



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

2001

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

DB 25819

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 décembre 2001

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

HENRI POINCARÉ-NANCY I

Mention "Sciences du Médicament"

Par

Séverine LECLERC

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

Métabolisme et Mécanisme d'Action des Médicaments

Pharmacologie Clinique

Sujet :

***GLUCURONOCONJUGAISON DANS LES ORGANES OLFACTIFS :
ROLES DANS LA PROTECTION DU CERVEAU ET DANS LE
METABOLISME DE MOLECULES ODORANTES ET DE MEDICAMENTS***

MEMBRES DU JURY

Juges :	Y. ARTUR	Professeur
	J. MAGDALOU	Docteur
	A. MINN	Docteur
	B. WALTHER	Docteur
Rapporteurs :	A. HOLLEY	Professeur
	M.H. SIESS	Docteur



Ce travail a été effectué au :

Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires

UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I

Faculté de médecine,

9 avenue de la Forêt de Haye, Vandoeuvre-les-Nancy.

Directeur : Professeur Patrick Netter

Sous la responsabilité du Docteur Alain Minn

Il a été réalisé en collaboration avec des chercheurs des laboratoires suivants :

➤ Laboratoire de Biochimie Pharmacologique

JE-MENRT 2180

Université de Bourgogne

Directeur : Professeur Yves Artur.

➤ Centre Européen des Sciences du goût (CESG)

CNRS-FRE 2049

Directeur : Professeur André Holley.

Ce travail a bénéficié du soutien financier :

- De la région Lorraine
- De l'Université Henri Poincaré Nancy I
- De l'Institut Danone, contrat Alimentation-Santé 1998 -2000
- Du Contrat Européen BIOMED CEEBMH4-CT37-2621

Nous remercions Monsieur le Professeur Patrick Netter pour son accueil au sein de son laboratoire. Nous lui exprimons notre sincère reconnaissance et notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Docteur Alain Minn de nous avoir accueillis dans son équipe, pour sa disponibilité et son soutien au long de ces années. Qu'il trouve ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre plus profond respect.

Nous remercions Monsieur le Docteur Jacques Magdalou pour ses précieux conseils, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et sa présence dans ce jury. Nous lui en sommes très reconnaissants et lui témoignons notre plus profonde considération.

Nous remercions Monsieur le Professeur André Holley et Madame le Docteur Marie-Hélène Siess qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail. Nous leur témoignons notre profond respect et toute notre gratitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur Yves Artur pour l'honneur qu'il nous fait de participer à ce jury. Nous lui témoignons notre sincère reconnaissance et notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Docteur Bernard Walther pour sa présence dans ce jury. Nous lui adressons notre sincère reconnaissance.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur Hervé Goudonnet, Monsieur Jean-Marie Heydel, les chercheurs du laboratoire de Biochimie Pharmacologiques de Dijon et Madame Martine Cattarelli avec qui nous avons partagé une collaboration fructueuse et enrichissante. Qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance.

Nous remercions Mademoiselle Stéphanie Etienne pour son aide technique en immunohistologie, Monsieur Michel Thiery pour ses bons soins aux animaux, Monsieur Ramon El Bachà, Madame Nicole Sabolovic pour son accueil chaleureux et l'ensemble du personnel du laboratoire.

Nous remercions enfin tous nos amis du laboratoire qui ont partagé notre quotidien pendant ces années. Nous avons passé avec eux de merveilleux moments.

A mes parents

A Florence et Florent

A Fabrice

A mes amis

Je dédie cette thèse

SOMMAIRE



INTRODUCTION	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. LE SYSTEME OLFACTIF.....	6
1.1. <i>La muqueuse olfactive</i>	8
1.1.1. Les neurones olfactifs	10
1.1.2. Les cellules de soutien	11
1.1.3. Les cellules basales.....	11
1.2. <i>L'organe voméronasal</i>	11
1.3. <i>Le système trigéminal</i>	12
1.4. <i>Les bulbes olfactifs</i>	13
1.5. <i>Le système nerveux central</i>	16
1.5.1. Les neurones	16
1.5.2. Les cellules endothéliales cérébrovasculaires	16
1.5.3. Les cellules gliales	17
1.5.3.1. Les astrocytes	17
1.5.3.2. Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann	20
1.5.3.3. Les cellules épendymaires	20
1.5.4. Traitement de l'information olfactive dans le système nerveux central.....	20
1.6. <i>Transmission du signal olfactif</i>	22
1.6.1. Les molécules odorantes.....	22
1.6.2. Activation des récepteurs et transduction du signal	23
1.6.3. Arrêt du signal olfactif	31
1.6.4. Troubles du système olfactif.....	33
1.7. <i>Pénétration des xénobiotiques dans le SNC</i>	34
1.7.1. La voie nasale	35
1.7.2. Autres voies de pénétration des xénobiotiques dans le SNC.....	36
1.7.2.1. La voie sanguine et la barrière hématoencéphalique.....	36
1.7.2.2. Le liquide céphalorachidien.....	37
2. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES.....	38
2.1. <i>Les enzymes de phase I</i>	39
2.1.1. Les monoamines oxydases A et B	39

2.1.2. Les cytochromes P450.....	40
2.1.3. Les monooxygénases à flavine	41
2.1.4. Les époxydes hydrolases	41
2.2. <i>Les enzymes de phase II</i>	41
2.2.1. Les UDP-glucuronosyltransférases	41
2.2.1.1. Nomenclature.....	41
2.2.1.2. Localisation des UGT	44
2.2.1.3. Réaction de glucuronoconjugaison.....	45
2.2.1.4. Fonctions des UGT.....	46
2.2.1.5. Répartition des UGT.....	47
a) UGT cérébrales.....	48
b) UGT olfactives	49
2.2.2. Les autres enzymes de phase II	49
2.2.2.1. Les glutathion S-transférases	49
2.2.2.2. Les méthyltransférases	50
a) Les catéchol O-méthyltransférases.....	51
b) Les N-méthyltransférases	51
c) Les thiol S-méthyltransférases.....	52
2.2.2.3. Les N-acétyltransférases	52
2.2.2.4. Les sulfotransférases.....	52
2.3. <i>La phase III</i>	53
3. LES MOLECULES ETUDIEES	55
3.1. <i>Les molécules odorantes</i>	55
3.2. <i>Les anti-inflammatoires non stéroïdiens</i>	58
3.3. <i>Les catéchols</i>	60
OBJECTIFS DU TRAVAIL	63
MATERIEL ET METHODES	66
1. MATERIEL	67
1.1. <i>Réactifs biochimiques</i>	67
1.2. <i>Réactifs de biologie cellulaire et moléculaire</i>	67
2. PREPARATION DES HOMOGENATS TISSULAIRES DE MUQUEUSE OLFACTIVE, BULBES OLFACTIFS, ET CERVEAU.....	68
3. ISOLEMENT DES MICROSOMES.....	69

3.1. Culture cellulaire d'astrocytes	69
3.2. Lignée V79-UGT2B1	71
3.3. Isolement des microsomes	71
4. DOSAGE DES PROTEINES	72
5. DOSAGE DES GLUCURONIDES	72
5.1. Chromatographie sur couche mince.....	72
5.2. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse	74
5.3. Fluorimétrie.....	75
6. IMMUNOHISTOCHIMIE.....	76
6.1. Préparation des coupes	77
6.2. Protocole	77
7. TRANSCRIPTION INVERSE- POLYMERASE EN CHAÎNE (RT-PCR).....	77
7.1. Extraction des ARNm.....	78
7.2. Etape de transcription inverse (RT)	79
7.3. Etape d'amplification (PCR).....	79
7.4. Détection et quantification	80
8. HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	80
8.1. Synthèse des sondes	81
8.1.1. Transformation de bactéries avec la séquence d'intérêt	81
8.1.2. Amplification du plasmide avec l'insert.....	82
8.1.3. Transcription in vitro	83
8.1.4. Dosage de la sonde	83
8.2. Hybridation <i>in situ</i>	84
8.3. Détection immunologique.....	84
RESULTATS	86
1. LES UGT DE LA MUQUEUSE OLFACTIVE, DES BULBES OLFACTIFS ET DU CERVEAU.....	87
1.1. Glucuronocouplage de molécules odorantes.....	87
1.2. Expression de l'UGT2A1.....	116
1.3. Activité de l'UGT1A6 dans les bulbes olfactifs et modifications en fonction de l'âge	127
2. COUPLAGE DE L'APOMORPHINE.....	134
3. COUPLAGE DES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS ET PRÉSENCE DES CYCLO-OXYGÉNASES	146

4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	150
4.1. Localisation de l'UGT1A6 dans la muqueuse olfactive par hybridation in situ	150
4.2. Activité de glucuronoconjugaison du 1-naphtol dans les microsomes d'astrocytes.....	151
4.3. Conjugaison des catéchols dans les microsomes d'astrocytes, et dans les homogénats de muqueuse olfactive, de bulbes olfactifs et de cerveau.....	152
DISCUSSION.....	155
1. ACTIVITE DE GLUCURONOCONJUGAISON ENVERS DES MOLECULES ODORANTES ET EXPRESSION DES ARNm DES ISOFORMES UGT2A1 ET UGT1A6	156
1.1. Activité de glucuronoconjugaison	156
1.2. Comparaison de l'activité de glucuronoconjugaison et de l'expression des transcrits d'UGT.....	157
1.3. Relation entre la glucuronoconjugaison et la fonction olfactive	157
1.4. Localisation des isoformes UGT2A1 et UGT1A6.....	158
2. GLUCURONOCONJUGAISON DU 1-NAPHTOL DANS LES BULBES OLFACTIFS ET DANS LES ASTROCYTES	159
2.1. L'isoforme UGT1A6	160
2.2. Glucuronoconjugaison cérébrale du 1-naphtol	160
3. GLUCURONOCONJUGAISON DE CATECHOLS	161
4. GLUCURONOCONJUGAISON D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS	164
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197



LISTE DES ABREVIATIONS

AINS	: anti-inflammatoire non stéroïdien
BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate
bFGF	: facteur de croissance des fibroblastes basique (« basic fibroblast growth factor »)
BHE	: barrière hématoencéphalique
BO	: bulbe olfactif
Butyl-PBD	: 2-(4-t-butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole
CCM	: chromatographie sur couche mince
CLHP	: chromatographie liquide haute performance
CO	: monoxyde de carbone
COMT	: catéchol <i>O</i> -méthyltransférase
COX	: cyclo-oxygénase
CYP	: cytochrome P450
DAB	: diaminobenzidine tetrachloride
DAG	: diacide glycérol
DMEM	: «Dulbelcco's modified Eagle's medium»
DMPC	: diméthylpyrocarbonate
DMSO	: diméthylsulfoxyde
EEG	: électroencéphalogramme
ERO	: entité réactive de l'oxygène
GC	: guanidine cyclase
GFAP	: protéine fibrillaire acide de la glie (« glial fibrillary acid protein »)
GRK	: « G-protein-coupled receptor kinase »
GSH	: glutathion
GST	: glutathion-transférase
Hépès	: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine ethane sulfonique
IP ₃	: inositol 1,4,5-triphosphate
IRM	: imagerie par résonance magnétique
IRMf	: imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
LCR	: liquide céphalorachidien
L-DOPA	: L-3,4-dihydroxyphenylalanine
MAO	: monoamine oxydase
MDR	: « multi-drug resistance »
MFO	: mono-oxygénase à flavine
MMLV	: « moloney murine leukemia virus »
MO	: muqueuse olfactive

MOAT	: transporteur multispécifique d'anions organiques
MPP ⁺	: N-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	: 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MRP	: protéine de résistance à plusieurs médicaments « multidrug resistance protein »
MRPc	: « canalicular multidrug resistance protein »
NBT	: p-nitroblue tetrazolium chloride
N-CAM	: molécule d'adhésion nerveuse (« nervous- cell adhesion molecule »)
NO	: oxyde nitrique
OATP	: transporteur polypeptidique d'anions organiques
OBP	: « odorant binding protein »
O-CAM	: molécule d'adhésion olfactive (« olfactory- cell adhesion molecule »)
PAPS	: 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PBS	: tampon phosphate (« phosphate buffer saline »)
PGH ₂	: prostaglandine H ₂
Pgp	: P-glycoprotéine
PIP ₂	: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	: protéine kinase A
PKC	: protéine kinase C
PKG	: protéine kinase G
PLC	: phospholipase C
PST	: phénol-sulfotransférase
RE	: réticulum endoplasmique
SNC	: système nerveux central
SVF	: sérum de veau fœtal
TEP	: tomographie à émission de positrons
UDPGA	: acide UDP-glucuronique
UGT	: UDP-glucuronosyltransférase



INTRODUCTION

L'odorat, un des sens fondamentaux du règne animal, intervient dans une multitude de comportements spécifiques. Il régule notamment la préférence alimentaire, le comportement social, et permet la reconnaissance des individus entre eux. La perception des odeurs est basée sur des mécanismes neuronaux complexes, d'une part la reconnaissance de l'odeur au niveau de l'épithélium olfactif et d'autre part son traitement neuronal.

Au début des années 1990, Lazard *et al.* ont montré la présence d'uridine-5'-diphosphoglucuronosyltransférases (UGT, EC 2.4.1.17) dans l'épithélium olfactif de bœuf et de rat. Ces enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments pourraient jouer un rôle dans la perception olfactive des molécules odorantes en modulant leur concentration au niveau de l'épithélium olfactif, et donc en intervenant dans l'interaction de ces molécules avec leurs récepteurs. L'étude de ces enzymes dans les organes olfactifs et le cerveau a plusieurs intérêts. D'une part, elle permet de mieux comprendre l'implication des enzymes métabolisant les xénobiotiques dans l'olfaction. D'autre part, la voie nasale est une voie alternative d'administration des médicaments. Cette voie est non invasive et permet le passage direct de certains médicaments dans le système nerveux central en évitant le métabolisme hépatique. Une meilleure connaissance du contrôle éventuel de cette voie par les enzymes du métabolisme des médicaments permettra de valider l'utilisation d'une voie d'administration de médicaments à action centrale par la muqueuse olfactive.

Le travail que nous présentons ici a consisté à étudier le rôle des UGT dans le système olfactif du rat, utilisé comme modèle animal. Nous avons, premièrement, identifié les UGT présentes dans la muqueuse olfactive (MO) par RT-PCR quantitative. Deuxièmement, nous avons localisé les ARNm des isoformes UGT2A1 et UGT1A6 dans la MO et les bulbes olfactifs (BO) par hybridation *in situ*. Enfin, les activités de glucuronoconjugaison envers de nombreux substrats (molécules odorantes, catéchols et anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)) a été étudiée, par chromatographie sur couche mince, dans des homogénats cellulaires de MO, de BO et de cerveau.

Bien que les activités de glucuronoconjugaison trouvées dans le cerveau soient faibles, elles ne sont pas négligeables. Par ailleurs, la toxicité ou l'efficacité de xénobiotiques se retrouvant dans le SNC peut être modulée par la glucuronoconjugaison cérébrale. Nous avons donc déterminé sur un modèle *in vitro*, l'astrocyte en culture, le métabolisme de catéchols qui sont des neurotransmetteurs ou des médicaments dopaminergiques, et d'AINS, molécules passant la barrière hématoencéphalique (BHE) par simple diffusion et pouvant pénétrer ainsi dans le système nerveux central.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Après avoir fait la description du système olfactif et expliqué la perception des odeurs, nous détaillerons le métabolisme des xénobiotiques en particulier celui des UGT et enfin nous présenterons les différentes familles de molécules étudiées.

1. LE SYSTEME OLFACTIF

L'odorat joue un rôle important pour la plupart des animaux parce qu'il leur permet de communiquer efficacement et d'interpréter les informations fournies par l'environnement (présence de nourriture, d'eau, de prédateur...). Chaque individu a une odeur particulière, déterminée génétiquement, et peut reconnaître un grand nombre d'odeurs différentes : le système olfactif de l'Homme peut en reconnaître environ 10 000. Ces odeurs déclenchent des réactions émotionnelles et cognitives variées. Deux régions sensorielles distinctes, la muqueuse olfactive et l'organe voméronasal, assurent la perception olfactive. Néanmoins, les signaux chimiques qu'ils perçoivent et les protéines impliquées dans la réception et la transduction du signal sont différents. De plus, les réseaux neuronaux pour chacun de ces deux organes sont indépendants et ne se projettent pas dans les mêmes régions du système nerveux central (SNC). Lors de la prise d'aliments, quatre saveurs seulement sont détectées, le salé, le sucré, l'amer et l'acide. Quand les aliments sont dans la bouche, des substances volatiles se dégagent du fait de l'élévation de température et du broyage lors de la mastication. Les odeurs passent dans le rhino-pharynx qui relie les cavités orales et nasales, et atteignent l'épithélium olfactif. Tout ce qui pénètre dans la bouche est perçu olfactivement. C'est ce qu'on appelle la rétro-olfaction (Brouard, 1992). Chez les mammifères, la détection des odeurs se fait dans la partie postérieure du nez où se trouve l'épithélium olfactif. Un signal électrique est alors transmis vers les bulbes olfactifs puis vers le cerveau (Figure 1).

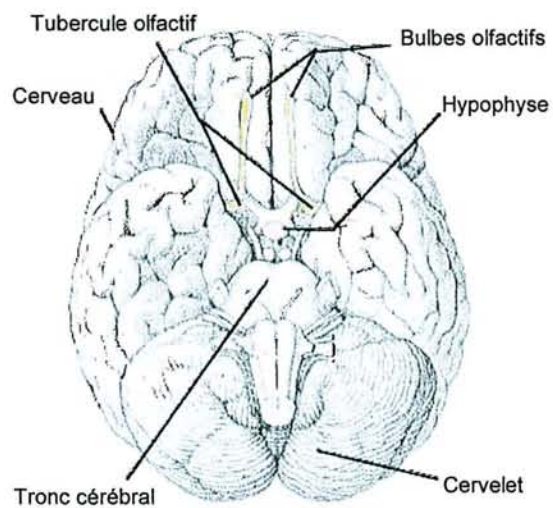
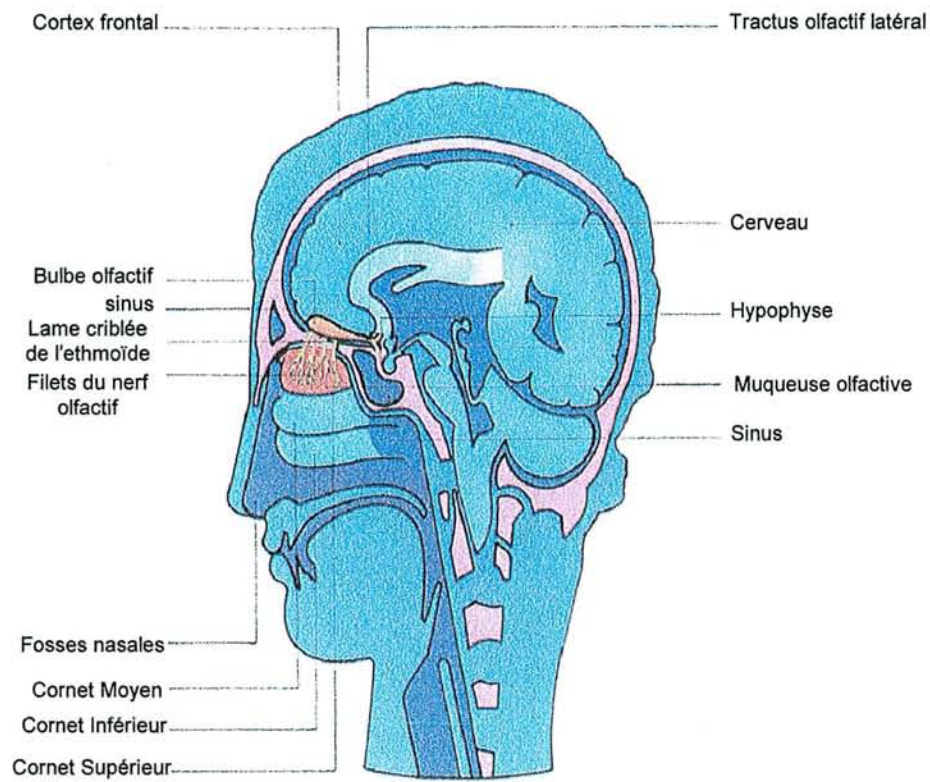


Figure 1: Le système olfactif de l'homme.

1.1. La muqueuse olfactive

La MO est le siège de la perception des molécules odorantes. Chez la majorité des vertébrés, l'organe qui abrite la muqueuse olfactive est pair. Chez le poisson, le dispositif est variable : il se trouve parfois dans des excroissances céphaliques ou protégé dans des cavités tubulaires organisées différemment et ouvertes vers l'extérieur par des narines parfois contractiles. L'anatomie est plus régulière chez les autres vertébrés. La cavité nasale s'ouvre vers l'environnement à l'avant par la narine et communique à l'arrière avec le carrefour nasopharyngien par le choane. Un plancher osseux constitué par la lame horizontale du palatin sépare la cavité nasale de la cavité buccale. Le septum nasal est une paroi médiane qui sépare les deux cavités nasales. Le nez est composé de structures cartilagineuses complexes appelées turbines ou conques. Les nasoturbines et les maxilloturbines, toutes les deux dans la partie antérieure du nez, sont couvertes de la muqueuse respiratoire. Les ethmoturbines, localisées postérieurement aux nasoturbines et maxilloturbines, sont recouvertes de la muqueuse olfactive. La MO occupe ainsi une partie de la cavité nasale, logée dans des sacs ou des chambres olfactifs, ou portée par des plis ou des enroulements osseux de forme et de nombres variables (les cornets) qui augmentent la surface d'échange avec l'air, ou l'eau chez les animaux aquatiques. La MO est recouverte d'une couche de mucus qu'elle sécrète, et comporte un épithélium olfactif et une sous-muqueuse, séparés par une lame basale (*lamina propria*). Chez les mammifères, elle se distingue de la muqueuse respiratoire par sa couleur jaune-brun due à des pigments différents (mélanine, caroténoïdes). Le territoire de la muqueuse olfactive est plus ou moins contourné et plus ou moins étendu selon les vertébrés. Ceux-ci ne sont pas égaux olfactivement. Chez l'homme, la cavité nasale renferme trois cornets étagés. La muqueuse olfactive est localisée sur le cornet supérieur, sur le toit de la cavité nasale et sur la face médiane du septum nasal qui fait face au cornet supérieur. Sa surface est d'environ 2 cm² (Figure 2). Chez le rat, les cornets sont repliés et contournés. La surface recouverte de muqueuse olfactive peut atteindre plusieurs dizaines de cm². La cavité subdivisée permet plusieurs trajets possibles à l'air inspiré.

L'épithélium olfactif est une forme modifiée de l'épithélium respiratoire, c'est un épithélium pseudo-stratifié composé de trois types de cellules : les neurones olfactifs, les cellules de soutien et les cellules basales (Holley et McLeod, 1977). Dans l'épithélium olfactif, on trouve plusieurs glandes qui sécrètent le mucus dont les glandes de Bowman. Les glandes de Bowman sont situées dans la sous-muqueuse et leurs conduits traversent l'épithélium olfactif pour s'ouvrir à la surface de celui-ci (Figure 2 et Figure 3). Le mucus se

présente comme un milieu aqueux à deux phases. La couche superficielle est très liquide et composée chez l'homme de 95 % d'eau, de glycoprotéines, d'immunoglobulines et de sels organiques. La couche inférieure est plus visqueuse. Le mucus olfactif semble remplir plusieurs fonctions dont un rôle dans la défense immunitaire due à la présence d'immunoglobulines (Getchell *et al.*, 1991). Il peut capter des microparticules présentes dans l'air inspiré puis les éliminer par écoulement (Merkus *et al.*, 1998). Le mucus humecte la face externe de la membrane olfactive et constitue une barrière hydrophile pour les substances odorantes dont la plupart sont hydrophobes. Plusieurs types de protéines, en particulier les « odorant binding proteins » ou OBP et l'olfactomédine, ont été détectés dans le mucus. Les OBP, protéines qui se lient aux molécules odorantes, prendraient en charge ces molécules pour les présenter aux récepteurs olfactifs. Mais les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ces processus restent théoriques. L'olfactomédine est une protéine qui a une analogie de séquence avec la molécule d'adhésion nerveuse, N-CAM, et pourrait ainsi contribuer au développement des neurones olfactifs (Yokoe et Anholt, 1993).

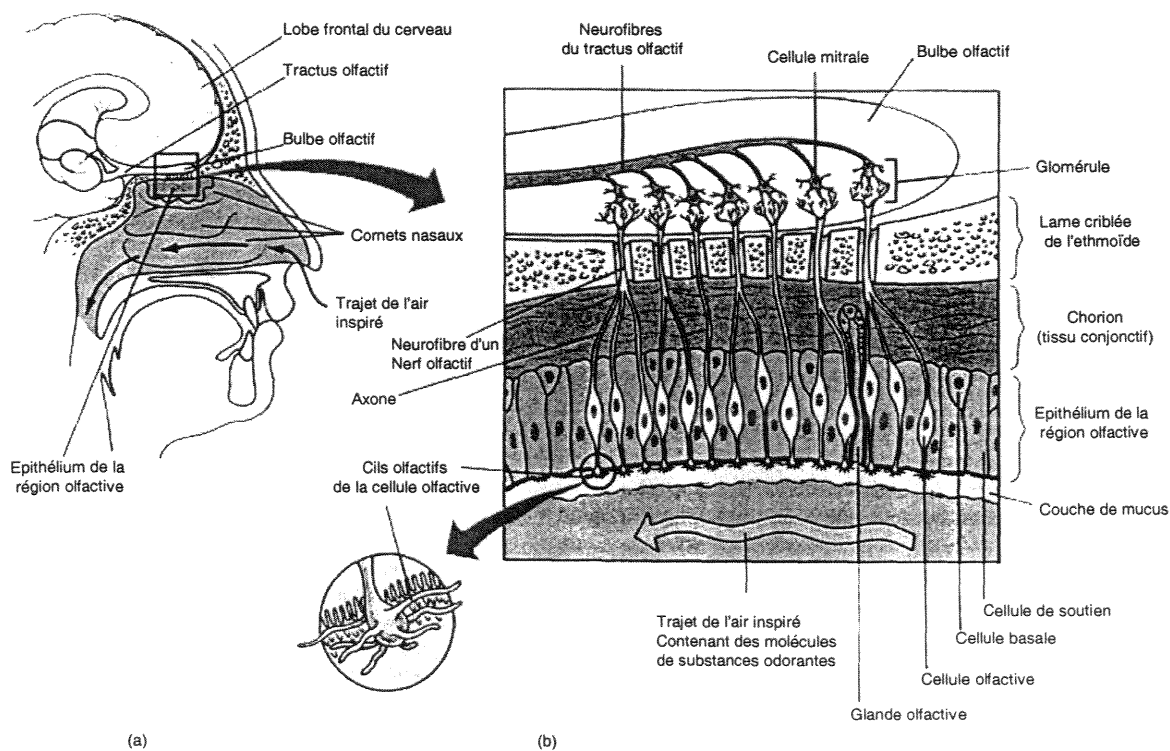


Figure 2 : Structure de la muqueuse olfactive. (a) situation de l'épithélium de la région olfactive dans la partie supérieure de la cavité nasale ; (b) agrandissement montrant la composition cellulaire de l'épithélium de la région olfactive et le trajet des neurofibres du nerf olfactif à travers la lame criblée de l'éthmoïde, jusqu'à leurs synapses dans le bulbe olfactif sus-jacent.

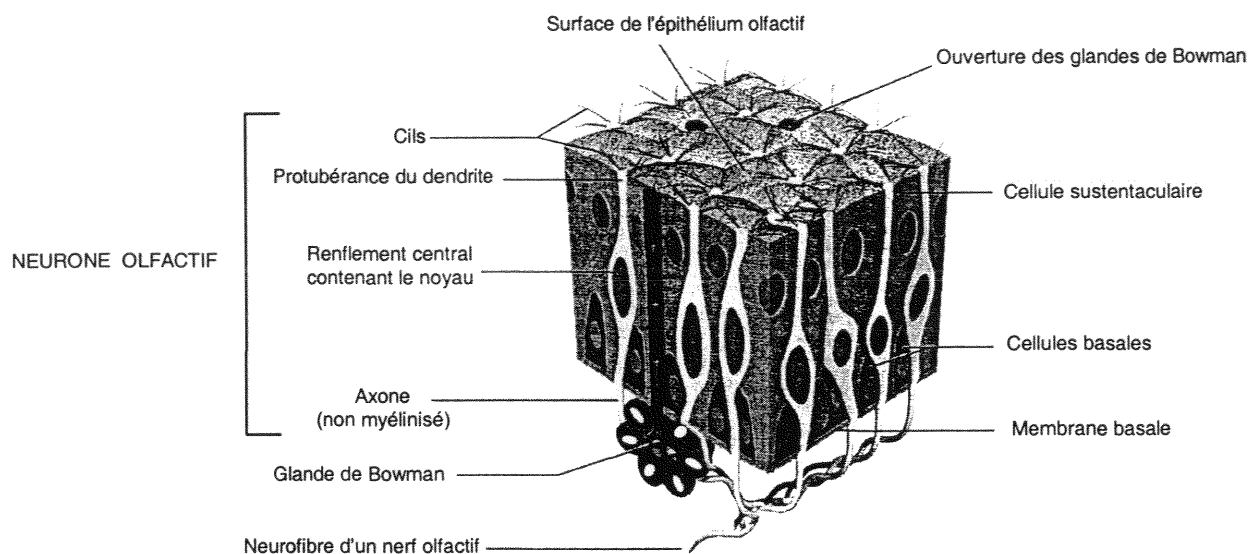


Figure 3 : Représentation de la muqueuse olfactive

1.1.1. Les neurones olfactifs

Les cellules olfactives sont des neurones bipolaires qui sont en connexion directe avec l'extérieur de l'organisme et le cerveau. A l'extrémité de chacun des neurones, au niveau de la surface apicale libre, les dendrites se terminent par des cils possédant des récepteurs olfactifs. Ces cils essentiellement immobiles chez les mammifères baignent entièrement dans le mucus. Leur nombre et leur taille varient selon les espèces. La présence de cils augmente la surface réceptrice facilitant ainsi le contact des molécules odorantes se trouvant dans l'air avec les neurorécepteurs (Marieb, 1993). Les axones fins non myélinisés qui partent des corps cellulaires des neurones olfactifs traversent la sous-muqueuse. Ils se regroupent alors par dizaines et sont fasciculés par des cellules engainantes. Cette myéline olfactive est particulière. Elle rassemble les caractéristiques immunocytochimiques des cellules astrocytaires et des cellules de Schwann puisqu'elle exprime la protéine fibrillaire acide de la glie (GFAP) typique des astrocytes et la protéine S-100 spécifique des cellules de Schwann (Barber et Dahl, 1987 ; Barber et Lindsay, 1982). Les faisceaux axonaux non myélinisés traversent la lame criblée de l'ethmoïde. Ils constituent le nerf olfactif et atteignent les glomérules du bulbe olfactif sans se ramifier (Holley et McLeod, 1977). Les neurones olfactifs transmettent ainsi leur message aux neurones de second ordre dont les corps cellulaires sont situés dans le bulbe olfactif. Les neurones de la MO sont les seuls en contact direct avec l'extérieur de l'organisme. Leur durée de demi-vie est d'environ 20 jours. Ils entrent alors spontanément en apoptose par un processus encore mal connu et sont les seuls

neurones avec ceux des BO capables de se régénérer à partir de cellules basales (Deckner *et al.*, 1997 ; Kato *et al.*, 2001). Le processus d'apoptose permet de maintenir un équilibre entre la prolifération et la mort neuronale (Jourdan *et al.*, 1997 ; Jones et Rog, 1998). Ces cellules subissent l'apoptose à tous les stades de différenciation : précurseur neuronal, neurone olfactif immature ou mature (Holcomb *et al.*, 1996).

1.1.2. Les cellules de soutien

Les cellules de soutien ou cellules sustentaculaires forment de minces colonnes qui s'étendent de la surface à la lame basale sur laquelle elles reposent. Leur surface apicale porte des microvillosités et certains portent des cils mobiles favorisant la circulation du mucus (Holley et Mc Leod, 1977). Elles sont moins nombreuses que les neurones olfactifs. Leur fonction est mal comprise mais ces cellules semblent servir de support mécanique aux cellules réceptrices, elles les maintiennent les unes contre les autres. Elles contribuent aussi à la régulation de l'environnement des neurones olfactifs.

1.1.3. Les cellules basales

Les cellules basales sont petites, coniques et situées dans la partie profonde de l'épithélium olfactif. Deux types cellulaires sont distingués par leurs caractéristiques morphologiques et topographiques : les cellules horizontales et les cellules globulaires. Les cellules horizontales sont en contact avec la lame basale alors que les cellules globulaires sont plus volumineuses et plus superficielles. Ces cellules basales génèrent des neurones olfactifs qui remplacent ceux qui sont détruits. Chez la souris, la durée de vie d'un neurone olfactif est de l'ordre de 30 à 90 jours (Mackay-Sim et Kittel, 1991).

1.2. L'organe voméronasal

L'organe voméronasal est un organe chémorécepteur enfermé dans une capsule cartilagineuse. Il s'ouvre par une conduite à la base de la cavité nasale et, est séparé de l'épithélium olfactif principal. Cet organe est spécialisé dans la détection des phéromones. Les phéromones sont un type d'hormone servant à la communication entre membres d'une même espèce. C'est un signal chimique spécifique produit par un animal, qui constitue un message qui va induire des comportements particuliers, chez d'autres animaux de la même

espèce, en relation avec la défense du territoire, le comportement social, et surtout l'accouplement et la reproduction. Chez l'homme, les phéromones ont un rôle moins important que chez les animaux car l'organe voméronasal est très peu développé. Cette communication hormonale produit des comportements programmés génétiquement, les hormones jouant un rôle dans la sexualité étant la prolactine, le lutibérine, et la progestérone.

Les neurones sensoriels de l'organe voméronasal sont bipolaires comme ceux de l'épithélium olfactif principal mais l'information sensorielle prend une voie différente de celle générée dans celui-ci. Les neurones de l'organe voméronasal envoient leur axone vers le bulbe olfactif accessoire qui envoie à son tour des projections vers l'amygdale et l'hypothalamus. Les aires de l'hypothalamus activées régulent les comportements de reproduction, de défense ainsi que les sécrétions neuroendocrines. L'activation de l'organe voméronasal va donc modifier les comportements sociaux et/ou sexuels et aussi les changements neuroendocriniens (Keverne, 1999 ; Brennan, 2000). Deux études montrent l'importance des phéromones sur notre comportement sexuel. Une première expérience a été menée sur un groupe de femmes à qui l'on a demandé de s'asseoir sur le siège de leur choix dans une salle d'attente. Au préalable, l'un de ces sièges avait été pulvérisé de phéromones mâles, et l'autre, de phéromones femelles. La grande majorité des femmes a instinctivement préféré le siège pulvérisé avec les phéromones mâles et évité très nettement le siège pulvérisé avec les phéromones femelles. La deuxième étude a montré que les femmes « synchronisent », après un moment d'adaptation, leur menstruation quand elles se trouvent dans le cadre d'une collectivité féminine comme un couvent ou lorsqu'elles partagent le même logement. Les chercheurs ont démontré que des phéromones sécrétées par des glandes situées dans les aisselles provoquaient un changement systématique de l'ovulation et du moment des règles de celles exposées à ces substances (Stern et Mc Clintock, 1998).

1.3. Le système trigéminal

La plupart des odeurs ont la potentialité de stimuler directement ou indirectement les fibres nerveuses du nerf trigéminal localisé à l'intérieur du vestibule nasal. Ces odeurs vont produire une sensation d'irritation, de chatouillement, de brûlure, de chaud, de froid ou de picotement. Les stimuli vont être traités dans le thalamus et le cortex somatosensoriel. Le système trigéminal et olfactif interagissent au niveau du SNC (Savic, 2001). De plus, il a été

suggéré que le système trigéminal puisse moduler l'activité des neurones olfactifs par un réflexe d'axone local impliquant la libération de substance P (Bouvet *et al.*, 1987)

1.4. Les bulbes olfactifs

Les bulbes olfactifs sont au nombre de deux chez les mammifères et se situent en avant du cerveau. Le BO a une structure laminaire de symétrie sphérique (Figure 4). Il contient des deutoneurones (cellules mitrales et cellules à panache), des interneurones (cellules périglomérulaires, cellules granulaires et cellules à axone court) et des axones d'origine extra-bulbaire.

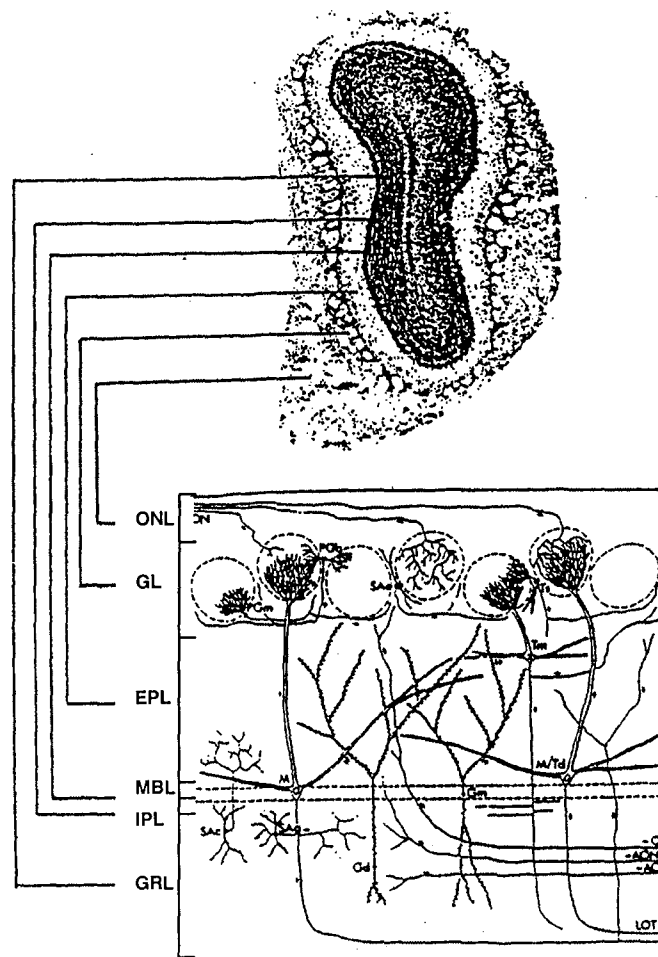


Figure 4 : Anatomie du bulbe olfactif de rongeur. ONL : couche du nerf olfactif ; GL : couche glomérulaire ; EPL : couche plexiforme externe ; MBL : couche de cellules mitrales ; IPL : couche plexiforme interne ; GRL : couche granulaire.

Les axones des neurones olfactifs atteignent les BO en traversant la paroi criblée de l'ethmoïde. La projection des neurones olfactifs sur les BO est ipsilatérale et suit une organisation topographique. Une partition suivant les axes dorso-ventral et médio-latéral a été décrite dans l'épithélium olfactif du rongeur (Astic et Saucier, 1986 ; Schoenfeld et al., 1994). Cette partition en quatre zones est conservée dans le BO et les projections axonales des neurones olfactifs se font respectivement de zone à zone. Cette projection régiono-régionale de l'épithélium au BO a été confirmée par immunohistochimie en utilisant un anticorps dirigé contre la molécule d'adhésion cellulaire olfactive, O-CAM (Yoshihara et Mori, 1997) (Figure 5).

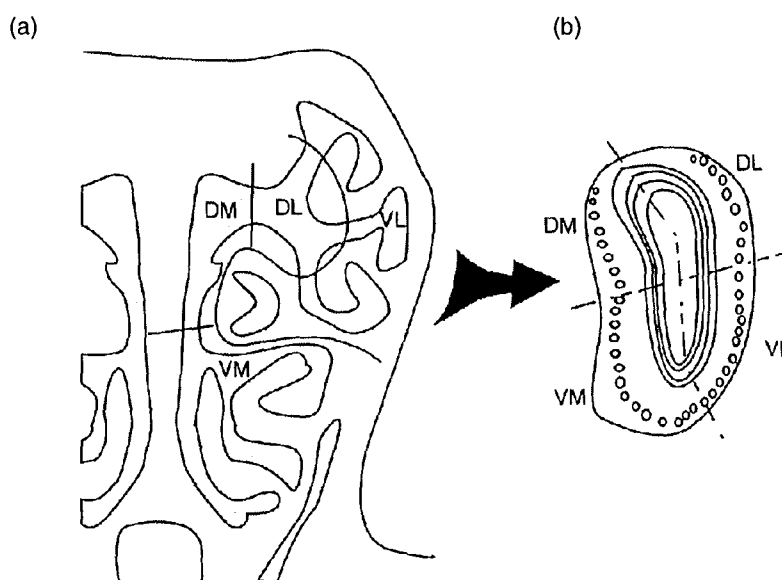


Figure 5 : Organisation topographique et projection régiono-régionale de l'épithélium olfactif vers les bulbes olfactifs. (a), coupe coronale d'un épithélium olfactif ; (b), coupe coronale du bulbe olfactif. Le schéma montre la partition de l'épithélium olfactif en quatre zones suivant les axes dorso-ventral et médio-latéral. La projection vers le bulbe des axones des neurones récepteurs olfactifs s'effectue de zone à zone. DL : dorso-latéral ; DM : dorso-médian ; VM : ventro-médian ; VL : ventro-latéral . D'après Schoenfeld et al., 1994.

Les connexions synaptiques épithélio-bulbaires s'effectuent dans une région du bulbe appelée glomérule. Chez le rongeur, il a été dénombré environ 2000 glomérules bien individualisés (Shepherd, 1994). L'organisation de l'entrée des axones des neurones olfactifs dans les glomérules implique une convergence de ces axones. La couche la plus superficielle du BO est formée par les fibres des neurones olfactifs qui se dirigent vers leur point de pénétration dans les glomérules. La couche glomérulaire se localise immédiatement en dessous de cette couche. Les glomérules sont entourés par les corps cellulaires de petits interneurones, les cellules périglomérulaires, dont le tronc dendritique pénètre dans le

glomérule et dont l'axone s'étend latéralement vers les glomérules voisins. La région périglomérulaire contient également des cellules à axone court dites superficielles. La couche plexiforme externe est traversée par les dendrites primaires des cellules mitrales qui se dirigent vers la couche glomérulaire et contient entièrement les dendrites secondaires de ces mêmes cellules. C'est dans cette couche que s'effectuent les interactions synaptiques entre les deutoneurones et les cellules granulaires sous la forme de synapse dendro-dendritiques. Elle renferme également les corps cellulaires des cellules à panache. La couche des cellules mitrales est mince et bien individualisée chez les vertébrés supérieurs. Immédiatement en dessous des somas des cellules mitrales se trouve la couche plexiforme interne. Elle est traversée par les dendrites des cellules granulaires, les axones des deutoneurones et par les fibres à direction tangentielle. La couche des cellules granulaires contient les corps cellulaires des interneurones bulbaires, les cellules granulaires disposées en strates ainsi que des cellules à axone court dites profondes. Enfin, une couche périventriculaire limite le ventricule olfactif. Les axones des cellules mitrales et une partie au moins des cellules à panache prennent alors une direction caudale pour former le tractus olfactif latéral. Les fibres nerveuses olfactives vont se projeter directement dans les zones primitives du cortex cérébral. Ces zones sont regroupées sous le nom de cortex olfactif. Chacune des couches décrites est homogène dans toute son étendue (Holley et McLeod, 1977) (Figures 4 et 6).

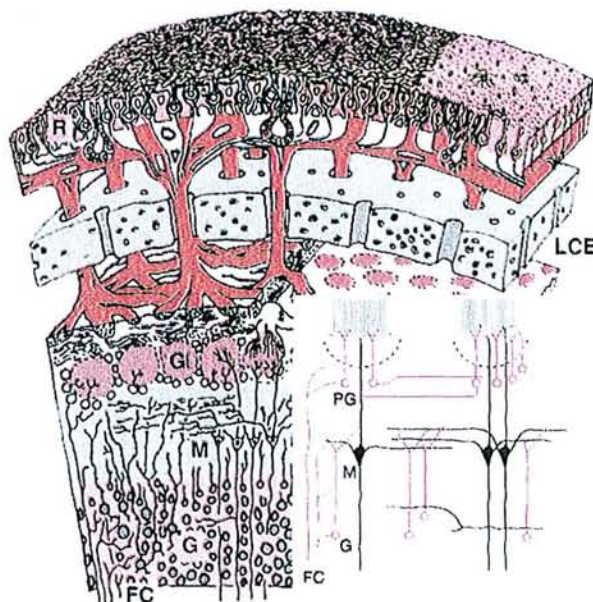


Figure 6: Relation entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif et organisation interne du bulbe. R : récepteurs ; LCE : lame criblée de l'éthmoïde ; GI : glomérules ; M : cellules mitrales ; PG : interneurones périglomérulaires ; G : cellules granulaires ; FC : fibres nerveuses centrifuges.

1.5. Le système nerveux central

Le SNC, centre d'interprétation et d'intégration des échanges sensoriels entre l'organisme et l'environnement, est composé de trois principales familles de cellules : les neurones, les cellules endothéliales et les cellules gliales.

1.5.1. Les neurones

Les neurones sont les cellules excitables du SNC et d'organes sensoriels comme la MO. Ils génèrent et transmettent des informations sous forme de potentiels d'action. Cette propriété est due à la présence de système de synthèse et de libération de neurotransmetteurs, à la présence de récepteurs, à l'ouverture de canaux ioniques et à l'activation de nombreux messagers secondaires. Les neurones du SNC ne se régénèrent généralement pas lorsqu'ils sont détruits. Ils sont alors remplacés par les astrocytes qui entrent en phase de prolifération.

1.5.2. Les cellules endothéliales cérébrovasculaires

Les cellules endothéliales cérébrovasculaires participent à la constitution de la barrière hématoencéphalique (BHE). Elles sont soudées entre elles par des jonctions serrées contrairement aux cellules des autres capillaires sanguins, et forment ainsi une barrière physique qui régule et contrôle les échanges entre le sang circulant et l'espace extracellulaire (Figure 7). Ces cellules possèdent des propriétés sélectives et restrictives de perméabilité, des activités enzymatiques capables de métaboliser les précurseurs directs des neurotransmetteurs ainsi que des systèmes de transport actif très efficaces, responsables de la résistance à de nombreux médicaments (« multidrug resistance »).

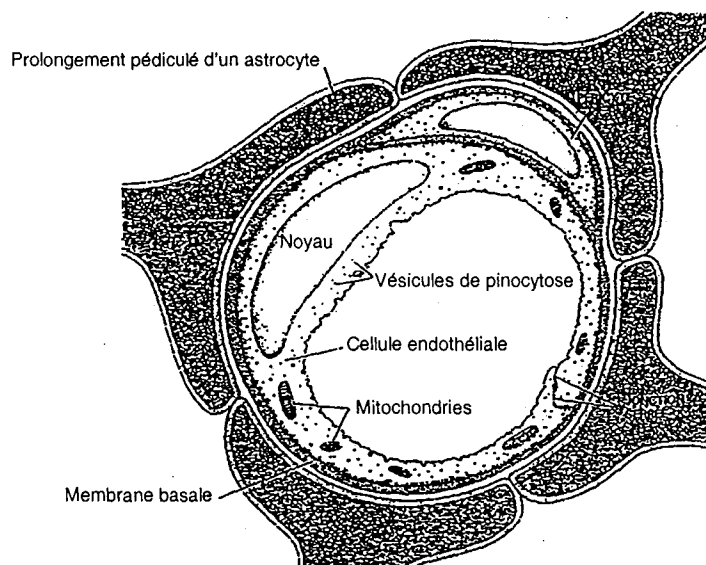


Figure 7 : Représentation d'une cellule endothéliale cérébrale, d'après Goldstein et Betz (1986).

1.5.3. Les cellules gliales

Les cellules gliales sont, dans le SNC, environ deux fois plus nombreuses que les neurones. Elles occupent l'espace laissé libre entre les neurones et leurs prolongements, et s'interposent entre les cellules nerveuses et les vaisseaux sanguins. Les cellules gliales sont divisées en deux groupes : la microglie et la macroglie. Les cellules de la microglie sont activées en réponse à une agression, une infection ou une maladie du SNC. Elles joueraient un rôle immunitaire pour le cerveau. Astrocytes, oligodendrocytes, cellules de Schwann et cellules épendymaires sont les principaux éléments cellulaires de la macroglie. Ces cellules participent au développement, au fonctionnement et à la réponse aux agressions du système nerveux. Les cellules gliales, en particulier les astrocytes, jouent un rôle nutritionnel, fonctionnel et protecteur envers les neurones en métabolisant les xénobiotiques et en les protégeant contre le stress oxydant (Wilson, 1997). Elles ont la plus forte activité métabolique envers les xénobiotiques des trois types cellulaires cérébraux (Suleman *et al.*, 1998), ce qui explique le choix de ces cellules pour les études de caractérisation de la glucuronoconjugaison cérébrale.

1.5.3.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont présents dans l'ensemble du SNC. Ce sont des cellules étoilées envoyant de fins prolongements, souvent terminés par des parties élargies en contact avec de nombreux éléments cellulaires dont les neurones et les cellules endothéliales des capillaires

sanguins (Figure 8). La principale caractéristique ultrastructurale des astrocytes est la présence de gliofilaments et de grains de glycogène dans le cytoplasme de leurs somas et de leurs prolongements. Les gliofilaments sont composés d'une protéine spécifique des astrocytes : la protéine fibrillaire acide de la glie (GFAP). Cette protéine permet l'identification des astrocytes par immunohistochimie.

Il existe deux principaux types d'astrocytes, soit impliqués dans les contacts du parenchyme nerveux avec le milieu extérieur (type I), soit jouant un rôle dans la transmission des influx nerveux (type II).

Les astrocytes de type I constituent la frontière entre le parenchyme nerveux et son environnement, construisant ce qu'on appelle la glie limitante (*glia limitans*) en rapport avec les méninges et entourant tous les espaces périvasculaires. A ce niveau frontière, les "pieds astrocytaires" sont jointifs, formant un étui continu entourant complètement les capillaires (Figure 9). Leur face externe est recouverte d'une lame basale qu'ils produisent

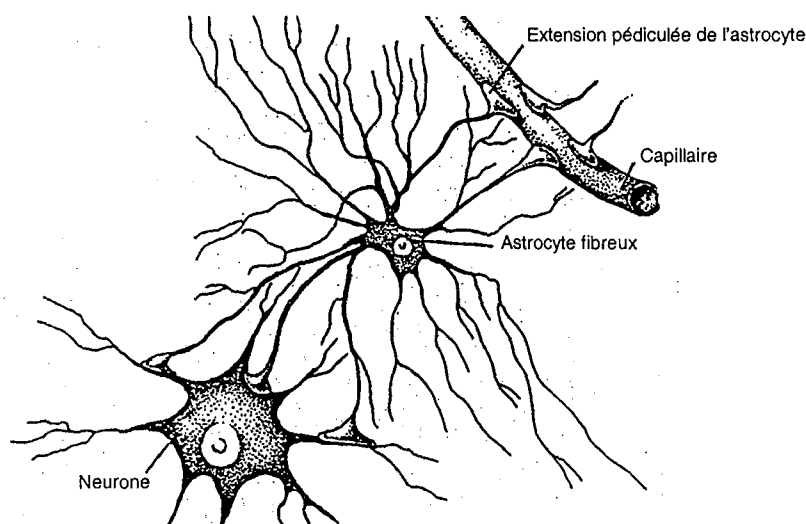


Figure 8 : Représentation d'un astrocyte dans son environnement.

Les astrocytes jouent un rôle de protection des neurones. La séparation entre le SNC et le milieu extérieur (sang) est stricte, mais la frontière n'est pas étanche. Il est donc probable que les astrocytes seraient impliqués à ce niveau dans des fonctions d'échanges très sélectives (Peschanski *et al.*, 1992). Les pieds astrocytaires participent, surtout sur l'aspect métabolique, à la fonction de BHE constituées par les cellules endothéliales (El Bachà et Minn, 1999). Enfin, les astrocytes assurent le développement ainsi que le maintien de plusieurs caractères

phénotypiques des cellules endothéliales cérébrales en leur fournissant divers facteurs de croissance ou de différenciation (Hammond et Tritsh, 1990 ; Abbruscato et Davis, 1999).

Les astrocytes de type II entrent en contact direct avec les neurones, soit au niveau de la membrane somato-dendritique, soit au niveau des nœuds de Ranvier. Ils jouent un rôle dans le processus de myélinisation. De plus, ils semblent intervenir dans la régulation de la composition du milieu extracellulaire, et ainsi seraient impliqués dans la régulation de la transduction des messages (Peschanski *et al.*, 1992). En effet, les astrocytes coopèrent avec les neurones au niveau des synapses chimiques en éliminant les neurotransmetteurs de la fente synaptique. Lorsque ces neurotransmetteurs sont captés, ils sont soit dégradés dans le cytoplasme, soit relargués dans la fente synaptique (Hammond et Tritsh, 1990).

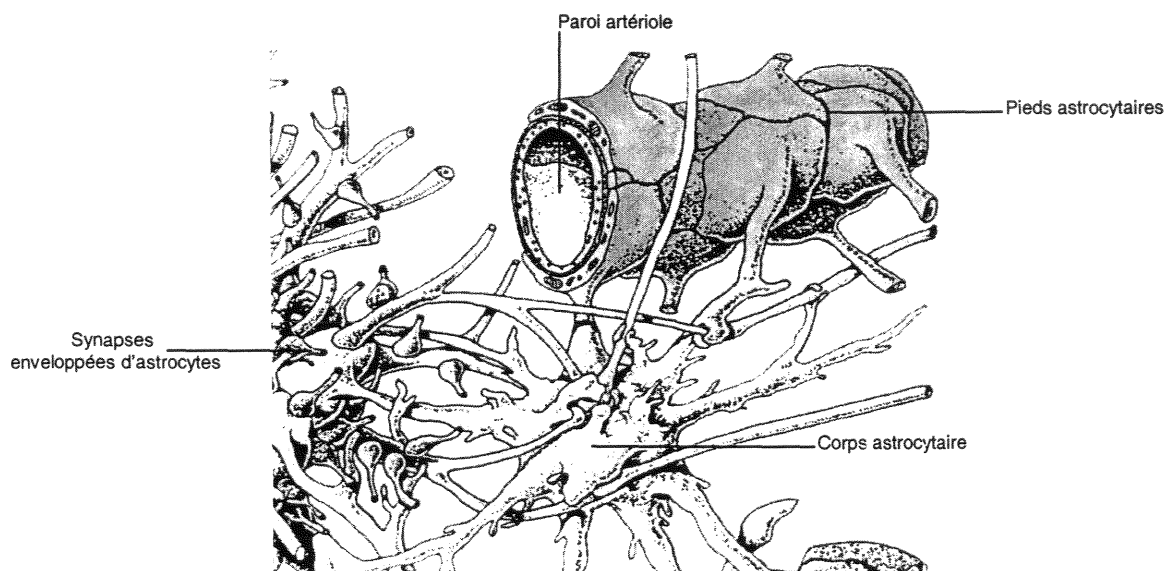


Figure 9 : Représentation spatiale des relations entre astrocyte, capillaire et neurone. 1 : pieds astrocytaires ; 2 : paroi artériole ; 3 : corps astrocytaire ; 4 : synapse enveloppées d'astrocytes.

Les astrocytes jouent un rôle encore mal connu dans la réponse du parenchyme nerveux aux agressions. Schématiquement, si des neurones sont détruits lors d'une agression ou lors du vieillissement cérébral, les astrocytes prolifèrent pour prendre leur place (Mandell *et al.*, 2001). A ce moment, les astrocytes subissent une transformation phénotypique dont les principales caractéristiques sont une croissance considérable des prolongements et la production de gliofilaments (Peschanski *et al.*, 1992).

1.5.3.2. Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann

Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann sont responsables, respectivement, de l'environnement axonal dans le SNC et dans les nerfs périphériques. Les oligodendrocytes fournissent aux neurones certains éléments nécessaires à leur métabolisme. Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann participent à la transmission des influx en formant les gaines de myéline autour des plus gros axones. Ces cellules jouent également un rôle dans les réponses du système nerveux à une lésion axonale. Les nerfs périphériques coupés peuvent, dans certaines limites, repousser et ré-innervier les zones désafférentées, ce n'est pas le cas dans le SNC. Cette régénération axonale semble due, non pas aux propriétés spécifiques des neurones, mais aux environnements différents créés par les oligodendrocytes ou par les cellules de Schwann. Les oligodendrocytes matures empêchent la repousse axonale alors que les cellules de Schwann la favorisent (Peschanski *et al.*, 1992).

1.5.3.3. Les cellules épendymaires

Ces cellules tapissent les ventricules cérébraux et le canal central de la moelle épinière. Dans ces cavités, elles forment un épithélium continu et hétérogène parce qu'elles sont de plusieurs types. Les deux grands types de cellules épendymaires sont celles des plexus choroïdes et les cellules épendymaires extrachoroïdiennes qui comprennent les cellules épendymaires ciliées et les tanocytes. Les cellules épendymaires ont en commun une polarité bien définie : un côté apical ou luminal en contact avec le liquide céphalorachidien (LCR) où se situe des cils ou des microvillosités selon le type de cellule, et un côté basal ou subépendymal qui repose sur une lame basale. Les cellules épendymaires sont unies les unes aux autres par des complexes jonctionnels situés du côté de leur pôle apical. Les jonctions assurent la cohésion de l'ensemble de l'épendyme. Les cellules épendymaires contrôlent et permettent le passage de substances du liquide céphalorachidien dans le tissu nerveux.

1.5.4. Traitement de l'information olfactive dans le système nerveux central

Les voies nerveuses olfactives qui partent du récepteur périphérique situé dans l'épithélium olfactif jusqu'au cortex frontal sont courtes et pratiquement directes. La perception olfactive peut être différente suivant les odeurs, les sujets et les méthodes utilisées dans les mesures. Deux valeurs de seuils sont reconnues : le seuil de détection et le seuil de reconnaissance. Le seuil de détection correspond à la sensibilité olfactive : le sujet signale la

présence de l'odeur mais ne l'identifie pas. Le seuil de reconnaissance est plus élevé : les qualités du stimulus sont perceptibles et le sujet peut identifier l'odeur. Dans ce cas, le traitement cognitif des odeurs se trouve associé à de nombreux autres systèmes (émotion, mémoire, langage...).

Un certain nombre d'études examine les modifications électroencéphalographiques induites par des stimulations odorantes chez l'homme. L'étude de Moncrieff (1962) est l'approche la plus basique pour l'application des techniques électroencéphalographiques. Il enregistre les électroencéphalogrammes (EEG) à l'aide d'électrodes placées de façon bilatérale sur des sujets à qui il présente différentes odeurs. Les études suivantes dérivent de celle de Moncrieff mais le nombre d'électrodes augmente, ce qui permet une meilleure précision des mesures (Martin, 1998 ; Lorig, 2000).

Les développements de l'imagerie cérébrale permettent désormais de repérer les zones du cerveau qui s'activent quand un sujet sent une odeur. Les techniques d'imagerie cérébrale, en particulier la tomographie à émission de positrons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), sont de plus en plus utilisées dans l'étude des processus olfactifs. Les résultats des travaux publiés montrent la complexité des structures impliquées dans les processus liés au traitement de l'information olfactive. La TEP mesure les changements du flux sanguin cérébral régional par la technique de bolus en $H_2^{15}O$. Comme le flux sanguin cérébral augmente avec l'activation neuronale, ce flux permet d'obtenir un index des changements dynamiques de l'activité neuronale. La TEP permet une excellente visualisation de l'activité dans le lobe frontal et dans le lobe temporal central. Les études de TEP suggèrent que les différentes subrégions olfactives sensibles du cortex orbitofrontal doivent avoir différentes fonctions. Par exemple, le cortex orbitofrontal central droit semble jouer un rôle dans la mémoire au niveau de la reconnaissance. Dans deux études séparées de TEP, le cortex orbitofrontal central droit est activé quand on demande aux sujets de juger des molécules odorantes familières. Par contre, le cortex orbitofrontal central gauche doit être impliqué dans les jugements hédoniques (par exemple odeurs plaisantes et déplaisantes) (Zald et Pardo, 2000 ; Royet *et al.*, 2001). La structure anatomique d'un cerveau humain vivant peut être visualisée en utilisant l'IRM et en particulier l'IRM fonctionnelle (IRMf). L'IRMf relate les changements, dans le cerveau, de la quantité d'hémoglobine oxygénée. Ces changements accompagnent la stimulation sensorielle ou les changements neuronaux lors des états cognitifs. L'IRMf a plusieurs avantages par rapport à la TEP : elle est plus accessible, moins coûteuse et surtout ne nécessite pas une exposition aux radiations. L'IRMf a aussi quelques

inconvenients comme la possibilité de nombreux artefacts au niveau des régions temporales et frontales du cerveau qui empêchent les mesures (Zald et Pardo, 2000). Kobal et Kettenmann (2000) ont réalisé une étude par IRMf de cerveaux totaux en délivrant à des sujets de la vanilline par bolus dans une narine. Les mesures d'IRMf montrent une activation significative du gyrus orbitofrontal, du rectus gyrus, du lobe temporal, de la région frontale latérale et de la région frontale médiane. Des différences entre l'activation des hémisphères gauche et droit ont été observées, les auteurs trouvant un plus fort pourcentage de pixels activés dans l'hémisphère droit pour les lobes temporal et frontal latéral.

Les études sur des sujets présentant des lésions au niveau des aires de traitement de l'information olfactive (épilepsie, lésions cérébrales...) permettent de mieux comprendre les zones impliquées dans la détection des odeurs. Les résultats de ces études sont néanmoins souvent contradictoires même si quelques convergences apparaissent. En effet, il semble que si les deux hémisphères sont impliqués dans les processus olfactifs, il est probable que l'un est prédominant par rapport à l'autre. De nombreuses études suggèrent que l'hémisphère droit ait un rôle plus important dans le traitement de l'information olfactive mais la dominance n'est pas clairement établie.

1.6. Transmission du signal olfactif

1.6.1. Les molécules odorantes

Une molécule odorante est une petite molécule dont la masse moléculaire est généralement inférieure à 200 grammes par mole. Celles qui ont une masse moléculaire supérieure à 300 grammes par mole sont plutôt rares. Une molécule est odorante si elle peut activer les récepteurs olfactifs, recouverts de mucus. Il faut donc que ces molécules soient solubles dans celui-ci, mais la plupart des molécules odorantes sont hydrophobes. Pour pallier ce problème, ils existent des protéines, les OBP, qui permettent aux molécules odorantes de traverser le mucus. Les molécules odorantes ont des structures très variées et appartiennent à six groupes différents d'un point de vue chimique :

- Les composés aliphatiques
- Les terpènes acycliques
- Les terpènes cycliques
- Les phénols et leurs dérivés

- Les hétérocycles oxygénés et sulfurés
- Les hétérocycles azotés et sulfurés

De nombreux dérivés du benzène sont des composantes de parfums, par exemple les composants des odeurs de cannelle, de miel, de rose... Les cycles benzéniques (ou aromatiques) substitués présentent des odeurs de vanille ou de clou de girofle par exemple. Les molécules approximativement sphériques sont des odeurs camphrées. L'ail se caractérise par la présence de substances soufrées originales (l'alliine ou sulfoxyde d'allylcystéine), responsables de son odeur et de sa saveur typées.

Une propriété générale des molécules organiques est leur chiralité. Très souvent, les deux formes, images l'une de l'autre dans un miroir, se distinguent par leur odeur. Le limonène gauche a une odeur de citron alors que le limonène droit a une odeur de mandarine. Cette odeur différente s'explique par le processus olfactif. Les interactions entre les molécules odorantes et les récepteurs qui caractérisent les réactions chimiques sont de faible énergie (force de van der Waals, interactions hydrophobes) et sont stéréospécifiques. L'odeur n'est donc pas systématiquement déterminée par les fonctions chimiques d'une molécule. Le stimulus provient d'une combinaison stérique particulière entre le récepteur et la molécule odorante. La forme des molécules joue donc un rôle dans la perception des différentes odeurs perçues.

1.6.2. Activation des récepteurs et transduction du signal

Chez les mammifères, la détection initiale des odeurs se fait dans l'épithélium olfactif qui tapisse les fosses nasales. La membrane des cils des neurones olfactifs contient des récepteurs capables de générer un potentiel d'action après liaison d'une molécule odorante. Les cils olfactifs baignent dans le mucus que les molécules odorantes doivent traverser avant d'aller interagir avec un ou plusieurs récepteurs. Le mucus étant une solution aqueuse, il représente une barrière difficile à franchir pour les substances odorantes pour la plupart lipophile. Les molécules odorantes peuvent se lier de façon réversible à des protéines appelées « odorant binding protein » (OBP) trouvées dans le mucus (Tegoni *et al.*, 2000). Les rôles de ces protéines ne sont pas bien définis mais il semblerait qu'elles puissent concentrer et présenter les molécules odorantes aux récepteurs olfactifs et ainsi faciliteraient l'initiation du message olfactif. Les OBP sont des petites protéines solubles trouvées à proximité des neurones olfactifs. Chez les vertébrés, les OBP appartiennent à la superfamille des lipocalines (Flower,

1996). Cette famille comprend des protéines capables de transporter des molécules lipophiles comme le cholestérol, les stéroïdes et le rétinol. Chez l'homme, deux OBP, hOBP IIa et hOBP IIb, ont été identifiées mais il existe plusieurs sous-types (Lacazette *et al.*, 2000). Chez le rat, trois OBP (OBP-I, -II et un variant de l'OBP-I, OBP-IF) ont été clonées (Briand *et al.*, 2000). L'interaction OBP-molécule odorante n'apparaît pas être une interaction dépendante de l'hydrophobicité mais plutôt d'une interaction polaire et de contacts de type van der Waals (Burova *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle a pu être étudiée par cristallographie aux rayons X pour deux OBP bovines (Bianchet *et al.*, 1996 ; Tegoni *et al.*, 1996) et une OBP porcine (Spinelli *et al.*, 1998). Ces OBP auraient plusieurs rôles (Pelosi, 1998) :

- Solubiliser et transporter les molécules odorantes lipophiles dans le mucus
- Faciliter le signal de transduction en formant un complexe reconnu par le récepteur
- ~~Filtrer en sélectionnant les molécules odorantes qui seront fixées (rôle dans la discrimination des odeurs)~~
- Capturer, dans l'espace perirécepteur, les composés toxiques et non voulus et les transporter pour qu'ils soient dégradés par les enzymes de biotransformation intracellulaires
- Prévenir la saturation des récepteurs en piégeant les molécules odorantes présentes en trop forte concentration.

Les récepteurs olfactifs appartiennent à une superfamille de récepteurs à sept domaines transmembranaires liés à une protéine G (Buck et Axel, 1991 ; Schandar *et al.*, 1998). La complexité du répertoire des récepteurs olfactifs est estimée à 1000 gènes chez la souris et le rat, 500 à 750 gènes chez l'homme, et 100 gènes chez le poisson chat et le poisson zèbre (Mombaerts, 1999) (Figure 10). Un récepteur olfactif va reconnaître différentes molécules odorantes, et une molécule odorante va reconnaître plusieurs récepteurs. L'odeur codée est déterminée par l'activation d'un ou plusieurs types de récepteurs olfactifs (Malnic *et al.*, 1999). Mais, il semble qu'un neurone olfactif n'exprime qu'un seul type de récepteur. Les récepteurs olfactifs aux propriétés distinctes sont codés par un très grand nombre de gènes. Les cellules réceptrices sont, individuellement, sensibles à des molécules de structures chimiques et d'odeurs très différentes. Mais les neurones exprimant un même récepteur vont converger vers les mêmes glomérules.

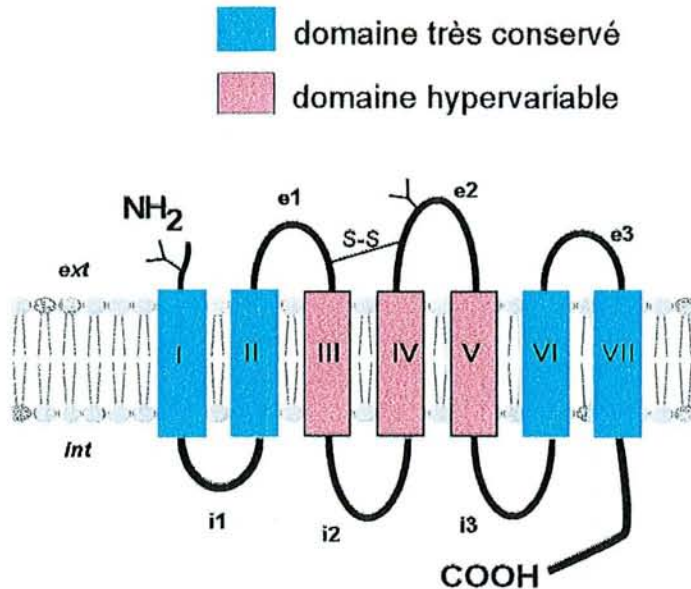


Figure 10 : Représentation schématique des récepteurs olfactifs à sept domaines transmembranaires chez les vertébrés. ext : extérieur ; int : intérieur.

Le message olfactif est transmis au BO sous forme d'un signal électrique. Les récepteurs olfactifs contrôlent plusieurs messagers intracellulaires, adénosine monophosphate cyclique (AMPC), inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Breer, 1990). La fixation des molécules odorantes sur les récepteurs active des protéines G et initie ainsi une cascade de signaux intracellulaires. Les protéines G amplifient les réponses des récepteurs et influencent l'amplitude et les délais des signaux eux-mêmes. Elles existent sous deux états conformationnels, l'une active est liée à la guanine triphosphate (GTP) et l'autre inactive liée à la guanine diphosphate (GDP). Dans les cellules non stimulées, le GTP est hydrolysé par l'activité GTPase et par conséquent la forme inactive liée au GDP prédomine. Les protéines G présentes dans les neurones olfactifs sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α liant le GDP ou le GTP et d'un complexe $\beta\gamma$ indissociable en milieu physiologique. La sous-unité α donne son identité à la protéine G. En liant le GTP, cette sous-unité se dissocie du complexe $\beta\gamma$ et stimule sélectivement les protéines effectrices comme l'adénylate cyclase (Figure 11). Les protéines G de sous-type α_s stimulent l'adénylate cyclase, celles de sous-type α_i l'inhibent et Gq activent la phospholipase C (PLC). Les neurones olfactifs expriment G α_s mais surtout Golf. La protéine Golf présente 88 % d'identité avec G α_s et active également l'adénylate cyclase (Bakalyar et Reed, 1990 ; Jones et Reed, 1989). L'activation de l'adénylate cyclase entraîne la production rapide et transitoire d'AMPC (Lancet, 1991 ; Breer *et al.*, 1994). L'augmentation d'AMPC conduit à

l'ouverture de canaux cationiques (Ca^{2+} , Na^{+}) qui vont provoquer la dépolarisation de la cellule et créer ainsi un potentiel d'action (Figure 12). Celui-ci va se propager dans les axones, jusqu'aux bulbes olfactifs (Menini, 1999).

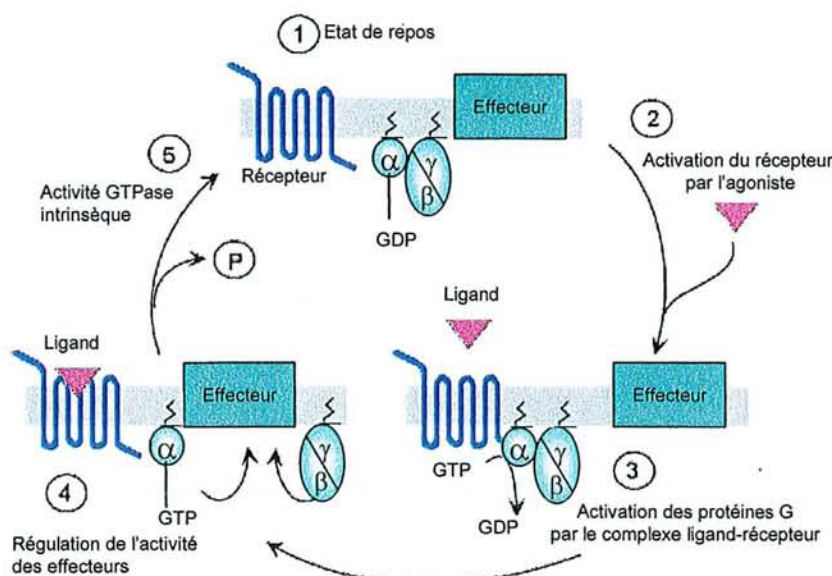


Figure 11 : Schématisation du cycle d'activation des protéines-G hétérodimériques.

Comme certaines molécules odorantes ne déclenchent pas la production d'AMPc, un deuxième mécanisme de transduction impliquant la production d' IP_3 a été proposé (Figure 12). L'activation d'une protéine G va entraîner l'activation de la PLC qui va conduire à la production rapide et transitoire d' IP_3 et de diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2) membranaire. L' IP_3 serait généré pendant la réponse à certaines molécules odorantes et serait le second messenger pouvant mobiliser le calcium et également provoquer la dépolarisation de la membrane. La transduction du signal faisant intervenir l'AMPc et l' IP_3 ne semble pas impliquer les mêmes protéines G (Schandar *et al.*, 1998). La protéine Golf associée à l'AMPc n'est pas sensible à la toxine de Pertussis contrairement à celle qui conduit à la production d' IP_3 (Breer *et al.*, 1994). Ces deux seconds messagers ouvrent des canaux ioniques différents mais tous les deux changent le potentiel membranaire et conduisent à un potentiel d'action transmis au BO. Il semblerait que ces deux voies ne fonctionnent pas indépendamment mais qu'il existe une interaction négative : alors que l'inhibition de la PLC conduit à une augmentation du signal AMPc induit par les

molécules odorantes, l'activation de la voie phosphoinositol déclenche une atténuation du taux d'AMPC (Vogl *et al.*, 2000).

Les variations de l'homéostasie calcique jouent un rôle dans la transduction olfactive (Restrepo et Teeter, 1990 ; Restrepo *et al.*, 1996). Plusieurs conductances qui dépolarisent la cellule (chlorure, cationique, potassique) sont dépendantes du Ca^{2+} (Figure 12).

Un troisième mécanisme faisant intervenir la GMPc semble participer à la transduction des odeurs. Breer *et al.* (1992) ont montré que l'AMPC n'était pas le seul nucléotide cyclique inductible par les molécules odorantes dans les cils olfactifs de rats, mais que la formation de GMPc pouvait aussi être stimulée par ces molécules odorantes. Les propriétés du signal provenant de la GMPc diffèrent de celles provenant de l'AMPC pour différents aspects :

- Le signal dépend de la force du stimulus et apparaît seulement pour les stimuli forts, comme s'il y avait une valeur de GMPc à atteindre pour déclencher sa formation.
- L'accumulation de GMPc est lente et pourrait survivre à la rapide et transitoire élévation d'AMPC pendant plusieurs minutes.
- La GMPc atteint des taux plus faibles que l'AMPC. La lente formation de GMPc suggère l'implication d'un phénomène d'adaptation habituellement observé pour les plus forts stimuli.

Le GMPc est produit par deux formes de guanylate cyclase (GC), l'une soluble et l'autre membranaire. La forme cytosolique est activée par les messagers gazeux comme l'oxyde nitrique (NO) ou le monoxyde de carbone (CO) eux-mêmes respectivement produits par la NO-synthase et l'hème-oxygénase. La forme membranaire est activée par les ligands extracellulaires (Garbers *et al.*, 1994). Un nouveau membre de la famille des récepteurs aux GC a été cloné. Il est exprimé dans les cils de neurones olfactifs (Fülle *et al.*, 1995 ; Juilfs *et al.*, 1997). Actuellement, il est évident qu'il existe plusieurs voies conduisant à la formation de GMPc dans les neurorécepteurs olfactifs des vertébrés, ce qui montre un rôle fonctionnel important pour ce système de second messenger dans l'olfaction.

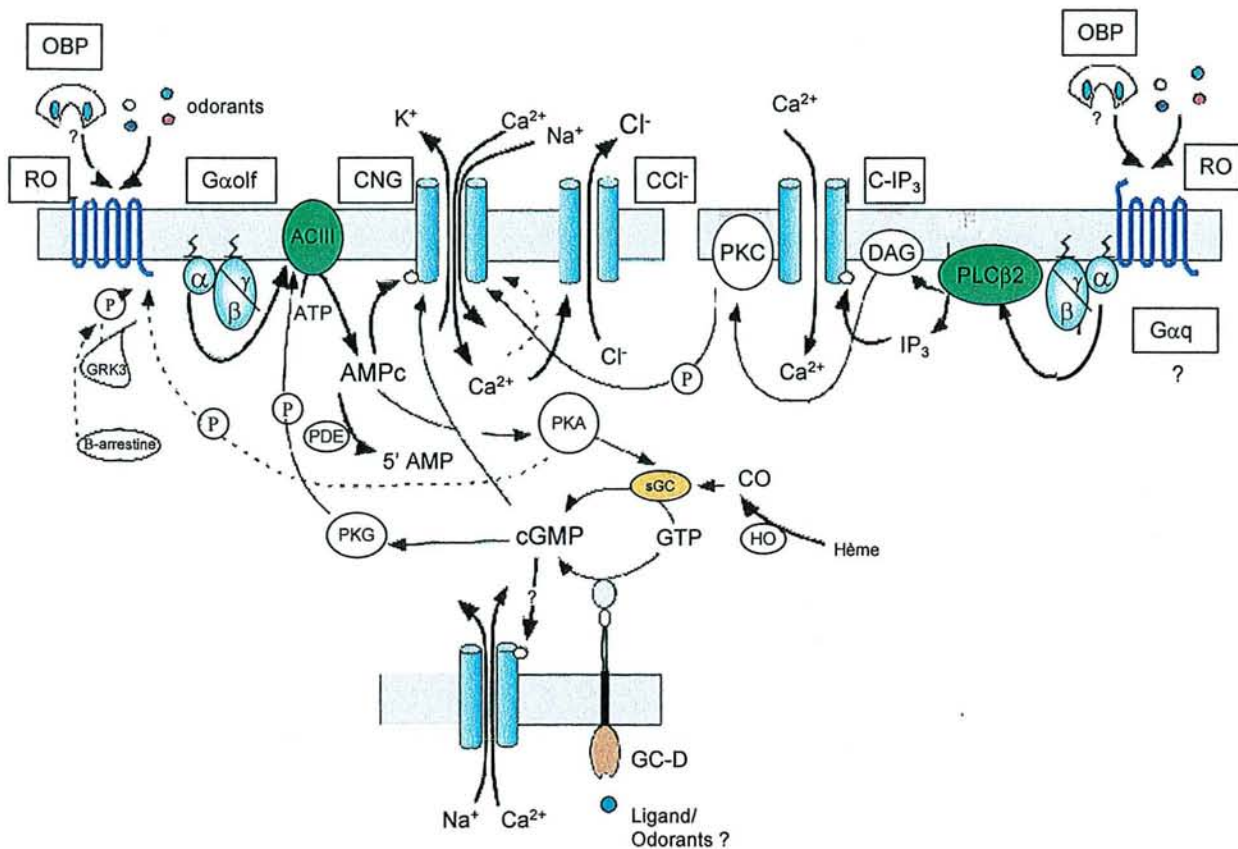


Figure 12 : Les voies de transduction du signal olfactif. Les flèches épaisses représentent les mouvements ioniques et les réactions chimiques, alors que les flèches plus fines indiquent des régulations. Les flèches en pointillées représentent des voies inhibitrices. RO : récepteur olfactif ; CNG : canal AMPc dépendant ; CCI : canal calcium dépendant ; CIP₃ : canal IP₃ dépendant ; HO : hème oxygénase ; GC-D : guanylyl-cyclase membranaire ; sGC : guanylyl-cyclase soluble.

Les potentiels d'action créés par l'activation des messagers secondaires vont arriver au niveau des glomérules des BO où les terminaisons axonales des neurones olfactifs font synapse avec les cellules mitrales. Les BO sont les premiers relais de transmission de l'information olfactive entre le nez et le cerveau. L'information est ensuite transmise des BO vers les centres sensoriels supérieurs du cortex cérébral par le tractus olfactif latéral (Axel, 1995) (Figure 13).

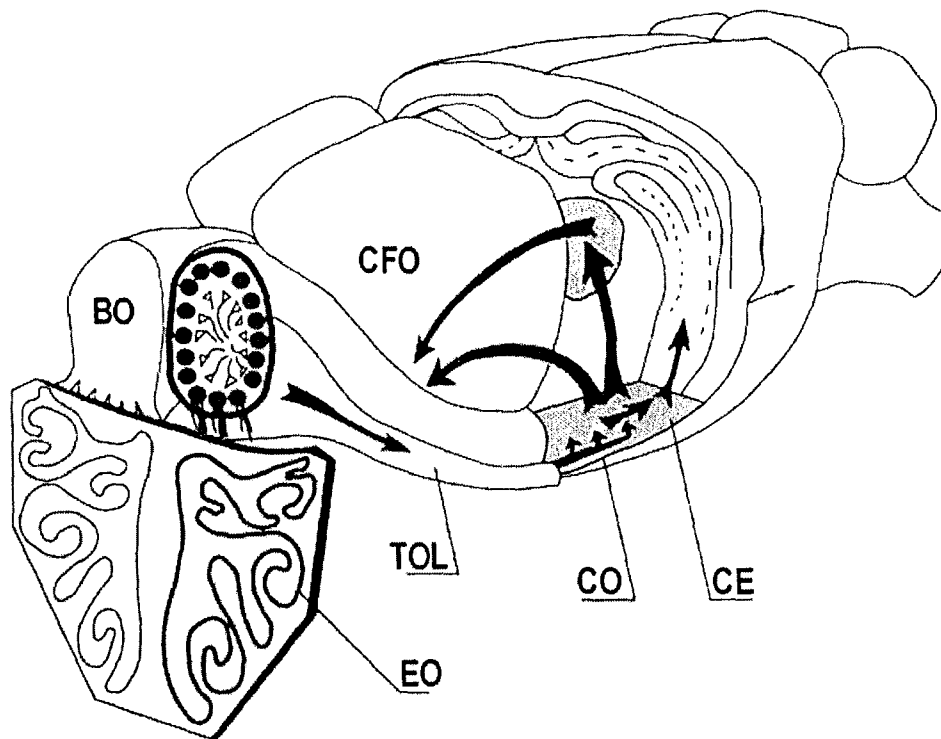


Figure 13 : Représentation schématique des voies olfactives chez un mammifère. Les axones des neurorécepteurs situés dans l'épithélium olfactif rejoignent les bulbes olfactifs. La sortie du bulbe olfactif se projette, via le tractus olfactif latéral, sur l'ensemble d'aires télencéphaliques paléocorticales groupées sous le nom de cortex olfactif. De là, l'information chemine vers le néocortex fronto-orbitaire soit par une voie directe, soit par une voie indirecte par le thalamus. Le cortex entorhinal, en continuité avec le cortex olfactif est la voie d'entrée dans l'hippocampe. Des projections vers l'amygdale et l'hypothalamus (non montrées) constituent d'autres accès du système hypothalamo-limbique. EO : épithélium olfactif ; BO : bulbe olfactif ; TOL : tractus olfactif latéral ; CO : cortex olfactif ; CFO : néocortex fronto-orbitaire ; CE : cortex entorhinal.

L'épithélium olfactif est divisé en quatre grandes régions selon les types de récepteurs présents dans chacune d'entre elles (Mombaerts 1999). Mais les récepteurs ont une répartition aléatoire dans chaque région. Les cibles des projections axonales des neurones olfactifs exprimant un même récepteur ont été visualisées par deux méthodes différentes chez le rat et la souris, l'hybridation moléculaire et la modification génétique de souris. L'hybridation moléculaire pour identifier les ARN de chimiorécepteurs a montré que les neurones exprimant un même récepteur olfactif sont connectés à un seul glomérule (Figure 14).

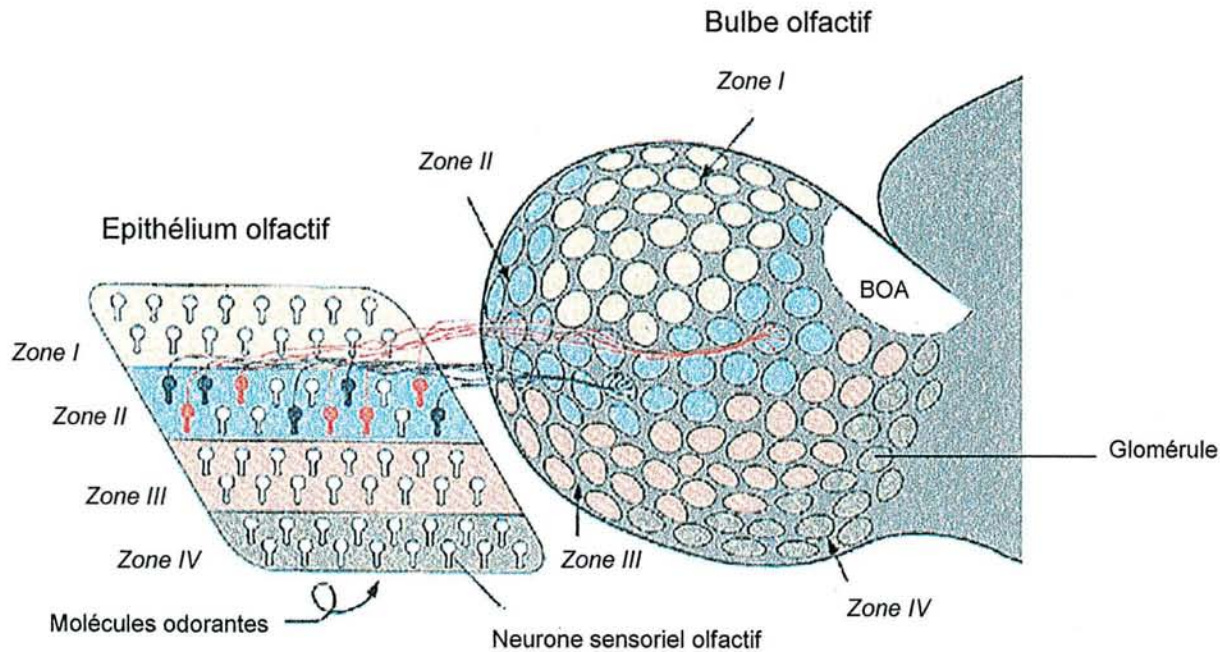


Figure 14 : Schéma illustrant la projection régiono-régionale entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif chez la souris. L'épithélium olfactif est divisé en quatre zones (zones I à IV) qui se définissent par l'expression des récepteurs olfactifs. Dans une zone donnée, les neurones récepteurs olfactifs de l'épithélium projettent leur axone dans la zone correspondante localisée dans le glomérule (zone I à IV). C'est la projection régiono-régionale. Les axones des neurones sensoriels exprimant un récepteur olfactif identique convergent vers un glomérule. NC : néocortex ; BOA : bulbe olfactif accessoire ; d'après Mori et al. (1999).

Les positions des glomérules sont fixes : une odeur particulière suscite toujours la même activité dans le cerveau des animaux d'une espèce donnée (Ressler *et al.*, 1993 ; Vassar *et al.*, 1993 ; Mombaerts *et al.*, 1996). D'autre part, la modification génétique de souris afin de produire des animaux dont les neurones olfactifs possédant un type spécifique de récepteurs sont colorés en bleu a permis de localiser les cellules. Dans les épithéliums et les cerveaux de souris modifiées, un récepteur sur 1000 était bleu. Les axones bleus ne se dirigeaient que vers deux des 2000 glomérules du BO. Les récepteurs activés par certaines odeurs ne dirigent leurs axones que vers un petit nombre de glomérules. Comme les glomérules du BO sont spécifiques des odeurs et que les positions des glomérules sont individuellement bien définies, le BO doit former une carte bidimensionnelle qui permet au cerveau d'identifier les récepteurs activés dans la MO. Une odeur déterminée active une combinaison précise de glomérules dans le BO. Les signaux issus des glomérules sont alors transmis au cortex olfactif où l'odeur est ensuite identifiée (Mombaerts *et al.*, 1996). Le cortex olfactif primaire est composé du noyau du tractus olfactif latéral, du tubercule olfactif, du noyau olfactif antérieur, du cortex piriforme, du cortex périamygdalien, du cortex

entorhinal latéral et de la *tenia tecta* ventrale. Ces différentes aires sont largement interconnectées et elles renvoient toutes des efférences centrifuges au BO. Le BO subit également d'autres influences extrinsèques de certaines régions du tronc cérébral et du télencéphale basal. Depuis ces aires primaires, d'autres neurones transmettent l'information olfactive vers des aires de fonctionnement variées, corticales et sous-corticales comme l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et le cortex orbitofrontal (Brand, 1999) (Figure 15).

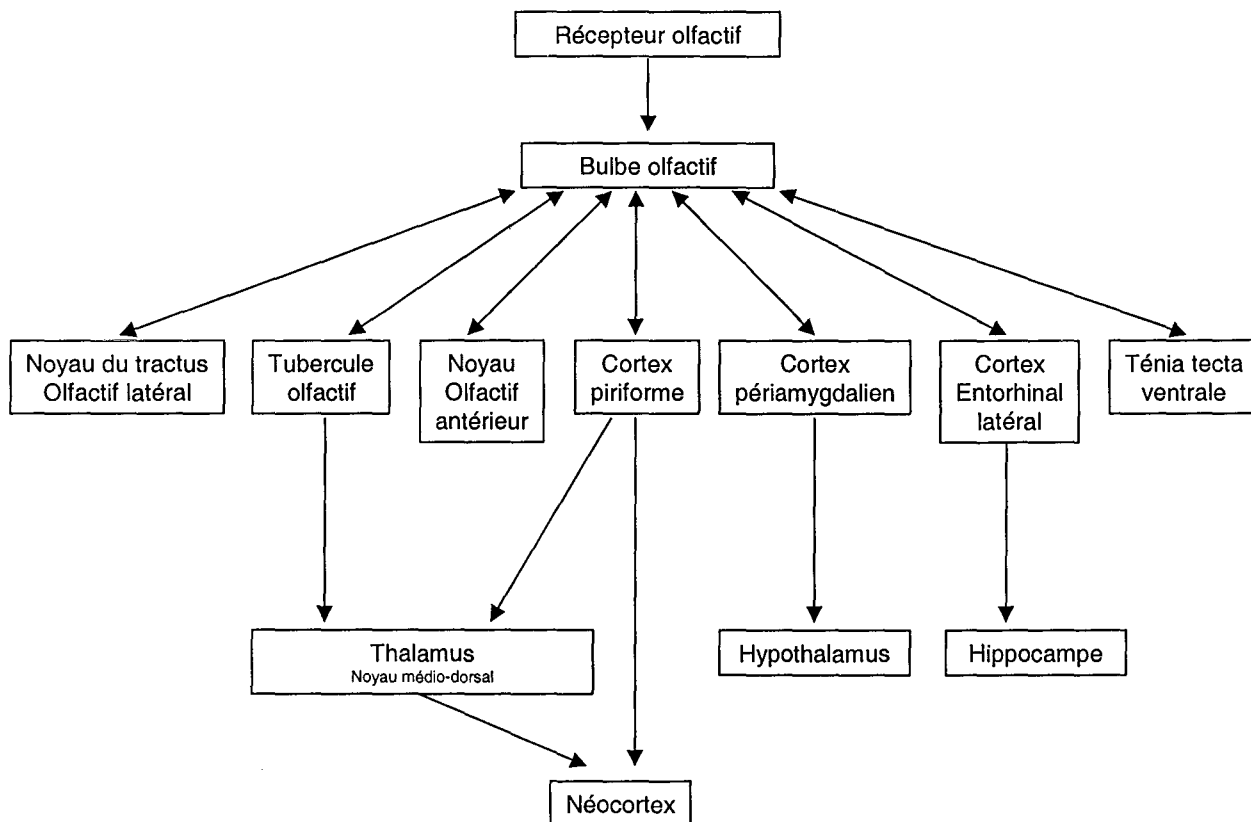


Figure 15 : L'organisation du système olfactif d'après Brand (1999).

1.6.3. Arrêt du signal olfactif

L'arrêt du signal olfactif semble faire intervenir plusieurs mécanismes (Figure 12). La formation de second messager induite par la reconnaissance des molécules odorantes par les récepteurs ressemble à celle des récepteurs aux hormones. Même si les molécules odorantes sont toujours présentes, les taux d'AMPC vont augmenter, atteindre un plateau puis retourner à un niveau basal, ceci pendant une courte période. Ce phénomène correspond à une désensibilisation du système, due à la phosphorylation des récepteurs olfactifs. La cascade

faisant intervenir l'AMPc serait inactivée par la protéine kinase A (PKA). Celle de l'IP₃ et du DAG ferait intervenir la protéine kinase C (PKC). La désensibilisation des récepteurs serait donc une réaction de rétrocontrôle négatif via les protéines kinases qui sont activées en même temps que la production de messenger secondaire (Breer *et al.*, 1994 ; Boekhoff *et al.*, 1996 ; Gomez *et al.*, 2000). Une autre protéine kinase, la « G-protein-coupled receptor kinase » (GRK) semble également avoir un rôle dans l'arrêt du signal olfactif. Cette kinase phosphorylerait les récepteurs actifs pour les rendre inactifs. La PKA pourrait phosphoryler la GRK et la rendre ainsi active. La PKA pourrait également phosphoryler et inactiver les inhibiteurs de la GRK (Breer *et al.*, 1994 ; Bruch *et al.*, 1997). Les phosphatases doivent certainement avoir un rôle important dans la réactivation des récepteurs et donc dans l'augmentation de l'efficacité du système.

La diminution du signal et son arrêt peuvent être expliqués par la diminution de l'AMPc et sa transformation en 5'AMP par les phosphodiesterases. De plus, la réduction de la réponse obtenue pendant l'état d'adaptation semble liée à un rétrocontrôle du calcium complexé à la calmoduline sur le canal cationique AMPc dépendant (Kurahashi et Menini, 1997). La diminution d'AMPc empêcherait la dépolarisation de la cellule et la propagation d'un potentiel d'action.

De même, les molécules odorantes peuvent induire la production lente et prolongée de GMPc qui serait impliquée dans la désensibilisation et non dans les événements initiaux du signal olfactif. La GMPc stimulerait l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine kinase G (PKG). La production retardée d'AMPc due à la GMPc régulerait les réponses cellulaires à long terme provoquées par la détection des odeurs, incluant l'expression de gènes. La GMPc interviendrait dans la cascade de régulation qui contribue à l'adaptation olfactive en diminuant la sensibilité des récepteurs olfactifs à des stimuli répétés (Moon *et al.*, 1999).

La fixation des molécules odorantes par les OBP pourrait également intervenir dans l'arrêt du signal olfactif. En effet, ces OBP peuvent fixer l'excès de molécules odorantes et les transporter à l'intérieur de la cellule où elles pourront être métabolisées par des enzymes de transformation comme les cytochromes P450 (CYP) et les UGT. Les molécules ainsi transformées ne pourront plus interagir avec les récepteurs d'où une diminution du signal olfactif (Burchell, 1991).

1.6.4. Troubles du système olfactif

Les troubles olfactifs les plus fréquents sont dus à des atteintes ORL, des maladies neurologiques ou peuvent être provoqués par l'absorption de nombreux médicaments. Ces atteintes sont soit transitoires soit définitives. Plusieurs atteintes du système olfactif ont été décrites. Ce sont :

- La perte totale de l'olfaction ou anosmie
- La diminution de la sensibilité envers quelques-unes ou toutes les molécules odorantes ou hyposmie
- L'augmentation de la sensibilité envers quelques-unes ou toutes les molécules odorantes ou hyperosmie
- La distorsion dans la perception des odeurs comme la phantosmie (hallucination olfactive, perception d'une odeur déplaisante alors qu'aucune odeur n'est présente), la parosmie (impression olfactive erronée en présence d'un stimulus) (Smith et Duncan, 1992) ou la cacosmie (sensation réelle ou subjective d'une mauvaise odeur).

Ces divers troubles peuvent être totaux, affectant l'ensemble des odeurs, ou sélectifs, ne concernant que quelques odeurs limitées. Les patients anosmiques décrivent une perte de goût, alors que c'est de la perte de flaveur (sensation complexe résultant des sensations gustatives, olfactives par rétro-olfaction, trigémينية lors de l'entrée en bouche d'une substance odorante) dont ils sont atteints. Ils ressentent encore la chaleur, la texture, le sucré, le salé, l'amer, l'acide d'un aliment mais ont perdu toute la finesse d'analyse qu'apporte la flaveur, c'est-à-dire l'odorat. La perte ou la diminution de l'odorat apparaît aussi fréquemment lors du vieillissement. Chez les personnes âgées, cette diminution a des conséquences importantes sur la qualité de vie. Elle peut réduire l'appétit puisque la saveur des aliments n'est plus perçue olfactivement et peut ainsi conduire à une malnutrition. Les systèmes de défense olfactifs comme par exemple la détection de gaz butane, diminuent avec l'âge. La perte d'odorat peut donc avoir des conséquences dramatiques.

Deux origines aux troubles de l'odorat existent : les atteintes de la transmission et celles de la perception. Les troubles par atteinte de la transmission olfactive c'est-à-dire les atteintes ne permettant pas aux molécules odorantes d'atteindre les cellules sensorielles apparaissent surtout dans les pathologies naso-sinusiennes. Ces pathologies incluent les tumeurs ou les oedèmes qui constituent un obstacle pour les molécules odorantes et les altérations du mucus lors de rhinites ou sinusites. Les troubles de l'olfaction sont alors généralement fluctuants.

Les troubles par atteinte de perception sont observés lors de maladies, de traumatismes crâniens d'intoxication ou de prises de certains médicaments. L'atteinte olfactive a été décrite dans de nombreuses maladies dont celles de Parkinson ou d'Alzheimer où elle est considérée comme un marqueur précoce de ces maladies neurodégénératives (Murphy, 1999 ; Schiffman, 1997), mais aussi l'hépatite aiguë, l'insuffisance rénale, le sida, l'hypothyroïdie, le diabète, la schizophrénie, l'épilepsie ou l'alcoolisme. Dans l'insuffisance surrénale, les patients décrivent une hyperosmie qui régresse après traitement (Norès *et al.*, 2000). Certains médicaments dont les AINS, la L-dopa, la morphine, les antithyroïdiens (Norès *et al.*, 2000b), des polluants atmosphériques, ou encore certaines interventions chirurgicales provoquent des troubles du système olfactif (Schandar *et al.*, 1998 ; Jones et Rog, 1998).

1.7. Pénétration des xénobiotiques dans le SNC

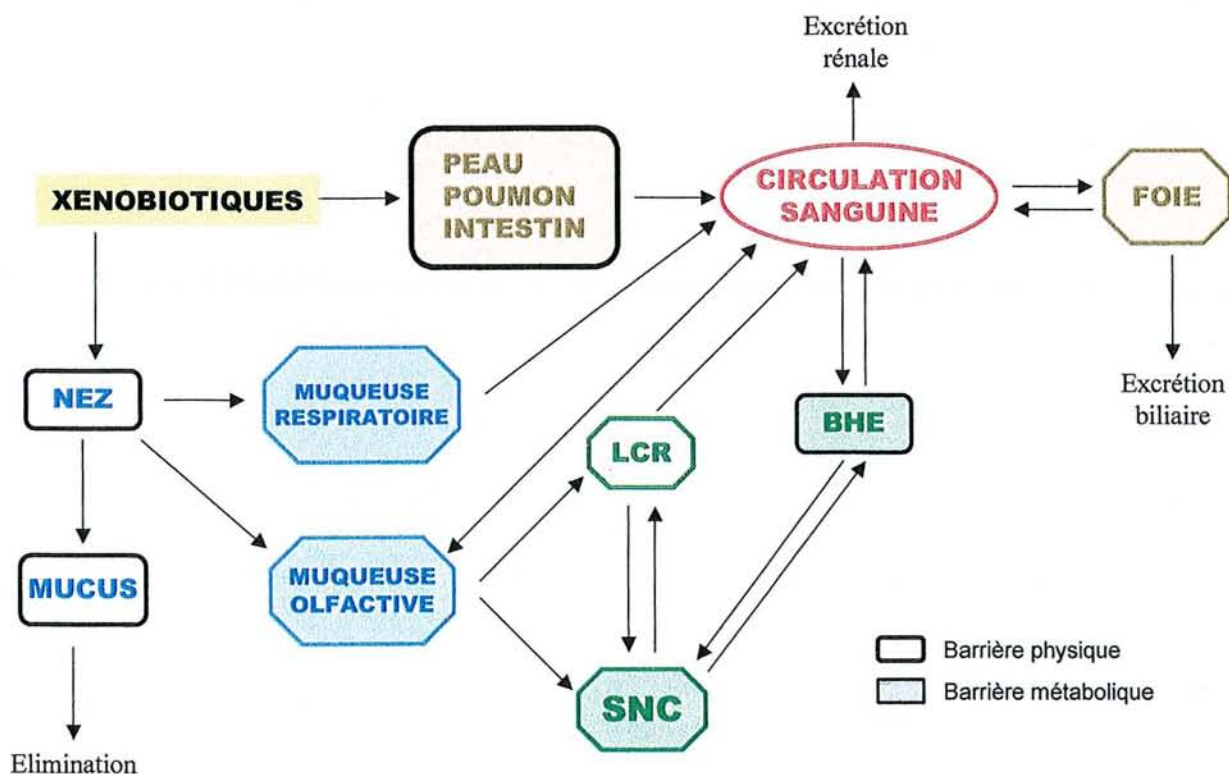


Figure 16 : Les voies de pénétration des xénobiotiques. LCR : liquide céphalo-rachidien, SNC : système nerveux central, BHE : barrière hémato-encéphalique.

1.7.1. La voie nasale

La voie nasale est une voie d'entrée directe et rapide de nombreux xénobiotiques dans le cerveau (Figure 16). Des substances chimiques comme des polluants atmosphériques (solvants, hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les fumées), ou des drogues comme la cocaïne peuvent pénétrer rapidement par cette voie et provoquer des altérations réversibles ou irréversibles du fonctionnement cérébral. Hastings et Evans (1991) ont montré que des métaux lourds, comme le cadmium, peuvent atteindre le cerveau par un transport dans les axones des neurones olfactifs. De même, des médicaments ou des peptides de faible poids moléculaire comme l'estradiol, la progestérone, la cephalexine peuvent pénétrer dans le LCR, dans les BO, et atteindre parfois d'autres régions du cerveau après administration nasale (Illum, 2000). Quand un médicament est administré par voie nasale, une importante partie est d'abord éliminée rapidement par le mucus. Une autre partie est absorbée par le sang et rejoint la circulation systémique où il sera éliminé par les mécanismes de clairance rénale et hépatique. Mais une certaine quantité de cette substance présente dans le sang peut atteindre le cerveau en traversant la BHE. Enfin, les xénobiotiques peuvent être absorbés dans la région olfactive au niveau de la muqueuse et pénétrer directement dans le LCR. La quantité de médicament qui va suivre les différentes voies est très largement dépendante des caractéristiques physico-chimiques de la molécule, en particulier son poids moléculaire et sa lipophilie mais aussi les excipients qui sont ajoutés à sa forme galénique (Illum, 2000 ; Sakane *et al.*, 1995). Trois voies sont envisagées pour expliquer le transport des molécules de la région olfactive au LCR et au cerveau :

- La voie transcellulaire à travers les cellules sustentaculaires par endocytose des récepteurs, ou diffusion passive pour les molécules lipophiles.
- La voie paracellulaire à travers les jonctions serrées entre les cellules sustentaculaires ou entre les cellules sustentaculaires et les neurones olfactifs. C'est un transport très rapide comme le transport transcellulaire.
- La voie nerveuse où les molécules pénètrent dans les neurones par des mécanismes d'endocytose et de pinocytose et sont transportées par un transport axonal intracellulaire jusqu'aux BO. C'est un transport très lent : les molécules atteignent le SNC 24 heures après leur administration dans la cavité nasale (Kristensson et Olsson, 1971).

1.7.2. Autres voies de pénétration des xénobiotiques dans le SNC

1.7.2.1. La voie sanguine et la barrière hématoencéphalique

Différents médicaments et autres substances lipophiles présents dans les polluants atmosphériques ou les additifs alimentaires vont pénétrer dans le sang par voie digestive, par la peau, par les poumons, par voie intramusculaire ou par voie intraveineuse (Figure 16). Lorsqu'ils sont présents dans le milieu circulant, une partie de ces molécules va être métabolisée par le foie, et les métabolites vont être excrétés par les reins ou la bile. Une partie de ces substances lipophiles peut traverser les cellules cérébrovasculaires, qui constituent la BHE et ainsi pénétrer dans l'espace cérébrale. La BHE représente le premier obstacle à la pénétration des médicaments dans le SNC. Elle est constituée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux soudées entre elles par des jonctions serrées, et forme ainsi une barrière physique qui régule et contrôle les échanges entre le sang circulant et l'espace extracellulaire. De plus, les cellules endothéliales cérébrales expriment des glycoprotéines transmembranaires ATP-dépendantes qui réduisent l'accumulation intracellulaire de xénobiotiques en les excluant de la cellule. Ce mécanisme est connu sous le nom de « multidrug-resistance » (van Asperen *et al.*, 1997). La BHE laisse passer les molécules apolaires par simple diffusion, selon leur liposolubilité et leur poids moléculaire. Après leur entrée dans les cellules endothéliales, certains xénobiotiques pourront être métabolisés par des enzymes de biotransformation en molécules polaires non perméantes. Comme les astrocytes sont en contact étroit avec les cellules endothéliales cérébrovasculaires, les enzymes gliales en particulier les UGT pourraient prendre une part active dans cette protection métabolique du cerveau.

Pour franchir l'obstacle que constitue la BHE, des chercheurs tentent actuellement de mettre au point différents systèmes de transfert permettant l'administration de médicaments polaires dans le SNC. Un premier système concerne la réalisation de précurseurs lipophiles de médicaments polaires, par le greffage d'un groupe très liposoluble. Par exemple, l'équipe de Bodor (Prokai *et al.*, 2000) réalise des esters d'acide nicotinique qui traversent facilement la BHE, et sont oxydés et hydrolysés en un groupe pyridinium et le médicament actif. Ce système permet une augmentation significative du passage de la BHE par de nombreux médicaments à visée neurologique, y compris les neuropeptides. D'autres systèmes utilisent des nanoparticules (Kreuter, 2001), l'injection intrathécale ou l'injection intraventriculaire. Le

mécanisme de transport de médicaments par celle-ci à travers la BHE n'est pas encore entièrement élucidé. Il semble néanmoins que ces nanoparticules subissent une endocytose par les cellules endothéliales cérébrovasculaires. Ces particules mimant les lipoprotéines de faible densité (LDL), elles peuvent se fixer sur les récepteurs de celles-ci qui sont endocytés (Kreuter, 2001). L'implantation chirurgicale de polymères libérant progressivement un médicament est utilisée pour l'administration d'agonistes dopaminergiques chez les parkinsoniens. Ces méthodes permettent l'administration de quantités connues d'un médicament dans le cerveau mais elles restent invasives (Gherssi-Egea et Strazielle, 2001 ; Segal, 2001).

1.7.2.2. Le liquide céphalorachidien

Le passage de molécules circulantes dans le SNC peut aussi se faire par le LCR (Figure 16). Le LCR est sécrété par les plexus choroïdes à une vitesse de 0,2 ml/heure chez le rat, et 20 ml/heure chez l'homme (Davson *et al.*, 1987). Considéré à tort pendant longtemps comme un simple filtrat du plasma, le LCR est en fait un produit de sécrétion ayant une composition différente de celle du plasma. Il circule sur la surface et les concavités du cerveau d'une direction rostrale à caudale, et quitte l'espace subarachnoïde et les villosités arachnoïdes pour être absorbé dans le sang. Les plexus choroïdes représente une interface entre le sang et le LCR, constituée des cellules épithéliales qui comportent des jonctions serrées empêchant la libre diffusion des solutés. Plusieurs systèmes de transport ATP-dépendant assurent le maintien de l'homéostasie du LCR qui représente le milieu extracellulaire des cellules cérébrales. Une injection de médicaments qui sont efficacement bloqués par la BHE peut se faire directement dans le LCR par administration intrathécale ou intracérébroventriculaire. Cependant, les vitesses de diffusion de médicaments entre le LCR et le tissu nerveux sont relativement faibles, sans doute en raison du taux élevé de renouvellement du LCR (4 à 5 fois par 24 heures) (Pardridge, 1991). De plus, l'efficacité des systèmes de transport ATP-dépendants présents dans les PC font qu'il est difficile d'atteindre des seuils thérapeutiques efficaces pour les molécules qui sont des substrats de ces transporteurs. On utilise cependant l'implantation d'un système de cathéter relié à une micropompe implantée ou à un réservoir sous-cutané, l'extrémité du cathéter permettant de perfuser le médicament sur la cible. Mais son utilisation reste limitée à l'expérimentation en recherche et en thérapeutique où elle s'applique à des patients pour qui les autres méthodes sont devenues inefficaces, par exemple pour administrer de la morphine à des patients en phase terminale de cancer.

2. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES

Les systèmes enzymatiques ont pour fonction de rendre les médicaments plus hydrosolubles en les oxydant ou en les hydroxylant, et pharmacologiquement inactifs en modifiant leur structure moléculaire. Cependant, ce métabolisme conduit parfois à la formation de métabolites pharmacologiquement actifs ou toxiques qui peuvent entraîner des conséquences graves et parfois irréversibles. Les travaux réalisés dans notre groupe depuis près de 15 ans suggèrent que les enzymes de biotransformation, en particulier les UGT présentes dans le cerveau et dans les interfaces sang-cerveau et sang-LCR, aient pour principale fonction d'inactiver ces molécules activées ou toxiques et donc de protéger le SNC. La transformation métabolique des xénobiotiques (polluant atmosphériques, additifs alimentaires, médicaments ...) et des molécules endogènes (hormones stéroïdiennes, bilirubine...) implique trois étapes : les réactions de phase I ou de fonctionnalisation, les réactions de phase II ou de conjugaison, et la phase III qui consiste à éliminer les métabolites produits hors des cellules par des systèmes de transport actif. Les substrats pour les enzymes de la phase I sont généralement des molécules lipophiles qui subissent une monooxygénation, une déalkylation, une réduction, une aromatisation ou une hydrolyse. Ces molécules peuvent servir de substrats aux enzymes de phase II. Certains substrats possédant déjà des groupements fonctionnels (par exemple des fonctions hydroxyles comme la morphine) pourront être conjugués par des enzymes de phase II sans avoir subi de réaction de phase I. Les réactions de phase II sont des réactions de transfert de groupements très hydrophiles : sulfate, méthyle, acides aminés, glutathion ou sucre (Leininger-Muller *et al.*, 1994). Le foie est le principal site de transformation des médicaments mais la présence d'enzymes du métabolisme des médicaments comme les CYP ou les UGT a été détectée dans des tissus extra-hépatiques tels que les reins, les poumons, la peau, l'intestin, le cœur et le cerveau, et des activités très élevées de ces enzymes ont été mesurées dans le système olfactif. La phase III correspond au transport ATP-dépendant des produits polaires du métabolisme hors de la cellule (Figure 17).

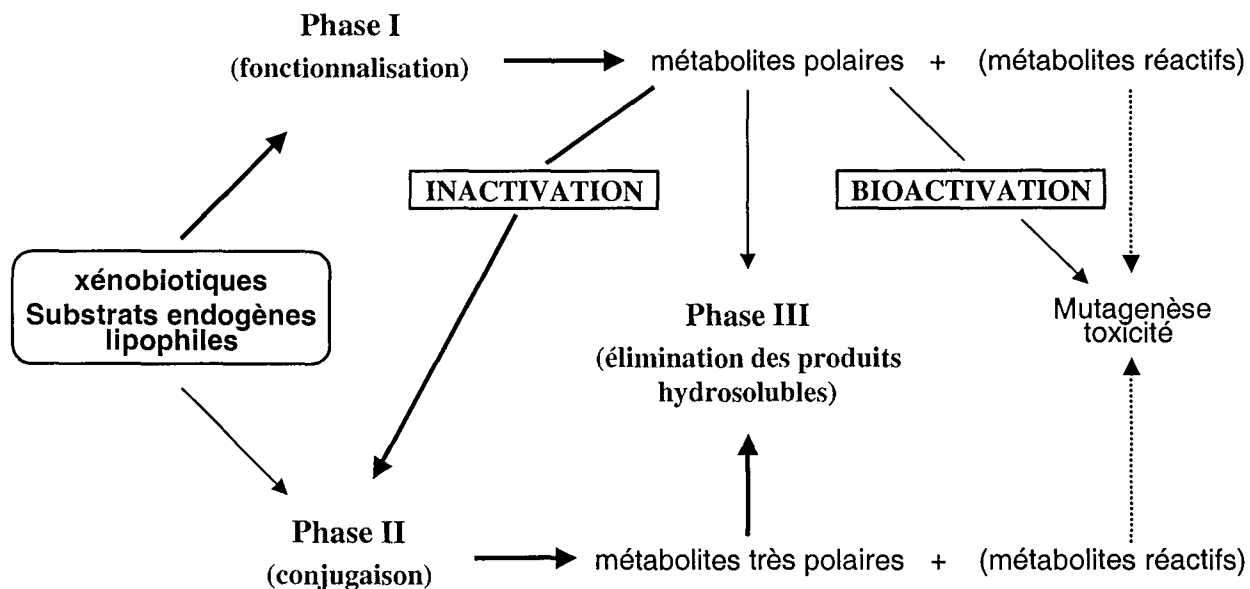


Figure 17 : Le métabolisme des xénobiotiques.

2.1. Les enzymes de phase I

2.1.1. Les monoamines oxydases A et B

Elles jouent un rôle vital dans la régulation du taux de neurotransmetteurs dans le cerveau et sont des cibles potentielles pour certains médicaments. Les monoamines oxydases (MAO) catalysent la désamination oxydative des amines biogènes pour former des aldéhydes et relarguer du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac (Strolin-Benedetti, 2001). Ces deux dernières molécules sont cytotoxiques si elles ne sont pas efficacement neutralisées. Il existe deux formes de MAO : la MAO-A inhibée par la clorgyline et la MAO-B inhibée par le L-déprényl. Les inhibiteurs de MAO comme le L-deprenyl sont utilisés en clinique pour traiter les désordres affectifs de la maladie de Parkinson (Olanow *et al.*, 1995). Ces enzymes mitochondriales participent à la protection du cerveau contre les xénobiotiques. Elles sont présentes dans les vaisseaux cérébraux du rat et métabolisent de nombreuses amines neuroactives et leurs précurseurs directs. La forte activité des MAO-B dans l'endothélium des vaisseaux cérébraux apparaît efficace pour protéger le cerveau contre les dérivés exogènes neurotoxiques de pyridine comme le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Riachi et Harik, 1988).

2.1.2. Les cytochromes P450

Les CYP appartiennent à une superfamille d'enzymes héminiques qui métabolisent un grand nombre de composés exogènes et endogènes comme les acides gras et les hormones stéroïdiennes dans le foie. Ils sont localisés majoritairement dans le réticulum endoplasmique mais dans le cerveau, le CYP mitochondriale est très élevé (Walther *et al.*, 1986). Les formes de CYP présents dans les microsomes sont principalement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques en particulier les médicaments. Les CYP mitochondriales, quant à elles, semblent intervenir majoritairement dans le métabolisme de substrats endogènes dont les hormones stéroïdiennes. Néanmoins, une activité envers les xénobiotiques a été récemment démontrée dans les mitochondries cérébrales (Bhagwat *et al.*, 2000). L'activité CYP implique la présence de la NADPH-cytochrome P450 réductase, flavoprotéine qui va fournir les électrons nécessaires au déroulement du cycle catalytique des CYP du réticulum endoplasmique (RE) ou d'une NADPH-adrénodoxine réductase présente dans les mitochondries qui va jouer le même rôle que la flavoprotéine. Même si le foie est l'organe impliqué majoritairement dans le métabolisme des xénobiotiques, la présence et l'activité extrahépatique de certaines isoformes de CYP est d'un grand intérêt. Le cerveau considéré comme dépourvu d'activités CYP-dépendantes au début des années 1980, est devenu l'un des organes les plus étudiés à cause des implications pharmacologiques et toxicologiques du métabolisme cérébral de médicaments. Au cours de leur activité catabolique, les CYP ainsi que les MAO forment des entités radicalaires dérivées de l'oxygène (ERO) (Lebel et Bondy, 1991). Ces radicaux libres peuvent engendrer l'oxydation directe de xénobiotiques en métabolites réactifs, modifier les propriétés des membranes par l'oxydation de protéines et la peroxydation des lipides et modifier les acides nucléiques. L'ensemble de ces changements est identique à ceux observés lors du vieillissement cellulaire. Plusieurs isoformes de CYP ont été détectées dans les cerveaux humains ou de rongeurs : CYP 1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2D, 2E1, 3A (Voirol *et al.*, 2000). La présence de CYP a aussi été décrite dans les bulbes olfactifs (Perrin *et al.*, 1990), dans l'épithélium olfactif (Lazard *et al.*, 1990 ; Gu *et al.*, 2000) et l'organe voméronasal (Gu *et al.*, 1999). L'activité est relativement faible dans le cerveau alors que dans la MO, elle est élevée (Gu *et al.*, 2000 ; Voirol *et al.*, 2000). Les multiples formes de CYP qui sont sélectivement inductibles selon l'exposition à des médicaments ou xénobiotiques variés sont localisés essentiellement dans le réticulum endoplasmique, mais ces formes ont également été trouvées dans les mitochondries du foie et du cerveau de rats (Bhagwat *et al.*, 2000).

2.1.3. Les monooxygénases à flavine

Les monooxygénases à flavine (MFO) appartiennent à un groupe d'oxygénases dépendantes du NADPH et de l'oxygène ayant une faible spécificité. Les molécules monooxygénées métabolisées par ces enzymes possèdent divers groupes fonctionnels comme un atome de phosphore, d'azote, de sélénium, ou encore de groupements sulfure, amine ou hydrazine. La part la plus importante des MFO semble localisée dans les neurones (Rouet *et al.*, 1981 ; Bhamre *et al.*, 1993).

2.1.4. Les époxydes hydrolases

Elles sont exprimées sous une forme soluble ou microsomiale. L'époxyde hydrolase microsomiale est impliquée dans le métabolisme de xénobiotiques en particulier les époxydes réactifs formés par le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les CYP (Lu et Miwa, 1980). En effet, lorsque des molécules aromatiques ou portant des liaisons éthyléniques sont métabolisées par les CYP, elles peuvent donner naissance à des époxydes très réactifs et mutagènes. Ces époxydes sont transformés en diols vicinaux peu toxiques par les époxydes hydrolases, enzymes qui s'avèrent donc très importantes pour la protection de l'organisme contre ces métabolites réactifs (Wixtrom *et al.*, 1985). Ces enzymes ont été détectées dans le cerveau (Farin et Omiecinski, 1993) et dans la MO (Genter *et al.*, 1995).

2.2. Les enzymes de phase II

2.2.1. Les UDP-glucuronosyltransférases

2.2.1.1. Nomenclature

Les UDP-glycosyltransférases appartiennent à une superfamille d'enzymes qui catalysent le transfert de l'acide UDP-glucuronique (UDPGA), de l'UDP-galactose, de l'UDP-glucose ou de l'UDP-xylose sur des petites molécules hydrophobes (aglycones). La présence de séquences homologues dans les plantes, les animaux et les bactéries suggère que les UGT aient évolué à partir d'un même gène ancestral. Les enzymes qui utilisent l'acide UDP-glucuronique comme donneur de sucre sont principalement trouvées chez les insectes, les poissons et les mammifères. Elles n'ont pas été détectées chez les bactéries, les levures ou les plantes. Les UGT sont séparées en plusieurs familles, dans la nomenclature basée sur

l'évolution des gènes (Figure 18). Chaque famille est désignée par un nombre arabe puis une lettre désigne la sous-famille quand il y en a 2 ou plusieurs et enfin un autre nombre arabe qui représente le gène individuel. Les familles 1 à 50 correspondent aux UGT animales et humaines, 51 à 70 aux UGT des levures, 71 à 100 aux UGT des plantes et 101 à 200 aux UGT des bactéries (Mackenzie *et al.*, 1997). Chez les mammifères, la glucuronoconjugaison catalysée par les UGT constitue la principale forme de conjugaison de xénobiotiques. Les différentes isoformes d'UGT sont séparées en deux familles 1 et 2 selon les similitudes entre leur séquence primaire en acides aminés. Deux membres de la même famille possèdent une séquence identique en acides aminés de plus de 50 % mais ont moins de 50 % d'identité avec une autre famille et deux sous-familles ont 60 % d'homologies de séquence entre elles.

Le gène de la famille 1 contient au moins 13 exons 1 qui possèdent chacun leur propre promoteur (Gong *et al.*, 2001). Les isoformes de cette famille sont donc formées par l'épissage alternatif de l'exon 1 puis par les exons 2 à 5 qui sont communs à toutes ces enzymes. Les UGT de la famille 1 sont considérées comme provenant de gènes distincts. La conséquence de cette structure du gène et du mécanisme d'épissage pour l'isoforme 1A est la variabilité de la partie amino-terminale et de la conservation de la partie carboxy-terminale (Mackenzie, 1990). La famille UGT1 comprend les enzymes capables de conjuguer la bilirubine, les hormones thyroïdiennes, les quinones et les phénols.

La famille 2 est divisée en trois sous-familles : 2A, 2B, 2C. Les isoformes de cette sous-famille sont codées par des gènes différents contenant chacun 6 exons. La sous-famille 2A correspond aux UGT olfactives. La sous-famille 2B contient les gènes inductibles par le phénobarbital et est impliquée dans la conjugaison des stéroïdes endogènes, d'acides carboxyliques, d'alcools, d'amines et de thiols. La sous-famille 2C n'est représentée que par une forme exprimée dans le foie de lapin. La comparaison des séquences de ces sous-familles démontre que les différences de séquence sont réparties sur l'ensemble de l'ADNc contrairement à la famille 1 qui présente des différences uniquement dans la région correspondant à l'extrémité amino-terminale de la protéine.

La famille UGT8 contient un seul membre qui code pour une enzyme qui catalyse le transfert du galactose provenant de l'UDP-galactose sur des céramides pour former des cérébrosides. Les cérébrosides font parties des glycosphingolipides majeurs qui forment la membrane lipidique de la gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (Schulte et Stoffel, 1993 ; Schaeren-Wiemers *et al.*, 1995).

D'autres isoformes d'UGT, localisées dans l'appareil de Golgi et impliquées dans la synthèse des protéoglycanes sont également étudiées. C'est le cas de la β -1,3-glucuronosyltransférase I, enzyme clé dans la synthèse des glycosaminoglycanes (Gouze *et al.*, 2001).

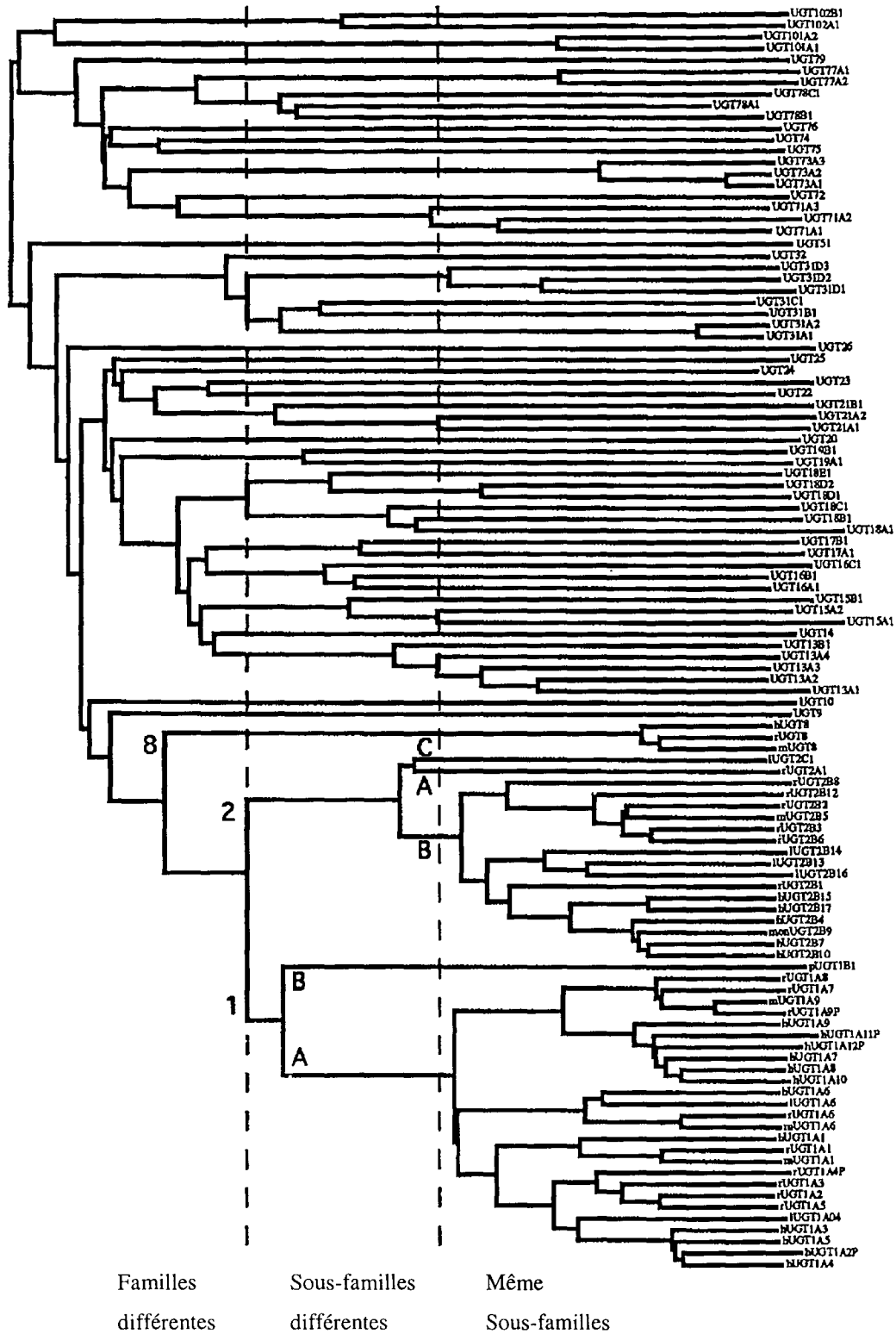


Figure 18 : Arbre génétique des UGT d'après Mackenzie et al. (1997)

2.2.1.2. Localisation des UGT

Dans les cellules, les UGT sont localisées dans le RE et semblent aussi présentes dans l'enveloppe nucléaire. Ce sont des enzymes transmembranaires de 50 à 60 kDa contenant 528 à 531 acides aminés qui peuvent être divisées en deux régions, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal (Figure 19). La partie amino-terminale est la moins conservée d'une isoenzyme à l'autre. Cette portion variable semble conférer leur spécificité aux UGT. Cette région protéique contient une séquence signal qui dirige la protéine dans le RE (Kinosaki *et al.*, 1993). Ce peptide signal sera clivé ultérieurement et la protéine pourra être glycosylée. La très grande homologie de séquence dans la région carboxy-terminale des UGT conduit à l'hypothèse que cette région est responsable de la liaison avec le cofacteur UDPGA. L'analyse de la structure primaire de l'enzyme révèle un signal d'ancrage au RE composé d'acides aminés chargés positivement dans la région carboxy-terminale. Il semblerait que les UGT soient actives sous la forme d'homodimères ou hétérodimères composés de deux chaînes polypeptidiques d'UGT (Radomska *et al.*, 1999)

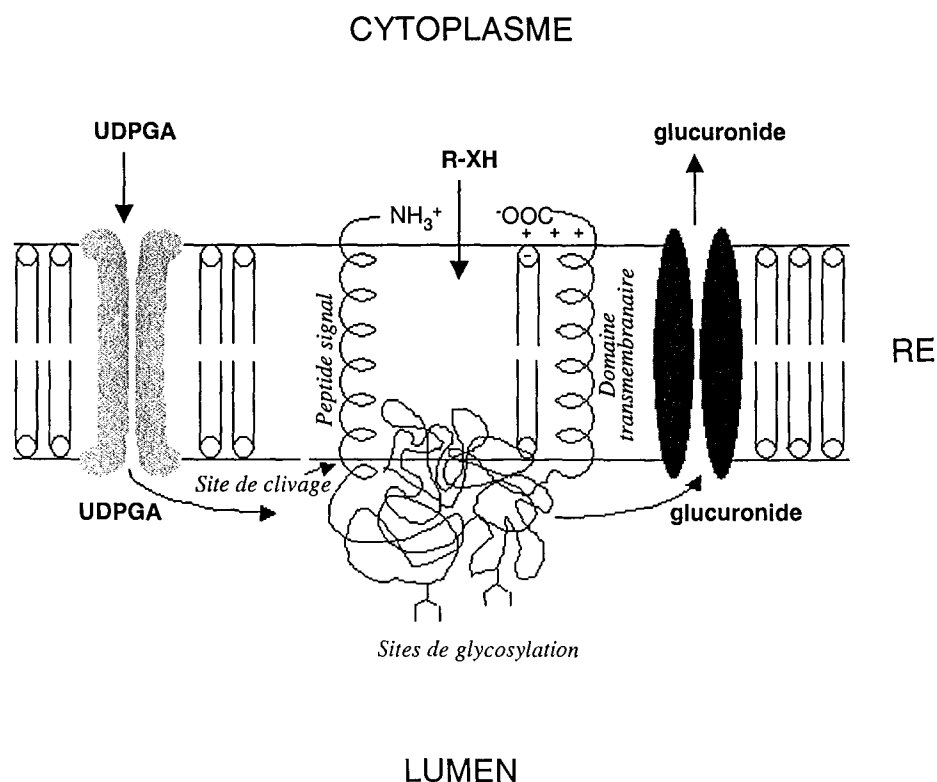
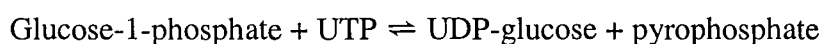


Figure 19 : Représentation de l'organisation membranaire des UGT dans le réticulum endoplasmique (RE), d'après Burchell et Coughtrie (1989).

2.2.1.3. Réaction de glucuroconjugaison

Les UGT reconnaissent de nombreux substrats et catalysent le transfert de l'UDPGA sur des structures chimiques possédant une fonction R-OH, R-COOH, R-CO, R-NH₂ et R-SH. L'UDPGA est un composé stable très hydrosoluble. Il est formé, dans la cellule, par une réaction en deux étapes à partir de glucose-1-phosphate et d'uridine triphosphate (UTP). La première étape est catalysée par l'UDP-glucose pyrophosphorylase pour former l'UDP-glucose (UDPG). Ensuite, l'UDPG est oxydé sur le carbone C₆ de l'UDPGA. L'activité UDPG deshydrogénase est contrôlée par le rapport NAD⁺/NADH (Mulder *et al.*, 1990) :



Le groupement accepteur du substrat attaque le carbone C1 situé dans le groupement pyranose de l'UDPGA par une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 avec inversion de configuration, formant ainsi un acide β-D-glucuronide (Figure 20). Les glucuronides ainsi formés ont une forte solubilité, une faible liaison aux protéines sériques et des petits volumes de distribution. Ils sont rapidement excrétés hors de la cellule par des systèmes de transport ATP-dépendant. Les UGT se trouvent sous un état latent dans le RE et sont activées par les ultrasons ou des détergents comme le triton ou la digitonine. Une isoforme d'UGT peut métaboliser plusieurs molécules et inversement, une molécule peut être conjuguée par plusieurs UGT.

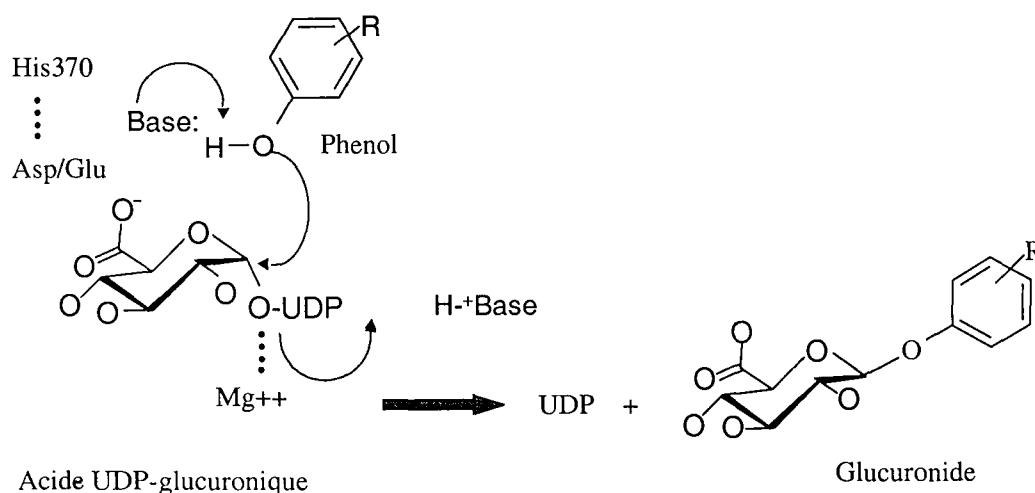


Figure 20 : Mécanisme catalytique de la glucuroconjugaison des phénols par l'UGT1A6.

2.2.1.4. Fonctions des UGT

Ces enzymes ont une spécificité de substrats chevauchante. En effet, plusieurs substrats peuvent être métabolisés par plusieurs UGT. Elles transforment également divers substrats endogènes et exogènes qui présentent des structures chimiques parfois très différentes. Leur activité conduit à une augmentation de la polarité, donc de l'hydrosolubilité, des composés hydrophobes et dans la plupart des cas à une perte de leur activité biologique. Elles participent donc à la protection de l'organisme contre la toxicité des xénobiotiques, et à l'inactivation de nombreux médicaments et facilitent leur excrétion par voie urinaire ou biliaire. Néanmoins, les UGT forment parfois des substances bioactives, voire toxiques. La morphine, les stéroïdes, les acides biliaires et les rétinoïdes sont, par exemple, tous transformés en métabolites pharmacologiquement plus actifs (Vore *et al.*, 1983 ; Abbott et Palmour, 1988 ; Olson *et al.*, 1992 ; Radomska *et al.*, 1999 ; Mercadante, 1999). Les UGT régulent aussi la concentration de certains composés endogènes comme les hormones thyroïdiennes et leur activité est régulée par ces hormones (Masmoudi *et al.*, 1997).

La glucuronoconjugaison peut également conduire à la formation de glucuronides réactifs. Les glucuronides formés à partir de médicaments à structure carboxylique peuvent se fixer de manière covalente sur des protéines tissulaires ou plasmatiques pour former des adduits. Le glucuronide de kétoprofène se fixe de manière covalente sur les UGT provoquant une inhibition irréversible de la glucuronoconjugaison (Terrier *et al.*, 1999). Les adduits peuvent générer des effets toxiques et/ou immunoallergiques après administration de ces médicaments (Spahn-Langguth et Benet, 1992).

Il existe des maladies génétiques liées à l'absence d'UGT. Les syndromes de Gilbert et de Crigler-Najjar sont caractérisés par un taux important de bilirubine non-conjuguée dû à une absence complète ou partielle de l'UGT1A1. La bilirubine est un composé très toxique qui est formé par le catabolisme des hémoprotéines comme l'hémoglobine dont la seule voie d'élimination est la glucuronoconjugaison. L'inactivation de l'enzyme conduit à une accumulation de bilirubine dans le sérum. Au niveau cérébral, l'accumulation de bilirubine qui peut apparaître chez l'enfant lorsque la BHE n'est pas totalement fonctionnelle entraîne des séquelles neurologiques importantes et un retard mental.

La réaction de détoxification catalysée par les UGT peut être inhibée par une variété de composés endogènes, de médicaments, de polluants environnementaux, de substances toxiques naturelles, de certains aliments. De nombreuses substances endogènes comme les

acides biliaires, les hormones, le co-enzyme A et, les nucléotides inhibent ou régulent négativement l'activité des UGT. La novobiocine, un antibiotique de la famille des coumarines connu pour causer une hyperbilirubinémie chez les animaux et l'homme, produit une inhibition non compétitive *in vitro* et *in vivo* de l'UGT bilirubine dans le foie de rat. Les antidépresseurs dont l'imipramine et l'amitriptyline, le neuroleptique chlorpromazine, et les antihistaminiques prométhazine et cyproheptadine sont des inhibiteurs puissants de la glucuronoconjugaison de la testostérone, de l'androstérone, de l'estradiol, et du 1-naphtol. La diminution de la glucuronoconjugaison des hormones stéroïdiennes (5- α -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).

L'expression des UGT peut être augmentée en présence de substances inductrices caractérisées en trois classes majeures :

- Le phénobarbital et autres antiépileptiques induisent de nombreuses isoformes d'UGT en particulier celles qui conjuguent les molécules phénoliques non planes et les acides carboxyliques. Ce sont surtout les UGT de la famille 2B.
- Les hydrocarbures polycycliques aromatiques comme le 3-méthylcholanthrène ou la β -naphthoflavone induisent l'activité des UGT qui métabolisent les phénols plans (naphtol, 4-méthylumbelliférone) en particulier la famille 1A.
- Les proliférateurs de peroxisomes (clofibrates) sont des inducteurs sélectifs des UGT conjuguant la bilirubine.

L'induction ou l'inhibition des UGT peut conduire à une déstabilisation de la balance des composés endogènes, à une altération de la toxicité et de l'action de médicaments, à une augmentation de la mutagenèse et/ou à une augmentation du potentiel carcinogène de nombreux xénobiotiques (Grancharov *et al.*, 2001).

Il existe peu de données concernant l'influence de l'âge sur l'activité et l'expression des UGT. Plewk *et al.* (1997) ont montré que l'activité des UGT hépatiques est importante à la naissance puis diminue jusqu'à huit mois où elle atteint un plateau.

2.2.1.5. Répartition des UGT

Le foie est le site majeur de glucuronoconjugaison mais d'autres organes comme les poumons (Sutherland *et al.*, 1992, Villar *et al.*, 1998), le cerveau (Suleman *et al.*, 1998), la peau (Bélanger *et al.*, 1998 ; Vienneau *et al.*, 1995), les reins (Cheng, 1999 ; Mc Gurk, 1998),

l'intestin (Cheng, 1999 ; Strassburg, 1999 ; Sabolovic *et al.*, 2000), le système olfactif (Lazard *et al.*, 1991 ; Heydel *et al.*, 2001) possèdent une activité UGT. Certaines UGT sont exprimées spécifiquement dans certains tissus et pas dans d'autres comme l'UGT2A1 qui est présente dans la MO (Lazard *et al.*, 1991) et les BO (Heydel *et al.*, 2001). C'est également le cas des isoformes UGT1A8 et UGT1A10 qui sont présentes seulement dans l'intestin (Cheng *et al.*, 1999). Par contre, certaines UGT sont exprimées de façon ubiquitaire comme l'UGT1A6. Cette isoforme UGT1A6 a été détectée, par exemple, dans le cerveau (Suleman *et al.*, 1998 ; Brands *et al.*, 2000), dans le foie, dans les reins... Elle conjugue efficacement les phénols plans dont le 1-naphtol, qui provient de l'oxydation du naphthalène, et la 4-méthylumbelliférone. Mais ses substrats endogènes ne sont pas encore identifiés ni dans le cerveau, ni dans le foie.

a) UGT cérébrales

En 1987, Ghersi-Egea *et al.* ont mis en évidence une activité de glucuronoconjugaison envers le 1-naphtol dans le cerveau de rat. Cette activité est très inférieure à celle trouvée dans le foie. A l'opposé, la présence de très fortes activités UGT métabolisant le 1-naphtol a été détectée dans les plexus choroïdes (Leininger *et al.*, 1994 (b) ; Gradinaru *et al.*, 2001). D'autres études ont montré que l'activité des UGT envers le 1-naphtol et la 4-méthylumbelliférone sont supérieures dans les astrocytes par rapport aux neurones et supérieures dans les neurones par rapport à l'ensemble du cerveau (Suleman *et al.*, 1998). Les astrocytes doivent participer à la protection des neurones contre la toxicité éventuelle des xénobiotiques. Les études d'activité des enzymes métabolisant les médicaments, responsable de la détoxification et de l'inactivation pharmacologique des xénobiotiques ont trois intérêts. Premièrement, comme ces enzymes participent aux voies métaboliques endogènes, le métabolisme des médicaments peut interférer avec la synthèse ou le catabolisme de ces molécules. Deuxièmement, ces enzymes peuvent aussi générer des métabolites toxiques réactifs et/ou des radicaux libres. Ceci peut altérer le fonctionnement du SNC et induire à long terme une neurotoxicité par altération des protéines ou des lipides et par inactivation d'enzymes clés du métabolisme. Enfin, elles peuvent activer des molécules lipophiles et /ou des précurseurs en métabolites réactifs (Minn *et al.*, 1991). Toutes les molécules qui passent la BHE et qui pénètrent dans le cerveau sont susceptibles d'être métabolisées par les UGT présentes dans les différents types de cellules si elles possèdent des groupements fonctionnels reconnus par celles-ci. Les UGT présentes dans le cerveau doivent avoir pour rôle de le protéger des xénobiotiques. Une isoforme d'UGT, l'UGT1A6, a été identifiée et caractérisée

dans le cerveau de rat par Suleman *et al.* (1998). Chez l'homme, les activités des isoformes UGT1A6 et UGT2B7 ont été détectées (King *et al.*, 1999). D'autres isoformes d'UGT spécifiques comme la glucuronosyltransférase néolactotétracosylcéramide ont un autre rôle, celui de métaboliser des molécules complexes impliquées dans l'adhésion cellulaire en particulier dans l'adhésion neurone-astrocyte durant le développement du SNC (Kawashima *et al.*, 1992).

b) UGT olfactives

Lazard *et al.* (1990) ont démontré l'existence d'une isoforme spécifique, UGT2A1, dans l'épithélium olfactif de rat et de bœuf. L'expression de l'UGT2A1 est restreinte au système olfactif. Dans ce tissu, l'UGT2A1 est principalement localisée dans les glandes de Bowman et, dans les cellules sustentaculaires de la couche épithéliale superficielle (Lazard *et al.*, 1991). Récemment, Jedlitsky *et al.* (1999) ont identifié et caractérisé l'UGT2A1 chez l'homme. L'UGT2A1 humaine conjugue les phénols et les alcools monoterpénoïdes parmi lesquels de nombreuses molécules odorantes. Les enzymes de biotransformation, CYP, glutathion transférase et UGT, ont été mis en évidence dans les antennes qui représentent les organes olfactifs des mouches *Drosophila melanogaster*. Chez les insectes, les UGT utilisent l'UDP-glucose à la place de l'acide UDP-glucuronique des vertébrés. La conservation de l'expression de ces enzymes durant l'évolution implique que ces enzymes jouent un rôle important dans l'olfaction (Wang *et al.*, 1999). Les UGT présentes dans le système olfactif faciliteraient l'élimination des molécules odorantes en les métabolisant et participeraient aussi à l'arrêt du signal olfactif, car les métabolites ne pourraient plus interagir avec les récepteurs odorants. Ce phénomène conduirait à une diminution du signal olfactif ou à son arrêt. Il est associé à d'autres mécanismes comme la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G qui interviennent également dans l'arrêt de ce signal. Les UGT présentes dans la MO et les BO ont certainement d'autres rôles dont celui de protéger le SNC contre les xénobiotiques, la voie nasale étant une voie d'entrée directe de ces molécules dans le cerveau.

2.2.2. Les autres enzymes de phase II

2.2.2.1. Les glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases (GST) catalysent la conjugaison de composés électrophiles au glutathion (GSH). Les GST sont principalement localisées dans le cytosol, mais elles sont aussi actives dans les mitochondries et le RE. Elles participent au transport

intracellulaire d'hormones, de métabolites endogènes, de neurotransmetteurs, des drogues. Les GST sont impliquées dans la détoxification de radicaux toxiques dérivés de l'oxygène comme le radical hydroxyle OH[•], de xénobiotiques incluant des carcinogènes et des produits de la peroxydation lipidique. Bien qu'il existe un nombre considérable d'isoenzymes chez le rat, la souris et l'homme, elles sont regroupées en trois classes principales, α , μ et π . Cette classification est basée sur des propriétés structurales et catalytiques de leur sous-unités. Ces familles d'isoenzymes montrent des propriétés catalytiques distinctes et jouent des rôles différents dans la protection contre les toxiques. Ainsi, les isoformes de la classe α montrent généralement une activité peroxydasique élevée, celles de la classe π sont particulièrement actives envers l'acide éthacrynique, alors que le trans-stilbène oxyde est utilisé pour l'identification de la classe μ (Leininger *et al.*, 1994).

Dans le cerveau, le GSH participe surtout à la protection contre le stress oxydant par réduction directe des oxydants et par son implication dans plusieurs activités enzymatiques antioxydantes. Il est formé dans les neurones à partir de cystine fournie par les cellules gliales. Les GST sont impliquées dans la détoxification des dérivés réactifs de quinones formés durant l'auto-oxydation des catécholamines. Elles préviennent donc le cycle redox et le stress oxydatif (Baez *et al.*, 1997 ; Minn *et al.*, 1999). Les hormones sexuelles jouent un rôle important dans la régulation des GST cérébrales, mais le cofacteur GSH n'apparaît pas être sous l'influence de ces hormones. Plusieurs molécules d'origine exogène dont la MPTP et le manganèse peuvent inhiber l'activité GST cérébrale. L'exposition chronique à des poussières de manganèse produit des désordres neurologiques apparentés à la maladie de Parkinson, chez l'homme. Les GST ont également été détectées dans le système olfactif (Ben-Arie *et al.*, 1993).

2.2.2.2. Les méthyltransférases

Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyle à partir d'un donneur, généralement la S-adénosylméthionine, vers un accepteur nucléophile ayant un groupement phénol, amine ou thiol. Elles peuvent également prendre directement en charge des molécules exogènes portant au moins l'une de ces trois fonctions. Ces enzymes augmentent la lipophilicité de leurs substrats.

a) Les catéchol O-méthyltransférases

Principalement localisées dans le foie, les catéchol O-méthyltransférases (COMT) sont également localisées dans d'autres organes dont le cerveau où elles sont majoritairement cytosoliques (Karhunen *et al.*, 1994 ; Bonifacio *et al.*, 2000). Une forme membranaire a également été décrite dans le cerveau humain et le cerveau de rat. Les substrats physiologiques des COMT sont les catécholamines (dopamine, norépinéphrine, épinéphrine) et leurs métabolites. La localisation des COMT aux interfaces sang/LCR et sang/cerveau suggère qu'elles assurent une protection du milieu cérébral envers les catécholamines d'origine périphérique.

Plusieurs inhibiteurs des COMT ont été découverts, en particulier la tolcapone et l'entacapone qui sont des catéchols (Jorga *et al.*, 1998 ; Haasio *et al.*, 2001). Ces molécules sont utilisées avec la lévodopa pour traiter la maladie de Parkinson. La lévodopa est métabolisée par les COMT (Offen *et al.*, 2001). L'inhibition de ces enzymes conduit à un meilleur effet de la lévodopa et à un meilleur control des symptômes de la maladie de Parkinson mais elles sont toxiques pour le foie (Haasio *et al.*, 2001).

b) Les N-méthyltransférases

La phényléthanolamine N-méthyltransférase est un marqueur spécifique des neurones adrénergiques. Son accumulation dans les corps cellulaires des neurones semble contribuer à leur dégénérescence dans la maladie d'Alzheimer (Burke *et al.*, 1990).

La tryptamine N-méthyltransférase est une enzyme cérébrale spécifique qui convertit la tryptamine et la 5-hydroxytryptamine respectivement en N,N-diméthyltryptamine et en bufoténine. Ces composés hallucinogènes sont des produits naturels du métabolisme humains et seraient impliqués dans l'étiologie de la schizophrénie (Borchardt, 1980).

Le dysfonctionnement de l'amine N-méthyltransférase cérébrale est peut-être une des clefs de l'étiologie de la maladie de Parkinson. En effet, cette enzyme peut catalyser la N-méthylation de la 4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine en MPTP et de la 4-phénylpyridine en ion N-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺), métabolite du MPTP responsable d'un syndrome neurologique de type parkinsonien.

La phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase et l'histamine N-méthyltransférase sont deux méthyltransférases cérébrales dont seule l'implication dans le métabolisme endogène a été étudiée. La première catalyse la méthylation de la phosphatidyléthanolamine

en phosphatidylcholine, composant majeur des membranes cellulaires et de la myéline et précurseur de l'acétylcholine. La deuxième est localisée dans le cerveau et d'autres organes. Elle catalyse la méthylation de l'histamine, qui représente la première étape de l'inactivation de l'histamine.

c) Les thiol S-méthyltransférases

Dans le cerveau de rat, ces enzymes pourraient métaboliser des molécules soufrées en particulier des dérivés conjugués du glutathion.

2.2.2.3. Les N-acétyltransférases

Les N-acétyltransférases capturent le groupement acétyle de l'acétylcoenzyme A pour former un intermédiaire acétyl-enzyme qui va catalyser l'acétylation du substrat avec régénération de l'enzyme. Les substrats sont des amines primaires, généralement des arylalkylamines, des hydrazines et hydrazides, ainsi que des carcinogènes.

2.2.2.4. Les sulfotransférases

Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfate à partir d'un donneur, le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), sur des phénols, amines ou hydroxylamines. Elles interviennent dans le métabolisme de plusieurs classes de composés endogènes, mais leur faible spécificité permet la sulfoconjugaison de nombreux médicaments ou de leurs métabolites monooxygénés. Les sulfotransférases se présentent sous la forme d'une famille d'isoenzymes, parmi lesquelles les phénolsulfotransférases (PST) qui sont plus particulièrement impliquées dans le métabolisme des phénols. Les sulfotransférases sont impliquées dans le métabolisme des monoamines et probablement dans la synthèse du sulfate de prégnanolone, neurostéroïde antagoniste du GABA (Majewska et Schwartz, 1987). Ces enzymes sont également capables de sulfoconjuguer la morphine en 3- et 6-sulfates de morphine. Les propriétés analgésiques 6-sulfate de morphine sont trente fois plus élevées que celle de la morphine injectée directement dans les ventricules cérébraux (Brown *et al.*, 1985). Les sulfotransférases ont été localisées dans les cellules sustentaculaires de la MO de souris. Une forte activité de sulfoconjugaison a été détectée pour les molécules odorantes phénoliques alors qu'une plus faible activité est obtenue pour les molécules odorantes alcooliques. Cette forte activité des sulfotransférases suggère, comme pour les UGT, qu'elles ont un rôle important dans la perception olfactive et en particulier dans la terminaison du signal olfactif (Tamura *et al.*, 1997) La sulfoconjugaison et la glucuronoconjugaison sont

complémentaire, ce qui facilite l'élimination des métabolites. La glucuronoconjugaison est une voie de faible affinité pour les substrats mais de forte capacité métabolique alors que la sulfoconjugaison est une voie de forte affinité mais avec une faible efficacité. L'importance respective de chacune de ces voies métaboliques peut varier de façon considérable entre espèces, en fonction de la dose de substrat administrée, de facteur génétiques, de l'âge et de l'interaction éventuelle avec d'autres médicaments, avec des inducteurs ou des inhibiteurs et enfin, en fonction de l'état des fonctions hépatiques et rénales.

2.3. La phase III

Les métabolites formés lors de la biotransformation des xénobiotiques peuvent perturber l'homéostasie ou dans certains cas être toxiques. Leur clairance ou phase III est donc une étape cruciale du métabolisme des xénobiotiques.

La P-glycoprotéine (Pgp) ou MDR1, codée chez l'homme par le gène *mdr1* (*multidrug resistance*), est une pompe d'efflux énergie dépendante qui exporte ses substrats hors de la cellule. La Pgp humaine est souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses mais elle est aussi présente dans les tissus normaux comme le foie, le cerveau, l'intestin, les reins. La distribution tissulaire indique que la Pgp joue un rôle significatif dans l'excrétion des xénobiotiques et des métabolites dans l'urine et la bile, dans la lumière intestinale, et prévient leur accumulation dans le cerveau. La Pgp intervient dans la distribution des médicaments par un mécanisme d'excrétion urinaire pour les reins, un mécanisme d'excrétion biliaire pour le foie (Figure 21), par sa présence dans la BHE qui limite l'accumulation des médicaments dans le cerveau. L'inhibition de la fonction de transport de la Pgp peut causer des interactions médicamenteuses et augmenter la pénétration et l'accumulation des médicaments dans le cerveau (Tanigawara, 2000).

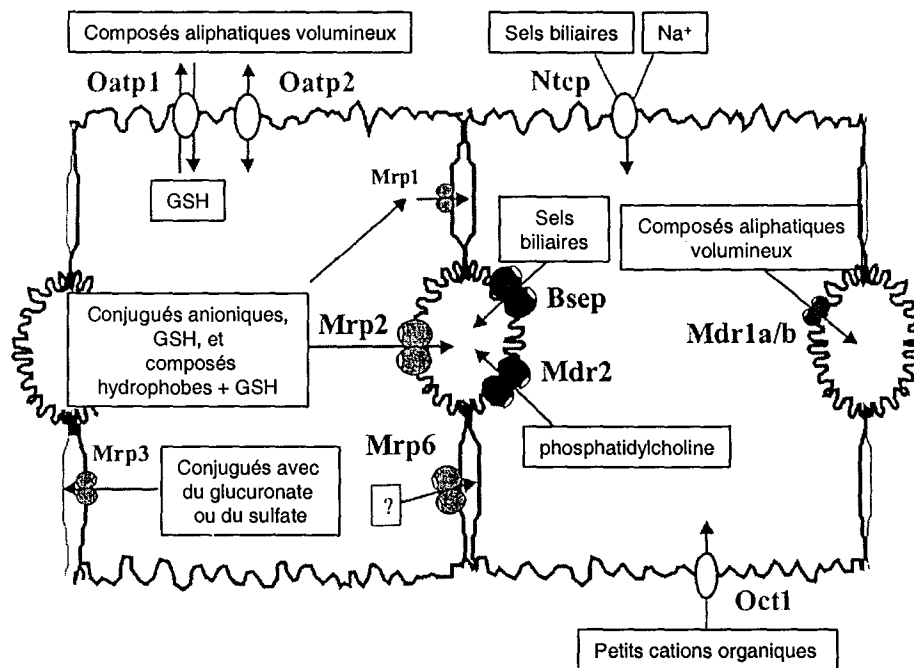


Figure 21 : Transport polaire dans les hépatocytes de rats, d'après Hooiveld et al. (2001). Le transport de protéine est représenté par des structures sphériques avec des flèches montrant la direction du transport. La taille des structures indique le taux d'expression des protéines dans le foie de rat normal (petite : faible expression ; large : forte expression). Les sels biliaires dont le taurocholate pénètrent dans les hépatocytes par le polypeptide co-transporteur sodium-taurocholate (Ntcp). Les polypeptides transporteurs d'anions organiques 1 et 2 (Oatp1 et Oatp2) sont responsables de l'entrée dépendante de la charge des composés organiques volumineux, incluant les sels biliaires et autres anions organiques, des glycosides cardiaques non chargés, des hormones stéroïdiennes, et certains cations organiques de type 2. Des données récentes indiquent que le transport de composés anioniques par Oatp1 est suivi par la sécrétion de glutathion intracellulaire (GSH). Les petits cations organiques de type 1 sont transportés par le transporteur de cations organiques Oct1. La P-glycoprotéine (MDR) et la protéine « multi-drug resistance » (MRP) ont été identifiées dans le foie de rat. Mdr1a/1b sont responsables de l'excrétion des composés aliphatiques volumineux dans la bile, alors que mdr2 est une phosphatidylcholine translocase. Les sels biliaires monovalents sont sécrétés dans les canalicules par la pompe d'export de sels biliaires (Bsep). Mrp2 est un transporteur d'anions organiques dans la membrane canaliculaire. Mrp1, exprimé à faible taux dans la membrane basolatérale d'hépatocytes normaux, a la même spécificité de substrat que Mrp2. Mrp3 transfère préférentiellement les glucuronoconjugués et les sulfoconjugués. Les substrats physiologiques de Mrp6 ne sont pas connus.

D'autres transporteurs de la famille des MRP (*multidrug resistance proteins*) ont été découverts. La MRP1, aussi appelée pompe de conjugués au GSH (pompe GS-X), permet l'extrusion des xénobiotiques conjugués avec le glutathion, le glucuronate, ou le sulfate (Keppler *et al.*, 1997 ; Wijnholds *et al.*, 2000). C'est également le transporteur majeur du leukotriène C₄ endogène, un important médiateur de la réponse inflammatoire (Leier *et al.*, 1994). La MRP1 transporte aussi les glucuronides de bilirubine, le glucuronide d'estradiol, les sels biliaires dianioniques comme l'hyodéoxycholate α -glucuronosyl et le glutathion réduit (GSSG). L'exportation de ce dernier permet de défendre la cellule contre le stress oxydant (Keppler *et al.*, 1998). Cette pompe semble également impliquer dans la modulation de l'action antiproliférative de certains agents antitumoraux (Ishikawa, 1992). Les MRP1 sont

présentes dans la membrane basale des cellules de Sertoli (Wijnholds *et al.*, 1998), dans la membrane basolatérale de l'épithélium des poumons (Wright *et al.*, 1998, Wijnholds *et al.*, 1998), dans le foie (Mayer *et al.*, 1995) et dans les plexus choroïdes (Rao *et al.*, 1999).

La MRP2, aussi appelée MRP canaliculaire (MRPC), est la forme canaliculaire de la MRP1. Elle est localisée dans le domaine apical de l'épithélium, en particulier dans la membrane des hépatocytes canaliculaires. La MRP2 comme la MRP1 est associée à la résistance envers plusieurs médicaments dans les tumeurs malignes. La spécificité de substrat des MRP1 et MRP2 est très différente de celle de la Pgp (Keppler *et al.*, 1997).

Le transporteur polypeptidique d'anions organiques 1 (OATP) accepte un grand nombre de substrats dont les acides biliaires, les conjugués au glutathion, le leukotriène C4, le glutathion. Ce transporteur est localisé dans la membrane basolatérale des hépatocytes, dans les cellules épithéliales des reins et dans la membrane apicale des plexus choroïdes. Le transporteur OATP2 est également présent dans le foie, les reins mais sa localisation cellulaire exacte n'a pas encore été déterminée. Gao *et al.* (1999) ont montré l'expression de OATP 2 dans les cellules endothéliales de la BHE et dans le pôle basolatéral des cellules épithéliales des plexus choroïdes, et la participation de ce transporteur dans les échanges actifs de médicaments entre le cerveau, le LCR et le sang. Le transporteur OATP 2 représente un important système d'efflux de la BHE pour de nombreux substrats amphipatiques alors que la Pgp entraîne un efflux rapide et unidirectionnel de composés potentiellement toxiques.

3. LES MOLECULES ETUDIEES

Trois types de molécules ont été étudiés : des molécules odorantes, des AINS et des catéchols.

3.1. Les molécules odorantes

Nous avons sélectionné une vingtaine de molécules odorantes de structure moléculaire variée pour étudier leur conjugaison par les UGT et mettre en évidence un rôle éventuel de ces enzymes dans l'olfaction. Ces molécules ont été choisies en fonction de leur structure chimique et de leur potentialité à être conjuguées. En particulier, des alcools, des acides carboxyliques et des phénols ont été utilisés.

Les molécules à structure aliphatiques sont l'acide caprylique, le géraniol, le *trans*-2-hexène-1-ol, le 1-nonanol, le β -citronellol, l'alcool isoamylique, l'acétate d'isoamyle et le 1-octène-3-ol (Figure 22). Les monoterpénoïdes en particulier le géraniol sont des composés produits par beaucoup de plantes, incluant le raisin et le houblon. Les réactions de biotransformation impliquant les monoterpénoïdes ont été caractérisées dans les champignons filamenteux et dans quelques levures. Le géraniol, par exemple, peut être réduit en citronellol par des levures dont la *Saccharomyces cerevisiae*. Les monoterpénoïdes sont en contact avec les levures durant la fabrication du vin ou de la bière, les réactions de biotransformation apparaissant lors de la fermentation (King *et al.*, 2000). Le *trans*-2-hexène-1-ol peut provenir des feuilles vertes des plants de pommes de terre, et fait partie de la composition essentielle de l'odeur qui attire certains coléoptères sur ces feuilles (De Jong et Visser, 1988). L'alcool isoamylique est un composant du thé à base d'aiguilles de pin (Kim *et al.*, 2000). L'acétate d'isoamyle a une odeur de banane. Le 1-octène-3-ol est une substance volatile qui émane généralement des odeurs corporelles de l'homme et d'autres animaux. Cette molécule attire beaucoup d'espèces d'insectes et serait le ligand d'une OBP bovine (Ramoni *et al.*, 2001).

Le carvacrol, l'alcool coniféryle, l'eugénol, l'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, l'anisole, le 4-hydroxydiphényl et le naphthol sont des substances phénoliques dont la structure est représentée Figure 23. La plupart de ces molécules sont extraites des plantes.

Les autres molécules utilisées ont une structure chimique cyclique non phénolique (Figure 24). Ces molécules sont le (+) et le (-)-bornéol, l'acide camphorcarboxylique, le cinéole, le (-)-nopol, le menthol, le (-)-myrtanol et la (-)-nicotine.

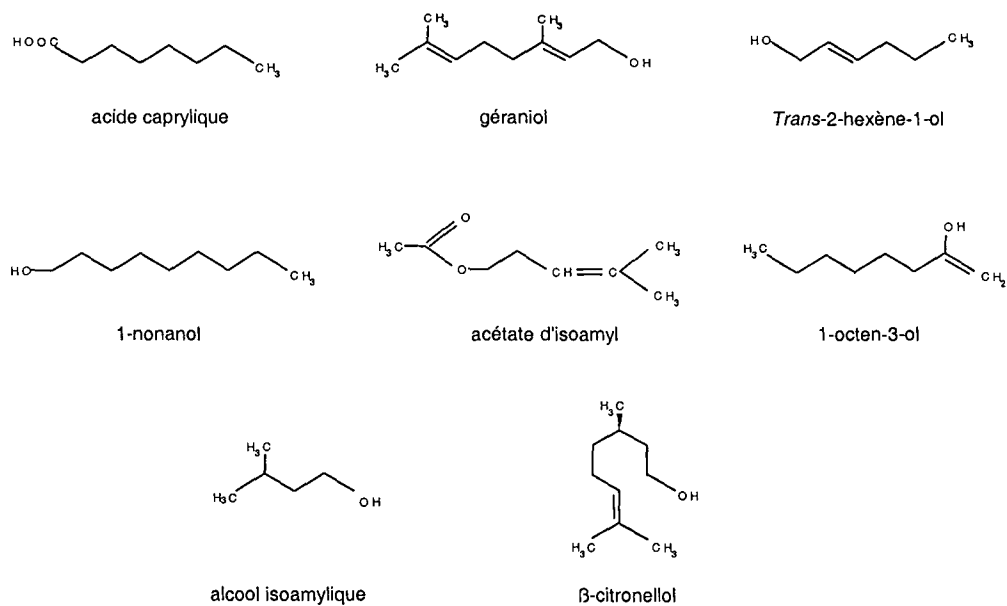


Figure 22 : Molécules odorantes à structure aliphatique

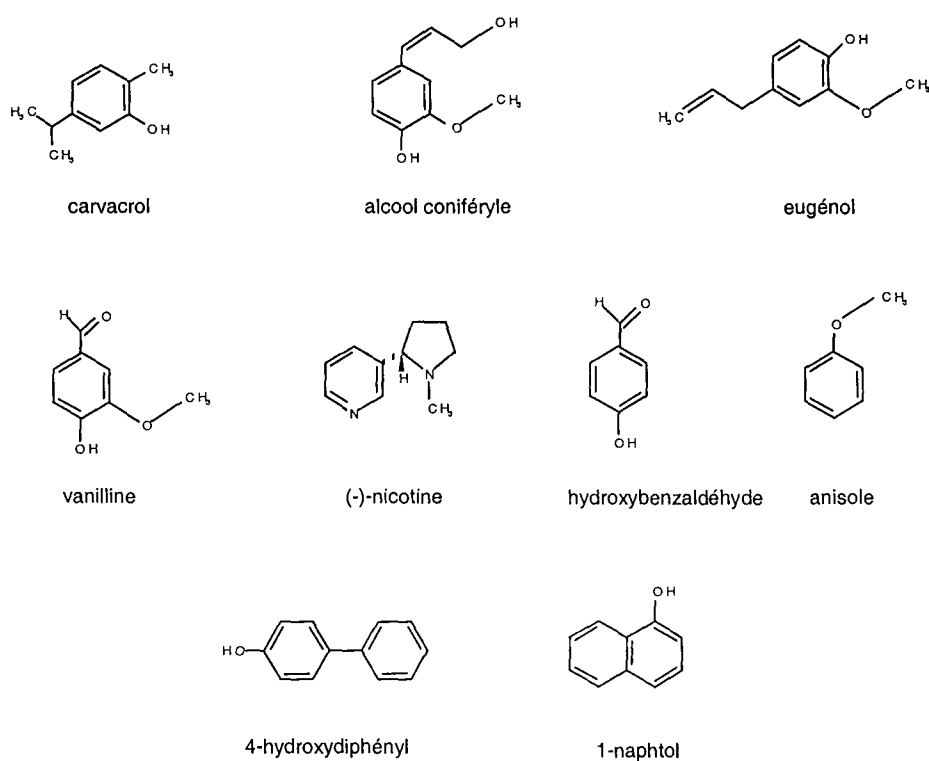


Figure 23 : Molécules odorantes à structure phénolique

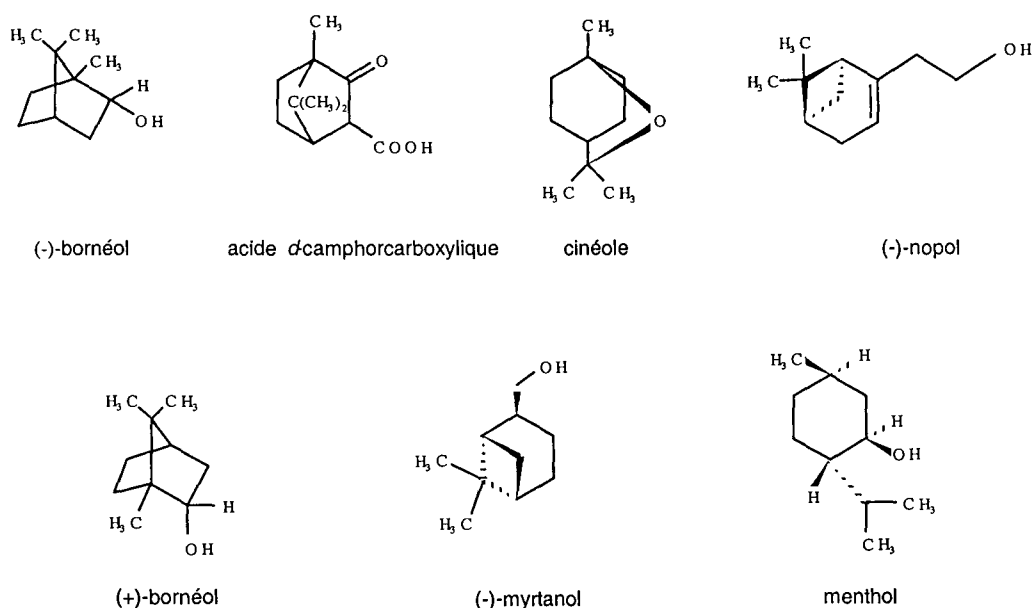


Figure 24 : Molécules odorantes à structure cyclique non phénolique

3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les AINS et le paracétamol sont des molécules qui passent la BHE et dont la structure est montrée figure 25. Ils bloquent la synthèse des prostaglandines qui sont à l'origine des signes principaux de l'inflammation (fièvre, douleur, œdème...). Les enzymes cibles des AINS sont les cyclooxygénases (COX) qui convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine H_2 (PGH_2). Le métabolisme de PGH_2 conduit aux diverses prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes. Il existe deux isoformes de COX : COX-1 qui est constitutive, et COX-2 qui est inducible par les médiateurs de l'inflammation. Cependant, la COX-2 est exprimée constitutivement dans le cerveau et les reins. Les AINS classiques, aspirine et autres AINS de type profène, n'ont qu'une faible affinité pour COX-2 comparativement à COX-1 d'où l'administration de fortes doses pour obtenir une action anti-inflammatoire. Pour limiter les effets secondaires (irritation de l'estomac, néphrotoxicité) de ces AINS liés à une inhibition de COX-1, de nouveaux AINS inhibiteurs spécifiques de COX-2 (Celecoxib, Rofecoxib, Vioxx...) sont actuellement à l'étude, certains ayant déjà une autorisation de mise sur le marché (Blain *et al.*, 2000).

Différents travaux montrent que ces molécules passent la BHE. Le *R*- et *S*-kétoprofène (acide 3-benzoyl-2-phénylpropionique) se retrouvent rapidement dans le liquide céphalo-rachidien lorsqu'il est injecté par voie intramusculaire (Netter *et al.*, 1985). Ce médicament a

aussi un effet analgésique central (Willer *et al.*, 1989). Le dextkétoprofène ((+)-s-kétoprofène) inhibe les COX cérébrales (Carabaza *et al.*, 1997) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens agissent sur la régulation de la température corporelle. Enfin, une étude épidémiologique montre que l'incidence de la maladie d'Alzheimer chez les patients traités de façon chronique aux AINS est significativement diminuée (Andersen *et al.*, 1995). Ces différentes études confirment donc que les AINS pénètrent et agissent dans le cerveau.

De plus, de nombreux médicaments anti-inflammatoires ont été associés à des dysfonctionnements du goût et de l'odorat. Les AINS, inhibiteurs potentiels des prostaglandines, pourraient affecter le goût par ce système d'inhibition qui interfère avec le métabolisme du zinc. Des données expérimentales ont démontré un rôle spécifique du zinc dans la fonction de goût. Une déplétion en zinc induit une perte du goût et des pathologies spécifiques à l'anatomie du système gustatif. Les AINS pourraient également diminuer la sécrétion de mucus, induire des lésions de la muqueuse et altérer la fonction des récepteurs du goût (Henkin, 1994 ; Norés *et al.*, 2000).

La voie principale de biotransformation des AINS est la conjugaison par les UGT en particulier l'isoforme UGT2B1 chez le rat et l'isoforme UGT2B7 chez l'homme. Les AINS et analgésiques dont nous avons étudié la glucuronoconjugaison dans les astrocytes sont l'aspirine, l'ibuprofène, le naproxène, le kétoprofène et le paracétamol. L'aspirine (ou acide acétylsalicylique) appartient à la famille des salicylates alors que l'ibuprofène, le naproxène et le kétoprofène sont des acides propioniques (Bursaux, 1994). Le paracétamol est analgésique et antipyrétique. Le naproxène et le paracétamol sont conjugués en partie par l'UGT1A6 au niveau du foie (el Mouelhi *et al.*, 1993). Nous nous sommes intéressés à ces molécules parce qu'elles passent la BHE pour pénétrer dans le cerveau et sont glucuronoconjuguées. La glucuronoconjugaison du kétoprofène, du naproxène, de l'ibuprofène et de l'étodolac a également été étudiée dans les homogénats de BO, de MO et de cerveau total. Actuellement, les AINS ne sont pas administrés par voie nasale. Cependant, si l'une des isoformes qui les conjuguent est présente dans les BO ou la MO, il sera possible de détecter la formation de glucuronoconjugués.

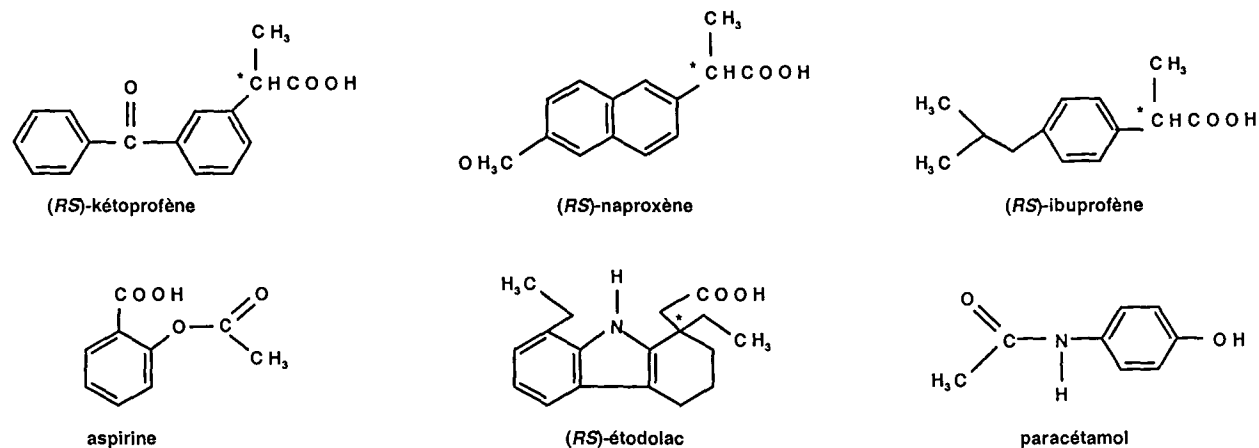


Figure 25 : Structure des anti-inflammatoires non stéroïdiens étudiés, * : carbone asymétrique.

3.3. Les catéchols

Les catéchols ont une structure de base commune constituée d'un cycle 1,2-dihydroxybenzène (figure 26).

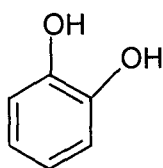


Figure 26 : Structure de base d'un catéchol

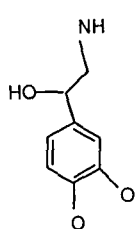
Les catéchols que nous avons étudié peuvent être classés en quatre groupes (Figure 27):

- Les catéchols simples : 4-nitrocatéchol, pyrocatéchol, pyrogallol, acide gallique, 8-hydroxyquinoline.
- Les neurotransmetteurs et médicaments dopaminergiques : adrénaline, noradrénaline, dopamine, L-DOPA, apomorphine, dobutamine.
- Les catéchols estrogènes : 2-hydroxyestrone, 4-hydroxyestradiol.
- Les inhibiteurs de COMT : tolcapone, entacapone, nitécapone.

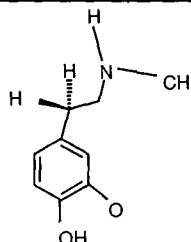
Les catéchols, et particulièrement les catécholamines, sont potentiellement toxiques et leur oxydation *in vivo* est fréquemment considérée comme un facteur déclencheur de

pathologies, incluant la schizophrénie et la maladie de Parkinson (Roginsky, 1997). Le métabolisme et l'auto-oxydation de ces molécules génèrent des formes activées de l'oxygène. La production de mélanine est corrélée à la cytotoxicité induite par la dopamine et la L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), la mélanine étant le produit final de l'auto-oxydation de ces molécules. Sa toxicité a été récemment établie sur des neurones et des astrocytes (El Bachà *et al.*, 2001). La L-DOPA, précurseur de la dopamine, est le principal agent thérapeutique utilisé pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson. Mais l'efficacité de la thérapie diminue avec la durée du traitement à la L-DOPA. Il a été suggéré que ce traitement puisse aggraver le processus de dégénération des neurones dopaminergiques des patients atteints de la maladie de Parkinson (Lai et Yu, 1997). L'apomorphine, un autre catéchol agoniste de la dopamine, est aussi utilisée pour le traitement de cette maladie (Ben-Shachar *et al.*, 1995). Les catéchols étudiés dans les astrocytes sont l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine, la L-DOPA, l'apomorphine, le 4-nitrocatechol, le pyrocatechol, le pyrogallol, l'acide gallique, la dobutamine, le 2-hydroxyestrone, le 4-hydroxyestradiol, la tolcapone, l'entacapone et la nitécapone. Ces trois derniers catéchols sont des inhibiteurs des COMT. Nous avons également étudié la glucuronoconjugaison de l'apomorphine et le 4-nitrocatechol dans les BO et la MO. Certaines de ces molécules comme l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine sont produites dans le cerveau, les autres passent la BHE.

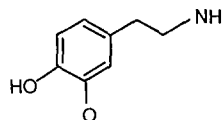
Neurotransmetteurs et médicaments dopaminergiques :



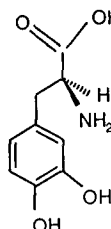
noradrénaline



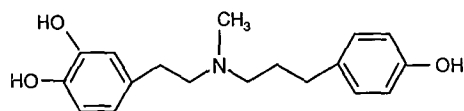
adrénaline



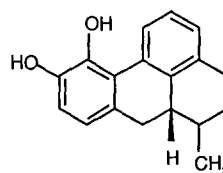
dopamine



L-dopa

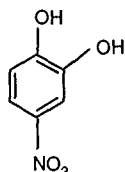


dobutamine

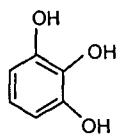


apomorphine

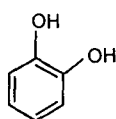
Catéchols simples :



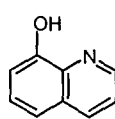
4-nitrocatéchol



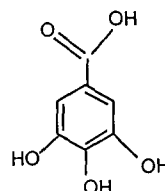
pyrogallol



pyrocatéchol

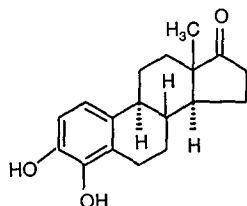


8-hydroxyquinoline

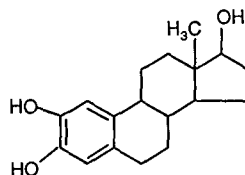


acide gallique

Catéchols estrogènes :

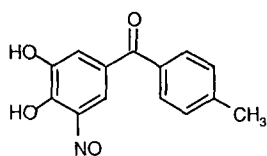


2-hydroxyestrone

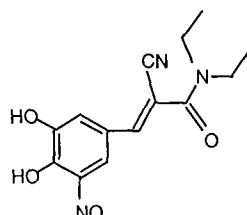


4-hydroxyestradiol

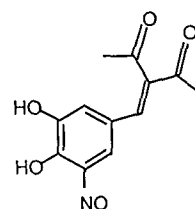
Inhibiteurs de COMT :



tolcapone



entacapone



nitécapone

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La MO représente un interface fonctionnel entre le cerveau et le milieu extérieur puisqu'elle permet de recueillir des informations sensorielles de l'environnement pour les transmettre au SNC où l'information est traitée. Elle représente également un autre interface puisque les molécules de cet environnement peuvent atteindre le SNC par cette voie. Ceci a été montré pour des médicaments, des drogues (cocaïne), et des sels de métaux lourds (cadmium, mercure) (Hasting et Evans, 1991). Les UGT présentes dans ces différents organes interviendraient dans la détoxification de certaines de ces molécules en les métabolisant. Cette hypothèse est confortée par plusieurs travaux antérieurs qui montrent qu'au niveau d'autres interfaces comme la BHE ou les plexus choroïdes, les UGT assurent une protection métabolique du SNC (Leininger *et al.*, 1994 ; Gradinaru *et al.*, 2001). Les UGT présentes dans les différents organes qui constituent le tractus olfactif semblent donc participer à cette protection. De plus, elles interviendraient dans l'arrêt du signal olfactif en conjuguant les molécules odorantes. En fait, les UGT présentes dans la MO joueraient un rôle dans la perception olfactive des molécules odorantes en modulant leur concentration au niveau de la muqueuse et/ou en modulant la capacité de ces molécules à interagir avec les récepteurs correspondants.

Lors de ce travail, nous avons cherché à établir le rôle des UGT dans l'olfaction par une approche pluridisciplinaire faisant intervenir des techniques de culture cellulaire, biologie moléculaires, et biochimie. Nous avons étudié les activités métaboliques, la localisation et l'expression des ARNm de ces enzymes dans la MO, les BO et le cerveau, ces trois organes participant respectivement à l'initiation, à la transmission et au traitement du signal olfactif. La technique de chromatographie sur couche mince décrite par Bansal et Gessner (1980) nous a permis de déterminer la spécificité de substrats des UGT présentes dans ces différents organes. Nous avons également développé une technique d'hybridation *in situ* pour localiser les ARNm des isoformes UGT2A1 et UGT1A6 sur des coupes tissulaires. Parallèlement, J.M. Heydel, de l'équipe de Dijon dirigée par le professeur Artur, a identifié les UGT présentes dans les différents organes par une technique de RT-PCR quantitative. Comme la perception olfactive diminue lors du vieillissement, nous avons étudié les variations de glucuronoconjugaison au cours du développement.

L'activité de glucuronoconjugaison du 1-naphtol qui est un bon substrat pour l'UGT1A6, a été étudiée par une technique de fluorimétrie et comparée pour dans deux modèles cellulaires, des astrocytes en culture primaire et provenant d'une lignée immortalisée (cellules C6). Par chromatographie sur couche mince, la capacité métabolique des UGT

envers des catéchols et des AINS a été étudiée. Ces deux familles de molécules traversent la BHE et atteignent le SNC où elles peuvent provoquer, éventuellement, des effets secondaires. De nombreux catéchols sont des molécules à visée thérapeutique pour le cerveau. Les AINS sont conjugués au niveau du foie, principal organe de glucuronoconjugaison, par l'UGT1A6 et d'autres isoformes. Ils peuvent pénétrer dans le SNC même si ce n'est pas leur site d'action. Le SNC doit alors les métaboliser pour se protéger et maintenir l'homéostasie nécessaire à son fonctionnement. L'objectif de ce travail a également été de caractériser les astrocytes en culture comme modèle *in vitro* d'étude de la glucuronoconjugaison cérébrale. En effet, des travaux précédents ont montré que l'activité de glucuronoconjugaison existe dans le cerveau et qu'elle diffère selon le type cellulaire. L'activité métabolique des UGT trouvée dans les astrocytes est notamment supérieure à celle détectée dans les cellules endothéliales et dans les neurones (Suleman *et al.*, 1998). Nous avons donc utilisé des astrocytes en culture confluente pour étudier l'activité métabolique des UGT astrocytaires envers des médicaments appartenant à deux familles chimiques différentes, les catéchols et les AINS, par fluorimétrie ou par chromatographie sur couche mince.

Pour ce travail, nous avons ainsi utilisé des astrocytes de deux provenances différentes :

- Des cellules immortalisées de la lignée astrocytaire C6 provenant d'un gliome de cerveau de rat.
- Des cellules en culture primaire réalisée à partir de cortex cérébraux de rats nouveau-nés (Booher et Sensenbrenner, 1972).

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL

1.1. Réactifs biochimiques

Les molécules odorantes : 1-naphtol, acide caprylique, géraniol, *trans*-2-hexen-1-ol, 1-nonanol, β -citronellol, carvacrol, alcool coniféryle, eugénol, *p*-hydroxybenzaldéhyde, vanilline, (-)-bornéol, (+)-bornéol, 4-hydroxydiphényle, anisole, 1-octène-3-ol, acide camphorcarboxylique, (-)-nopol, (-)-menthol, (-)-nicotine, acétate d'isoamyle, (-)-myrtanol et cinéole proviennent de chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'alcool isoamylique de chez Merck (Damstadt, Allemagne). L'apomorphine provient de chez Sigma, les capones de chez ORION Pharma (Espoo, Finlande), les autres catéchols de Fluka (Buchs, Suisse). L'UDPGA (sel de sodium) est fournis par Boehringer (Mannheim, Allemagne). Le acide UDP-[U-¹⁴C]-glucuronique (10-14 Gbq/mmol) ([¹⁴C]-UDPGA) provient de chez NEN Life Science Products (Boston, MA). Tous les autres produits chimiques utilisés sont de qualité analytique et proviennent de chez Merck ou Sigma.

Les plaques de chromatographie sur couche mince composé d'un gel de silice (LK6DF, gel de silice cannelé 20 x 20 cm dont les pores ont une épaisseur de 60 Å) sont fournies par Whatman (Saint-Quentin, France). Le 2-(4-*t*-butylphényl)-5(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole (butyl-PBD) provient de Merck.

1.2. Réactifs de biologie cellulaire et moléculaire

Les milieux de culture *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), *Dulbecco's modified Eagle's medium MixF12* (DMEM Mix F12) et *alpha Modified Eagle Medium* (α MEM), le sérum de veau fœtal (SVF), les antibiotiques (streptomycine, pénicilline), l'amphotéricine B, la L-glutamine, la gentamycine sont fournis par Gibco-BRL (Eragny, France). Le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) et le pyruvate de sodium proviennent de chez Boehringer, le Nu-serum[®] de chez TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France). L'acide *n*-butyrique (sel de sodium), l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (hépès), le saccharose sont fournis par Sigma. Le tampon phosphate (PBS, « Phosphate Buffer Saline ») provient de chez Eurobio (Les Ulis, France).

Le Triton X-100, l'eau oxygénée proviennent de chez Sigma. Pour l'immunohistochimie, deux kits sont utilisés. Le premier contient le sérum bloquant, l'anticorps secondaire biotinylé et le complexe avidine-biotine (« Novostain rabbit super ABC kit (rabbit) » ; Novocastra, Newcastle, Angleterre). Le kit « liquid DAB substrate » (Novocastra, Newcastle, Angleterre) permet de révéler la réaction. Les anticorps anti-COX-1 et anti-COX-2 sont fournis par Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA).

Le trizol, l'inhibiteur de RNase sont fournis par Gibco-BRL. La DNase « RQ1 RNase-free Dnase » provient de chez Promega (France). La transcriptase inverse MMLV (« Moloney Murine Leukemia Virus ») et la TAQ polymérase sont fournies par Eurobio. Les enzymes de restriction *EcoR* I et *Pvu* II proviennent de chez Gibco-BRL.

Les fragments de PCR sont purifiés par le kit « PCR reaction using QIAquick Gel extraction kit protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France), et lié dans un vecteur pCR[®]II-TOPO (Invitrogen, Groningen, Nederland). Ce vecteur est amplifié dans des cellules *E. Coli* compétentes TOP10 One Shot[™] (Invitrogene). La synthèse des sondes se fait grâce aux nucléotides marqués à la digoxigénine (« DIG RNA labelling Mix ») de Boehringer. La concentration des sondes est estimée par comparaison à un témoin « Dig-labeled Control RNA » (Boehringer). Les enzymes T7 polymérase et SP6 polymérase sont fournies par Promega. La protéinase K, le paraformaldéhyde, la triéthanolamine, le formamide désionisé, le Diméthylpyrocarbonate (DMPC), le sulfate de dextran, la solution de Denhardt, les ARN de transfert de levure, l'ADN de sperme de saumon, la RNase A, le sérum normal de chèvre, le NBT, le BCIP et le vert de méthyle proviennent de chez Sigma. L'anhydride acétique est fourni par Merck et les anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline sont fournis par Boehringer.

2. PREPARATION DES HOMOGÉNATS TISSULAIRES DE MUQUEUSE OLFACTIVE, BULBES OLFACTIFS, ET CERVEAU

Les expériences sont réalisées sur des rats Wistar (Janvier, France) de 1 jour, 1 semaine, 2 semaines et des rats mâles de 3 mois, 12 mois et 24 mois. Les animaux sont maintenus sous les conditions standards de laboratoire c'est-à-dire des cycles lumière/obscurité de 12h/12h, un accès non restreint à la nourriture et à l'eau et une température ambiante de 22-24 °C. Pour

obtenir des rats nouveau-nés, d'une semaine et de deux semaines, deux femelles et un mâle sont mis ensemble pendant 48 heures, puis les femelles gestantes sont placées dans des cages séparées.

Cette étude a été approuvée par le Comité Local d'Ethique de l'Expérimentation Animale.

Pour prélever les différents tissus, les rats sont sacrifiés par décapitation, le cerveau et les BO sont rapidement prélevés, alors que la MO est grattée délicatement dans du LCR artificiel (124 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,24 mM KH₂PO₄, 1,3 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose) pour enlever les débris de cartilage. Les échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

Les différents échantillons sont homogénéisés à 4 °C dans du tampon 50 mM phosphate de potassium (pH 7,4), 1 mM, EDTA, 0,1 mM DTT en utilisant un homogénéisateur en verre de Dounce. Nous avons utilisé des homogénats à cause de la faible quantité de MO récupérée qui ne nous permettait pas d'isoler les microsomes.

3. ISOLEMENT DES MICROSOMES

3.1. Culture cellulaire d'astrocytes

Les cellules cultivées sont des cellules gliales de rats. Les cellules C6 (ATCC, Interchim, Montluçon, France) sont une lignée d'astrocytes provenant d'un gliome et les astrocytes en culture primaire proviennent de rats Wistar nouveau-nés.

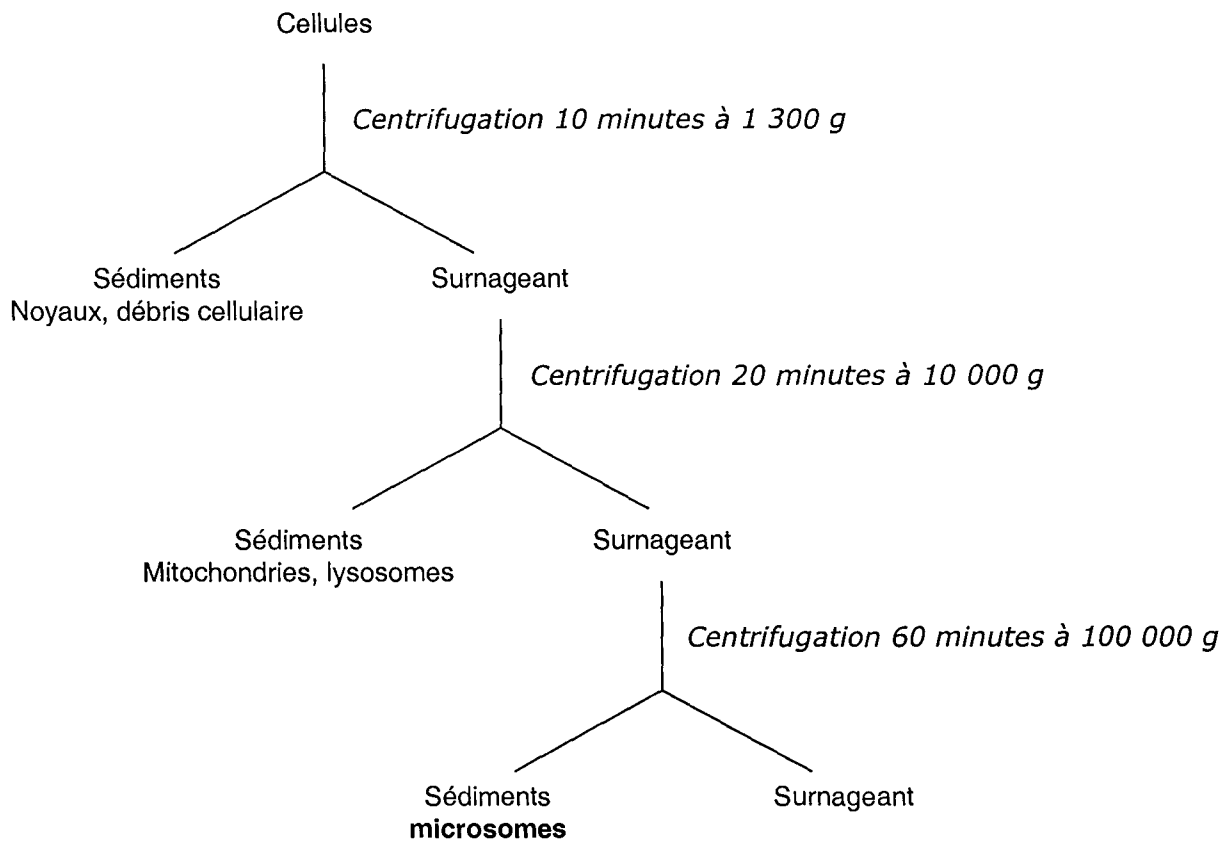


Figure 27 : Schéma de l'isolement des microsomes.

Le milieu de culture des cellules de la lignée C6 est composé des milieux DMEM Mix F12 et α MEM (1 : 1, v/v) additionnés de 10 % (v/v) de SVF inactivé par la chaleur, d'un mélange d'antibiotiques et d'un antifongique (100 μ g/ml de streptomycine, 100 unités/ml de pénicilline et 0,25 μ g/ml d'amphotéricine B), de 2 mM de L-glutamine, et de 1 ng/ml de bFGF. Les cellules sont conservées dans du milieu de culture contenant 5 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) (v/v) et 30 % de SVF inactivé par la chaleur, et stockées dans l'azote liquide. Après ensemencement, les cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % CO₂. Les cellules sont à confluence en 3-4 jours.

Les cultures primaires sont préparées selon la technique développée par Booher et Sensenbrenner (1972). Deux femelles Wistar et un mâle sont mis en accouplement pendant 48 heures. La gestation dure vingt et un jours. Les rats nouveau-nés sont décapités, et les parties dorsales droite et gauche du cortex cérébral sont prélevées en conditions stériles et plongées dans du milieu de culture DMEM supplémenté par 10 % de SVF (v/v), 2 mM de L-glutamine et 50 μ g/ml de gentamycine. Les méninges sont soigneusement enlevées. Les cellules du cortex sont dissociées par passages lents et successifs à travers une aiguille hypodermique,

dans un faible volume (10 à 20 ml) de milieu de culture. Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri et mises à incuber à 37°C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine. Les cultures sont à confluence après vingt jours environ. Quand les cellules dissociées d'hémisphères cérébraux de rats nouveau-nés sont mises en culture dans ces conditions, ce sont essentiellement des cellules de type astrocytaire qui survivent et se développent. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine.

3.2. Lignée V79-UGT2B1

La lignée cellulaire V79 (fibroblastes de poumon de hamster chinois) transfectée de manière stable par l'isoforme de rat UGT2B1 a été établie par Pritchard *et al.* (1994). Les cellules V79 sont cultivées en monocouche dans du milieu DMEM complet supplémenté par 5 % de Nu-serum®, des antibiotiques (100 µg/ml de streptomycine et 100 unités/ml de pénicilline), 2 mM de L-glutamine et de 1 mM de pyruvate de sodium. L'expression des UGT recombinantes est augmentée par traitement des cellules pendant 24 heures avec 2 mM d'acide *n*-butyrique avant récolte.

3.3. Isolement des microsomes

L'UGT étant localisée dans les membranes du réticulum endoplasmique, l'étude de glucuronoconjugaison est réalisée sur des microsomes préparés par centrifugations différentielles successives selon la méthode décrite par Walther *et al.* (1987).

Lorsque les cellules astrocytaires sont à confluence, elles sont récupérées par grattage dans du tampon phosphate contenant 50 mM de KH₂PO₄ / K₂HPO₄ (pH 7,4), 1 mM d'EDTA et 0,1 mM de DTT. Une première centrifugation à 2 000 g pendant 10 minutes permet la récupération du culot cellulaire. Ce culot est remis en suspension dans le tampon phosphate. Les cellules sont ensuite soniquées, les tubes étant placés dans la glace, à une intensité de 60 W pendant 50 secondes. Une deuxième centrifugation à 1 300 g pendant 10 minutes permet de sédimenter les noyaux et les débris cellulaires. Cette centrifugation est suivie d'une troisième à 10 000 g pendant 20 minutes qui permet de sédimenter les mitochondries et lysosomes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 100 000 g pendant une heure. Le culot correspondant à la fraction microsomiale est remis en suspension dans du tampon contenant 100 mM de K₂HPO₄ / K₂HPO₄ (pH 7,4), 1 mM d'EDTA et 20 % de glycérol (v/v).

Les cellules V79-UGT2B1 sont grattées dans du PBS. Les fractions membranaires sont préparées à partir d'homogénats cellulaires, par ultracentrifugations différentielles selon une technique adaptée de Battaglia *et al.* (1994). Les culots cellulaires sont mis en suspension dans du tampon 5 mM Hépès (pH 7,4), 0,25 M saccharose, soniqués trois fois 10 secondes, puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Les fractions membranaires sont obtenues par ultracentrifugation du surnageant à 100 000 g pendant 1 heure.

Les microsomes et les homogénats sont conservés à -80°C .

4. DOSAGE DES PROTEINES

La concentration des protéines présentes dans les homogénats et les microsomes est déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951), utilisant l'albumine bovine comme standard.

5. DOSAGE DES GLUCURONIDES

Les glucuronides sont synthétisés dans des conditions optimales de pH, de température et de temps et sont séparés par deux méthodes, la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

5.1. Chromatographie sur couche mince

La technique de Bansal et Gessner (1980) permet de séparer les glucuronides formés du substrat et de l'UDPGA non utilisé grâce à leur différence de polarité, par CCM suivie d'une autoradiographie. La phase stationnaire est composée d'un gel de silice et la phase mobile est apolaire. L'UDPGA, substance polaire, se fixe à la silice et donc migre peu. Par contre, l'aglycone apolaire migre avec la phase mobile et le glucuronide de polarité intermédiaire a une distance de migration entre les deux. Cette technique est à la fois qualitative par la mise en évidence d'un signal sur le film d'autoradiographie (Figure 29) et quantitative puisque le ^{14}C -glucuronide récupéré par grattage est compté.

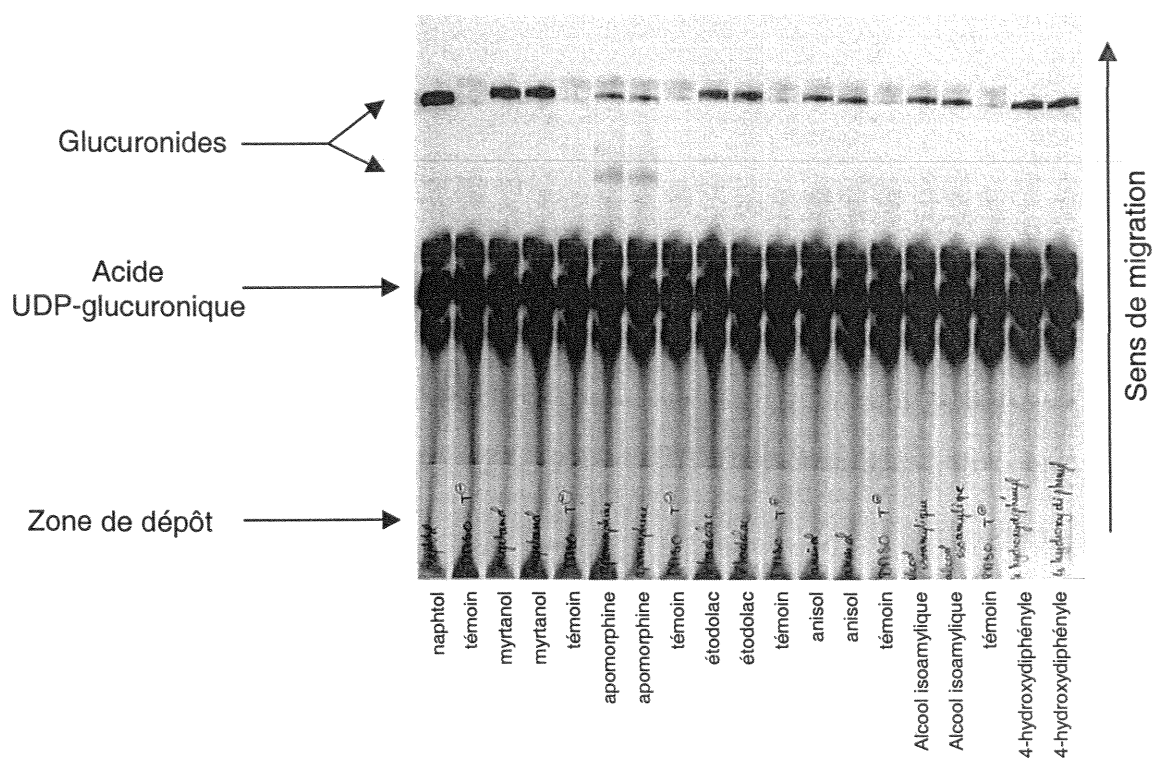


Figure 28 : exemple de film autoradiographique obtenue lors d'une technique de chromatographie sur couche mince.

Cette technique implique l'utilisation du $[^{14}\text{C}]$ -UDPGA. Pour chaque expérience, un témoin positif est réalisé avec du 1-naphtol comme substrat et plusieurs témoins négatifs sans substrat sont aussi réalisés.

Pour optimiser la glucuronoconjugaison des molécules odorantes et des catéchols, les microsomes sont activés par du Triton X-100 (rapport optimal Triton/protéine de 0,15) pendant 15 minutes dans la glace (Suleman *et al.*, 1993). L'UGT étant ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique, l'action de détergents va faciliter l'accès du cofacteur au site actif de l'enzyme. Les microsomes sont ensuite incubés à 37°C pendant 1 heure avec du tampon 100 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM de MgCl_2 , 2,5 mM d'UDPGA, 0,1 μCi de $[^{14}\text{C}]$ -UDPGA et 1 mM de substrat dissous dans du DMSO (volume final 40 μl).

Pour les AINS, les microsomes sont activés par de la digitonine dissoute dans du tampon 0,25 M de saccharose, 1 mM d'EDTA (rapport optimal digitonine/protéine de 1) pendant 15 minutes dans la glace. Les microsomes sont ensuite incubés à 37°C pendant 1 heure avec du tampon 100 mM d'acétate de sodium (pH 5,4), 10 mM de MgCl_2 , 2,5 mM de l'UDPGA, 0,1 μCi de $[^{14}\text{C}]$ -UDPGA, 1 mM de substrat, et 5 mM de la saccharonolactone. La saccharonolactone inhibe les β -glucuronidases actives à un pH acide et qui dégradent les glucuronides formés.

Les réactions sont arrêtées avec de l'éthanol absolu à la dilution finale 1/1, (v/v). Les protéines précipitées sont ensuite centrifugées à 3 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant (60 µl) est alors déposé sur une plaque de CCM. Cette plaque est mise à sécher une nuit sous une hotte ventilée puis déposée verticalement dans une cuve contenant une phase mobile composée de *n*-butanol, d'acétone, d'acide acétique, d'ammoniaque 25 % et d'eau (35/25/9/1/30 ; v/v) qui va entraîner la séparation des différents produits de réaction. La plaque séchée est ensuite pulvérisée avec une solution de butyl-PBD 1 % dans du toluène pour améliorer la sensibilité de l'autoradiographie. Elle est à nouveau séchée environ une heure avant autoradiographie. La plaque est mise en contact avec un film Kodak Biomax pendant 3 à 5 jours à l'abri de la lumière et à -20°C. Le film est développé, la plaque grattée à l'emplacement des glucuronides et la radioactivité est mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide.

La détermination de l'activité spécifique (AS) de glucuroconjugaison se fait par le calcul suivant :

$$AS = [(DPM_e - DPM_t) \times V_t \times U_t] / [V_d \times DPM_d \times P \times T]$$

DPM_e : nombre de désintégrations par minute mesuré dans l'échantillon

DPM_t : moyenne des désintégrations par minute mesuré dans les témoins

V_t : volume total d'incubation (80 µl)

U_t : nombre total de molécules d'UDPGA dans le milieu réactionnel (UDPGA froid et chaud) (≈ 100 nmol)

V_d : volume de surnageant déposé sur la plaque de CCM (60 µl)

DPM_d : nombre de désintégration par minute mis au départ dans le milieu réactionnel

P : quantité de protéine présente dans l'incubation (0,04 – 0,08 mg)

T : temps d'incubation (1 heure)

5.2. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange selon leur polarité. En phase inverse, les molécules éliminées en premier sont les plus polaires.

Cette technique nous a permis d'identifier le glucuronide d'apomorphine formé par l'isoforme UGT2B1

Le système de chromatographie liquide à haute performance couplé à un détecteur UV est composé d'une pompe Waters 510, d'une colonne Novapak C-18 (Waters, Phase Separations, Saint Quentin, France) 8 mm x 100 mm, remplie avec des particules de 4 μ m, et qui est insérée dans un module de compression Radial-Pak (Waters). Le détecteur Waters 996 relié à la pompe 510 permet la détection des pics, de tracer les spectres des substances absorbant dans l'ultraviolet. Les cartouches SEP-PACK C-18 proviennent également de chez Waters (Phase Separations, Saint Quentin, France).

La réaction enzymatique consiste à incuber à 37 °C, pendant 1 heure, les microsomes de cellules V79-UGT2B1 ou de foie (200 μ g de protéines) avec du tampon 100 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM d'UDPGA et 1 mM d'apomorphine (dissoute dans de l'HCl 0,01 N). La réaction est arrêtée à 4°C par ajout de 20 μ l d'HCl 6 N. Les protéines sont précipitées par centrifugation à 3 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est filtré dans des colonnes Sep-Pack C-18, préalablement équilibrée par passage de 5 ml de méthanol puis de 5 ml d'eau. L'UDPGA a un temps de rétention proche de celui de l'apomorphine, ces deux substrats sont élués quasiment en même temps. Pour augmenter la résolution du système, l'excès d'UDPGA est donc éliminé dans le filtrat après passage sur les cartouches SEP-PACK. Les glucuronides sont retenus dans la colonne et sont complètement récupérés après lavage avec 700 μ l d'eau puis 1 ml de méthanol. Le méthanol est évaporé sous azote. Le culot est repris dans de la phase mobile composée d'acétonitrile, d'eau et de TFA (25/74,9/0,04 ; v/v/v) et injecté dans le système CLHP. La détection se fait sous un flux de 1 ml/min à 215 nm. Le glucuronide formé est déterminé en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des microsomes de cellules V79-UGT2B1 à ceux des microsomes de foie de rat.

5.3. Fluorimétrie

La mesure de l'activité de glucuronoconjugaison du 1-naphtol est réalisée sur trois fractions différentes : des microsomes de foie (témoin positif), d'astrocytes en culture primaire et d'astrocytes immortalisés C6. Les microsomes sont incubés 15 minutes à 37°C avec de l'UDPGA 2 mM et du 1-naphtol 1 mM dans du tampon 100 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM de $MgCl_2$. Après arrêt de la réaction avec du tampon acide trichloroacétique 0,4 M (pH 2,2), glycine 0,6 M, une extraction au chloroforme est réalisée. Le glucuronide de 1-naphtol est utilisé comme standard. Après centrifugation 10 minutes à 5 000 g, la phase aqueuse est récupérée. La lecture au fluorimètre (Hitachi F-2000 Fluorescence

Spectrophotometer, Science Tech, Tokyo, Japon), aux longueur d'onde d'excitation et d'émission, respectivement 290 nm et 330 nm, se fait directement après ajout de 1,8 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 évalués par comparaison avec l'intensité de fluorescence d'une gamme étalon de 1-β-D-glucuronide de naphtol (Sigma).

6. IMMUNOHISTOCHIMIE

L'immunohistochimie permet de mettre en évidence la présence d'une protéine dans un tissu. Un anticorps primaire dirigé contre la protéine choisie va se fixer sur celle-ci. Un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre l'anticorps primaire va se fixer à celui-ci. Le complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase se fixe aux biotines de l'anticorps secondaire. Ce complexe permet d'amplifier le marquage. La réaction est révélée par l'ajout du substrat de la peroxydase, la diaminobenzidine (DAB) (Figure 30).

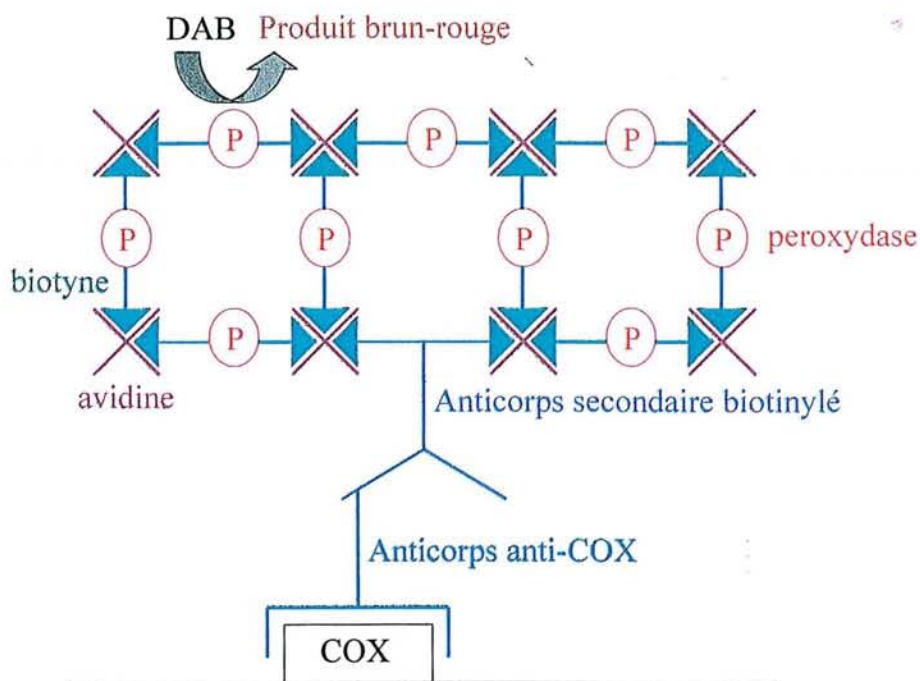


Figure 29 : Principe de l'immunohistochimie

6.1. Préparation des coupes

Des rats Wistar mâles (350-370 g) sont anesthésiés avec un mélange kétamine (Imalgène, Merial, Lyon, France) 50 mg/kg et de l'acépromazine (Vétranquil, Sanofi, Libourne, France) 1,25 mg/kg avant une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 4 % (v/v) dans du PBS. La MO, les BO et le cerveau sont prélevés, déshydratés dans des bains d'alcool à concentration croissante et inclus en paraffine. Un microtome permet de réaliser des coupes de 5 μ m d'épaisseur.

6.2. Protocole

Les coupes sont déparaffinées 5 minutes dans du toluène, puis réhydratées dans des bains d'alcool à concentration décroissante. Elles sont lavées dans de l'eau puis dans du PBS. Les coupes sont perméabilisées dans du Triton X-100 0,3 %. Trois lavages au PBS sont alors réalisés. Les sites aspécifiques sont bloqués par incubation dans du sérum bloquant pendant 1 heure 30. Puis, les coupes sont incubées une nuit à 4 °C avec 10 μ g/ml d'anticorps de lapin anti-COX-1 ou anti-COX-2. Le lendemain, les coupes sont lavées 3 fois dans du PBS puis incubées 45 minutes avec le deuxième anticorps anti-lapin biotinylé dilué dans le sérum bloquant. Les coupes sont lavées et les peroxidases endogènes sont inhibées par incubation dans 3 % d'eau oxygénée. Les coupes sont à nouveau lavées dans du PBS et incubées avec le complexe ABC (contient de l'avidine et de la biotine) pendant 45 minutes. Ce complexe permet d'amplifier la marquage. Les coupes sont lavées dans du PBS puis dans de l'eau. Le substrat de la peroxydase, la DAB, est incubé pendant 3 min environ. Les lames sont ensuite montées avec la résine Eukitt (O. Kindler, Freiburg, Allemagne).

7. TRANSCRIPTION INVERSE- POLYMERASE EN CHAÎNE (RT-PCR)

L'expression des ARNm codant l'UGT1A6 est quantifiée à partir d'une technique de RT-PCR quantitative multistandard utilisant à la fois la conservation inter-espèce des séquences des gènes codant pour l'UGT1A6 et la β -actine, et le polymorphisme de restriction existant entre ces mêmes espèces (Khiri *et al.*, 1996) (Figure 31). Les ARN totaux extraits à

partir de tissus de rat sont mélangés à des ARN totaux extraits d'un mélange de tissus murins (peau, adipocytes et muscle) qui contiennent la séquence d'intérêt et celle de la β -actine, ce qui apporte à la fois les séquences compétitives de l'UGT1A6 et de la β -actine. Les ARNm extraits de tissus murins agissent alors comme une source multistandard : la séquence de la β -actine sert de standard interne et celle de l'UGT1A6 murine de standard externe. Les amorces utilisées doivent amplifier avec la même efficacité les différentes séquences.

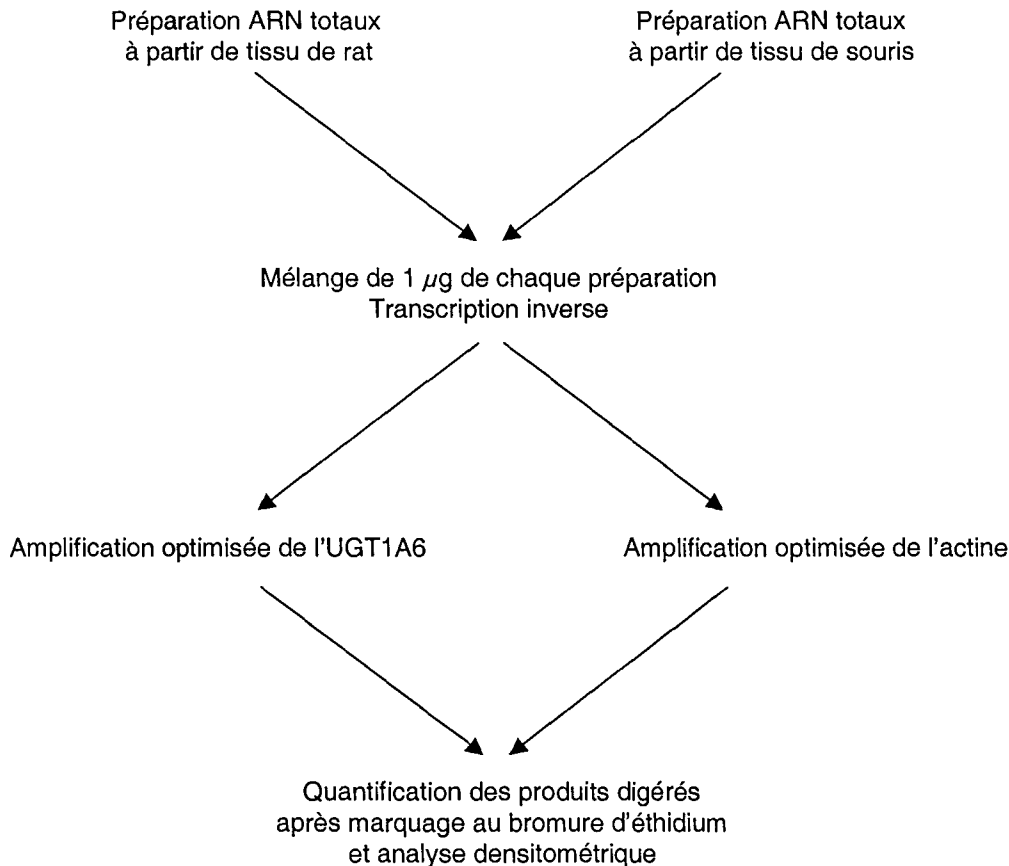


Figure 30 : Schéma de la RT-PCR semi-quantitative.

7.1. Extraction des ARNm

Les rats Wistar mâles nouveau-nés, de 3, de 12 et de 24 mois sont décapités. Le cerveau et les BO sont rapidement prélevés, coupés en morceau et congelés dans l'azote liquide. Les ARNm sont extraits en utilisant du Trizol selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). Les morceaux de tissu sont broyés dans 1 ml de Trizol, puis additionné de 100 μ l de chloroforme. Après 5 minutes à 4°C, les tubes sont centrifugés 20 minutes à 15 000 g. La phase aqueuse est récupérée. Un demi-volume de chloroforme est ajouté. Après une

centrifugation de 10 minutes à 13 000 g, les ARN présents dans la phase aqueuse sont précipités à -80°C après ajout d'un volume d'isopropanol. Après centrifugation 20 minutes à 15000 g et lavage du culot avec 500 μl d'éthanol à 70 %, les culots d'ARN sont séchés à température ambiante et repris dans de l'eau distillée stérile. Afin d'éviter toute contamination génomique, les ARN sont traités par une DNase (RQ1 RNase-free DNase) pendant 30 minutes à 37°C en présence d'un inhibiteur de RNase (RNase Inhibitor, 10 unités). La réaction est arrêtée par ajout de 1 % EDTA 0,5 M (pH 8). Les ARN sont à nouveau extraits par la méthode phénol-chloroforme. Les échantillons sont dosés dans un spectromètre (1 unité de $A_{260\text{nm}}$ d'ARN simple brin = 40 $\mu\text{g/ml}$) et, la pureté vérifiée par établissement du rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

7.2. Etape de transcription inverse (RT)

Des quantités identiques (1 μg) d'ARN extrait de tissu de rat (MO, BO ou cerveau) et d'ARN extraits de tissus de souris (peau, adipocytes et muscles) sont mélangés, chauffés 3 minutes à 65°C et maintenues dans la glace. La transcription inverse est réalisée 1 heure 30 à 37°C dans un volume final de 20 μl contenant 50 mM de tampon Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl_2 , 10 mM de dithiothréitol, 5 μM d'un mélange d'amorces aléatoires de six nucléotides, 0,5 mM de chaque dNTP et 200 unités de transcriptase inverse MMLV.

7.3. Etape d'amplification (PCR)

Deux amplifications séparées par PCR, pour l'UGT1A6 et la β -actine, sont réalisées avec des amorces oligonucléotidiques qui peuvent s'hybrider avec la même efficacité sur les séquences du rat et de la souris. Pour l'UGT1A6, l'amorce directe 1A6DIRR/S (5'-GGA CTC AGT TCT AGG TGA CAA GC-3') s'étend du nucléotide 191 à 213 et l'amorce inverse 1A6REVR/S (5'-GGC GTT GAC ATA GGC TTC AAA TTC C -3'), du nucléotide 1010 à 986, selon la séquence de souris déposée dans la banque sous le numéro U16818 (Reuter *et al.*, 1994). Les nucléotides sont synthétisés par MWG-Biotech (Courtaboeuf, France). La position 3 de l'amorce directe est occupé par un A pour ne pas favoriser une matrice par rapport à l'autre. Pour la β -actine, l'amorce directe ACT 53 s'étend du nucléotide 558 à 579, et l'amorce inverse ACT33 s'étend du nucléotide 1126 à 1100, selon la séquence humaine (Ponte *et al.*, 1984). Les réactions d'amplification sont réalisées en ajoutant à la solution de

PCR, 1 μ l de la solution d'ADN complémentaire synthétisé précédemment. La solution de PCR contient 20 mM de tampon Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,4 μ M d'amorces, et 2,5 mM de Taq DNA polymérase. Les échantillons sont maintenus dans la glace avant d'être placés dans un thermocycler (Gene E, Techne, OSI, Maurepas, France). Pour amplifier le gène de l'UGT1A6, les produits de RT sont soumis à 31 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94 °C pendant 45 secondes, une étape d'hybridation à 60 °C pendant 45 secondes et une étape d'élongation 45 secondes à 72 °C. L'amplification de la β -actine consiste en 27 cycles composé d'une dénaturation de 45 secondes à 94 °C, d'une hybridation de 45 secondes à 65 °C et d'une élongation de 45 secondes à 72 °C.

7.4. Détection et quantification

Chaque produit d'amplification est distingué par le polymorphisme des sites de restriction. Le produit de PCR de l'UGT1A6 de souris est digéré par *EcoR* I en deux fragments (682 et 138 paires de bases), alors que celui du rat n'est pas coupé. Une même différence de site de restriction permet de différencier la β -actine de rat de celle de souris. Un site de restriction de l'enzyme *Pvu* II qui produit des fragments de 475 et 94 bases est présent chez le rat mais pas chez la souris. Après migration sur gel d'agarose 1,5 % (p/v) contenant au bromure d'éthidium, les produits de PCR digérés sont photographiés sous une lampe UV par une caméra liée à un système d'analyse d'image (NIH software) permettant la quantification de chaque bande. Pour chaque échantillon, les résultats sont exprimés, selon la méthode de Khiri *et al.* (1996), en unité arbitraire par le rapport :

$$(\text{gène}_{\text{rat}}/\text{gène}_{\text{souris}}) \times (\beta\text{-actine}_{\text{souris}}/\beta\text{-actine}_{\text{rat}})$$

8. HYBRIDATION *IN SITU*

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de mettre en évidence la présence d'ARNm à l'intérieur des cellules. Nous avons utilisé des sondes non radioactives marquées à la digoxigénine. Deux sondes, une dont la séquence nucléotidique est la même que celle de l'acide nucléique recherché (sonde sens) et l'autre qui est complémentaire (sonde anti-sens), sont synthétisées et amplifiées. Une transcription *in vitro* permet de marquer la sonde à la

digoxigénine. Cette sonde va s'hybrider sur l'ARNm cible. Un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline va reconnaître et se fixer sur les nucléotides marqués à la digoxigénine. L'ajout du substrat de la phosphatase alcaline va permettre la mise en évidence de l'hybridation. La sonde sens, ayant la même séquence que l'ARNm cible, est le témoin négatif, car elle ne s'hybride pas (Figure 32).

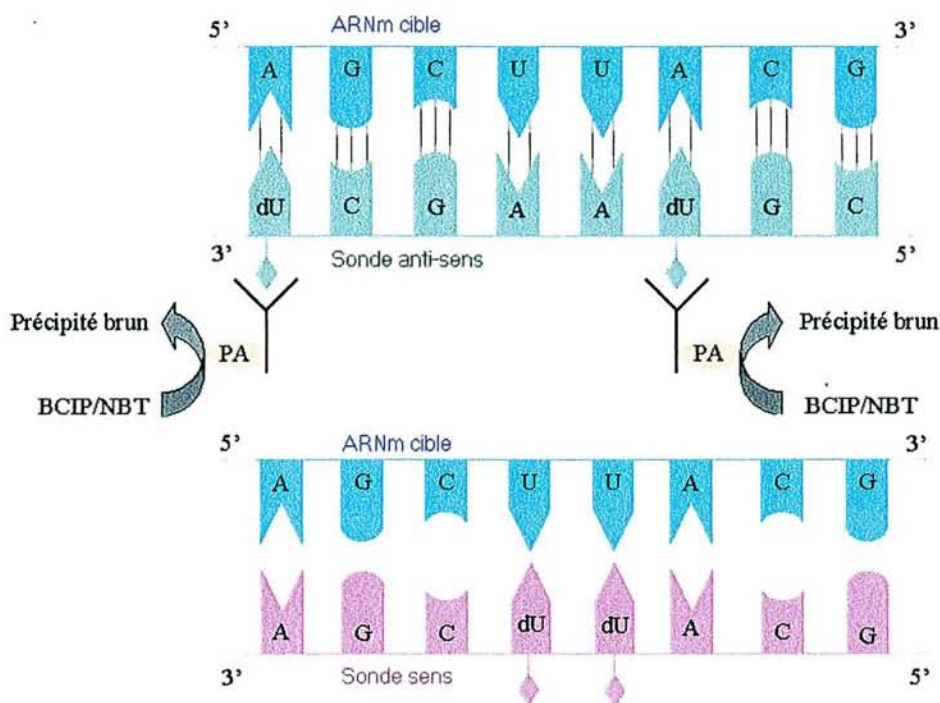


Figure 31 : Principe de l'hybridation *in situ*.

8.1. Synthèse des sondes.

8.1.1. Transformation de bactéries avec la séquence d'intérêt

La technique de RT-PCR est réalisée sur du foie de rat pour amplifier les ARNm de l'UGT1A6. Les amorces choisies sont TCT TCC TGC TGC TCG ACT TCC (directe) et TGG TTC TCC CTG AGG AAG CTG (reverse). La technique est la même que précédemment, le fragment amplifié est de 414 bases.

Les fragments de PCR de l'UGT2A1 (fournis par J.M. Heydel, Laboratoire de Biochimie Pharmacologie Toxicologie, Dijon) et de l'UGT1A6 sont purifiés en utilisant le kit « PCR reaction using QIAquick Gel extraction kit protocol » (Qiagen), et lié dans un vecteur pCR®II-TOPO (Invitrogène). Ce vecteur contient les promoteurs des polymérases SP6 et T7.

Des cellules compétentes chimiquement TOP10 One Shot™ sont transformées avec le plasmide recombinant. Les bactéries sontensemencées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar 32 g/l(Gibco-BRL) supplémenté avec 50 µg/ml de kanamycine et 40 mg/ml de X-galactose (Invitrogen). Les bactéries qui ont inséré le plasmide sont les seules qui vont croître, le plasmide portant la résistance à la kanamycine. Le site d'insertion de la séquence d'intérêt se trouve dans le gène LacZ qui code pour une β-glucuronidase. Cette protéine clive le X-galactose en galactose et X qui donne une couleur bleue à la bactérie. Par conséquent si notre séquence est insérée, le gène lacZ n'est pas exprimé est les bactéries restent blanches.

8.1.2. Amplification du plasmide avec l'insert

Les cellules ayant insérées le plasmide (bactéries blanches) sont prélevées etensemencées dans du milieu LB Broth base 20 g/l (Gibco-BRL) contenant 50 µg/ml de kanamycine (Gibco-BRL) une nuit à 37 °C.

Une minipréparation de plasmides est réalisée. Deux ml de culture bactérienne sont centrifugés à 13 000 g pendant 5 minutes. Le culot est repris par 200 µl de tampon 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM d'EDTA et 100 µg/ml de RNase A. Un volume de tampon de lyse (200 mM de NaOH, 1 % de SDS (p/v)) est ensuite ajouté. Après agitation par retournement successifs, 200 µl de tampon acétate de potassium 3 M (pH 5,5) est ajouté. L'ensemble est placé 15 minutes dans la glace. Une centrifugation à 13 000 g pendant 20 minutes est réalisée. Un volume d'isopropanol est alors ajouté au surnageant. Après une centrifugation à 13 000 g pendant 20 minutes, le culot est séché puis repris dans 20 µl d'eau stérile. La présence de l'insert est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1,5 % de la minipréparation digérée par l'enzyme *EcoR* I. Deux bandes, l'une correspondant à l'insert et une correspondant au plasmide sont observées.

Une maxipréparation de plasmide est alors réalisée. Le principe d'isolement des plasmides est identique mais les volumes utilisés sont plus grands. La totalité de la culture est centrifugée à 6 000 g pendant 15 minutes. Le culot est repris dans 10 ml de tampon 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM d'EDTA et 100 µg/ml de RNase A. Un volume de tampon de lyse (200 mM de NaOH, 1 % de SDS (p/v)) est ensuite ajouté. Après agitation par retournement successifs, 10 ml de tampon acétate de potassium 3 M (pH 5,5) est ajouté. Après incubation 15 minutes dans la glace, un centrifugation de 30 minutes à 20 000 g est réalisée. Le surnageant est récupéré et passé sur une colonne échangeuse d'ions *QIAGEN-tip 500* selon les

recommandations du fournisseur (GIAGEN Plasmid Maxi). Après lavage et élution, le culot est récupéré et séché. Il est ensuite repris dans 200 μ l d'eau stérile puis dosé (une unité de $A_{260\text{ nm}}$ de plasmide = 50 μ g/ml).

Le plasmide est purifié avec le kit d'extraction « Qiagen QIAquick Gel extraction kit protocol ». Il est séquencé pour connaître le sens d'insertion de la sonde.

8.1.3. *Transcription in vitro*

Les fragments antisens et sens sont générés par linéarisation du vecteur pCR[®]II-TOP par les enzymes de restriction *Xba* I et *Bam*H I. La polymérase T7 transcrit le fragment coupé par l'enzyme *Bam*H I et la polymérase SP6, celui coupé par l'enzyme *Xba* I. Les sondes marquées à la digoxigénine sont synthétisées par transcription *in vitro* en utilisant un mélange de nucléotides dont l'uridine est marquée à la digoxigénine (« DIG RNA labelling Mix », ATP 10 mM, CTP 10 mM, GTP 10 mM, UTP 6,5 mM et DIG-11-UDP 3,5 mM), suivant les recommandations du fournisseur (Boehringer). Le plasmide (2,5 μ g) est incubé 2 heures à 37 °C avec 10 mM de DTT, des dNTP 1X, du tampon de transcription 1X (Eurobio), et 40 unités de polymérase SP6 ou T7 (Eurobio). La réaction est arrêtée avec 0,2 M d'EDTA (pH8). Les sondes sont purifiées par l'ajout de 2,5 μ l de chlorure de lithium 4 M et 75 μ l d'éthanol absolu froid. Elles sont précipitées 30 minutes à -80 °C. Après une centrifugation à 13 000 g pendant 15 minutes, le culot est lavé avec 50 μ l d'éthanol à 70 %. Le culot est séché et repris dans 50 μ l d'eau DMPC. Les sondes sont conservées à -80 °C.

8.1.4. *Dosage de la sonde*

Plusieurs dilutions des solutions de sonde sens et antisens et d'un témoin (« DIG-labeled control RNA ») sont déposées sur une membrane de nylon. Les ARN sont fixées à la membrane 5 minutes sous UV. La membrane est lavée dans du tampon 10 mM acide maléique (pH 7,5), 15 mM NaCl et 0,03 % de tween 20 (v/v) (tampon de lavage). Les sites aspécifiques sont bloqués dans un tampon 10 mM acide maléique (pH 7,5), 15 mM NaCl contenant 1 % de solution bloquante (« Liquid blocking reagent », Amersham). L'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (1/5000 dans la solution de blocage) est incubé 30 minutes. La membrane est lavée dans le tampon de lavage puis incubée dans du tampon de détection (10 mM Tris-HCl (pH 9,5), 10 mM NaCl). La révélation se fait en incubant la membrane avec le substrat, mélange de 0,33 mg/ml de NBT et 0,165 mg/ml de

BCIP dans du tampon de détection. La réaction est arrêtée par lavage dans de l'eau. Les spots correspondant à la sonde sens ou antisens sont comparés à ceux du témoin dont les concentrations sont connues.

8.2. Hybridation *in situ*

Les coupes de paraffine sont réalisées de la même manière que pour la technique d'immunohistochimie. Les coupes de 5 μm d'épaisseur sont placées, une nuit, dans une étuve à 40 °C. Elles sont déparaffinées dans du toluène, réhydratées dans des bains d'alcool à concentration décroissante, lavées dans du PBS puis dans du PBS contenant 100 mM de glycine. Les coupes sont perméabilisées 15 minutes dans du Triton X-100 0,3 % (v/v) dans du PBS, lavées, puis déprotéinisées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de protéinase K dans du tampon 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA pendant 30 minutes à 37 °C. Les coupes sont alors post-fixées 5 minutes à 4 °C dans du paraformaldéhyde 4 % dans du PBS. Après deux lavages dans du PBS, elles sont acétylées avec de la triéthanolamine 0,1 M contenant 0,25 % (v/v) d'anhydride acétique. Les sections sont entourées avec un marqueur hydrophobe (PAP-PEN, Daido, Sangyo, Japon) et incubées 10 minutes au moins à 37 °C avec du tampon de préhybridation contenant du SSC 4X, 50 % (v/v) de formamide désionisé et de l'eau DMPC. L'hybridation est réalisée avec 50 à 100 ng de sondes dénaturées dans du tampon composé de 40 % de formamide désionisé (v/v), 10 % de sulfate de dextran (v/v), de solution de Denhardt's 1X, du SSC 4X, 10 mM de DTT, 1 mg/ml d'ARNt de levure et 0,2 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Les coupes sont recouvertes d'une lamelle et placées dans une chambre humide. L'hybridation se fait dans une étuve à 42 °C, pendant une nuit.

Les coupes sont lavées deux fois dans du SSC 2X pendant 15 minutes, puis deux fois 15 minutes dans du SSC 1X. Les sondes non fixées sont digérées par 20 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A dans du tampon NTE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,) pendant 30 minutes à 37 °C suivi de 2 lavages dans du SSC 0,1X.

8.3. Détection immunologique

Les coupes sont incubées 10 minutes dans du tampon 1 (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM), bloquées 30 minutes dans le même tampon contenant 0,1 % de Triton X-100 et 2 % de sérum normal de chèvre, et incubées 2 heures avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à

la phosphatase alcaline (1/250 dans du tampon 1 contenant 0,1 % de triton X-100 et 1 % de sérum normal de chèvre). Les coupes sont lavées 2 fois dans du tampon 1, puis 10 minutes dans du tampon 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (tampon 2). La réaction est révélée par ajout du substrat de la phosphatase alcaline c'est-à-dire le NBT/BCIP (0,33 mg/ml de NBT et 0,165 mg/ml de BCIP dans du tampon 2). La réaction est arrêtée dans du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8,1), EDTA 1 mM. La contre-coloration se fait au vert de méthyle 1 % 3 minutes puis les lames sont montées avec de la résine Eukitt.

RESULTATS

1. LES UGT DE LA MUQUEUSE OLFACTIVE, DES BULBES OLFACTIFS ET DU CERVEAU

1.1. Glucuronoconjugaison de molécules odorantes

Publication 1

**Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system.
Activity, expression and age-linked modifications of
UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1,
and relation with mitral cell activity.**

LECLERC S., HEYDEL J.M., AMOSSE V., GRADINARU D., CATTARELLI M., ARTUR Y., GOUDONNET H., MAGDALOU J., NETTER P., PELCZAR H., MINN A.

Molecular Brain Research, 2002, *sous presse*.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'activité de glucuronoconjugaison des UGT présentes dans des homogénats cellulaires de MO, de BO et de cerveau, de 24 molécules odorantes. La plupart de ces molécules sont conjuguées efficacement par les UGT de la MO, alors que dans les BO et le cerveau les activités de glucuronoconjugaison sont plus faibles et peu de molécules odorantes sont conjuguées. Des changements dans le profil de conjugaison selon l'âge sont observés dans la MO et les BO. L'activité est faible chez les rats de 1 jour puis augmente pour atteindre un maximum à l'âge de 3 mois et décroît ensuite dans la MO. Dans les BO comme dans le cerveau, l'activité est maximale pour les rats nouveau-nés puis elle diminue avec l'âge. L'expression de deux isoformes, l'UGT1A6 et UGT2A1, a également été étudiée en fonction du développement. L'expression des ARNm de l'UGT1A6 est du même ordre de grandeur dans la MO, les BO et le cerveau selon les âges étudiés. Les ARNm de l'UGT2A1 sont exprimés dans la MO et les BO, le taux d'ARNm de l'UGT2A1 étant 400 à 4 000 fois plus important que celui de l'UGT1A6. Des variations de la quantité d'ARNm de l'UGT2A1 en fonction de l'âge ont également été observé. Comme les enzymes métabolisant les médicaments peuvent avoir un rôle dans la fonction olfactive, l'activité électrique de cellules mitrales a été enregistrée durant la présentation de différentes molécules odorantes à

des rats jeunes, adultes et vieux. Des changements d'amplitude des réponses en fonction de l'âge, après une stimulation avec plusieurs molécules odorantes, ont été observés. Les réponses les plus fortes sont obtenues avec les molécules les moins conjuguées dans la MO. En conclusion, ce travail suggère l'implication des UGT dans le processus olfactif.

Manuscript prepared for: *Molecular Brain Research*.

Word processing: MS-DOS Word 2000 for IBM-compatible PC.

**Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system.
Activity, expression and age-linked modifications of
UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1,
and relation with mitral cell activity.**

Séverine Leclerc, Jean-Marie Heydel[#], Valérie Amossé[§], Daniela Gradinaru[#], Martine Cattarelli[§], Yves Artur[#], Hervé Goudonnet[#], Jacques Magdalou, Patrick Netter, Hélène Pelczar[#], and Alain Minn^{*}

UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy 1, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France ; [#] Unité de Biochimie Pharmacologie Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Dijon, France ; [§] Centre Européen des Sciences du Goût-CNRS, Dijon, France.

*Corresponding author. Address: UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy 1, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Tel.: (33) 383 592 753 – Fax: (33) 383 592 621 – mail: minn@medecine-uhp.nancy.fr

S. Leclerc and J.M. Heydel contributed equally to this work.

Number of pages: 32 – Number of tables: 1 – Number of figures: 6

Acknowledgements:

The authors gratefully acknowledge the financial help of the Conseil Régional de Lorraine, the Conseil Régional de Bourgogne, and the Danone Institute (Contrat Alimentation – Santé 1998-2000). Thanks are also due to Mrs S. Etienne for her skilful technical assistance.

Abstract

The aim of the present study was to examine the glucuronidation of a series of odorant molecules by homogenates prepared either with rat olfactory mucosa, olfactory bulb or brain. Most of the odorant molecules tested were efficiently conjugated by olfactory mucosa, whereas olfactory bulb and brain homogenates displayed lower activities and glucuronided only a few molecules. Important age-related changes in glucuronidation efficiency were observed in olfactory mucosa and bulb. Therefore, we studied changes in expression of two UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, in 1-day, 1- and 2-week-, 3-, 12- and 24-month-old rats. UGT1A6 was expressed at the same transcriptional level in the olfactory mucosa, bulb and brain, throughout the life period studied. UGT2A1 mRNA was expressed in both olfactory mucosa and olfactory bulb, in accordance with previous results [Heydel et al. *Mol. Brain Res.* 90 (2001) 83-92], but UGT2A1 transcriptional level was 400 to 4000 times higher than that of UGT1A6. Moreover, age-dependent variations in UGT2A1 mRNA expression were observed. As it has been suggested that drug metabolizing enzymes could participate to olfactory function, mitral cell electrical activity was recorded during exposure to different odorant molecules in young, adult and old animals. Age-related changes in the amplitude of response after stimulation with several odorant molecules were observed, and the highest responses were obtained with molecules that were not efficiently glucuronided by olfactory mucosa. In conclusion, the present work present new evidence of the involvement of UGT activity in some steps of the olfactory process.

Theme F: Sensory systems

Topic: Olfactory senses

Key words: Olfactory mucosa, olfactory bulb, glucuronidation, UGT expression, odorants, mitral cells.

Abbreviations: BBB, blood-brain barrier; CYP, cytochrome P450; OBP, olfactory binding proteins; UDPGA, UDP-glucuronic acid; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

Introduction

The olfactory sensory system of vertebrate can recognize and discriminate a large number of odorants of diverse molecular structure. Olfactory perception is initiated by interaction of odorants with receptors located on the olfactory cilia, a specialization of the dendrites of olfactory sensory neurons. These numerous olfactory receptors, which are expressed by a series of different genes [27], are coupled to a G-protein and their stimulation mainly leads to the production of a second messenger, cAMP [30]. The binding of cAMP to an ion channel allows a flux of positive ions into the cells that generates action potentials which are directed to the brain [25]. The olfactory bulb is the first relay of transmission of olfactory information between the nasal mucosa and the brain.

If present in excess, odorant molecules bind to olfactory binding proteins (OBP), which carry odorants to the endoplasmic reticulum where they are substrates of cytochromes P450 (CYPs) [26], glutathione *S*-transferase [2] or UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), leading to their metabolism and elimination [4]. Some of these enzymes, such as CYP2G1 [14], are only expressed in the olfactory mucosa, whereas the others exhibit a broader pattern of expression [2, 20]. All these proteins play a role in modulating the concentration of odorant molecules, and therefore, should contribute to both the valuable transmission of olfactory messages and to the detoxification of potentially toxic molecules present in the inspired air.

Mainly expressed in the liver, the UGTs are a multigenic superfamily of enzymes that catalyze the conjugation of glucuronic acid from UDP-glucuronic acid (UDPGA) to various endogenous and exogenous substances bearing a hydroxyl, carboxyl or amine group. The formed glucuronides are hydrophilic metabolites readily eliminated in bile or urine (for a review, see [29]). Glucuronidation also occurs in extra-hepatic tissues exposed to xenobiotics, such as skin, lung, intestine, or brain [24, 29, 32]. In this respect, we recently demonstrated the presence of the isoform UGT1A6, an isoform that metabolizes preferentially planar phenols [29], in the olfactory bulb [10], isolated brain microvessels that form in vivo the blood-brain barrier (BBB), and choroid plexus [22]. In the nasal epithelium, several groups [17, 21] have identified the olfactory UGT2A1, that is highly expressed and considered as tissue specific, but we recently showed that UGT2A1 is also expressed in the olfactory bulb [13]. Nevertheless, scarce information is available concerning the expression and functions of UGT isoforms in olfactory and cerebral tissues.

In the present work, we determined the glucuronidation potency of the rat olfactory mucosa, olfactory bulb and brain parenchyma toward a series of 24 chemically unrelated odorant molecules, and we examined the effects of aging on this activity. Using quantitative RT-PCR, we also described the expression changes of UGT1A6 and UGT2A1 isoforms in the brain, olfactory bulb and mucosa during animal development and aging. Moreover, since glucuronidation of odorant molecules in the olfactory mucosa results in changes in their concentration, it could also alter electrical responses of the olfactory tissue to odors. Thus we also checked the influence of odor quality on amplitude, duration, and latency of positive responses as a function of age.

Materials and methods

Materials

Odorant molecules: caprylic acid, geraniol, *trans*-2-hexen-1-ol, 1-nonanol, β -citronellol, carvacrol, coniferyl alcohol, eugenol, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, (–)-borneol, (+)-borneol, 4-hydroxydiphenyl, anisole, 1-octen-3-ol, camphorcarboxylic acid, (–)-nopol, (–)-menthol, (–)-nicotine, (–)-myrtenol, 1-naphthol, isoamyl acetate, and cineole were purchased from Sigma. Isoamyl alcohol was obtained from Merck. Other routine reagents were of the highest purity commercially available.

Animals

For enzymatic assays, we used 1-day-, 1-week-, 2-week-, and male 3-month-, 12-month- and 24-month-old Wistar rats, and male Wistar SPF rats for electrophysiological assays (Janvier, France). The animals were maintained under standard laboratory conditions on 12: 12h light/dark cycle with unrestricted access to standard rodent food and tap water. In order to obtain newborn, 1-week-, and 2-week-old rats, two female rats in proestrus cycle were housed together with a male for 24 h, and pregnant females were then maintained in separate cages. For electrophysiological studies, four groups of animals were considered: 15 ± 4 day-old rats (45.5 ± 10.0 g) ($n = 12$); 3 month-old adults (476.7 ± 55.0 g) ($n = 10$); 12 month-old (631.2 ± 83.3 g) ($n = 5$); and 16 month-old (685.0 ± 24.9 g) ($n = 5$). Our local Ethics Committee for Laboratory Animal Care approved the study.

Tissue preparation:

For tissue harvesting, rats were sacrificed by decapitation and the brain and olfactory bulb were rapidly removed, whereas olfactory mucosa was carefully scraped under binocular microscope in sterile artificial cerebrospinal fluid (124 mM NaCl; 3.3 mM KCl; 1.24 mM KH_2PO_4 ; 1.3 mM MgSO_4 ; 2.5 mM CaCl_2 ; 26 mM NaHCO_3 ; 10 mM glucose) to remove any cartilage debris. Liver samples were also harvested from 3-month-old rats for control glucuronidation activity measurements. The samples were immediately frozen by immersion into liquid nitrogen and stored at -80°C .

Before conjugation activity assays, samples were thawed and homogenized in a 50 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, pH 7.4 buffer using a manual glass Dounce type homogenizer. We only used homogenates because of the minute quantities of mucosa available from a rat, especially a newborn rat, making it very difficult to isolate microsomes. Protein content was determined according to the method of Lowry et al. [23], using bovine serum albumin as a standard.

Total RNA was extracted according to a microscale method [6], using a RNAXEL kit (Eurobio, les Ulis, France). The RNA preparations were incubated in the presence of RNase-free DNase (Promega, Lyon, France) in order to avoid amplification of possible contaminating genomic DNA.

Measurement of glucuronidation activity:

UGT activities toward odorant molecules were measured in olfactory mucosa, olfactory bulb, and brain homogenates by a thin layer chromatographic method [1]. 1-Naphthol conjugation was considered as the positive activity control. Before assays, the homogenates were activated by addition of 0.15 mg Triton X-100/mg protein for 15 min on ice [32]. Aliquots of homogenates (0.04-0.08 mg protein) were incubated for 1 hour at 37°C in a 10 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 buffer, in the presence of 0.1 μCi [$\text{U}-^{14}\text{C}$] UDPGA, 2.5 mM UDPGA and 1 mM substrate, in a final volume of 40 μl . The reaction was terminated by addition of 40 μl of absolute ethanol. The mixtures were centrifuged at 3,000 g for 10 min and 60 μl of supernatant was applied to the TLC plates (Whatman LK6DF). The chromatograms were developed in 1-butanol/acetone/acetic acid/ammonia/water (35/25/9/1/30, v/v). After autoradiography for 3-5 days, the spots containing the radiolabeled glucuronides were scraped from TLC plates and the radioactivity counted by liquid spectrometry. Values were the mean of two to eight separate assays.

Quantitative multi-standard RT-PCR.

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from RNA samples by mixing 1 μ g total RNA (0.5 μ g total RNA from the rat tissue sample plus 0.5 μ g total RNA from mouse olfactory mucosa used as a multistandard source), 100 pmol of random hexamer in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer, (pH 8.3); 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM dithiothreitol; 200 units of Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (all reagents were purchased from Eurobio) as described in [13].

The separate PCR amplifications for UGT isoforms and for β -actin were undertaken with primers (Life Technologies) that are able to hybridize to the rat and mouse sequences with the same efficiency. For UGT2A1 amplification, we used the sense primer: 5'-AACTCACAGACCAGATGTCCTTCGC-3'; and the antisense primer: 5'-TTCTGAGGAATCTGGGCAAGG-3' (Life Technologies) and for UGT1A6, the sense primer: 5'-GGACTCAGTTCTAGGTGACAAGC-3'; and the antisense primer: 5'-GGCGTTGACATAGGCTTCAAATTCC-3'. For β -actin amplification, primers designed as in [18] were used. PCR reactions were performed using a 10 μ l cDNA aliquot added to a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 150 μ g/ml bovine serum albumin, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 50 pmol of each primer and 2 units of Taq DNA polymerase (Eurobio), in a total volume of 50 μ l. The mixture was subjected to 26 cycles for UGT2A1 and 36 cycles for UGT1A6 through a 15-sec denaturing step at 94°C, a 15-sec annealing step at 58°C and 60°C for UGT2A1 and UGT1A6, respectively, and a 30-sec elongation step at 72°C in a thermal cycler. The β -actin fragment was amplified through 24 cycles consisting of a 15-sec denaturing step at 94°C, a 15-sec annealing step at 60°C and a 30-sec elongation step at 72°C. Following the final cycle, a 1-min elongation step at 72°C was included. Each amplification product was then characterized by a restriction site polymorphism (UGT2A1: 400 bp, UGT1A6: 820 bp, β -actin: 493 bp) analysis. The UGT2A1 and UGT1A6 mouse amplification products were respectively digested by Hind III and Eco RI into two fragments of 289 and 111 bp, and 682 and 138 bp, while the rat products remained uncut. For β -actin, a single Xba I site (producing 269 and 224 bp fragments) was present in mouse, but not in rat. Amplification products, restricted or not, were resolved by agarose gel electrophoresis and observed after revelation by ethidium bromide. The bands were visualized under UV light and recorded by a computer-assisted camera (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Quantification of UGT2A1 (U) and β -actin (B) was performed by densitometry analysis with a NIH software (NIH, USA).

Considering the sample (e) and the standard (s), the results were expressed as the ratio $(U_e / U_s) \times (B_s / B_e)$ for rat mRNA expression, according to the method described in [18].

The mRNA levels of UGT2A1 and UGT1A6 in the mouse multistandard total RNA were determined by competitive PCR experiments. Following the same approach than that described in [13], we found that 2.6 attomoles of UGT2A1 mRNA/ μ g RNA and 3.2×10^3 attomoles of UGT1A6 mRNA / μ g RNA from the mouse multistandard, equivalently competed for standard in the competitive PCR assays, which gave us the factor (a) for each UGT isoform in the final formula.

Using the absolute quantification of each UGT mRNA in the multistandard total RNA as a constant factor (a), the level of UGT mRNA in the samples could be deduced from multistandard quantitative assay, as long as the same multistandard total RNA preparation was used. The final results were expressed as the ratio $(U_e / U_s) \times (B_s / B_e) \times a$.

Recording of multiunit activity of mitral cells:

Rats were anaesthetized by i.p. injection of equithesine, a mixture of pentobarbital and chloral hydrate (3 to 3.5 ml/ kg for the young rats, and 3.5 ml/kg for adult rats). Animal body temperature was kept constant with a warm electrical blanket. Being anesthetized, rats were placed in a stereotaxic apparatus. A bipolar electrode made of two stainless steel wires twisted together (100 μ m diameter) and insulated except at the beveled shape tip was implanted into each olfactory bulb. It was driven down until the ventral mitral cell layer was reached. Mitral cell activity is synchronized with the respiratory rhythm [5]. Multiunit electrical activity collected in a band pass of 300-3000Hz was amplified and then summated as a measure of multiunit activity level in the mitral cell layer. A brass electrode was screwed into the skull in the parietal bone and was used as reference electrode.

Normal environmental air was used as a control stimulus. The pure chemicals were presented to rats as saturated vapors. The odor (1 l/min) was delivered in front of the rat nostrils for 10 sec, and pure air was delivered (1 l/min) for 2 min between each stimulation. After completion of the first series of odors a second one was delivered. Thus, each odor was delivered twice with an interval of about 15 minutes. Odors were removed from the environmental air by ventilation.

Olfactory bulb activity recorded during the different stimulations was compared to that recorded in pure air (control stimulus). When an odorous stimulation was delivered, activity was either increased (positive response) or remained unchanged (null response). The number

of olfactory bulb responses, either positive or null, was counted for all stimuli. Moreover, amplitude, duration and latency of positive responses were measured. Statistical analysis of the data was performed by using Chi Square test, variance analysis and Student *t* test for small samples, according to the type of data compared.

Results

1. Odorant substrate glucuronidation

As a high 1-naphthol glucuronidation activity was recorded in the three tissues, we considered 1-naphthol glucuronidation as a positive control for all glucuronidation activity measurement we performed. For clarity, the glucuronidation activity profiles of the best conjugate odorant molecules as a function of age have been summarized in Fig. 1A, 1B, and 1C. Cineole and (-)-nicotine, were not conjugated (detection limit, 0.1 nmol/hr.mg protein) by any of the three tissue homogenates.

Olfactory mucosa: almost all odorant molecules we assayed were glucuronidated by olfactory mucous homogenates (Table 1A). Phenolic substances, especially carvacrol and eugenol, were the most efficiently glucuronidated substrates by the UGTs present in olfactory mucosa. Nopol and (-)-borneol, that possess a nonaromatic ring, were also efficiently conjugated, whereas aliphatic molecules as caprylic acid, geraniol, trans-2-hexen-1-ol, and 1-nonanol were glucuronidated with a lower efficacy. Low conjugation activities were observed in neonates, which progressively increased to reach a maximum in rats aged 2 weeks to 3 months, and the activity decreased until 12 months. These activities slowly increased again during aging for most odorant molecules, excepted for isoamyl alcohol, (-)-borneol, camphorcarboxylic acid and caprylic acid, whose conjugation rates regularly decreased until 24 months. A very high specific activity for 1-naphthol conjugation was recorded in 3-month-old rats, that was even higher than that in the liver (369.4 ± 37.3 nmoles/h.mg protein and 245.0 ± 16.9 nmoles/h.mg protein, respectively).

Olfactory bulb: Depending on the age of the animals, only 5 to 14 molecules were glucuronidated by homogenates of this tissue. As compared to the olfactory mucosa, phenolic molecules were still better conjugated than aliphatic and other molecules, but glucuronidation rates were much lower than those measured in the olfactory mucosa. Moreover, olfactory bulb homogenates displayed a glucuronidation profile different from that observed in the olfactory mucosa as a function of age (Table 1B). Glucuronidation of some odorant molecules was the highest during the first postnatal week, then decreased until 24 months.

Brain: Only five phenolic odorants were substrates of cerebral UGTs, the rate of glucuronidation being of the same order of magnitude than that in the olfactory bulb homogenates, and displayed similar age-related changes. Specific activities progressively decreased from day 1 to 3 months and then remained constant (Table 1C).

2. Expression of UGT1A6 and UGT2A1 isoforms, and age-related changes

Using quantitative RT-PCR (Fig. 1), we studied the relation between the age-related changes in glucuronidation activity of odorants and the changes in expression of UGT1A6 and / or UGT2A1, as the corresponding recombinant proteins are able to conjugate some of the molecules we have tested here [11, 20]. In accordance with previous results from our group [13] and from others [20], we observed that UGT2A1 mRNA was present in the olfactory mucosa, but not in the brain. On the other hand, UGT1A6 was expressed in the olfactory bulb and in the brain, and we showed here for the first time the expression of UGT1A6 mRNA in the olfactory mucosa (Fig. 2).

Absolute mRNA quantification indicated that the level in mRNA encoding UGT2A1 was between 400 and 4000 times higher than that of UGT1A6 in the olfactory epithelium and olfactory bulb (Fig. 3, 4). Whatever the age of the rat, UGT1A6 presented almost the same expression level in the three tissues around $2\text{--}3.5 \cdot 10^{-3}$ attomole/ μg of total mRNA. UGT2A1 was 7–10 times more expressed in the mucosa than in the bulb. The expression profile as a function of age was quite similar in both the olfactory mucosa and the olfactory bulb. Its decrease at 12 months was more pronounced in the mucosa where the UGT2A1 mRNA level slowly increased again at 24 months.

3. Electrophysiological study: recording of multiunit activity of mitral cells

We studied the changes of activity of olfactory neurons during exposure of rats to different odors as a function of age, and we compared the recorded activities to changes in either activity or expression of UGT1A6 and UGT2A1. In general, only a few positive responses were recorded for most of the odors tested whatever the age of the rats. The percentages of positive and null responses to the different odors in the first and second series of stimulation considered were compared in the four groups of rats considered either together or separately (Fig. 5A). In both cases, they were not significantly different (Chi Square Test, $p > 0.05$). Moreover, the same result was obtained when amplitude, duration, and latency of the positive responses in the first and the second series of stimulation were compared whatever the age of the rats or the odor tested. Thus, according to the small amount of positive responses recorded

and in order to improve the statistical analysis of the data, the whole responses to both series of stimulations have been subsequently taken into account.

As a whole, only 19.4% of olfactory bulb positive responses were recorded when all the stimuli are considered together in the four groups of rats. However, the percentages of positive responses were significantly different ($p < 0.05$, Chi Square Test) according the odor tested, from 1.7 % for control to 70.9% for isoamyl acetate (Fig. 5A). It can be noted that only isoamyl acetate and anisole elicited a number of positive responses higher than 30%. Most of the stimuli induced less than 10% of positive responses. When the percentage of positive responses was calculated according to the age of the rats, only the 3-month-old rats responded to all the stimuli. The oldest animals, 12- and 16-month-old rats, were the less sensitive to the odors. Nevertheless, a similar percentage of responses to anisole and isoamyl acetate was noted in the four groups of rats (Fig. 5B). The distribution of positive and null responses was significantly different ($p < 0.05$, Chi Square Test) for each odor in function of the rat age except for anisole, naphthol and control.

The influence of odor quality on amplitude, duration, and latency of positive responses was not statistically significant, whatever the odor considered. However, a significant difference ($p < 0.05$, Chi Square Test) in the amplitude of the positive responses according to the age of the rats was observed for anisole and isoamyl acetate odors only. It is noteworthy that in the two cases, amplitude was always larger in the youngest rats; it significantly decreased in the 3 month old rats and increased again in the two other groups (Fig. 6).

Discussion

The results presented here show for the first time that a series of 24 odorant molecules were glucuronidated throughout the rat life in the different organs forming the rat olfactory system, i.e., olfactory mucosa, olfactory bulb and brain. However, these three tissues displayed very different activity rates. Tissue specific glucuronidation potency toward the test molecules was larger for the olfactory mucosa than for the two other tissues in terms of substrate diversity and enzymatic activity rate. This suggests that the olfactory mucosa could be the most important place for regulation of the concentration of molecules taking the nasal route, excepted at the beginning of rat post-natal life where the olfactory bulb displayed glucuronidation activities that were similar to that of the mucosa.

It is generally accepted that glucuronidation efficiency in tissues results from the expression of different UGT isoforms with overlapping specificities, as several isoforms may metabolize a same substrate, but at different rates [24]. In addition, it has been shown that both rat recombinant UGT2A1 and UGT1A6 conjugate identical substrates, such as the phenolic substances 1-naphthol or eugenol [20]. Therefore, we studied the expression of UGT2A1 and UGT1A6 that are respectively expressed in the olfactory mucosa and bulb [13, 20], and for UGT1A6, in the olfactory bulb and brain [10], and olfactory mucosa (Fig. 2), and we compared the expression profiles to the corresponding odorant molecules conjugation activities.

Olfactory mucosa: As the expression of UGT2A1 mRNA in the mucosa was largely more important than that of UGT1A6 mRNA, it is not surprising that the glucuronidation activity changes during aging resemble the profile of UGT2A1 expression, with a maximum between 2 weeks and 3 months. However, UGT2A1 should not account of isoamyl alcohol, (-)-borneol and camphorcarboxylic acid we recorded, as there is a decrease in the expression after 12 months, that is not observed in glucuronidation activity. Thus an other UGT isoform should contribute between 12 months and 24 months to the increasing catalytic activity observed toward carvacrol, nopol, 4-hydroxybiphenyl, geraniol, 1-naphthol, 1-nonanol or citronellol. As some of these molecules are efficiently glucuronidated by rat recombinant UGT2B1 [28], we investigate presently the expression of this isoform in the olfactory mucosa and its corresponding age-related changes.

Olfactory bulb: There is no evident correlation between UGT2A1 and UGT1A6 mRNA expression and the age-related changes in glucuronidation activity, as the glucuronidation of numerous substrate became barely detectable in rat older than 1 week. UGT2A1 mRNA was 10 time less expressed than in the olfactory mucosa, but the activity towards some substrates of the recombinant enzyme (citronellol and geraniol for instance) [20] was no more detectable. Thus the activities recorded should result from UGT1A6 activity, or from other UGT isoforms that have not been characterized until now.

Brain: no correlation appeared between the sole UGT1A6 mRNA detected and enzymatic activities. Again, as recombinant UGT1A6 is unable to glucuronidate carvacrol [16], another unknown isoform should be expressed in the brain, as already suggested by other works [31]. The present work describes for the first time age-dependent changes in expression rate of both UGT1A6 and UGT2A1 isoforms in the olfactory tissues and in the brain. The observed differences in glucuronidation activities strongly suggest different regulatory processes in the

expression of UGT2A1 and UGT1A6 displayed by the different olfactory tissues, and again the implication of other unknown isoforms.

Glucuronidation of odorants in the olfactory system has major functional implications. First, in synergy with several other xenobiotic-metabolizing enzymes present in the olfactory mucosa, UGTs should contribute to the biotransformation of odorant molecules, thus contributing to a specific metabolic barrier preventing a possible influx of xenobiotics into the brain [15], as previously suggested for the BBB [8]. In accordance with this view, mucosal activities were very high, especially in 3-month-old rats, where 1-naphthol glucuronidation displays a higher efficiency than in the liver. Secondly, mucosal metabolism of odorant molecules should also allow an efficient odor coding, by preventing a saturation of the olfactory receptors and / or participate in the termination of the olfactory signal, in accordance with [19, 20].

Odorant molecules glucuronidation has been also detected in the olfactory bulb and in the brain tissue. These activities probably participate to the metabolic barrier [8, 10], but should not be involved in olfactory function.

As both UGT expression and smelling efficiency change with age [7], we examined if there was a functional correlation between glucuronidation activities and olfactory function. Mitral cells are relay neurons in the olfactory bulb, conveying activity from mucosa olfactory receptor cells to the piriform cortex. There is strong physiological and behavioral evidence that local synaptic interactions within the olfactory bulb modulate mitral cell discharges and facilitate odorant discrimination [9]. Therefore, we recorded mitral cell activity in response to different odorants chosen among the substrates of the UGT isoforms expressed in the olfactory tissues. The rather small number of positive responses recorded in these experimental conditions could result from the fact that the electrophysiological recordings were carried out on anaesthetized rats. As very young rats (15-day-old) were tested, it was impossible to chronically implant them with electrodes in the olfactory bulb and to wait until recovering from anesthesia because it was necessary to introduce them again in the nest and the dam will have not accepted them easily. Therefore, electrophysiological data were recorded on anaesthetized rats in all groups, and it was not possible to avoid a possible influence of anesthesia on the olfactory bulb responses. Anesthesia could be responsible from the rather low level of positive responses to most odorants tested, even if a large percentage of positive responses (around 70%) was observed for isoamyl acetate and anisole. The small number of positive responses to many stimuli tested made the statistical analysis of the data difficult. Interestingly, response amplitude varied in the same way for both odors, and was

smaller in the 3-month-old rats. As olfactory UGT2A1 expression is the largest at this age, the small amplitude of the positive responses at this age may result from a higher glucuronidation efficiency of odorant molecules, resulting in a modification or modulation of their interaction with the olfactory receptors [2]. However, it should be underlined that an activity of UGT2A1 towards isoamyl acetate has not yet been described.

Olfactory deficits are a hallmark of both normal aging [7] and neurodegenerative disorders like Parkinson disease [12], but may also result from local CYP-dependent toxicity [3]. Thus a better knowledge of xenobiotic metabolism in olfactory pathways, i.e. olfactory mucosa, olfactory bulb, and the brain itself, may provide an important clue to the etiology of Parkinson's disease and of xenobiotic-triggered olfactory damage.

References:

- [1] S.K. Bansal and T. Gessner, A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronyltransferase activity toward various aglycones using uridine diphospho[U-¹⁴C]glucuronic acid. *Anal. Biochem.* 109 (1980) 321-329.
- [2] N. Ben-Arie, M. Khen and D. Lancet, Glutathione S-transferase in rat olfactory epithelium: purification, molecular properties and odorant biotransformation. *J. Biochem.* 292 (1993) 379-384.
- [3] E.B. Brittebo, Metabolism of xenobiotics in the nasal olfactory mucosa: implications for local toxicity. *Pharmacol. Toxicol.* 72 (1993) 50-52.
- [4] B. Burchell, Turning on and turning off the sense of smell. *Nature* 350 (1991) 16-17.
- [5] M. Cattarelli, J. Pager and J. Chanel, Modulation des réponses multiunitaires du bulbe olfactif et de l'activité respiratoire en fonction de la signification des odeurs chez le rat non contraint. *J. Physiol. (Paris)* 73 (1977) 963-984.
- [6] P. Chomczynski and N. Sacchi, Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159.
- [7] R.L. Doty, P. Shaman, S.L. Applebaum, R. Giberson, L. Siksorski and L. Rosenberg, Smell identification ability: changes with age. *Science* 144 (1984) 1441-1442.
- [8] R.D.S. El-Bachá and A. Minn, Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Molecul. Biol.* 45 (1999) 15-23.

- [9] D. Friedman and B.W. Strowbridge, Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J. Neurophysiol.* 84 (2000) 39-50.
- [10] D. Gradinaru, F.G. Suleman, S. Leclerc, J.M. Heydel, J.P. Grillasca, J. Magdalou and A. Minn, UDP-glucuronosyltransferase in the rat olfactory bulb: identification of the UGT1A6 isoform and age-related changes in 1-naphthol glucuronidation. *Neurochem. Res.* 24 (1999) 997-1002.
- [11] D. Harding, S. Fournel-Gigleux, M.R. Jackson, B. Burchell, Cloning and substrate specificity of a human phenol UDP- glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 8381-8385.
- [12] C.H. Hawkes, B.C. Shephard and S.E. Daniel, Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 62 (1997) 436-446.
- [13] J.M. Heydel, S. Leclerc, P. Bernard, H. Pelczar, D. Gradinaru, J. Magdalou, A. Minn, Y. Artur and H. Goudonnet, Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system. I. Expression of the olfactory UGT2A1 in the rat and mouse nasal epithelium and olfactory bulb. *Mol. Brain Res.* 90 (2001) 83-92.
- [14] Z. Hua, Q.Y. Zhang, T. Su, T.W. Lipinska and X. Ding, cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of mouse CYP2G1, an olfactory-specific steroid hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 340 (1996) 208-214.
- [15] A.A. Hussain, Intranasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29 (1998) 39-49.
- [16] M.R. Jackson, S. Fournel-Gigleux, D. Harding, B. Burchell, Examination of the substrate specificity of cloned rat kidney phenol UDP-glucuronyltransferase expressed in COS-7 cells, *Mol Pharmacol* 34 (1988) 638-642.
- [17] G. Jedlitschky, A.J. Cassidy, M. Sales, Pratt N. and B. Burchell, Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J.* 340 (1999) 837-843.
- [18] H. Khiri, P. Reynier, N. Peyrol, B. Lérique, J. Torresani and R. Planells, Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. *Mol. Cell. Probes* 10 (1996) 201-211.
- [19] D. Lancet, Olfaction. The strong scent of success. *Nature* 351 (1991) 275-276.
- [20] D. Lazard, K. Zupko, Y. Poria, P. Nef, J. Lazarovits, S. Horn, M. Khen and D. Lancet, Odorant signal termination by olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Nature* 349 (1991) 790-793.

- [21] D. Lazard, N. Tal, M. Rubinstein, M. Khen, D. Lancet and K. Zupko, Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase. *Biochemistry* 29 (1990) 7433-7440.
- [22] B. Leininger-Muller, J.F. Gherzi-Egea, G. Siest and A. Minn, Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neurosci. Lett.* 175 (1994) 37-40.
- [23] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [24] P.I. Mackenzie, I.S. Owens, B. Burchell, K.W. Bock, A. Bairoch, A. Bélanger, S. Fournel-Gigleux, M. Green, D.W. Hum, T. Iyanagi, D. Lancet, P. Louisot, J. Magdalou, J.R. Chowdhury, J.K. Ritter, H. Schachter, T.R. Tephly, K.F. Tipton and D.W. Nebert, The UDP-glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7 (1997) 255-269.
- [25] T. Nakamura and G.H. Gold, A cyclic-nucleotide gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325 (1987) 442-444.
- [26] P. Nef, J. Heldman, D. Lazard, T. Margalit, M. Jaye, I. Hanukoglu and D. Lancet, Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 6780-6785.
- [27] Y. Pilpel, A. Sosinsky and D. Lancet, Molecular biology of olfactory receptors. *Essays Biochem.* 33 (1998) 93-104.
- [28] M. Pritchard, S. Fournel-Gigleux, G. Siest, P. Mackenzie, J. Magdalou, A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP- glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase 2B1) stably expressed in V79 cells catalyzes the glucuronidation of morphine, phenols, and carboxylic acids, *Mol Pharmacol* 45 (1994) 42-50.
- [29] A. Radomska-Pandya, P.J. Czernik, J.M. Little, E. Battaglia and P.I. Mackenzie, Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug. Metab. Rev.* 31 (1999) 817-899.
- [30] R.R. Reed, Signaling pathways in odorant detection. *Neuron* 8 (1992) 205-209.
- [31] F.G. Suleman, A. Abid, D. Gradinaru, J.L. Daval, J. Magdalou and A. Minn, Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 358 (1998) 63-67.

- [32] F.G. Suleman, B. Leininger-Muller, J.F. Gherzi-Egea and A. Minn, Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes. *Neurosci. Lett.* 161 (1993) 219-222.

Table 1: Age-related changes in odorant glucuronidation activity in the rat olfactory mucosa (A), olfactory bulb (B) and in the rat brain (C). Aliquots of olfactory tissue homogenates (10 mg protein) were incubated in the presence of odorant substrates, and [14 C]-UDPGA as the cosubstrate. The amount of glucuronides formed was measured by thin layer chromatography and liquid scintillation counting.

A. OLFACTORY MUCOSA (nmol/h/mg protein) (a)

	1 day	1 week	2 weeks	3 months	12 months	24 months
1-naphthol	13.5 $\pm$ 0.6*	160.9 $\pm$ 7.9*	270.1 $\pm$ 44.4	369.7 $\pm$ 37.3	202.5 $\pm$ 29.5	318.0 $\pm$ 28.0
Caprylic acid	0.1	11.6	27.4	23.1	10.3	11.4
Geraniol	0.3	40.0	88.7	87.5	62.0	100.0
<i>Trans</i> -2-hexen-1-ol	1.0	22.3	48.8	39.5	9.1	12.4
1-nonanol	0.5	74.5	202.2	210.0	148.1	238.4
β -citronellol	0.3	46.1	104.3	174.1	105.4	169.8
1-octen-3-ol	2.8	92.2	175.8	254.5	64.5	80.2
Anisole	0.4	4.0	7.9	4.7	2.6	4.7
Isoamyl acetate	0.7	2.4	19.4	27.9	0.9	6.1
Carvacrol	5.3	118.8	230.3	418.8	141.5	274.3
Coniferyl alcohol	1.3	53.7	104.2	125.3	20.4	28.8
Eugenol	11.4	164.1	275.9	501.4	196.3	376.8
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	13.5	108.2	168.8	147.6	62.0	88.3
Vanillin	6.1	86.7	166.9	157.0	55.2	78.2
Isoamyl alcohol	0.4	6.8	26.3	21.4	5.5	4.4
4-hydroxydiphenyl	1.5	5.0	97.8	166.4	92.3	189.6
(-)-borneol	2.0	120.0	325.7	350.5	120.2	92.5
(+)-borneol	4.2	56.8	114.4	146.1	33.3	40.7
($\pm$)-camphorcarboxylic	0.1	4.6	11.9	10.9	2.2	0.7
(-)-nopol	1.6	132.3	211.1	343.1	101.2	169.8
(-)-menthol	0.1	19.2	49.7	43.2	17.7	21.1
(-)-myrtanol	2.7	73.7	175.3	285.4	115.3	136.5

(a) the following substrates, cineole and (-)-nicotine, were not significantly glucuronided whatever the age in rat olfactory mucosa homogenates (activity $\leq$ 0.1 nmol/h/mg protein).

B. OLFACTORY BULB (nmol/h/mg protein) (b)

	1 day	1 week	2 weeks	3 months	12 months	24 months
1-naphthol	4.8 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.6	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3
β-citronellol	0.3	0.1	ND	ND	ND	ND
1-octen-3-ol	0.5	ND	ND	ND	0.1	ND
Anisole	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	ND
Carvacrol	2.3	0.6	1.0	0.3	0.4	0.2
Coniferyl alcohol	0.5	ND	ND	ND	0.1	0.1
Eugenol	5.1	2.3	2.8	1.3	1.3	0.4
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	2.3	3.3	1.9	1.6	1.5	0.7
Vanillin	1.6	2.2	1.6	1.2	1.3	0.6
Isoamyl alcohol	0.2	ND	ND	0.1	ND	ND
4-hydroxydiphenyl	0.5	ND	ND	0.1	0.1	ND
(-)-borneol	0.6	0.1	ND	ND	0.3	ND
(+)-borneol	0.5	ND	0.1	ND	0.2	ND
(-)-myrtanol	0.4	ND	0.1	ND	0.1	ND

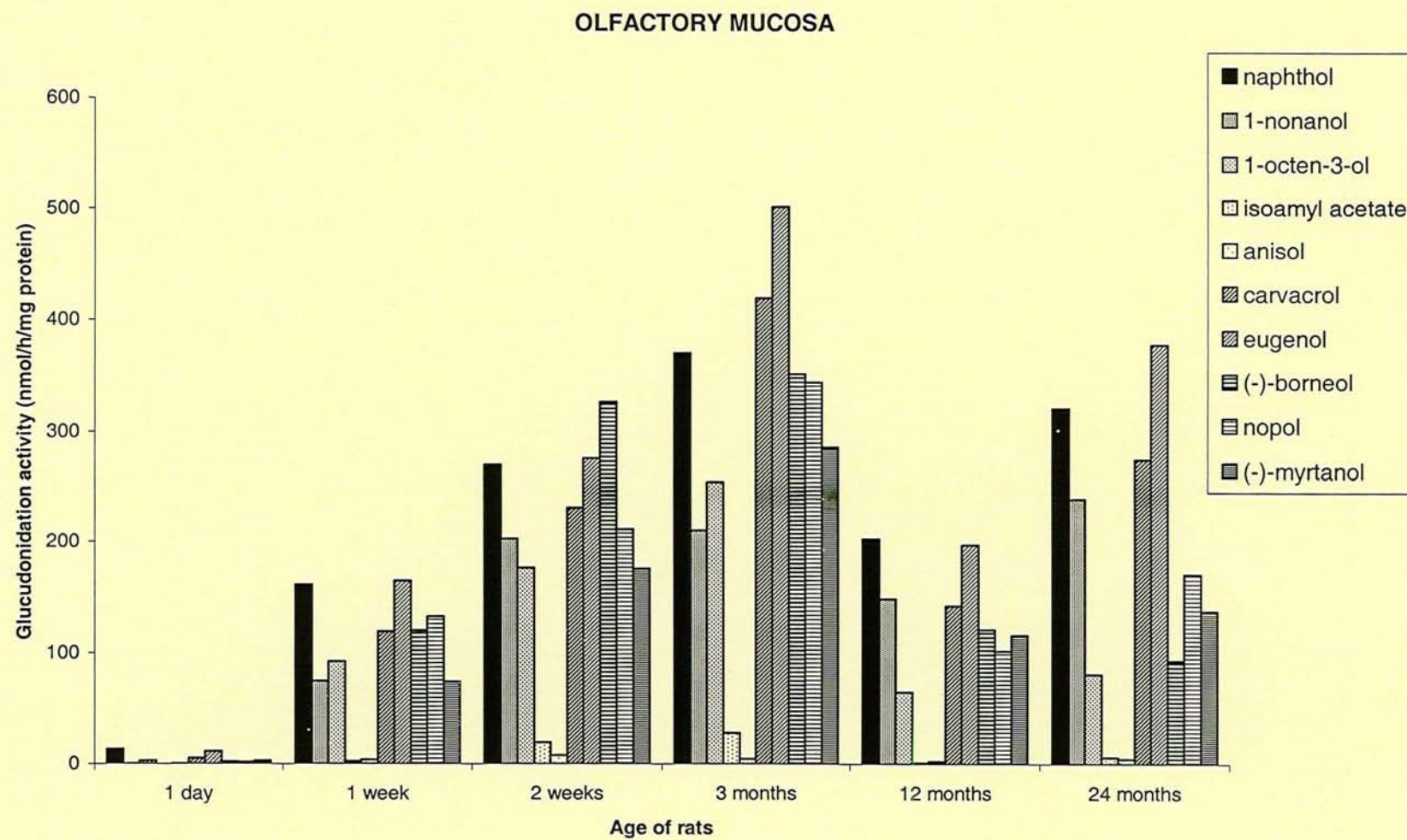
(b) the following substrates, *trans*-2-hexen-1-ol, 1-nonanol, (-)-nicotine, (±)-camphorcarboxylic acid, cineole, (-)-nopol, (-)-menthol, caprylic acid, geraniol, were not significantly glucuronided whatever the age in rat olfactory bulb homogenates. ND, not detectable activity (≤ 0.1 nmol/h/mg protein).

C. BRAIN (nmol/h/mg protein) (c)

	1 day	1 week	2 weeks	3 months	12 months	24 months
1-naphthol	4.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2
Carvacrol	0.5	0.7	0.7	ND	ND	0.2
Eugenol	3.6	1.6	1.7	0.4	0.4	0.9
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	4.0	1.8	1.6	0.6	0.8	1.1
Vanillin	1.7	1.0	1.2	0.5	0.8	0.8

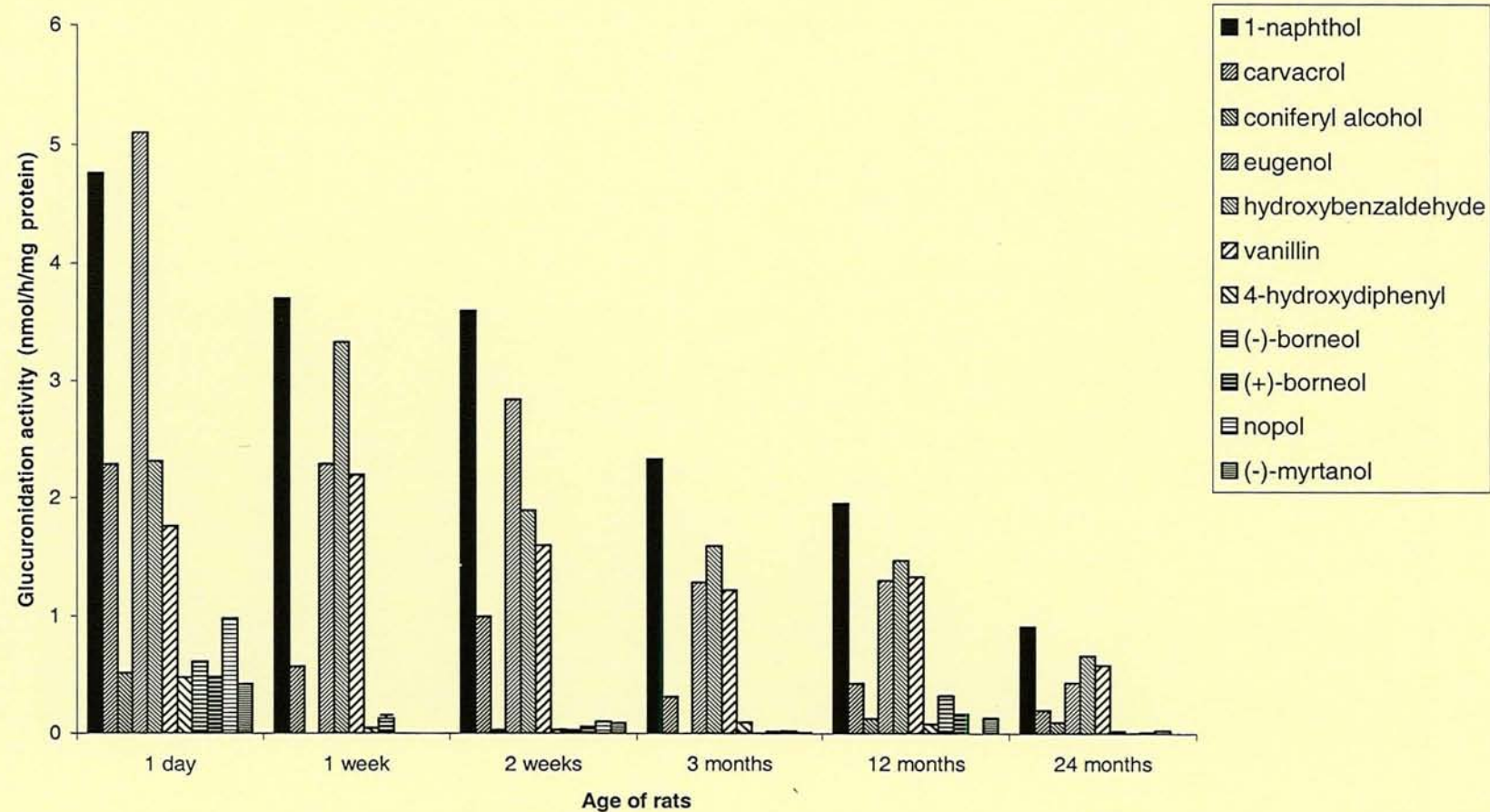
(c) : the following substrates, anisole, (+)-borneol, (–)-borneol, 1-octen-3-ol, caprylic acid, geraniol, trans-2-hexen-1-ol, 1-nonanol, β-citronellol, cineole, coniferyl alcohol, (–)-nopol, (–)-menthol, (–)-myrtanol, (±)-camphorcarboxylic acid, (–)-nicotine, isoamyl alcohol, 4-hydroxydiphenyl were not significantly glucuronided whatever the age in rat brain homogenates. ND, not detectable activity (≤ 0.1 nmol/h/mg protein).

A



B

OLFACTORY BULB



C

BRAIN

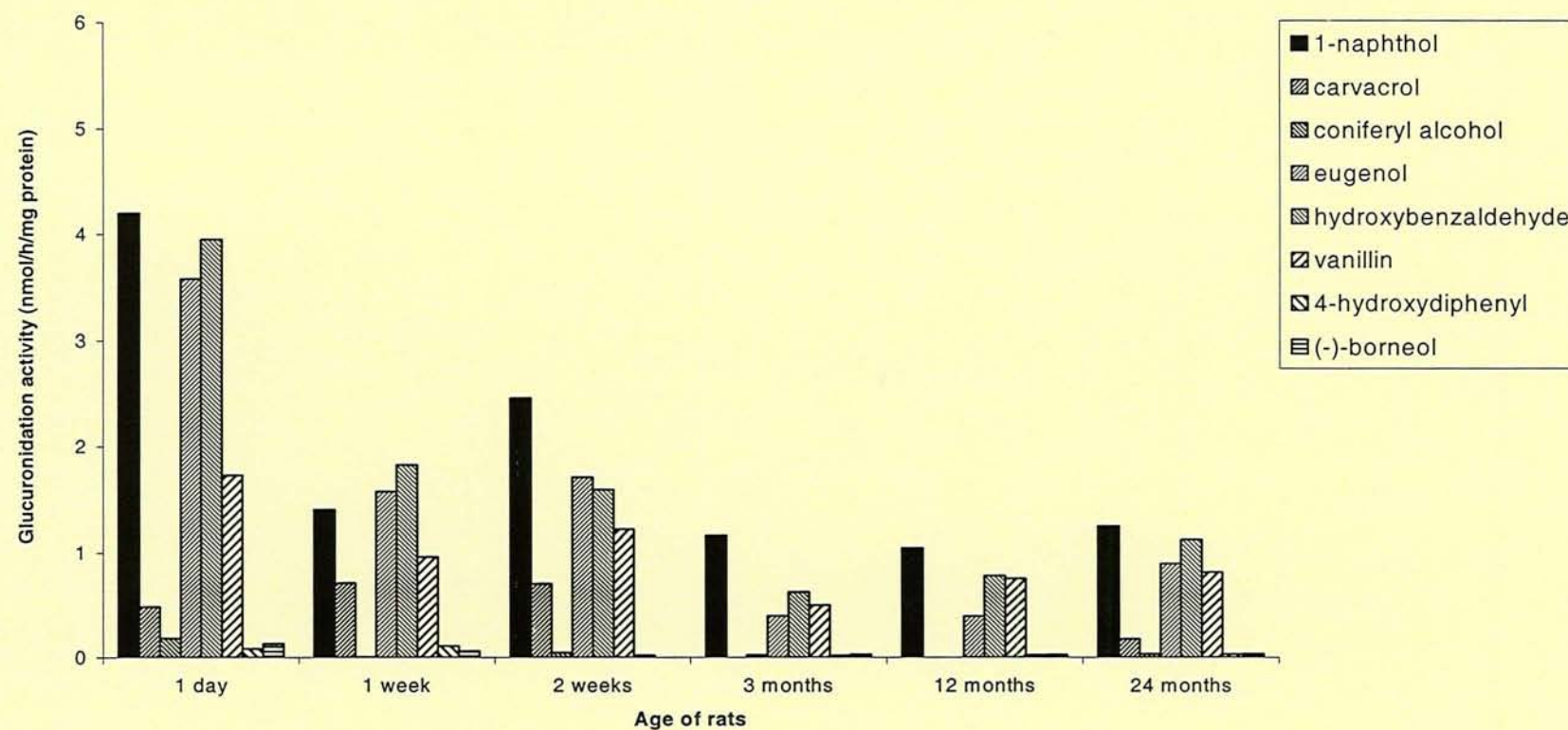


Figure 1: Age-related changes in odorant glucuronidation activity in the rat olfactory mucosa (A), olfactory bulb (B) and in the rat brain (C). Aliquots of olfactory tissue homogenates (10 mg protein) were incubated in the presence of odorant substrates, and [^{14}C]-UDPGA as the cosubstrate. The amount of glucuronides formed was measured by thin layer chromatography and liquid scintillation counting. Only the significant glucuronidation activities of odorant molecules have been plotted. The complete data are displayed in Table 1.

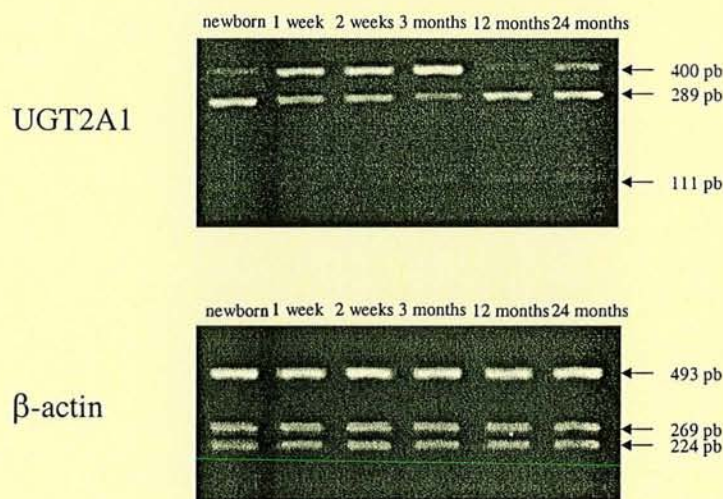
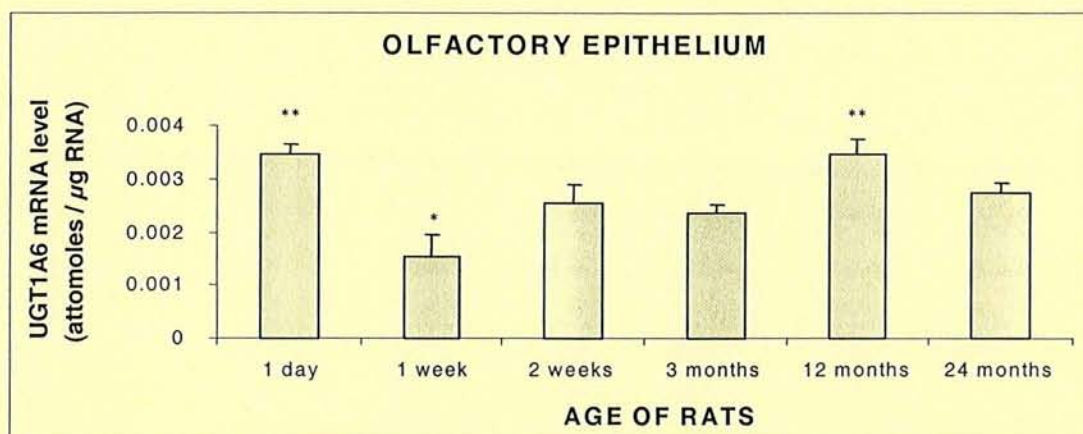
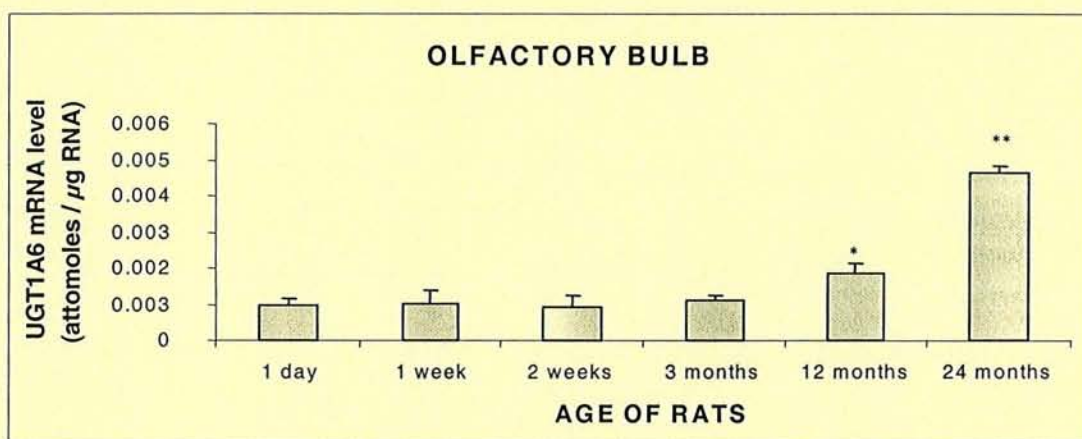


Figure 2: Representative pictures of ratUGT2A1 multistandard RT-PCR amplification as a function of age. For each rat (e) UGT2A1 mRNA test, β -actin mRNA is used as the internal standard and mouse (s) olfactory epithelium total RNA as the external standard. The cDNA bands obtained from both rat and mouse UGT2A1 mRNA or both rat and mouse β -actin mRNA are respectively 400 bp or 493 bp in size. The mouse UGT2A1 and β -actin, RT-PCR products are further digested using a single site restriction enzyme, resulting in two DNA fragments of respectively 289 bp and 111 bp, and 269 bp and 224 bp. As described in the Materials and Methods section, the absolute UGT2A1 mRNA level in attomole/ μ g RNA is given by the formula: $2.6 \times [(U_e / U_s) \times (B_s / B_e)]$ where U and B are the respective density of the ethidium bromide stained UGT2A1 and β -actin cDNA bands.



B



C

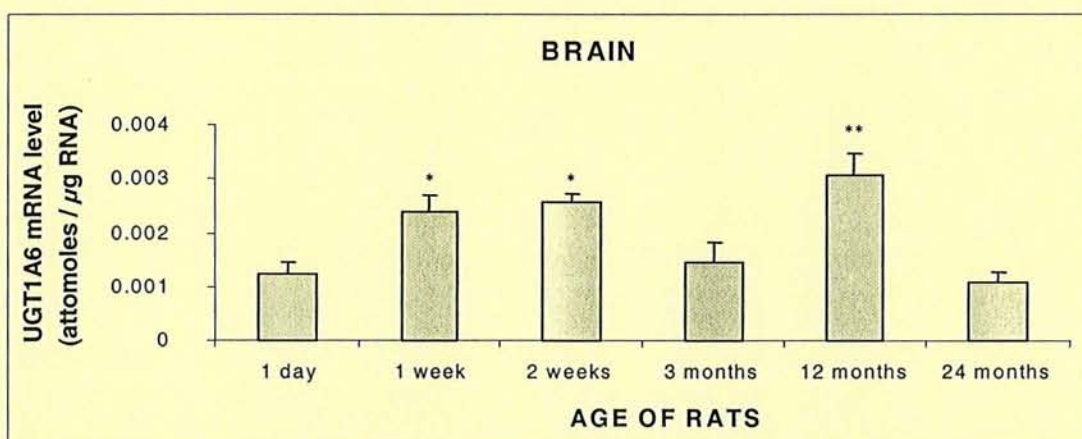
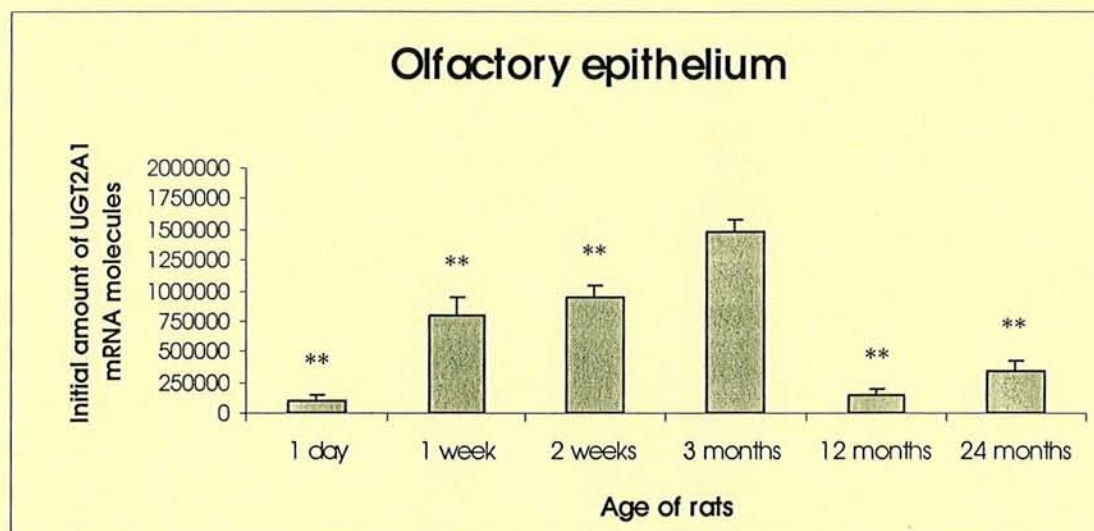


Figure 3: Changes in UGT1A6 mRNA expression of in rat olfactory epithelium (A), olfactory bulb (B) and in the rat brain (C) as a function of age. Results are the mean of at least 4 densitometric measurement of the bands obtained by quantitative RT-PCR performed as described in Materials and Methods and Figure 1. *: Significantly different from the 3-month-old value, $p < 0.05$, Student's t test. **: Significantly different from the 3-month-old value, $p < 0.01$, Student's t test.

A



B

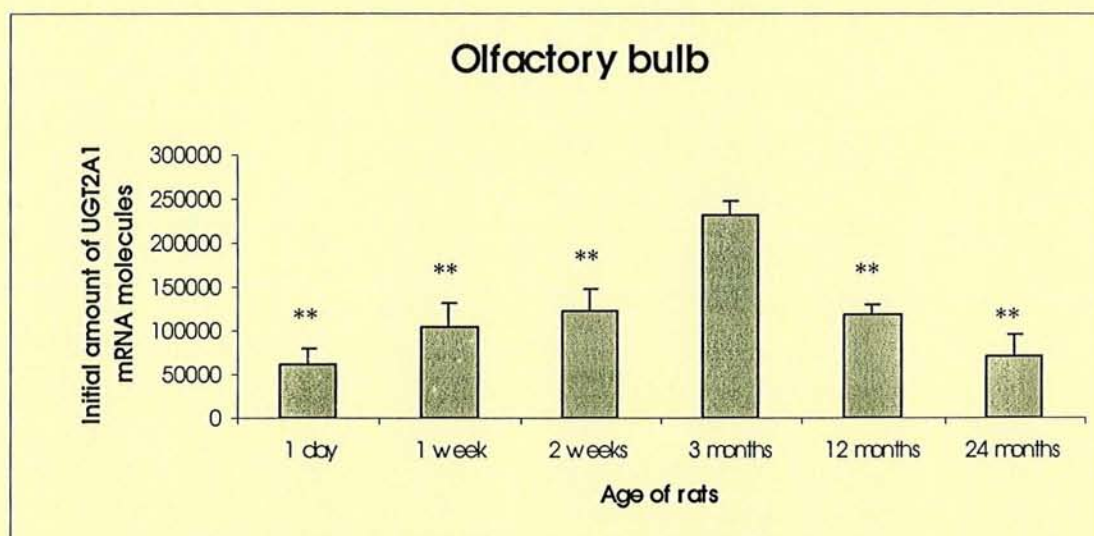
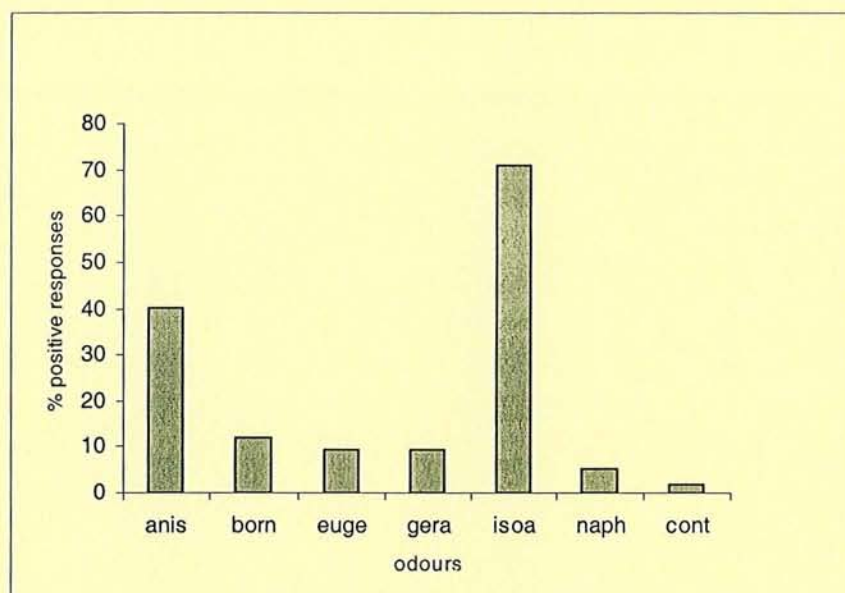


Figure 4: Changes in UGT2A1 mRNA expression in olfactory mucosa (A), and olfactory bulb (B). No mRNA expression was observed in brain tissue at any age (not shown). Experimental conditions are identical to those of Fig. 2, excepted for the primers used for quantitative RT-PCR. **: Significantly different from the 3-month-old value, $p < 0.01$, Student's *t* test.

A



B

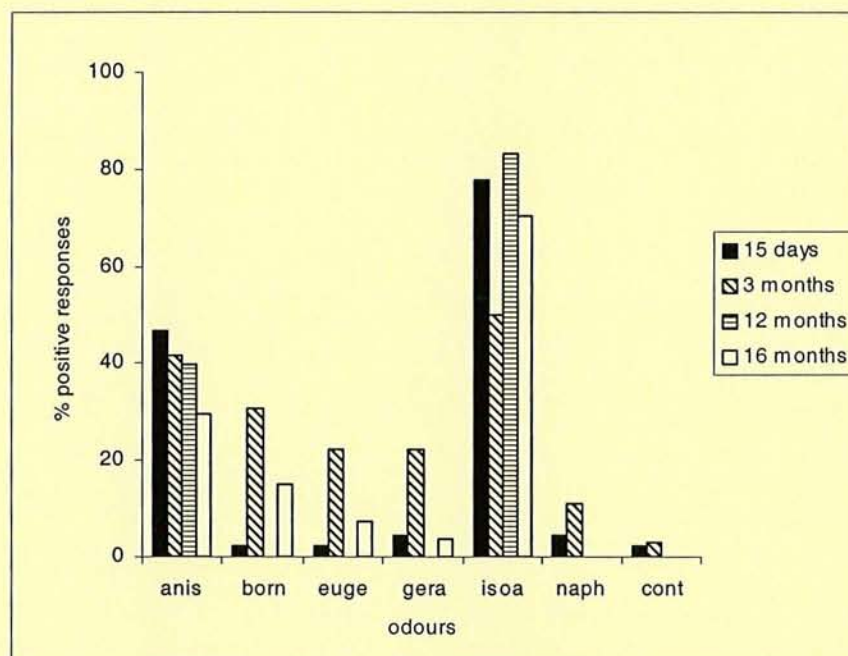


Figure 5: A) Percentage of positive olfactory bulb electrical responses to odour stimulations when the four groups of rats are considered together. B) Percentage of positive olfactory bulb electrical responses to odour stimulations according to the age of the rats recorded. Abbreviations: anis, anisole; born, borneol; euge: eugenol; gera, geraniol; isoa, isoamyl acetate; naph, 1-naphtol; cont, control (pure air). Experimental conditions are described in the "Materials and Methods" section.

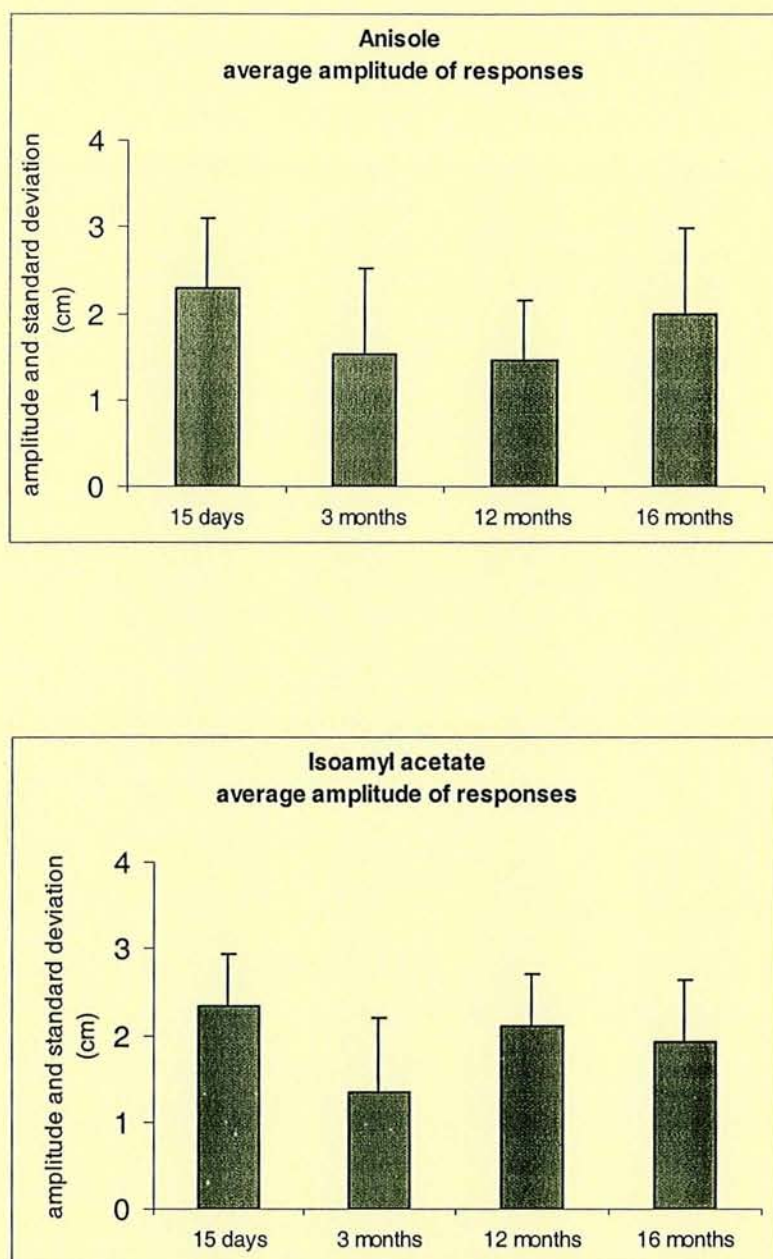


Figure 6: Average amplitude of mitral cell activity recorded in response to anisole and isoamyl acetate stimulations according to the age of the rats recorded.

1.2. Expression de l'UGT2A1

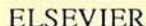
Publication 2

**Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1)
expression : *in situ* mRNA localization and quantitative analysis.**

HEYDEL J.M., LECLERC S., BERNARD P., PELCZAR H., GRADINARU D.,
MAGDALOU J., MINN A., ARTUR Y., GOUDONNET H.

Molecular Brain Research, 2001, 90, 83-92.

Ce travail montre l'expression des ARNm de l'UGT2A1 dans les BO par hybridation *in situ* et RT-PCR quantitative. Lazard *et al.* (1990) avaient mis en évidence la présence de cette isoforme uniquement dans l'épithélium olfactif et dans aucun autre organe. Cette isoforme spécifique d'un tissu a ainsi été qualifiée d'UGT olfactive. Dans la MO, les ARNm de l'UGT2A1 sont principalement trouvés dans les cellules sustentaculaires et, à un taux plus faible dans les cellules des glandes de Bowman. Le marquage par hybridation *in situ* montre la présence des ARNm de l'UGT2A1 dans les cellules granulaires des BO. Le taux d'ARNm de l'UGT2A1 apparaît 6 fois plus faible dans les BO que dans la MO par RT-PCR quantitative. L'expression des ARNm de l'UGT2A1 conforte l'hypothèse du rôle de cette enzyme dans la protection du SNC contre les xénobiotiques.



Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: in situ mRNA localization and quantitative analysis¹

Jean-Marie Heydel^{a,*}, Séverine Leclerc^{b,2}, Pascal Bernard^{a,c}, Hélène Pelczar^a, Daniela Gradinaru^a, Jacques Magdalou^b, Alain Minn^b, Yves Artur^a, Hervé Goudonnet^a

^bLaboratoire de Pharmacologie (UMR CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy-1 n° 7561), Faculté de Médecine, Nancy, France

Accepted 13 March 2001

Keywords: UDP; Glucuronosyltransferase; Olfactory epithelium; Olfactory bulb; In situ hybridization; Neurotoxicity; Rat; Mouse

Although liver is the major site of glucuronidation, other organs such as kidney, intestine, lung and skin have been

0169-328X/01/\$ - see front matter © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0169-328X(01)00080-8

reported to participate in this process and to express quantitatively and qualitatively different UGT isoforms [6,34,38–40]. In rat brain, we previously demonstrated a significant glucuronidation activity towards planar phenols (1-naphthol, 4-methylumbelliferone) that we proposed to be related to the protection of the brain against lipophilic chemicals which can cross the blood–brain barrier [12,17,42]. Other studies from our group also suggested the probable involvement of the olfactory bulb in brain protection against xenobiotics, as olfactory bulb displayed the highest activity among other cerebral regions [30]. Recently, we demonstrated the expression of the UGT isoform UGT1A6, which efficiently glucuronidates phenols, in the brain and the olfactory bulb [41]. However, the expression of other UGT isoforms could not be ruled out in these organs [18].

Lazard et al. identified a specific UGT isoform, the olfactory UGT2A1, in rat and bovine olfactory epithelium, which was proposed to exhibit an expression restricted to the olfactory epithelium [28,29]. In this tissue, the bovine and rat UGT2A1 proteins were immunolocalized in the subepithelial Bowman's glands and in the superficial epithelial sustentacular cells [29]. Recently, Jedlitschky et al. [24] identified and characterized UGT2A1 in humans. In both rat and human, UGT2A1 glucuronidates phenols and monoterpenoid alcohols, among them many odorant compounds [24,29]. Thus, besides a potential detoxification role, UGT2A1 expression in olfactory epithelium might cause termination of the odorant signals [29], as has already been suggested for the olfactory specific cytochrome P450 isoform CYP2G [28].

In the present study, we demonstrate that UGT2A1 is also expressed in the rat and mouse olfactory bulb, a structure which belongs to the central nervous system. We report the localization of the UGT2A1 mRNA in the olfactory epithelium and in the olfactory bulb, using non-isotopic *in situ* hybridization. We also characterize by RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends), the mouse Ugt2A1 cDNA which allowed us to develop a multistandard quantitative RT-PCR method to measure UGT2A1 mRNA expression.

2. Materials and methods

2.1. Animal experiments

Male Balb/c mice (18–20 g) and male Wistar rats (165–170 g) (Janvier, Le Genest-St Isle, France) were housed in an environmentally controlled room (12-h/12-h light/dark cycles, temperature 20–22°C), and had unrestricted access to standard rodent food and tap water. The study was approved by the local Animal Ethic Committee, and the research adhered to the 'NIH Principles of Laboratory Animal Care'. The olfactory epithelium and the olfactory bulb were removed from 3-month-old animals

after decapitation. Rats and mice used as multistandard RNA sources were 5 weeks old. The olfactory epithelium was carefully scraped in a sterile 0.9% NaCl (w/v) solution to remove any cartilage debris. The samples were immediately frozen into liquid nitrogen and stored at –80°C until use. Total RNA was extracted according to a microscale method [8], using a RNAXEL kit (Eurobio, les Ulis, France). The RNA preparations were incubated in the presence of RNase-free DNase (Promega, Lyon, France) to avoid amplification of possible contaminating genomic DNA.

2.2. RT-PCR and RACE-PCR experiments

Complementary DNA was synthesized from RNA samples by mixing 1 µg total RNA, 100 pmol of random hexamer in the presence of 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 200 U of Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 40 U RNase inhibitor, and 1 mM of each dNTP (all reagents purchased from Eurobio) in a total volume of 20 µl. Samples were incubated at 37°C for 60 min and then diluted to 100 µl with sterile diethylpyrocarbonate-treated water. The enzyme was inactivated by heating at 95°C for 5 min. Two degenerated oligonucleotides were designed based on the amino acid sequences conserved between rat and bovine proteins (degenerated sense primer: 5'-ATGGGNAAa/gGCNGAa/gATa/ca/tTGG-3'; degenerated antisense primer: 5'-GGc/tTTNACNGGc/tTGa/gTCa/gTGa/gTG-3') (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). A PCR reaction using these degenerated primers and an olfactory epithelium cDNA pool from Balb/c mouse as template was undertaken. The RT reaction products (10 µl) were added to 20 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 150 µg/ml bovine serum albumin, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 50 pmol of each primer and 2 U of Taq DNA polymerase (Eurobio), in a total volume of 50 µl. The mixture was subjected to 33 cycles through a 1-min denaturing step at 94°C, a 1-min annealing step at 55°C and a 1.5-min elongation step at 72°C in a thermal cycler (Personnal-Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified 600-bp fragment was sequenced by dideoxy sequencing (Genome Express, Grenoble, France). RACE-PCR is a procedure for amplification of nucleic acid sequences from an mRNA template between a defined internal site and unknown sequences at either the 3'- or the 5'-end of the mRNA [14]. From the 600-bp fragment sequence, RACE-PCR experiments were performed according to the recommendations of the RACE-PCR Kit supplier (Life Technologies). The 5'- and 3'-RACE-PCR products were purified using the Glassmax DNA isolation spin method (Life Technologies) and then analyzed by the dideoxy method (Genome Express). The protein sequence Ugt2A1 was compared with sequences present in the Genbank database using the

BLAST network service at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.3. Quantitative multi-standard RT-PCR experiments

The amount of mRNA encoding the olfactory UGT protein was measured by a quantitative multistandard RT-PCR method. This strategy takes advantage of both UGT2A1 (U) and β -actin (B) mRNA sequence conservation between two animal species. Briefly, total RNA samples extracted from rat tissues were mixed with a constant amount of total RNA from mouse olfactory epithelium which brought both olfactory UGT and β -actin sequences, and thus acted as a multistandard source. For mouse samples, a constant amount of total RNA from rat olfactory epithelium was taken as multistandard source. Separate PCR amplifications for olfactory UGT and for β -actin were undertaken with primers that are able to hybridize to the rat and mouse sequences with the same efficiency. For UGT amplification, we used the sense primer: 5'-AACTCACAGACCAGATGTCCTTCGC-3'; and the antisense primer: 5'-TTCTGAG-GAATCTGGGCAAGG-3' (Life Technologies). For β -actin amplification, primers designed by Khiri et al. [25] were used. Complementary DNA was synthesized by mixing 0.5 μ g of total RNA from rat and mouse. PCR reactions were performed as follows: a 10- μ l cDNA aliquot was added to a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 150 μ g/ml bovine serum albumin, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 50 pmol of each primer and 2 U of Taq DNA polymerase (Eurobio), in a total volume of 50 μ l. The mixture was subjected to 26 cycles for olfactory UGT through a 15-s denaturing step at 94°C, a 15-s annealing step at 58°C and a 30-s elongation step at 72°C in a thermal cycler. The β -actin fragment was amplified through 25 cycles consisting of a 15-s denaturing step at 94°C, a 15-s annealing step at 60°C and a 30-s elongation step at 72°C. Following the final cycle, a 1-min elongation step at 72°C was included. Each amplification product was then characterized by restriction site polymorphism (UGT2A1: 400 bp, β -actin: 493 bp). The mouse amplification product was digested by Hind III into two fragments (289 and 111 bp), while the rat product remained uncut. For β -actin, a single Xba I site (producing 269- and 224-bp fragments) was present in mouse, but not in rat. Amplification products were resolved by agarose gel electrophoresis and observed after revelation by ethidium bromide. The bands were visualized under UV light and photographed by a computer-assisted camera (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Quantification of each band was performed by densitometry analysis with NIH software (NIH, Bethesda, MD). Considering the sample (e) and the standard (s), the results were expressed as the ratio $(Ue/Us) \times (Bs/Be)$ for mRNA expression. The UGT2A1 mRNA level in the multistandard total RNA was de-

termined by competitive PCR experiments. This method takes advantage of sequence conservation between rat and mouse and uses the same primers to amplify UGT2A1 in both species. Separate serial dilutions of known amount of UGT2A1 PCR products from mouse and rat olfactory epithelium were carried out, and used as standards, in rat and mouse competitive PCR assays, respectively. A total of 1 μ g of mouse and 1 μ g of rat multistandard total RNA was used to synthesize the cDNA amplified in competitive PCR assay. By a graphical calculation method, we found that 2.6 amol/ μ g RNA and 3.1 amol/ μ g RNA of UGT2A1 mRNA (a), respectively, from the mouse and the rat multistandard, equivalently competed for standard in the competitive PCR assays. Using the absolute quantitation of UGT2A1 mRNA in the multistandard total RNA as a constant factor, the level of UGT2A1 mRNA in the studied samples could be deduced for subsequent multistandard quantitative assay, as long as the same multistandard total RNA preparation was used. The final results were expressed as the ratio $[(Ue/Us) \times (Bs/Be)] \times a$, and graphed as histograms in Fig. 3.

2.4. In situ hybridization analysis

2.4.1. Animal tissues

Adult male Wistar rats (350 g–370 g) were deeply anaesthetized with ketamine (Imalgène, Merial, Lyon, France) (50 mg/kg body weight) and acepromazine (Vétranquil, Sanofi, Libourne, France) (1.25 mg/kg body weight) before intra cardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline. Olfactory bulbs were dehydrated by immersion in increased alcohol concentration baths and then were embedded in paraffin.

2.4.2. Riboprobe preparation

The PCR fragment of UGT2A1 (complementary to nucleotides 686–1058) was purified from the PCR reaction using QIAquick Gel extraction kit protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France), and ligated into pCRII-TOPO vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). The high copy number pCR II-TOPO vector contains the T7 and SP6 RNA Polymerase promoters. The recombinant plasmid was transformed into TOP10 One Shot™ chemically competent cells (Invitrogen), isolated and purified with a Qiagen extraction kit. Antisense or sense templates were generated by Xba I and BamH I linearization of pCR II-TOPO vector, respectively. Digoxigenin-labeled riboprobes were synthesized using DIG RNA Labelling Kit and Dig RNA Labeling Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UDP), according to manufacturer's instructions (Roche, Mannheim, Germany).

2.4.3. In situ hybridization

Paraffin sections (5 μ m) were dried in an oven at 56°C overnight. They were rehydrated in baths containing

decreasing ethanol concentrations and washed in PBS. Then the sections were permeabilized with RNase-free proteinase K (10 µg/ml) (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) in 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA (pH 8.0) buffer for 30 min at 37°C and post-fixed for 5 min with PBS containing 4% paraformaldehyde at 4°C. After two washes in PBS, paraffin sections were acetylated with 0.1 M triethanolamine buffer (pH 8.0) containing 0.25% (v/v) acetic anhydride (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were encircled with a silicon pen (PAP-PEN, Daido Sangyo, Japan) and then were incubated with prehybridization buffer (4×SSC containing 50% (v/v) deionized formamide) for at least 10 min at 37°C. Hybridization was carried out with hybridization mix (40 µl/slide) which contained 100 ng denatured riboprobe, 40% deionized formamide (v/v), 10% dextran sulfate (v/v), 1×Denhardt's solution, 4×SSC, 10 mM DTT, 0.2 mg/ml yeast t-RNA and 1 mg/ml denatured salmon sperm DNA. Samples were covered with plastic cover slips. Slides were placed in a humid chamber and hybridized at 42°C overnight. Then, sections were washed twice under shaking in 2×SSC for 15 min, and 1×SSC for 15 min. Any single-stranded (unbound) RNA probe was digested with NTE buffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) containing 20 µg/ml RNase A (Sigma) for 30 min at 37°C followed by two washes in 0.1×SSC. For immunological detection, slides were washed for 10 min with buffer 1 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl), blocked for 30 min with buffer 1 containing 0.1% Triton X-100 and 2% normal sheep serum, and then incubated for 2 h with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibody (1/250) (Boehringer Mannheim, Germany). Slides were washed for 10 min in buffer 1 (twice) and then for 10 min in 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM Mg Cl₂ (buffer 2). Thereafter sections were covered with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma) overnight. The colour reaction was stopped by washing the slides in 10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM EDTA (buffer 3) and dipped briefly in distilled water. Counterstaining was carried out with methylene green for 3 min. Sections were mounted using a permanent mounting solution (Eukitt, O. Kindler, Freiburg, Germany).

3. Results

3.1. *In situ* hybridization analysis

Using non-radioactive *in situ* hybridization, presence of UGT2A1 mRNA is observed in the rat olfactory epithelium and bulb. Negative controls were performed under similar conditions using the sense riboprobe (Figs. 1A,C and 2A–C). The staining is observed throughout the epithelium (Fig. 1B,D). The most intense staining is found in the sustentacular cells, easily identified by the position of their nuclei (Fig. 1B), while a weaker signal is also

observed among the olfactory sensory neuron nuclei (Fig. 1D). UGT2A1 mRNA expression is also detected throughout the sub-epithelial tissue, in particular in Bowman's gland cells (Fig. 1E). Within the olfactory bulb, no signal is detected in the glomeruli or in the external plexiform layer. However, a weak signal is observed in some mitral cells, and the most intense staining is seen in the deeper granular cells (Fig. 2D–F).

3.2. Quantitative multistandard RT-PCR analysis

We investigated the expression of the rat UGT2A1 and the mouse Ugt2A1 transcripts, in the olfactory epithelium and the olfactory bulb by quantitative multistandard RT-PCR analysis. The use of multistandard RNA corrects for the tube-to-tube variations in amplification efficiency. The rat and mouse PCR products were identified by restriction site polymorphism. The tissues used in PCR assays and *in situ* hybridization analysis were removed using strictly identical protocols. The epithelium neurons, via their axonal projections, synapse within the glomerulus of the olfactory bulb; thus, an mRNA transport from the olfactory mucosa to the olfactory bulb could explain the presence of UGT2A1 mRNA, as previously demonstrated for the olfactory marker protein mRNA [49]. However, the UGT2A1 mRNA localization in the deeper neurons (granule cells) of the olfactory bulb unambiguously confirms the expression within this tissue and validates our olfactory tissue removal procedure.

The UGT2A1 mRNA level is 9.8 amol/µg RNA (±0.4, S.E.M.) in the rat epithelium and 1.6 amol/µg RNA (±0.4, S.E.M.) in the olfactory bulb (Fig. 3A). Thus, the expression in the olfactory bulb is six-fold lower than in the epithelium. A similar distribution is observed in the mouse epithelium and bulb (8.1±0.5 amol/µg RNA (±S.E.M.) and 1.3±0.5 amol/µg RNA, respectively) (Fig. 3B).

3.3. Identification of the mUgt2A1

The development of a quantitative multistandard RT-PCR required the characterization of the mouse Ugt2A1 cDNA. In order to obtain the full length cDNA sequence, we first amplified a cDNA fragment using degenerated UGT2A1 PCR primers deduced from sequence comparison between the bovine and rat UGT2A1 amino acid sequences. The 600-bp fragment thus obtained displayed a high degree of homology with the rat olfactory UGT. Subsequently, using a RACE-PCR method, PCR fragments of the 5' and of the 3' cDNA ends were obtained.

The cDNA deduced from the different sequences comprises a 1581-bp open reading frame that encodes a 527-amino acid protein (this sequence will appear in the GenBank nucleotide sequence database under the accession number: AF184901). The protein contains the typical UGT amino acid signature between residues 368 and 398

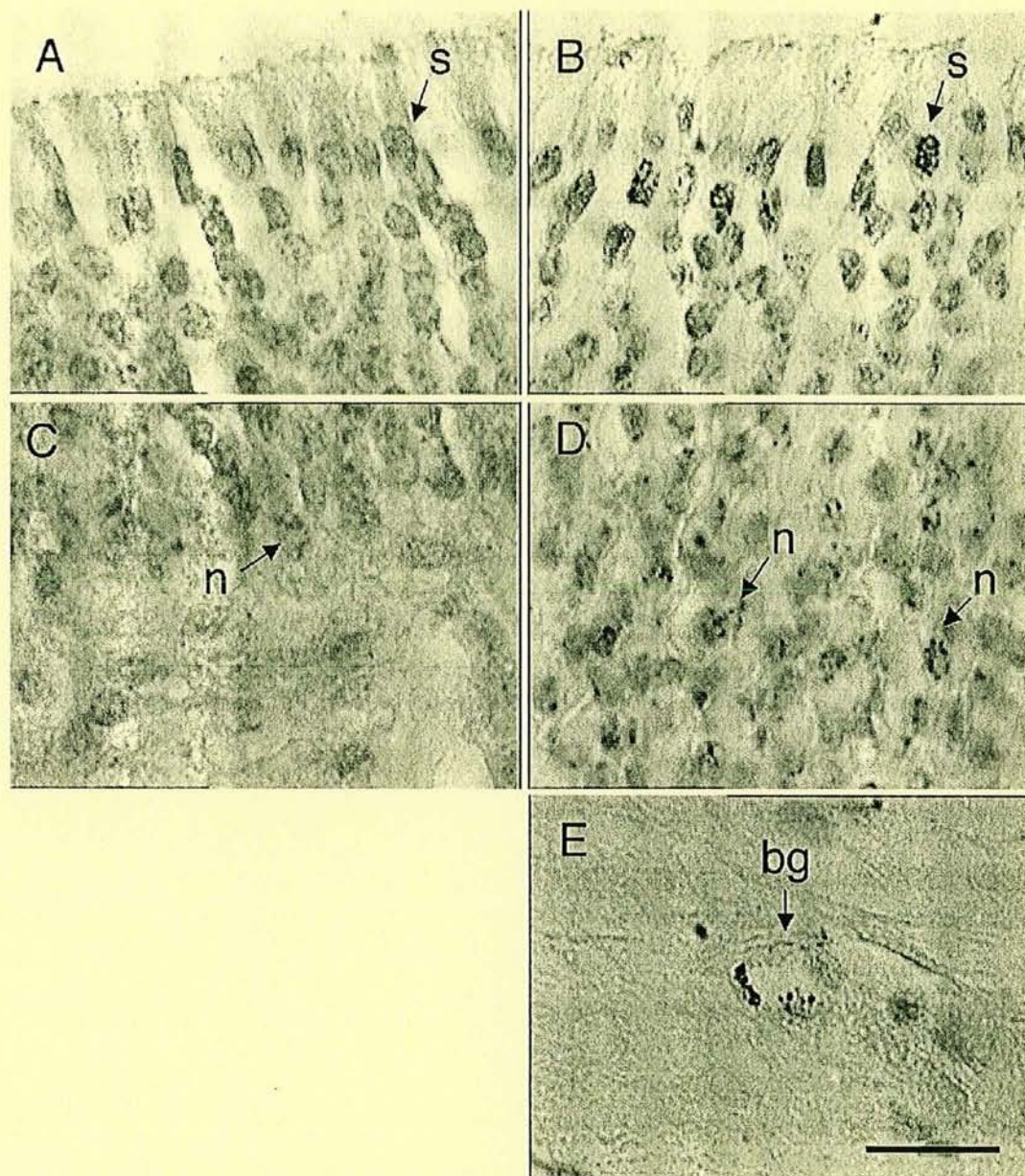


Fig. 1. UGT2A1 mRNA localization in the olfactory epithelium by in situ hybridization. Paraffin sections were hybridized with UGT2A1 antisense (B, D and E) and sense (A and C) riboprobes and stained with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibodies as described in Materials and methods. UGT2A1 staining is shown in sustentacular cells (B), in olfactory sensory neurons (D) and in Bowman's gland cells (E). Arrows indicate sustentacular cells (s), olfactory sensory neurons (n) and Bowman's gland cells (bg). Scale bars: 120 μ m.

of the C-terminal end. The overall homology with rat and human olfactory UGTs is ~96 and 87%, respectively (Table 1). This large homology concerns both the N-terminal and the C-terminal parts of the sequence. The mouse Ugt2A1 strongly differs from the mouse UGT isoforms belonging to the 2B and 1A families since it shares ~45% amino-acid sequence identity with these isoforms (mUgt1A1, 45.8%; mUgt1A2, 45.2%; mUgt1A6, 45.5%; mUgt1A9, 43.2%; mUgt2B5, 47.0%). Cluster analysis of the olfactory UGTs including the novel mouse

Ugt2A1 isoform and UGTs of family 1 and family 2 was conducted (Fig. 4). In agreement with the UGT Nomenclature Committee [32], the name mUgt2A1 was proposed for this novel enzyme.

4. Discussion

Numerous compounds are present in inhaled air, including various aldehydes, alcohols and ketones used common-

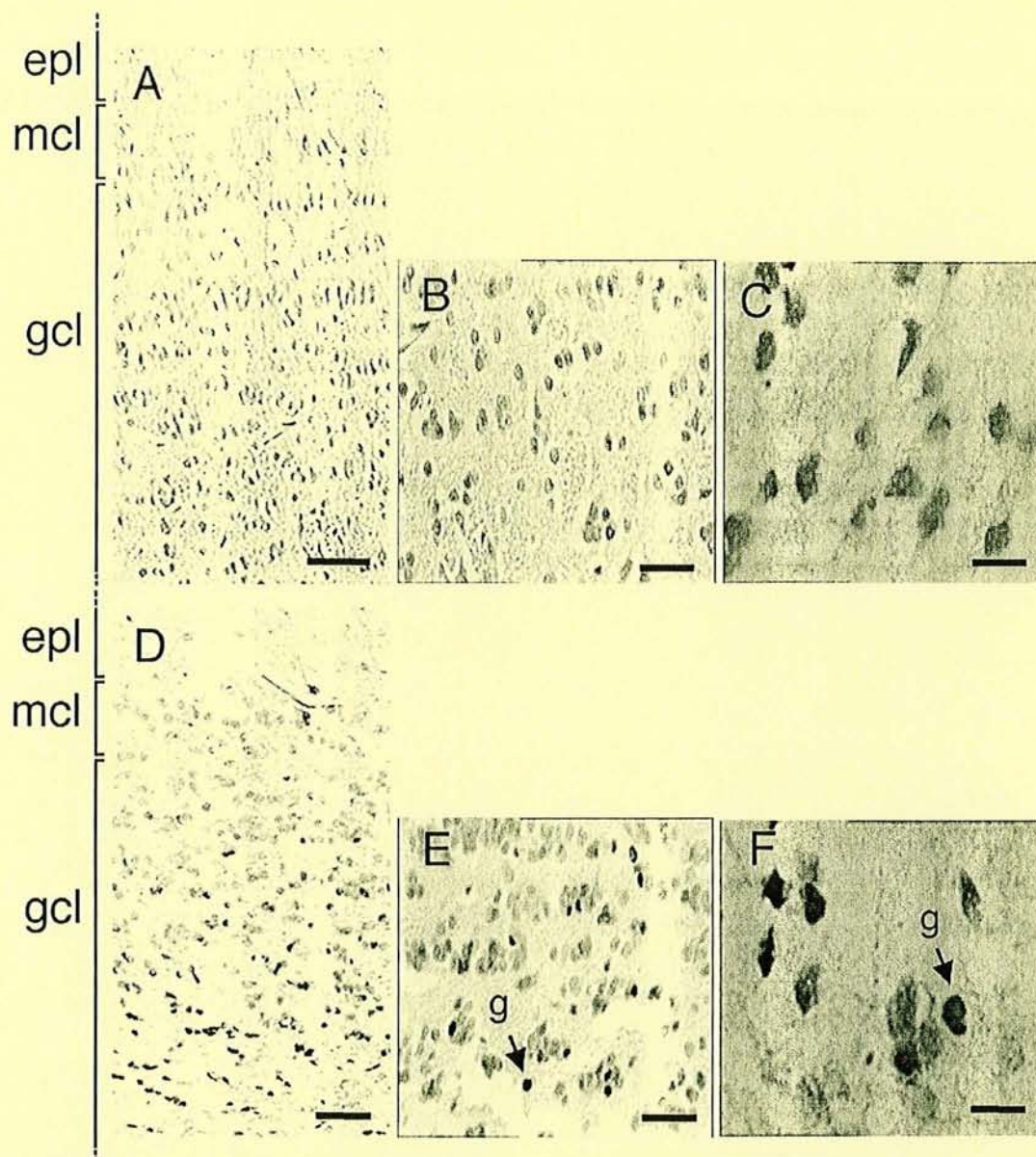


Fig. 2. UGT2A1 mRNA localization in the olfactory bulb by in situ hybridization. Hybridization with antisense (D, E and F) and with sense riboprobe as control (A, B and C) is shown. In A and D, different cell layers are indicated; epl, external plexiform; gcl, granule cell; mcl, mitral cell. UGT2A1 staining is shown in granular cells (D, E and F). Arrows indicate stained granular cells. Scale bars: (A,D) 800 μ m; (B,E) 400 μ m; (C) 130 μ m; (F) 200 μ m.

ly in fragrances and flavours, but also potentially toxic molecules such as epoxides found in tobacco smoke and volatile carcinogens like polycyclic hydrocarbons from engine smoke [51]. Accordingly, the drug metabolizing enzymes of the olfactory epithelium are thought to play the role of metabolic barrier contributing to organic compound detoxification as well as a function in metabolic odorant turnover. In particular, the primary olfactory neurons of the olfactory epithelium are in contact with the environment and, via their axonal projections, synapse in the olfactory bulb of the brain. Therefore, the olfactory neurons allow a direct transport of xenobiotics to the brain [21,44]. The

efficacy of this cerebral entry route into the brain is illustrated by the spreading of metals throughout the brain after metal dust inhalation. Both cerebral penetration and toxicity of organic compounds present in the inhaled air are biochemically modulated by the drug metabolizing enzymes [9], as shown by accumulation in the olfactory bulb of an environmental pollutant following administration of a cytochrome P450 (CYP) modulator or a glutathione depleting agent [2]. This modulation may be of significance not only in the field of toxicology, but also in the targeting of certain drugs to the brain via the nasal mucosa [23]. As xenobiotics or their metabolites resulting

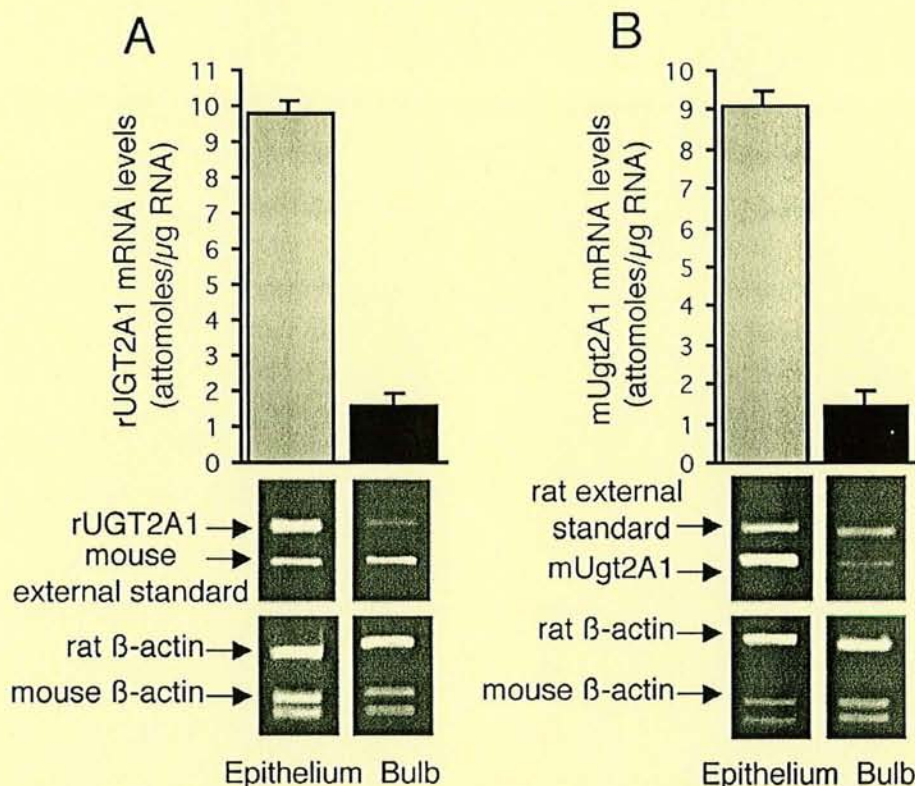


Fig. 3. Tissue distribution of UGT2A1 transcripts. Quantitative RT-PCR analysis of olfactory UGT products in olfactory epithelium and olfactory bulb, in rat (A) and mouse (B). The PCR products were identified by restriction site polymorphism (see Materials and methods for the restriction enzymes used and the size of restricted and unrestricted amplicons). Quantification of UGT2A1 mRNA, calculated according to $[(Ue/Us) \times (Bs/Be)] \times a$ (Materials and methods), is presented as histograms, in amol/ μ g RNA units. Data are the means $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed on three different animals.

from phase I reaction may easily reach the olfactory bulb, UGTs expressed in this tissue, among other phase II drug metabolizing enzymes, could conjugate some of these chemicals and therefore prevent their further entry into the brain. We previously demonstrated the expression of UGT1A6 isoform in the olfactory bulb [18] and we report here the presence of another isoform in this tissue, UGT2A1. This is the first evidence of the expression in the rat and mouse of this isoform outside the olfactory epithelium.

Non-isotopic in situ hybridization allowed us to detect precisely the localization of the UGT2A1 mRNA expression in rat olfactory epithelium and bulb, while quantita-

tive data were obtained using a RT-PCR method. Within the rat and bovine olfactory epithelium, UGT2A1 was localized by immunohistochemistry in Bowman's glands and the sustentacular cells [28,29]; a similar immunolocalization was also observed for numerous drug metabolizing enzymes such as CYP, glutathione transferase and phenol sulfotransferase [1,3,7,10,11,15,16,35,45,46]. To our knowledge, mRNA in situ hybridization had never been applied previously to any drug metabolizing enzyme in the olfactory epithelium. In the present study, we localize the UGT2A1 transcripts mainly in the sustentacular cells and a weaker signal is found in the subepithelial cells of Bowman's glands. UGT2A1 mRNA is also present

Table 1
Homology of amino acid sequences between mouse, rat and human UGT2A1

Name	Amino acids	N-terminal (%) (amino acids 1–240)	C-terminal (%) (amino acids 241–527)	Overall (%)
mUgt2A1	527	100	100	100
rUGT2A1	527	97.1	94.7	95.8
hUGT2A1	527	84.7	89.5	87.3

Data were obtained from sequence analysis, using BLAST and the CLUSTAL network service at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Overall identity (entire sequence) and N-terminal (amino acids 1–240) and C-terminal (amino acids 241–527) identities between the mouse sequence and the rat and human sequences are given.

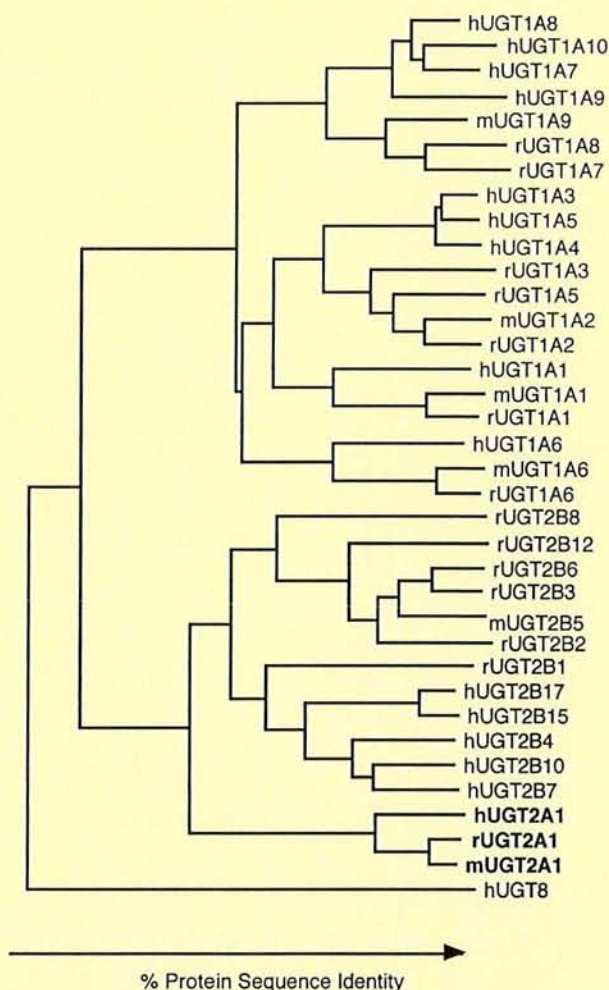


Fig. 4. Cluster analysis of the protein sequence identity of the UGT2 and UGT1 family. The horizontal branch lengths are inversely proportional to the degree of identity between the amino acid sequences. The sequences were taken from the GenBank/EMBL databases. In agreement with the UGT Nomenclature Committee, we propose the name mUgt2A1 for the novel mouse isoform identified.

in the olfactory sensory neurons, a localization that was not described by immunohistochemistry for any rat drug metabolizing enzymes to date. A previous distribution study of diverse inhaled toxic compounds using tape-section autoradiography suggested that both sustentacular and acinar Bowman's gland cells could be important metabolic sites in the olfactory epithelium [2]. However, the high labelling of the bioactivated mycotoxin aflatoxin B1 observed in the olfactory sensory neurons [27] raised the question of the drug metabolizing activity of these cells.

Little is known about the expression and the cellular localization of drug metabolizing enzymes in the olfactory bulb, even if this tissue exhibits several metabolizing activities towards model substrates. Several CYP were characterized by *in situ* hybridization and immunohisto-

chemistry [19,22,26,37], and CYP2D4 expression was found in the granule cells [22]. Interestingly, we find the main localization of the transcripts of UGT2A1 in these neurons. This suggests a specialized metabolic role of the granular olfactory bulb cells. To date, the sole neuronal cells known to express at least one UGT isoform are the cerebellum Purkinje cells, the hippocampal and cerebral cortex pyramidal cells which express UGT1A6 [5,33], and the olfactory sensory neurons, the granular and mitral cells of the olfactory bulb which express UGT2A1 (this study).

In order to compare the UGT2A1 mRNA levels between olfactory epithelium and bulb in rat and mouse, we developed an original multistandard quantitative RT-PCR method which ensured a high level of efficiency and reproducibility; this is the first absolute quantitative measurement of an UGT mRNA. The expression measured in the rat olfactory bulb was six-fold lower than that in the epithelium. The same distribution was found in mouse, in which we confirmed the restricted tissue specific expression of UGT2A1, since no detectable expression could be observed in brain, liver, lung, kidney or intestine (data not shown). UGT2A1 expression in the bulb sheds light on previous data: indeed 1-naphthol, the UGT1A6 model substrate, was highly glucuronidated by olfactory bulb rat homogenates, but we noticed a lack of correlation between this activity and UGT1A6 mRNA level in this tissue [18]. This discrepancy may be attributed to the presence of UGT2A1 in the olfactory bulb since 1-naphthol is also a substrate for this isoform, as demonstrated by the use of rat and human recombinant enzymes [24,29]. Further RT-PCR investigations should be of great interest to quantify the relative expressions of UGT2A1, UGT1A6 and other UGTs in both olfactory bulb and epithelium under various pathophysiological conditions. Such experiments should better document the conjugating ability in the olfactory tissues, as glucuronidation activities recorded in these tissues were shown to be as high as those in the liver [29]. However, a question is raised by the mRNA expression analysis, since the expression pattern of the UGT2A1 mRNA we noticed throughout the epithelium, mainly in the sustentacular cells and also in the olfactory sensory neurons, is not correlated to the protein expression, mainly found in Bowman's gland by another group [29]. This suggests a possible post-transcriptional expression regulation which occurs for some CYP in the brain and the olfactory bulb [20,22,48,50] and that remains to be elucidated at a molecular level.

We characterized in the present study the mouse olfactory Ugt2A1 cDNA in order to develop the quantitative RT-PCR method. The sequence of the mUgt2A1 enzyme possesses the typical amino acid signature of the UGT superfamily [32]. This region is probably involved in the binding of the UDP moiety of UDP-glucuronic acid, which is the common substrate of all isoforms. Indeed, the primary structure of UGT proteins is classically organized in two regions which are similar in size: a catalytic

conserved C-terminal part which interacts with UDP-glucuronic acid, and a highly variable N-terminal end which corresponds to the aglycone binding site, at the origin of the substrate specificity. The high identity level between mouse, rat and human UGTs observed on both parts of the protein is in favour of strictly conserved biochemical functions. This observation is further supported by the phylogenetic analysis that defines the olfactory UGT genes as orthologous genes (Fig. 4) [24]. Moreover, UGTs have also been specifically found in olfactory organs (antennas) of *Drosophila* [47]; this could be an example of a convergent specialized evolution between the *drosophila* and the mammalian olfactory UGT genes in olfactory tissues [4,13,24,28,29,31,35,36].

In conclusion, this work presents the first evidence for UGT2A1 expression in the olfactory bulb. In addition, we demonstrate the localization of the UGT2A1 transcripts in the neurons of both olfactory epithelium and bulb. On the one hand, the UGT2A1 conserved sequence and localization in the olfactory tissues support a role of this enzyme in the olfaction sense; on the other hand, its presence outside the olfactory epithelium, in the central nervous system, also emphasizes its role in the protection of the brain against neurotoxic compounds.

Acknowledgements

We thank Dr M.Cattarelli (CESG, CNRS, Dijon, France), Dr E. Moyse (CNRS UMR 5534, Lyon, France) and Dr L. Corcos (INSERM U517, Dijon, France) for stimulating scientific discussions. This work was supported in part by grants from the Danone Institute (Levallois-Perret, France, Contrat Alimentation-Santé 1998–2000) and from the Conseil Régional de Bourgogne.

References

- [1] D.R. Adams, A.M. Jones, C.G. Plopper, C.J. Serabjit-Singh, R.M. Philpot, Distribution of cytochrome P-450 monooxygenase enzymes in the nasal mucosa of hamster and rat, *Am. J. Anat.* 190 (1991) 291–298.
- [2] F. Bahrami, C. van Hezik, A. Bergman, I. Brandt, Target cells for methylsulphonyl-2,6-dichlorobenzene in the olfactory mucosa in mice, *Chem. Biol. Interact.* 128 (2000) 97–113.
- [3] K.K. Banger, J.R. Foster, E.A. Lock, C.J. Reed, Immunohistochemical localisation of six glutathione S-transferases within the nasal cavity of the rat, *Arch. Toxicol.* 69 (1994) 91–98.
- [4] N. Ben-Arie, M. Khen, D. Lancet, Glutathione S-transferases in rat olfactory epithelium: purification, molecular properties and odorant biotransformation, *Biochem. J.* 292 (1993) 379–384.
- [5] A. Brands, P.A. Munzel, K.W. Bock, In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 1441–1444.
- [6] M. Cappiello, L. Giuliani, G.M. Pacifici, Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 41 (1991) 345–350.
- [7] Y. Chen, M.L. Getchell, X. Ding, T.V. Getchell, Immunolocalization of two cytochrome P450 isozymes in rat nasal chemosensory tissue, *Neuroreport* 3 (1992) 749–752.
- [8] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [9] A.R. Dahl, W.M. Hadley, Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants, *Crit. Rev. Toxicol.* 21 (1991) 345–372.
- [10] T.N. Dear, K. Campbell, T.H. Rabbitts, Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins, *Biochemistry* 30 (1991) 10376–10382.
- [11] M. Debiec-Rychter, S.J. Land, C.M. King, Histological localization of messenger RNAs for rat acetyltransferases that acetylate serotonin and genotoxic arylamines, *Cancer Res.* 56 (1996) 1517–1525.
- [12] R.D.S. El-Bachá, A. Minn, Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 45 (1999) 15–23.
- [13] C. Eriksson, E.B. Brittebo, Metabolic activation of the olfactory toxicant, dichlobenil, in rat olfactory microsomes: comparative studies with *p*-nitrophenol, *Chem. Biol. Interact.* 94 (1995) 183–196.
- [14] M.A. Frohman, M.K. Dush, G.R. Martin, Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8998–9002.
- [15] M.B. Genter, D.M. Owens, N.J. Deamer, Distribution of microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in the rat olfactory mucosa: relevance to distribution of lesions caused by systemically-administered olfactory toxicants, *Chem. Senses* 20 (1995) 385–392.
- [16] M.L. Getchell, Y. Chen, X. Ding, D.L. Sparks, T.V. Getchell, Immunohistochemical localization of a cytochrome P-450 isozyme in human nasal mucosa: age-related trends, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 102 (1993) 368–374.
- [17] J.F. Ghersi-Egea, B. Walther, D. Decolin, A. Minn, G. Siest, The activity of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase in the brain, *Neuropharmacology* 26 (1987) 367–372.
- [18] D. Gradinaru, F.G. Suleman, S. Leclerc, J.M. Heydel, J.P. Grillasca, J. Magdalou, A. Minn, UDP-glucuronosyltransferase in the rat olfactory bulb: identification of the UGT1A6 isoform and age-related changes in 1-naphthol glucuronidation, *Neurochem. Res.* 24 (1999) 995–1000.
- [19] T. Hansson, N. Tindberg, M. Ingelman-Sundberg, C. Kohler, Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system, *Neuroscience* 34 (1990) 451–463.
- [20] N. Harada, K. Yamada, Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction, *Endocrinology* 131 (1992) 2306–2312.
- [21] L. Hastings, J.E. Evans, Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into the CNS, *Neurotoxicology* 12 (1991) 707–714.
- [22] E. Hedlund, A. Wyss, T. Kainu, M. Backlund, C. Kohler, M. Pelto-Huikko, J.A. Gustafsson, M. Warner, Cytochrome P4502D4 in the brain: specific neuronal regulation by clozapine and toluene, *Mol. Pharmacol.* 50 (1996) 342–350.
- [23] L. Illum, Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 1–18.
- [24] G. Jedlitschky, A.J. Cassidy, M. Sales, N. Pratt, B. Burchell, Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase, *Biochem. J.* 340 (1999) 837–843.
- [25] H. Khiri, P. Reynier, N. Peyrol, B. Leriche, J. Torresani, R. Planells, Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism, *Mol. Cell. Probes* 10 (1996) 201–211.
- [26] C. Kohler, L.G. Eriksson, T. Hansson, M. Warner, J. Ake-Gustafsson, Immunohistochemical localization of cytochrome P-450 in the rat brain, *Neurosci. Lett.* 84 (1988) 109–114.

- [27] P. Larsson, H. Tjalve, Intranasal instillation of aflatoxin B(1) in rats: bioactivation in the nasal mucosa and neuronal transport to the olfactory bulb, *Toxicol. Sci.* 55 (2000) 383–391.
- [28] D. Lazard, N. Tal, M. Rubinstein, M. Khen, D. Lancet, K. Zupko, Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase, *Biochemistry* 29 (1990) 7433–7440.
- [29] D. Lazard, K. Zupko, Y. Poria, P. Nef, J. Lazarovits, S. Horn, M. Khen, D. Lancet, Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase, *Nature* 349 (1991) 790–793.
- [30] B. Leininger, J.F. Gherzi-Egea, G. Siest, A. Minn, In vivo study of the elimination from rat brain of an intracerebrally formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl-beta-D-glucuronide, *J. Neurochem.* 56 (1991) 1163–1168.
- [31] V. Longo, L. Citti, P.G. Gervasi, Biotransformation enzymes in nasal mucosa and liver of Sprague–Dawley rats, *Toxicol. Lett.* 44 (1988) 289–297.
- [32] P.I. Mackenzie, I.S. Owens, B. Burchell, K.W. Bock, A. Bairoch, A. Belanger, S. Fournel-Gigleux, M. Green, D.W. Hum, T. Iyanagi, D. Lancet, P. Louisot, J. Magdalou, J.R. Chowdhury, J.K. Ritter, H. Schachter, T.R. Tephly, K.F. Tipton, D.W. Nebert, The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence, *Pharmacogenetics* 7 (1997) 255–269.
- [33] M.K. Martinasevic, C.D. King, G.R. Rios, T.R. Tephly, Immunohistochemical localization of UDP-glucuronosyltransferases in rat brain during early development, *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998) 1039–1041.
- [34] K.A. McGurk, C.H. Brierley, B. Burchell, Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 1005–1012.
- [35] A. Miyawaki, H. Homma, H. Tamura, M. Matsui, K. Mikoshiba, Zonal distribution of sulfotransferase for phenol in olfactory sustentacular cells, *EMBO J.* 15 (1996) 2050–2055.
- [36] P. Nef, J. Heldman, D. Lazard, T. Margalit, M. Jaye, I. Hanukoglu, D. Lancet, Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 6780–6785.
- [37] P.J. Norris, J.P. Hardwick, P.C. Emson, Regional distribution of cytochrome P450 2D1 in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 366 (1996) 244–258.
- [38] W.H. Peters, W.A. Allebes, P.L. Jansen, L.G. Poels, P.J. Capel, Characterization and tissue specificity of a monoclonal antibody against human uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase, *Gastroenterology* 93 (1987) 162–169.
- [39] W.H. Peters, P.L. Jansen, Immunocharacterization of UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in human liver, intestine and kidney, *Biochem. Pharmacol.* 37 (1988) 564–567.
- [40] A. Radomska-Pandya, J.M. Little, J.T. Pandya, T.R. Tephly, C.D. King, G.W. Barone, J.P. Raufman, UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa, *Biochim. Biophys. Acta* 1394 (1998) 199–208.
- [41] F.G. Suleman, A. Abid, D. Gradinaru, J.L. Daval, J. Magdalou, A. Minn, Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 358 (1998) 63–67.
- [42] F.G. Suleman, J.F. Gherzi-Egea, B. Leininger-Muller, A. Minn, Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes, *Neurosci. Lett.* 161 (1993) 219–222.
- [43] T.R. Tephly, Isolation and purification of UDP-glucuronosyltransferases, *Chem. Res. Toxicol.* 3 (1990) 509–516.
- [44] R.G. Thorne, C.R. Emory, T.A. Ala, W.H. Frey 2nd, Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain, *Brain Res.* 692 (1995) 278–282.
- [45] J.R. Thornton-Manning, K.J. Nikula, J.A. Hotchkiss, K.J. Avila, K.D. Rohrbacher, X. Ding, A.R. Dahl, Nasal cytochrome P450 2A: identification, regional localization, and metabolic activity toward hexamethylphosphoramide, a known nasal carcinogen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142 (1997) 22–30.
- [46] J.M. Voigt, F.P. Guengerich, J. Baron, Localization and induction of cytochrome P450 1A1 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in rat nasal mucosa, *J. Histochem. Cytochem.* 41 (1993) 877–885.
- [47] Q. Wang, G. Hasan, C.W. Pikielny, Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster*, the antennae, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10309–10315.
- [48] M. Warner, J.A. Gustafsson, Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1019–1023.
- [49] C.H. Wensley, D.M. Stone, H. Baker, J.S. Kauer, F.L. Margolis, D.M. Chikaraishi, Olfactory marker protein mRNA is found in axons of olfactory receptor neurons, *J. Neurosci.* 15 (1995) 4827–4837.
- [50] P.G. Zaphiropoulos, T. Wood, Identification of the major cytochrome P450s of subfamily 2C that are expressed in brain of female rats and in olfactory lobes of ethanol treated male rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 (1993) 1006–1013.
- [51] K. Zupko, Y. Poria, D. Lancet, Immunolocalization of cytochromes P-450olf1 and P-450olf2 in rat olfactory mucosa, *Eur. J. Biochem.* 196 (1991) 51–58.

1.3. Activité de l'UGT1A6 dans les bulbes olfactifs et modifications en fonction de l'âge

Publication 3

UDP-glucuronosyltransferase in the rat olfactory bulb : identification of the UGT1A6 isoform and age-related changes in the 1-naphthol glucuronidation.

GRADINARU D., SULEMAN F.G., LECLERC S., HEYDEL J.M., GRILLASCA J.P., MAGDALOU J., MINN A.

Neurochemical Research, 1999, 54 (8), 995-1000.

La conjugaison des xénobiotiques, au niveau des interfaces sang-cerveau, représente un facteur de protection du cerveau contre les médicaments et autres molécules étrangères à l'organisme. Dans cet article, une conjugaison importante du 1-naphtol, molécule potentiellement neurotoxique, est détectée dans les BO, lesquels sont une voie d'entrée des xénobiotiques dans le cerveau. De plus, la glucuronoconjugaison du 1-naphtol varie selon l'âge. Elle est importante à la naissance, puis diminue à 3 mois et augmente significativement jusqu'à 24 mois. Par western blot et RT-PCR, la présence de l'UGT1A6 qui catalyse la conjugaison des phénols plans dont le 1-naphtol a été démontrée. La RT-PCR quantitative indique que le taux d'ARNm codant pour l'UGT1A6 ne change pas significativement en fonction de l'âge. Ceci suggère que d'autres isoformes d'UGT soient exprimées dans les BO et que celles-ci pourraient participer aux variations de la glucuronoconjugaison du 1-naphtol observées.

UDP-Glucuronosyltransferase in the Rat Olfactory Bulb: Identification of the UGT1A6 Isoform and Age-Related Changes in 1-Naphthol Glucuronidation

Daniela Gradinaru,¹ Funmilayo G. Suleman,² Séverine Leclerc,² Jean-Marie Heydel,³ Joël-Paul Grillasca,² Jacques Magdalou,² and Alain Minn^{2,4}

(Accepted March 25, 1999)

Xenobiotic glucuronidation represents a major metabolic protection of the brain against chemical aggressions at blood-brain interfaces. We previously observed that glucuronidation of 1-naphthol was very effective in olfactory bulb, which is a pathway for the entry of foreign molecules into the brain. In this work, we showed that 1-naphthol glucuronidation varied according to age. It was very high at birth, then decreased markedly in 3-month-old rats and increased again significantly during aging. By Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), we demonstrated the presence in the olfactory bulb of the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 isoform, which catalyzes the glucuronidation of phenols, such as 1-naphthol. Quantitative RT-PCR indicated that the mRNA levels encoding UGT1A6 did not significantly change according to age, thus suggesting that other differently regulated UGT isoforms were present and would account for the variations of 1-naphthol glucuronidation observed.

KEY WORDS: Drug metabolism; glucuronidation; olfactory bulb; neurotoxicity; aging; blood-brain barrier.

INTRODUCTION

Olfactory signals generated by olfactory epithelium receptors, when stimulated by odorant molecules present in the inspired air, are conveyed to and integrated in the olfactory bulb, which is a part of the central nervous system (CNS). Olfactory messages start from the olfactory epithelium when stimulated by odorant molecules. Message termination results probably from the presence of efficient, specific enzyme

activities, which rapidly metabolize odorant molecules into products unable to stimulate olfactory receptors (1). The olfactory pathway also allows the penetration of drugs or xenobiotics by peri- or intra-axonal flux from the nasal mucosa to the olfactory bulb and to the rest of the brain (2). Neurotoxic heavy metals can also penetrate the brain by that way, promoting anosmia, that is the loss of olfactory ability, and neurologic disorders related to Parkinson's disease symptoms (3). Thus the olfactory bulb itself and the brain may be endangered by the toxicity displayed by some xenobiotics or by their reactive metabolites, triggering neurodegenerative processes and anosmia.

In mammals, glucuronidation represents the main metabolic pathway for the final biotransformation of drugs, xenobiotics and endogenous compounds (4). The reaction is catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (UGT, EC: 2.4.1.17). This multigenic family of enzymes transfer the glucuronic acid moiety of UDP-

¹ National Institute of Gerontology and Geriatrics «Ana Aslan», 9, Str. Manastirea Caldarusani, Bucharest, 78178, Romania.

² UMR CNRS-Université Henri Poincaré N° 7561, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP.184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France.

³ Laboratoire de Biochimie Pharmacologique, Faculté de Pharmacie, 7, Boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon Cedex, France.

⁴ Address reprint requests to: A. Minn. Tel.: +(33) 383 59 2753; Fax: +(33) 383 59 2621. E-mail: minn@facmed.u-nancy.fr.

glucuronic acid to structurally unrelated compounds (phenols, amines, thiols, carboxylic acids) (5). UGT are mainly located in the endoplasmic reticulum of the liver and, to a lesser extent, in extrahepatic tissues such as kidney, small intestine, skin, and brain (6,7). They lead to the formation of water-soluble, pharmacologically inactive metabolites that are excreted into bile or urine (4).

As part of an ongoing series of studies on brain glucuronidation activities, we sought to determine their specific functions in the CNS and in related structures. We recently showed that 1-naphthol glucuronidation exhibited a marked regioselectivity, with high levels in the olfactory bulb, as well as in the cellular structures forming either blood-brain- and cerebrospinal fluid (CSF)-brain interfaces (8-13). This suggests the presence of a metabolic protection of the brain against a possible influx of xenobiotics through the blood-brain barrier (BBB), choroid plexus or nasal pathway (11,12). In the present work, we characterized the UGT isoform, UGT1A6, catalyzing the activity displayed in the rat olfactory bulb towards 1-naphthol. Moreover, as smell efficiency undergoes age-related alterations, we also studied in the olfactory bulb the variations of the glucuronidation process during development and aging, using newborn, 3-month-, 12-month- and 24-month-old rats. We observed age-related changes that paralleled those already described in the liver (14,15). We also showed that these modifications were not the result from changes in the mRNA levels encoding the UGT1A6 isoform.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Male Wistar rats (200-220 g body weight; Iffa-Credo, St Germain-sur-l'Arbresle, France) were acclimated to laboratory conditions (normal 12 h/12 h light/dark cycle, temperature 20-22°C), and allowed unrestricted access to standard food and tap water. In order to obtain newborn rats, two Wistar female rats in proestrus cycle were housed together with a male rat for 24 h, and pregnant females were then maintained in separate cages. The study was approved by the local Animal Ethic Committee, and the research adhered to the "NIH Principles of Laboratory Animal Care".

Rats were sacrificed by decapitation, and brains and olfactory bulbs were rapidly removed and placed in an ice-cold isolation medium (0.32 M sucrose, 1 mM (K⁺)EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Brain tissue samples and olfactory bulb were homogenized separately in 10 volumes of isolation medium using a manual glass Dounce-type homogenizer.

Microsomes were obtained by the method described in (16). Microsomes were resuspended in a small volume of 0.1 M phosphate, 0.2 mM (K⁺)EDTA buffer, pH 7.4, containing 20% (v/v) glycerol. Protein content was determined according to the method of Lowry et al. (17) using bovine serum albumin as a standard.

The measurement of 1-naphthol glucuronidation activity was performed by HPLC analysis of the naphthyl- β -D-glucuronide formed, as previously described (16). Because of the minute size of the olfactory bulb, it was not possible to isolate enough microsomal fraction, especially from old rats, to carry out measurements of UGT activity by HPLC. Therefore, glucuronide formation was measured on olfactory bulb homogenates.

Data were expressed as mean $\pm$ SD. Values were compared by using the Fischer's *f*-test, followed by the Mann-Whitney nonparametric test or Student's *t*-test. *p* < 0.05 was considered significant.

The expression of UGT isoforms in brain cortex and olfactory bulb microsomes was revealed by Western blotting. Proteins were separated on 12% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and electrophoretically blotted onto Immobilon P membranes as previously described (18). UGT proteins were detected using a polyclonal antibody raised in sheep against hepatic UGTs of rats (14). The detection was performed by addition of a second goat antibody conjugated with alkaline phosphatase revealed by 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma).

For the study of the expression of *UGT1A6* gene, brain and olfactory bulb samples were rapidly removed after decapitation, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

RNA extraction was performed according to a microscale method (19). The amount of mRNA encoding rat UGT1A6 protein was measured using a quantitative multistandard RT-PCR method that takes advantage of both UGT1A6 and β -actin sequence conservation between animal species (20). Briefly, total RNA samples extracted from rat tissues were mixed with a constant amount of total RNA prepared from mouse tissues (skin, adipocyte and muscle) which brought both β -actin and UGT1A6 sequences and thus acted as a multi-standard source. All RNA preparations were incubated in presence of RNase-free DNase (Promega) in order to avoid amplification from possible contamination by genomic DNA. Separate PCRs for UGT1A6 and for β -actin amplification were then undertaken with oligonucleotide primers that are able to hybridize with rat and mouse sequences with the same efficiency. For UGT1A6 amplification, the direct primer 1A6DIRR/S (5'-GGA CTC AGT TCT AGG TGA CAA GC-3'), extended from nucleotide 191 to 213 and the reverse primer 1A6REVR/S (5'-GGC GTT GAC ATA GGC TTC AAA TTC C-3'), from nucleotide 1010 to 986, according to the mouse sequence UJ6818 (21). The oligonucleotides were synthesized by MWG-Biotech (Courtaboeuf, France). Position 3 of the direct primer was occupied by a A (underlined in the sequence above) which did not match with either sequence in order to not favor one of the matrices. For β -actin amplification, the direct primer ACT53, extended from nucleotide 558 to 579 and the reverse primer ACT33, extended from nucleotide 1126 to 1100, according to the human sequence (22,23). The mixture was subjected to 31 cycles for UGT1A6 through a 45-sec denaturing step at 94°C, a 45-sec annealing step at 60°C and a 45-sec elongation step at 72°C in a thermal cycler (Gene E, Techne, OSI, Maurepas, France). The β -actin fragment was amplified through 27 cycles consisting of a 45-sec denaturing step at 94°C, a 45-sec annealing step at 65°C and a 45-sec elongation step at 72°C. Each amplification product was then distinguished by restriction site polymorphism. The mouse UGT1A6 was digested by *Eco* RI into two fragments (682 and 138 bp), while the rat product remained uncut. A similar difference in pattern of restriction sites was used to differentiate β -actin products. A single *Pvu* II restriction site (producing 475 and 94 pb fragments) was present in rat, but not in mouse. RT-PCR reactions were performed in a thermal cycler as follows: complementary cDNA was synthesized

by mixing 1 µg RNA from rat and mouse in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) containing 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 5 µM hexa random primers, 200 units of MMLV reverse transcriptase, and 0.5 mM of each dNTP. Samples were incubated for 1.5 h at 37°C. A 1-µl aliquot was used for PCR and added in the incubation mixture containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase.

Amplification products were resolved by agarose gel electrophoresis stained by ethidium bromide. The bands were visualized under UV light by a trans-illuminator (UVT-20M, Herolab) and photographed by a computer assisted camera (Panasonic). Quantification of each band was performed by densitometry analysis with a NIH software. For each rat sample, the results were expressed as the ratio ($\text{gene}_{\text{rat}}/\text{gene}_{\text{mouse}} \times (\beta\text{-actin}_{\text{mouse}}/\beta\text{-actin}_{\text{rat}})$) in arbitrary units according to the method (20).

RESULTS

The glucuronidation rates of 1-naphthol in olfactory bulb homogenate of rats of different ages are shown in Table I. The corresponding activities observed in brain cortex microsomes are indicated for comparison. Glucuronidation of 1-naphthol was very effective at birth, where it was at the highest level, but decreased thereafter after 3-months and increased again in aged animals. At birth, the activity was 4- and 2-fold higher than in 3-month or 24-months old animals, respectively. By contrast, this activity did not markedly change during the same time period in total brain microsomes.

The expression of the UGTs in the olfactory bulb as a function of age was monitored by both Western blotting and RT-PCR. One major protein band at 51 kDa could be detected in olfactory bulb and in brain using antibodies raised against rat liver UGTs (Fig. 1). Additional bands of lower intensity could also be seen in the 51–54 kDa range. The Western blot clearly showed

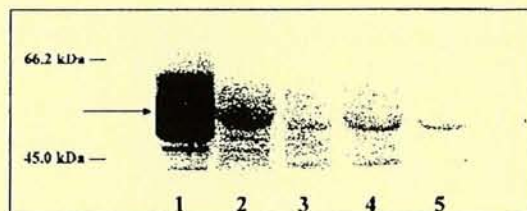


Fig. 1. Western immunoblot analysis of UGT isoforms expressed in 3-month-old and 19-month-old rat brain cortex and olfactory bulb microsomes. Brain or olfactory bulb fractions (150 µg protein) or liver microsomes (35 µg protein) were loaded onto the gel. Lane 1, liver; lane 2, 3-month-old olfactory bulb; lane 3, 3-month-old rat cortex; lane 4, 19-month-old olfactory bulb; lane 5, 19-month-old rat brain cortex. The arrow indicates the 51 kDa UGT isoform.

that the expression of UGTs in brain was both qualitatively and quantitatively different from that observed in the liver.

Using primers specific of mRNA encoding the rat liver UGT1A6 isoform, we were able to detect the presence of this protein in both olfactory bulb and brain (Fig. 2). PCR coamplification of reverse transcribed hepatic UGT1A6 mRNA and β -actin mRNA produced amplicons of the expected size: 820 bp for the fragment of UGT1A6, and 569 bp for that of β -actin. The nature of the amplicons was verified by restriction site polymorphism. Digestion of UGT1A6 mRNA (820 bp) by *EcoRI* led to two fragments (682 and 138 bp); digestion of β -actin mRNA (569 bp) by *PvuII* produced two fragments (475 and 94 bp).

We estimated the relative variations of content in mRNA encoding UGT1A6 as a function of age. These levels are given as the ratio UGT1A6 mRNA/actin mRNA (Fig. 2). The results indicate that there was no significant variations in UGT1A6 mRNA expression in the olfactory bulb and in total brain during rat development.

Table I. Age-Related Modifications of 1-Naphthol Glucuronidation

Animals	1-Naphthol UGT activity (nmol/h.mg protein)	
	Brain microsomes	OB homogenate
Newborn rats	8.86 ± 1.10 ^a	39.61 ± 1.84 ^b
3-month-old rats	6.17 ± 1.08	8.70 ± 0.84
12-month-old rats	8.78 ± 1.67	11.65 ± 1.19
24-month-old rats	10.51 ± 0.84 ^a	19.33 ± 6.90 ^b

Olfactory bulb (OB) homogenates and cerebral cortex microsomes from non-olfactory nervous tissue were isolated from newborn, young, adult or old animals. Samples were activated by Triton X-100, as described in the experimental section. Results are given as mean ± SD, N = 4. ^ap < 0.05, ^bp < 0.01, significantly different from the 3 month-old group.

DISCUSSION

Many molecules, and especially polar compounds, are prevented from entering the brain parenchyma via the bloodstream due to the presence of the BBB. However, several studies demonstrated in animals and in humans that heavy metals (3), drugs (2,24), or peptides (2,25) may reach the CNS and the CSF by transport along olfactory axons. Thus, as the anterior portion of the olfactory bulb lacks the BBB (26), the olfactory system represents a pathway for brain therapy allowing to circumvent the BBB (2,25). On the other hand, penetrating xenobiotics may diffuse into the entire

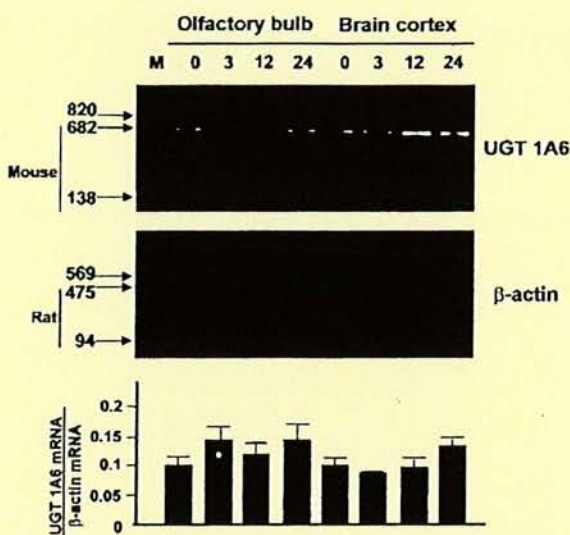


Fig. 2. Quantitative analysis of PCR products from UGT1A6 and β -actin mRNA in rat brain and olfactory bulb as a function of age. A mixture of total RNA from rat and mouse was reverse-transcribed and amplified separately for the detection of UGT1A6 (upper gel) and for β -actin (lower gel) amplicons. The nature of the amplicons was verified by restriction site polymorphism. Digestion of UGT1A6 mRNA (820 bp) by *EcoRI* led to two fragments (682 and 138 bp); digestion of β -actin mRNA (569 bp) by *PvuII* produced two fragments (475 and 94 bp). UGT1A6 mRNA quantitation was calculated as the UGT1A6 mRNA/ β -actin mRNA ratio, as described in the Experimental Procedure section. Data are the means $\pm$ SEM of three independent experiments performed on three different animals (0, newborn rats; 3, 3-month old rats; 12, 12-month old rats; 24, 24-month old rats). M, ladder of 1kb-DNA standards. The bands on the gels were visualized by a trans-illuminator (UVT-20M, Herolab).

CNS, and could promote more or less reversible damage to the neuronal tissue. Accordingly, previous reports showed that olfactory bulb in the rat displays higher arylhydrocarbon hydroxylase activity than other brain regions (27,28). This cytochrome P450-dependent activity may be responsible for the generation of active oxygen species and lipid peroxides, that cause damages to tissues exposed to chemicals (28). It has been established that anosmia and Parkinson's disease-like symptoms occur frequently among people working in heavy metal dust-contaminated environment (3), suggesting that the entry into the brain of pathogenic agents may be responsible for the appearance of neurodegenerative disorders. This hypothesis is conformed by the observation that anosmia is one of the early symptoms of Alzheimer's and Parkinson's neurodegenerative diseases (25,29). Even if relatively high protective drug metabolizing enzyme activities should afford a protection to the olfactory bulb (8,12),

olfactory neurons may undergo toxic damage by direct exposure to environmental pollutants. Fortunately, as the olfactory epithelium possesses high biotransformation activities catalyzed by cytochromes P450, UGT isoforms, and glutathione S-transferases, it should represent a first line of protection of the brain against airborne xenobiotics, as olfactory neurons lie outside the BBB, in direct contact with the environment (30). The present study clearly shows that the specific activity of 1-naphthol glucuronidation in the olfactory bulb was surprisingly high, when compared to that measured in total brain. This suggests a regio-localization of the UGT within this organ and emphasizes the protective role exerted by the olfactory bulb against the intrusion of potentially toxic phenols.

Among the isoforms characterized so far in rat liver, UGT1A6 was found to be actively involved in the glucuronidation of 1-naphthol and other short and planar phenols, such as 4-methylumbelliferone (5,31). This prompted us to determine the presence of this isoform in the olfactory bulb. Using a RT-PCR method, with highly specific primers, this protein was, for the first time, unambiguously detected and identified in the rat olfactory bulb. UGT1A6 belongs to a family of enzymes encoded by the *UGT1* gene complex. All these isoforms share the same C-terminal end, encoded by the four common exons 2 to 5. The N-terminal end is encoded by different exons 1 (31). Since no endogenous phenolic substrates of UGT1A6 has been reported to date, the physiological role of this isoform, which is expressed in several tissues in rat and man, is still unknown. In that respect, we found that the glucuronidation of the phenolic neurotransmitters, serotonin and dopamine, was not supported by UGT1A6 (results not shown).

Finally, we also showed age-related changes of glucuronidation activity towards 1-naphthol (Table I). The enzyme activity was significantly higher in newborn and old rats, as compared to young adult animals, suggesting age-dependent modifications of UGT expression. The increase of 1-naphthol glucuronidation observed in the brain of old rats may be related to an increase of the relative content of astrocytes and the decrease of that of neurons observed in the aged brain, as astrocytes display two-fold higher glucuronidation activities than neurons (32). The high neonatal activity of 1-naphthol glucuronidation recorded in both brain and olfactory bulb resembles that observed in the liver, where the highest glucuronidation of phenolic substrates develops in the late fetal life (14). No significant age-related changes in the expression of UGT1A6 were observed neither in rat brain, nor in olfactory

bulb. Other isoforms of the families 1 and 2 have been also reported to glucuronidate 1-naphthol, although at a lower extent than UGT1A6 (4,5). This result contributes to the well-known overlapping substrate specificity of the UGTs. It is therefore likely that other UGT isoforms that are able to glucuronidate 1-naphthol would coexist in the olfactory bulb and in brain (32). These proteins with a different ontogenic behavior could explain the differences found between variations in enzyme activity and in levels of UGT1A6 mRNAs. On the other hand, differences in the turnover rates of mRNA encoding UGT1A6 and of the isoform itself are also likely to occur according to age. Work is in progress to test these hypothesis.

In summary, we showed that olfactory bulb displays high 1-naphthol glucuronidation activity. These high levels of 1-naphthol glucuronidation should protect both the brain and the olfactory bulb itself from airborne phenolic xenobiotics to which it may be exposed. Using Western blotting and quantitative RT-PCR, we also identified the UGT1A6 isoform in the rat olfactory bulb. The present results suggest that the age-dependent changes in glucuronidation activity are not the result of modifications in UGT1A6 expression.

ACKNOWLEDGMENTS

DG received a Research Fellowship from the *Sandoz Foundation for Gerontological Research* (Brussels). This work was supported in part by a grant from the Institut Danone (Levallois-Perret, France), and by the Région Lorraine. The authors thank Prof. J. Atkinson (School of Pharmacy, Nancy) for the kind gift of the 12- and 24-month-old rat brains. Pr. B. Burchell (Ninewells Hospital, Dundee) is also gratefully acknowledged for kindly providing the UGT antibodies.

REFERENCES

- Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarowicz, J., Horn, S., Khen, M., and Lancet, D., 1991. Odorant signal termination by olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Nature* 349:790-793.
- Pardridge, W. M., 1991. Transnasal and intraventricular delivery of drugs. Pages 99-122. *in* Pardridge, W. M. (ed.), *Peptide Drug Delivery to the Brain*. Raven Press, New York.
- Hastings, L., Evans, J. E., 1991. Olfactory primary neurons as a route of entry for the toxic agents into the CNS. *Neurotoxicology* 12:707-714.
- Mulder, G. J., 1992. Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:25-49.
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Bélanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Roy-Chowdhury, J., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tip-ton, K. F., Nebert, D. W., 1997. The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7:255-269.
- Tephly, T. R., Coughtrie, M. W. H., 1989. UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharm. Sci.* 11:276-279.
- Kroemer, H. K., Klotz, U., 1992. Glucuronidation of drugs. A re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors. *Clin. Pharmacokinet.* 23:292-310.
- Leininger, B., Ghersi-Egea, J. F., Siest, G., Minn, A., 1991. In vivo study of the elimination from brain tissue of an intracerebrally-formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl- β -D-glucuronide. *J. Neurochem.* 56:1163-1168.
- Ghersi-Egea, J. F., Minn, A., Siest, G., 1988. A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: Activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated brain microvessels. *Life Sci.* 42:2515-2523.
- Leininger-Muller, B., Ghersi-Egea, J. F., Siest, G., Minn, A., 1994. Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neurosci. Lett.* 17:537-40.
- Minn, A., Ghersi-Egea, J. F., Perrin, R., Leininger, B., Siest, G., 1991. Drug metabolizing enzymes in the rat brain and brain microvessels. *Brain Res. Rev.* 16:65-82.
- Ghersi-Egea, J. F., Leininger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G., Minn, A., 1994. Localization of several drug-metabolizing enzymes activities in blood-brain interface structures. *J. Neurochem.* 62:1089-1096.
- El-Bachá, R. D. S., Minn, A., 1999. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol.* 45:15-23.
- Coughtrie, M. W. H., Burchell, B., Leakey, J. E. A., 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.
- Delpech, I., Kiffel, L., Magdalou, J., Siest, G., Martin, P., Bouchy, M., Andre, J. C., 1984. Structural changes of liver microsomes in rat during neonatal life: influence on the glucuronidation rates of various substrates. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 119:29-34.
- Ghersi-Egea, J. F., Walther, B., Decolin, D., Minn, A., Siest, G., 1987. The activity of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase in the brain. *Neuropharmacology* 26:367-372.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Chat, M., Bayol-Denizot, C., Suleman, G., Roux, F., Minn, A., 1998. Drug metabolizing enzyme activities and superoxide formation in primary and immortalized rat brain endothelial cells. *Life Sci.* 62:151-163.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Khiri, H., Reynier, P., Peyrol, N., Lericque, B., Torresani, J., Planells, R., 1996. Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. *Mol. Cell. Probes* 10:201-211.
- Reuter, S. F., Vasiliou, V., Puga, A., and Nebert, D. W., 1994. Characterization of the murine dioxin-inducible UDP glucuronosyltransferase (Ugt1-06) gene. *Toxicology* 14:410-410.
- Ponte, P., Ng, S. Y., Engel, J., Gunning, P., Kedes, L., 1984. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 12:1687-1696.
- Grillasca, J. P., Gastaldi, M., Khiri, H., Dace, A., Peyrol, N., Reynier, P., Torresani, J., Planells, R., 1997. Cloning and initial characterization of human and mouse Spot 14 genes. *FEBS Lett.* 401:38-42.

24. Chien, Y. W., Chang, S. F., 1987. Intranasal drug delivery for systemic medications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 42:67-194.
25. Thorne, R. G., Emory, C. R., Ala, T. A., Frey, W. H., 1995. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.* 692:278-282.
26. Naylor, J. L., Widdowson, P. S., Simpson, M. G., Farnworth, M., Ellis, M. K., Lock, E. A., 1995. Further evidence that the blood-brain barrier impedes paraquat entry into the brain. *Human Experim. Toxicol.* 14:587-594.
27. Das, M., Seth, P. K., Dixit, R., Mukhtar, H., 1982. Aryl hydrocarbon hydroxylase of rat brain mitochondria: properties of, and effect of inhibitors and inducers on, enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 217:205-215.
28. Iscan, M., Reuhl, K., Weiss, R., Maines, M. D., 1990. Regional and subcellular distribution of cytochrome P450-dependent drug metabolism in monkey brain: the olfactory bulb and the mitochondrial fraction have high levels of activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 169:858-863.
29. Talamo, B. R., Rudel, R. A., Kosik, K. S., Lee, V. M. Y., Neff, S., Adelman, L., Kauer J. S., 1989. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature* 337:736-739.
30. Miller, S., Coopersmith, R., Leon, M., 1991. Biochemical quantitation and histochemical localization of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in the olfactory system of adult and aged rats. *Neurochem. Res.* 16:475-481.
31. Emi, Y., Ikushiro, S., Iyanagi, T., 1995. Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) gene complex. *J. Biochem. (Tokyo)* 117:392-399.
32. Suleman, F. G., Abid, A., Gradinaru, D., Daval, J. L., Magdalou, J., and Minn, A., 1998. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 62:151-163.

2. CONJUGAISON DE L'APOMORPHINE

Publication 4

Glucuronidation of apomorphine

EL-BACHA R.S., LECLERC S., NETTER P., MAGDALOU J., MINN A.

Life Science, 2000, 67 (14), 1735-1745.

L'apomorphine, agoniste efficace des récepteurs dopaminergiques D2 et D3, est largement utilisée pour traiter la maladie de Parkinson. Dans cette étude, la glucuronoconjugaison de l'apomorphine et d'autres catéchols est étudiée en utilisant une méthode de séparation des glucuronides par chromatographie sur couche mince. Les microsomes de foie conjuguent efficacement l'apomorphine. Cette glucuronoconjugaison est augmentée en présence de dithiotréitol. La séparation par HPLC des métabolites montre la présence de deux glucuronides d'apomorphine. L'analyse par spectrométrie de masse a montré qu'il s'agit de monoglucuronides. D'autres catéchols sont conjugués par les microsomes de foie à des taux variables, parmi eux le 4-nitrocatéchol qui est le substrat le plus conjugué. Dans les microsomes de cerveau de rat, seul le 4-nitrocatéchol est significativement conjugué, suggérant que plusieurs isoformes d'UGT hépatiques, non exprimé dans le cerveau, participent au métabolisme de l'apomorphine. Pour déterminer les isoformes impliquées dans la conjugaison de l'apomorphine, deux enzymes recombinantes exprimées dans les cellules V79 ont été utilisées. L'isoforme UGT1A6 est incapable de conjuguer l'apomorphine, à l'opposé de l'isoforme UGT2B1 qui montre une activité significative envers ce substrat.

Glucuronidation of apomorphine

R.S. El-Bachá, S. Leclerc, P. Netter, J. Magdalou, A. Minn*

UMR CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy 1 N° 7561, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine,
B.P. 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Abstract

Apomorphine, a dopaminergic receptor agonist, is largely used in the therapy of Parkinson's disease. In this study, we characterized the glucuronidation of apomorphine and other catechols in rat liver and brain microsomes, using UDP-[U-¹⁴C]glucuronic acid and separation of the glucuronides formed by a thin layer chromatographic method. rat liver microsomes glucuronidate apomorphine at a significant rate, that was increased in the presence of dithiothreitol. Two apomorphine glucuronides were separated by high pressure liquid chromatography. We showed by electrospray mass spectrometry that both products were monoglucuronides. Other catechols were also glucuronidated in liver microsomes at various rates, and among them, 4-nitrocatechol was the most efficiently conjugated. In rat brain microsomes, only 4-nitrocatechol was significantly glucuronidated, suggesting that in the liver, several uridine-diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) isoforms participate to the conjugation of catechols. To determine which isoforms catalyze apomorphine glucuronidation, two recombinant enzymes expressed in V79 cells were used. The isoform UGT1A6 was unable to glucuronidate apomorphine, but we observed a significant activity catalyzed by the isoform UGT2B1. These results provide, to our knowledge, the first demonstration of apomorphine conjugation by recombinant UGT2B1, and the first evidence of the lack of apomorphine glucuronidation in the rat brain. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Apomorphine; Microsomes; Catechols; Dopamine; Glucuronidation; UGT isoforms; Parkinson's disease

Introduction

R-apomorphine is a mixed D₁/D₂ dopaminergic receptor agonist which is largely used by continuous subcutaneous infusion in the therapy of refractory "on-off" oscillations in Parkinson's disease (1). Apomorphine metabolism occurs mainly by glucuronidation in the liver (2,3), and after parenteral administration to different animal species, this drug is metabolized and mainly excreted in urine as a glucuronide (4). The reaction results from the activity of UDP-glucuronosyltransferases (UGT, EC 2.4.1.17), which are a family of enzymes involved

* Corresponding author. Tel.: +(33) 383 592753; Fax: +(33) 383 592621.

E-mail address: minn@facmed.u-nancy.fr (A. Minn)

in the detoxification of numerous endogenous and exogenous compounds. These enzymes are mainly located in the endoplasmic reticulum of the liver and of various extrahepatic tissues. They catalyze the binding of glucuronic acid from the high energy donor UDP- α -D-glucuronic acid (UDPGA) on structurally unrelated compounds that possess a hydroxyl, carboxyl, amine or thiol group. More than 26 distinct cDNAs have been sequenced to date in mammalian species (5). UGTs are part of a larger family of UDP-glycosyltransferases, either membrane-bound or cytosolic, that may preferentially use other nucleotide sugars, including UDP-galactose and UDP-glucose (5). In human cultured hepatocytes, two UGT isoforms glucuronidate 1-naphthol, one of them being identified as UGT1A6 (6). Glucuronidation of 1-naphthol and 4-methylumbelliferone also occurs in rat cerebral cells, brain microvessels or brain homogenates, although at different extents (7). A constitutive cerebral UGT identical to rat liver isoform UGT1A6 is expressed in astrocytes and neurons (8,9). However, 1-naphthol-UGT activity is barely detectable in human brains removed at autopsy (10).

The metabolism of catechol drugs and neurotransmitters is highly relevant to new drug development, especially for the treatment of neurological disorders and mental illnesses. However, despite the large therapeutic use of apomorphine, no data are available concerning its metabolism within the brain. In the present work, we investigated the glucuronidation of apomorphine and other catechols both in the liver and in the brain, and showed that two monoglucuronides were formed by liver microsomes, whereas brain microsomes were unable to conjugate apomorphine. We also attempted to identify the UGT isoforms involved in that process, using recombinant enzymes, and showed that UGT1A6 is unable to glucuronidate apomorphine. By contrast, UGT2B1 catalyzes the formation of one apomorphine glucuronide.

Methods

Reagents

Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM) and gentamicin were purchased from Gibco (Eragny). Fetal calf serum and UDP-glucuronic acid (UDPGA) were from Boehringer (Meylan). LK6DF silica gel thin layer chromatography (TLC) plates were purchased from Whatman (Phase Separations, Saint Quentin). Sep-Pak cartridges were Waters products (Phase Separations, Saint-Quentin). UDP-[U- 14 C]glucuronic acid ($10.6 \text{ Bq.pmol}^{-1}$) was purchased from Isotopchim (Ganagobie-Peyruis) and catechols from Fluka (Buchs). All other routine chemicals were from Sigma (Saint-Quentin Fallavier).

Animals

For each experiment, six male Sprague-Dawley rats (200–220 g) were killed by decapitation and the brain, olfactory bulb, brainstem, pituitary gland, and liver were rapidly excised and placed in ice-cold 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. Residual meningeal tissue was removed from brain by using fine scissors and tweezers. The meningeal membranes attached to the cranial bones, mainly dura mater, but possibly some arachnoid, were dissected and rinsed in the isolation medium. An inner set of meningeal membranes, composed of pia mater and most of the arachnoid, was gently teased free from the cortex surface. Brain tissue samples, cortex, hippocampus, mid-

brain, choroid plexus, brainstem, olfactory bulb, pituitary gland, and pia mater were fully homogenized in the isolation medium using a glass Dounce-type homogenizer. The dura mater preparation was homogenized in the medium by 50 up-and-down strokes of the low-clearance (12–63 μm) Dounce pestle, the remaining fibrous matrix being removed from the homogenate before use. The microsomal fractions of brain, olfactory bulb, and midbrain were obtained from homogenates by successive ultracentrifugations according to (7).

To obtain the microvessel fraction, the brain homogenate was centrifuged at $1,500 \times g$ for 15 min, and the sediment was resuspended in 20 ml of a Krebs-Ringer glucose medium without serum albumin and centrifuged again for 10 min at $1,500 \times g$. The pellet was resuspended in 10 ml of 0.25 M sucrose and filtered on a 500 μm nylon screen. Brain capillaries were isolated by centrifugation for 30 min at $58,000 \times g$ on a sucrose gradient according to (11). The liver microsomal fraction was obtained from the liver homogenate by successive ultracentrifugations according to (12). All preparations were stored at -80°C .

Cell culture

Astrocytes were prepared from the neopallium of 1-day-old Sprague-Dawley rat brains, as described by (13). The culture medium consisted in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin, and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. Cells usually reached confluence after 17 days. Primary cultures of astrocytes contained more than 90% immuno-positive cells, when labeled with anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, a specific astrocyte marker.

For microsome isolation, cultured cells were sonicated for 50 sec at a 60 W-output power, in a 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. The whole homogenate was centrifuged at $1,300 \times g$ for 10 min, then at $10,000 \times g$ for 20 min. The supernatant was centrifuged at $105,000 \times g$ for 90 min. The resulting microsomal pellet was suspended in a 20% (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, and stored at -80°C .

Recombinant UGT

The recombinant rat UGT1A6 and UGT2B1 cDNA were stably expressed in the eukaryotic V79 cells. Transfections, characterization of these isoforms and preparation of the membrane fraction have been previously described (14,15).

Enzymatic assays

UGT activities toward apomorphine and 1-naphthol were screened in tissues and cell microsomes or homogenates by a thin layer chromatographic method as described by (16). They were measured after treatment of the microsomes or homogenates by 0.15 mg Triton X-100/mg protein for 15 minutes at 4°C . The reaction was run in 10 mM MgCl_2 , 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 in the presence of 3.7 KBq UDP-[U- ^{14}C]glucuronic acid ($10.6 \text{ Bq.pmol}^{-1}$) at 37°C . The glucuronidation of other catechols was also screened in liver and brain cortex microsomes. The protein content was determined according to (17) using bovine serum albumin as a standard. Results were presented as mean $\pm$ SD and compared using Anova test. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Biosynthesis and characterization of apomorphine glucuronides

The glucuronides of apomorphine were biosynthesized by incubation of 1 mM apomorphine and 2.5 mM UDPGA in 10 mM MgCl₂, 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 in the presence of Triton X-100-activated liver microsomes (1 mg protein/ml) at 37°C for 4 h. The reaction was terminated by 0.6 M HCl. The excess of UDPGA was eliminated by filtration over Sep-Pak cartridges, then apomorphine and its glucuronides were eluted by water. Glucuronides were separated by HPLC on a system comprising a 100 mm × 8 mm, 4 µm particle Novapak C18 column inserted in a Radial-Pak compression module with a diode array UV-visible detection (996-Waters). The chromatographic separation was performed using an isocratic elution with 25% (v/v) acetonitrile, 0.04% (v/v) formic acid in water, pH 3.2, at a flow rate of 1 ml/min.

The formation of glucuronides was verified by their hydrolysis after incubation with bovine liver β-glucuronidase, 1000 unit/100 mM acetate buffer, pH 4.6, for 2 h at 37°C, and by electrospray mass spectrometry performed on a VG Platform mass spectrometer using a Mass Lynx software (Micromass Ltd.).

Results

UGT activity toward apomorphine and other catechols

Apomorphine was efficiently glucuronidated by rat liver microsomes. glucuronide formation by native microsomes was significantly increased in the presence of 0.5 mM DTT, and by 2–3 fold when microsomes were activated by Triton X-100 (Fig. 1). However, apomorphine was less efficiently conjugated than 1-naphthol, which was glucuronidated at rates 20 times greater than apomorphine, using Triton X-100 activated microsomes.

We screened the ability of liver and brain cortex microsomes to glucuronidate a series of catechols of potential or established therapeutic interest (Table 1). All catechols assayed were conjugated at various rates in liver microsomes, but with a lower efficiency than 1-naphthol. among them, 4-nitrocatechol was the most rapidly glucuronidated. As 1-naphthol glucuronidation occurs in various regions of the brain (7), we investigated if apomorphine and other catechols could be also conjugated by rat brain microsomes. Only 4-nitrocatechol was found to be efficiently glucuronidated in rat brain microsomes, although to a lesser extent than 1-naphthol. Traces of 4-hydroxyestradiol and catechol glucuronides were also detected. We also assayed apomorphine glucuronidation in regions of the brain and related structures. No detectable activity was observed (not shown), although glucuronidation of 1-naphthol was found in glial cell microsomes, and choroid plexus, hippocampus, arachnoid and pituitary homogenates as previously observed (18). Incubations in the presence of V79 cell membranes which were transfected with either rat *UGT1A6* or *UGT2B1* cDNA showed that *UGT1A6* does not catalyze apomorphine glucuronidation, whereas a significant activity was detected with *UGT2B1* (Table 2). However, in these experimental conditions, only one spot, corresponding to a single glucuronide, was detected.

Apomorphine glucuronides characterization

By HPLC, two major peaks corresponding to two different apomorphine glucuronides were detected after incubation of rat liver microsomes with apomorphine (Fig. 2A). The main

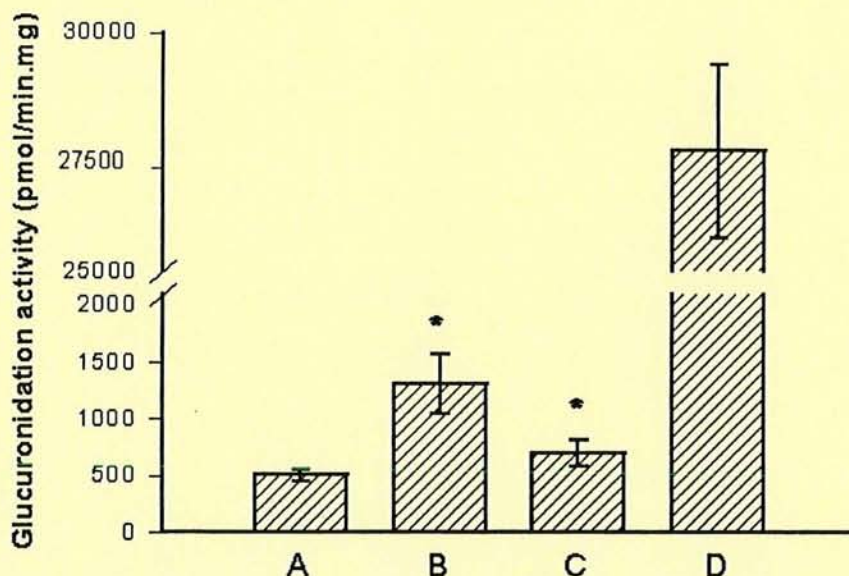


Fig. 1. Glucuronidation activities toward apomorphine and 1-naphthol as a control in rat liver microsomes. Substrate concentrations were 1 mM for apomorphine and 1-naphthol, 2.5 mM UDP-glucuronic acid, and 3.7 KBq UDP-[U- 14 C]glucuronic acid ($10.6 \text{ Bq.pmol}^{-1}$). The reaction was run in 10 mM MgCl_2 , 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 for 60 min at 37°C . A, activity towards apomorphine using non-activated liver microsomes; B, activity towards apomorphine using activated liver microsomes; C, activity towards apomorphine in the presence 0.5 mM DTT using non-activated liver microsomes; D, activity towards 1-naphthol using Triton X-100 activated liver microsomes (0.15 mg/mg protein for 15 minutes at 4°C). Values represent the mean $\pm$ SD of six different microsomal preparations. * $p < 0.01$ in comparison with A.

one (peak 2) corresponded to 90% of the total product, and the other one (peak 1) to 10%. Upon action of β -glucuronidase, both peaks completely disappeared, thus confirming that they are β -glucuronides (Fig. 2B). Apomorphine presented a major absorbance at 205 nm and an additional peak at 271 nm when eluted from the HPLC system. The spectra of glucuronides presented bathochromic displacements in the major absorbance peak which was displaced to 215 nm and 210 nm for the main and the minor glucuronides respectively, while the other one was preserved at 271 nm. The analysis by MS of apomorphine glucuronides harvested from the incubation medium by solid-phase separation presented the same quasi-molecular ion at m/z 444 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Fig. 3) and a fragment corresponding to the apomorphine molecular mass at m/z 268.

Discussion

The metabolism of catechol drugs and neurotransmitters is highly relevant to the development of new drugs, especially for the treatment of neurological or neurodegenerative disorders. For instance, nitrocatechol drugs are developed as inhibitors of catechol *O*-methyltransferase (COMT, EC 2.1.1.6) that are mainly metabolized by glucuronidation (19). Therefore, we investigated the glucuronidation of apomorphine and other catechols of potential therapeutic

Table 1

Glucuronidation activities toward catechols in microsomes of rat liver and brain

Substrate	Liver microsomes (pmol/min.mg)	Brain microsomes (pmol/min.mg)
4-Nitrocatechol	9,57	0.44
Catechol	1,08	0.04
Pyrogallol	40 ^a	ND
Pyrogallol	950 ^b	ND
3,5-Dinitrocatechol	591	ND
Apomorphine	505 ± 50 ^c	ND
DL-3,4-Dihydroxyphenylglycol	268	ND
Dopamine	143	ND
4-Hydroxyestradiol	130	0.09
3,4-Dihydroxyphenyl acetic acid	123	ND
3,4-Dihydroxy mandelic acid	118	ND
L-Dopa	92	ND
6-Hydroxydopamine	48	ND
1-Naphthol (control)	27,518 ± 1,827 ^c	1.11 ± 0.03

Substrate concentrations were 1 mM for 1-naphthol and catechols, 2.5 mM UDP-glucuronic acid, and 3.7 KBq UDP-[U-¹⁴C]glucuronic acid (10.6 Bq.pmol⁻¹). The reaction was run in 10 mM MgCl₂, 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 for 60 min at 37°C. Brain cortex microsomes were activated by Triton X-100 microsomes, but not liver microsomes. Two glucuronides were found for pyrogallol: ^aRf = 0.72; ^bRf = 0.63; ^c values represent the mean ± SD of six experiments. ND, not detected.

interest in liver and brain preparations. Apomorphine was glucuronidated by liver microsomes, although 1-naphthol was conjugated more efficiently than this drug. It has been established that rat liver microsomes display a high glucuronidation activity towards 1-naphthol, benza-zepines, apomorphine, and haloperidol (20) although the isoforms involved have not been identified yet. On the other hand, only one UGT isoform, UGT1A6, was recently detected in brain microsomes and also in cultured astrocyte and neuron homogenates (9). This isoform presents a strict specificity toward planar phenols, like 1-naphthol. Therefore, we investigated the glucuronidation activity towards apomorphine in CNS and also in V79 cells expressing UGT1A6. The glucuronidation activity towards apomorphine was absent either in brain cor-

Table 2

Glucuronidation activities toward apomorphine, 1-naphthol and 4-hydroxybiphenyl using V79 membrane expressing UGT1A6 or UGT2B1

UGT isoform	Apomorphine (pmol/min.mg)	1-Naphthol (pmol/min.mg)	4-Hydroxybiphenyl (pmol/min.mg)
UGT1A6	ND	2.20 ± 0.30	ND
UGT2B1	1.34 ± 0.03	ND	56.5 ± 6.4

Substrate concentrations were 1 mM for 1-naphthol, 4-hydroxybiphenyl and apomorphine, and 3.7 KBq UDP-[U-¹⁴C]glucuronic acid (10.6 Bq.pmol⁻¹). The reaction was run in 10 mM MgCl₂, 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.4 for 60 min at 37°C in the absence of non-labeled UPDGA in order to label all glucuronides produced. V79 cell membranes were activated by Triton X-100. Values represent the mean ± SD of three assays. ND, not detected.

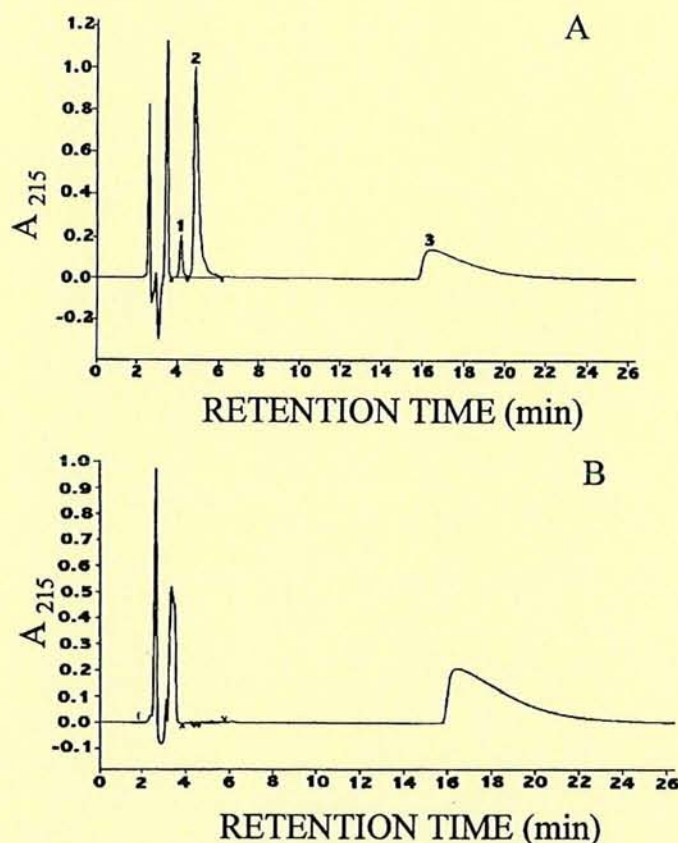


Fig. 2. Chromatograms from apomorphine glucuronides produced by rat liver microsomes, before (A) and after incubation with 1000 units β -glucuronidase (B). The chromatography was performed using a HPLC system composed of a pump 510-Waters, a 100 mm $\times$ 8 mm, 4 μ m particle Novapak C18 column inserted in a Radial-Pak compression module with diode array UV-VIS detection (996-Waters). Isocratic elution was performed with 25% (v/v) acetonitrile, 0.04% (v/v) formic acid in water at a flow rate of 1 ml/min. Apomorphine glucuronides (peaks 1 and 2) eluted at 4.1 min and 4.8 min respectively. Apomorphine (peak 3) eluted at 16.4 min.

tex, midbrain, olfactory bulb, and astrocyte microsomes, or in choroid plexus, brainstem, hippocampus, pituitary gland, pia mater, dura mater, and brain microvessel homogenates, even after a treatment of microsomes and homogenates with small amounts of Triton X-100 which activates UDPGT *in vitro* (18). The absence of apomorphine glucuronidation in central nervous system (CNS) preparations and V79 cells expressing rat UGT1A6, and the great difference in the rates of glucuronidation between apomorphine and 1-naphthol by liver microsomes suggest that the main isoform responsible for the conjugation of apomorphine is not UGT1A6.

The rat hepatic, phenobarbital-inducible UGT2B1 isoform glucuronidates morphine and carboxylic acid-containing compounds like nonsteroidal anti-inflammatory drugs and fatty acids (15). The genetically engineered V79 cell line expressing UGT2B1 conjugated apomorphine, although at a lower extent than 4-hydroxybiphenyl. Only one apomorphine glucuronide corresponding to peak 1 was formed by UGT2B1 (not shown), suggesting that an

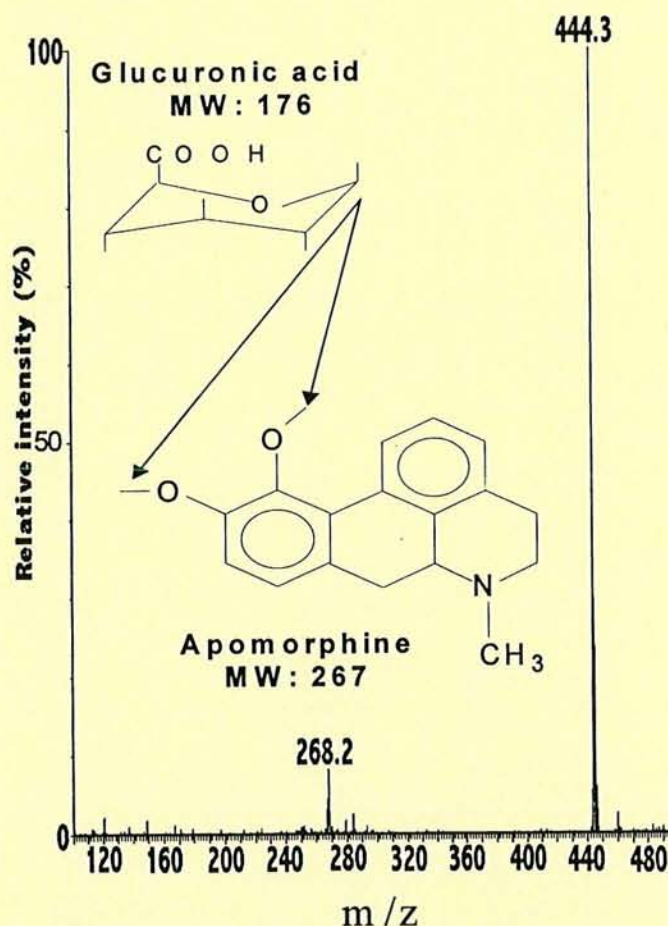


Fig. 3. Mass spectrum of apomorphine glucuronides. Electrospray positive mass spectroscopy of products purified by HPLC was performed on a VG Platform mass spectrometer using a Mass Lynx software (Micromass Ltd.).

other hepatic UGT isoform should be involved, that catalyzes the formation of the second glucuronide by liver microsomes. Nevertheless, this is the first demonstration that UGT2B1 isoform catalyzes apomorphine glucuronidation.

Autoxidation of apomorphine occurs spontaneously in aqueous solutions and the rate of degradation increases with an increase in pH, resulting in the formation of quinones and reactive oxygen species (ROS) (21). The present results also suggest that this reaction may compete with glucuronidation, as DTT significantly increased apomorphine glucuronidation activity in nonactivated liver microsomes. Thiols react with quinones both to form thiol conjugates and therefore reduce the quinone probably reforming the original substance (22). This results in an increase in the amount of substrate available for glucuronidation. Recently, we showed that apomorphine-quinones covalently bind to liver microsome proteins (submitted). *In vitro* and *in vivo* experiments also indicated covalent, non-specific binding of apomorphine to tissue proteins (23). This non-specific binding could inhibit some enzyme activ-

ities. Thiols scavenge ROS and DTT can also form reversible bonds with thiol residues on proteins, competing with quinones for these sites and protecting enzymes against them (24).

In the liver, apomorphine is metabolized by *O*-glucuronidation, *O*-methylation, and sulfation (2,3). Many HPLC techniques have been described to assay apomorphine using either UV (25,26), fluorescence (27) or electrochemical detection (28–31), although these techniques have never been used before to directly quantify apomorphine glucuronides, in part because these products are not available to be used as standards. Protocols for the quantification of glucuronides by HPLC proceed by subtraction the amount of free drug from the total amount of apomorphine after incubation with β -glucuronidase (3). This indirect technique measures total apomorphine glucuronides formed but does not discriminate between the two isomers. Therefore, we designed a biosynthesis process of both apomorphine glucuronides isomers using rat liver microsomes. We identified them upon the action of β -glucuronidase, by HPLC with a diode array UV-visible detector, and finally by mass spectrometry. Both apomorphine metabolites synthesized by rat liver microsomes presented the same molecular mass, confirming that they were monoglucuronides. Accordingly, previous studies indicated that the major metabolic products of apomorphine isolated from the urine of rabbits are two monoglucuronides (4). Steric considerations suggest that the major component is apomorphine 3-*O*-glucuronide, because the 3-position is much less hindered than the 4-position. This is the first report showing that rat liver microsomes can be used to produce significant amounts of apomorphine glucuronides by incubating 1 mM apomorphine and 2.5 mM UDP-glucuronic acid for 4 hours at 37°C in a final batch volume of 30 ml. Obviously, this method did not produce enough apomorphine glucuronides for preparative purposes, but a more efficient method for a semi-preparative purification can be designed and optimized. This will allow kinetic determinations of the reactions and also investigations on the potential pharmacological activity of these metabolites.

This work presents evidence that liver microsomes glucuronidated all catechols which were tested, and 4-nitrocatechol is a good substrate among this class of compounds (Table 1). However, 1-naphthol glucuronidation was approximately 2.9 times higher than the glucuronidation of 4-nitrocatechol in liver microsomes, and 2.5 times higher in activated brain cortex microsomes. Only 4-nitrocatechol was efficiently conjugated in brain cortex microsomes, although traces of catechol and 4-hydroxyestradiol glucuronides were also found. This result is consistent with the fact that the rat brain has been found to glucuronidate mainly planar phenols (7). A second nitration of the aromatic ring, at position 3-C in the catechol molecule decreased the rate of glucuronidation in liver microsomes, and it was not glucuronidated by the UGT isoforms which are present in the rat brain. In the same way, 3,5-dinitrocatechol was not glucuronidated by brain cortex microsomes. When incubated with rat liver microsomes, apomorphine was glucuronidated at higher rates than dopamine and its metabolites, and also than 4-hydroxyestradiol. The isoquinoline moiety is apparently the part of apomorphine responsible for a better adaptation in the active site which allows higher glucuronidation efficiency.

Finally, the present results show that dopamine, which acts as an important neurotransmitter in several regions of the CNS, is not glucuronidated by brain microsomes. This data differs from the conclusions of other authors that found dopamine glucuronide in the cerebrospinal fluid of rats, and concluded that glucuronidation constitutes an important metabolic pathway for endogenous dopamine of central origin (33).

In conclusion, the present work shows that apomorphine and several other catechols are glucuronidated by liver but not by brain microsomes, although it was found that 4-nitrocatechol can be conjugated in brain cortex microsomes. Apomorphine is a substrate for the UGT2B1 but not for the UGT1A6 isoform which is the main isoform expressed in the CNS. This study also shows that DTT increases the rate of glucuronidation, suggesting that apomorphine autooxidation, which produces oxygen-related free radicals (32), may inhibit or compete with glucuronidation.

Acknowledgments

RSE is the recipient of a fellowship from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Present address: Departamento de Biofunção, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 40110-100 Salvador, BA, Brazil. This study was supported by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and EU Biomed 2 Project BMH-97-2621. Mass spectrometric studies were carried out at the *Service Commun de Spectrométrie de Masse*, Université Henri Poincaré-Nancy 1. Pr P. Mackenzie (Bedford Park, Australia) and Dr S. Fournel-Gigleux (UMR 7561) are gratefully acknowledged for providing cDNA and the transfected cells used in this study.

References

1. Chaudhuri KR, Clough C. Subcutaneous apomorphine in Parkinson's disease. *British Medical Journal* 1998;316(7132):641.
2. Di Chiara G, Gessa GL. Pharmacology and neurochemistry of apomorphine. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy* 1978;15:87–160.
3. van der Geest R, Kruger P, Gubbens-Stibbe JM, van Laar T, H.E. Bodde, Danhof M. Assay of R-apomorphine, S-apomorphine, apocodeine, isoapocodeine and their glucuronide and sulfate conjugates in plasma and urine of patients with Parkinson's disease. *Journal of Chromatography (B) Biomedical Sciences Applications* 1997;702(1–2):131–41.
4. Kaul PN, Brochmann-Hanssen E, Way EL. Biological disposition of apomorphine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1961;50(3): 244–7.
5. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997;7(4):255–69.
6. Abid A, Sabolovic N, Magdalou J. Expression and inducibility of UDP-glucuronosyl transferases 1-naphthol in human cultured hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines. *Life Sciences* 1997;60(22):1943–51.
7. Ghersi-Egea JF, Walther B, Decolin D, Minn A, Siest G. The activity of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase in the brain. *Neuropharmacology* 1987;26(4):367–72.
8. Chat M, Bayol-Denizot C, Suleman G, Roux F, Minn A. Drug metabolizing enzyme activities and superoxide formation in primary and immortalized rat brain endothelial cells. *Life Sciences* 1998;62(2):151–63.
9. Suleman GF, 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998;358(1):63–7.
10. Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Cuny G, Siest G, Minn A. Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochemical Pharmacology* 1993;45(3):647–58.

11. Mrsulja BB, Mrsulja BJ, Fujimoto T, Klatzo I, Spatz M. Isolation of brain capillaries: a simplified technique. *Brain Research* 1976;110(2):361–5.
12. Hogeboom GH. Preparation and assay of enzymes. In S.P. Colowick and Kaplan NO, Editors. New York: Academic Press, 1955, pp. 16–9.
13. Booher J, Sensenbrenner M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 1972;2(3):97–105.
14. Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B, Siest G. Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferase cDNAs in V79 cell cultures. *Molecular Pharmacology* 1991;39(2):177–83.
15. Pritchard M, Fournel-Gigleux S, Siest G, Mackenzie P, Magdalou J. A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase 2B1) stably expressed in V79 cells catalyzes the glucuronidation of morphine, phenols, and carboxylic acids. *Molecular Pharmacology* 1994 Jan;45(1):42–50.
16. Bansal SK, Gessner T. A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-¹⁴C]glucuronic acid. *Analytical Biochemistry* 1980;109(2):321–9.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193(1):265–275.
18. Leininger B, Ghersi-Egea JF, Siest G, Minn A. *In vivo* study of the elimination from rat brain of an intracerebrally formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl-beta-D-glucuronide. *Journal of Neurochemistry* 1991;56(4):1163–8.
19. Lautala P, Kivimaa M, Salomies H, Elovaara E, Taskinen J. Glucuronidation of entacapone, nitecapone, tolcapone, and some other nitrocatechols by rat liver microsomes. *Pharmacological Research* 1997;14(10):1444–8.
20. Tedford CE, Ruperto VB, Barnett A. Characterization of a rat liver glucuronosyltransferase that glucuronidates the selective D1 antagonist, SCH 23390, and other benzazepines. *Drug Metabolism and Disposition* 1991;19(6):1152–9.
21. Kaul PN, Brochmann-Hanssen E. Biological disposition of apomorphine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1961;50(3):266–7.
22. Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, Moldeus P. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Molecular Pharmacology* 1985;28(3):306–11.
23. Smith RV, Velagapudi RB, McLean AM, Wilcox RE. Interactions of apomorphine with serum and tissue proteins. *Journal of Medicinal Chemistry* 1985;28(5):613–20.
24. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 1997 15;324 (1):1–18.
25. Smith RV, Glade JC, Humphrey DW. High-performance liquid chromatographic separation of apomorphine and its O-methyl metabolites. *Journal of Chromatography* 1979;172(3):520–3.
26. Smith RV, Humphrey DW, Szeinbach S, Glade JC. High-performance liquid chromatographic determination of apomorphine in blood serum. *Analytical Letters* 1979;12(B4):371–9.
27. Smith RV, De Moreno MR. Determination of apomorphine and N-n-propylnorapomorphine in plasma using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 1983;274(2):376–80.
28. Nicolle E, Pollak P, Serre-Debeauvais F, Richard P, Gervason CL, Broussolle E, Gavend M. Pharmacokinetics of apomorphine in parkinsonian patients. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 1993;7(5):245–52.
29. Przedborski S, Levivier M, Raftopoulos C, Naini AB, Hildebrand J. Peripheral and central pharmacokinetics of apomorphine and its effect on dopamine metabolism in humans. *Movement Disorders* 1995;10(1):28–36.
30. Sam E, Augustijns P, Verbeke N. Stability of apomorphine in plasma and its determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications* 1994;658(2):311–7.
31. Sam E, Sarre S, Michotte Y, Verbeke N. Distribution of apomorphine enantiomers in plasma, brain tissue and striatal extracellular fluid. *European Journal of Pharmacology* 1997;329(1):9–15.
32. El-Bachá RDS, Netter P, Minn A. Mechanisms of apomorphine cytotoxicity towards rat glioma C6 cells: protection by bovine serum albumin and formation of apomorphine-protein conjugates. *Neuroscience Letters* 1999;263(1):25–8.

3. CONJUGAISON DES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STERORDIENS ET PRESENCE DES CYCLO-OXYGENASES

Publication 5

Localization of cyclo-oxygenase 1 and 2 in the olfactory organs
and conjugaison of non selective NSAID COX inhibitor

LECLERC S., BOILEAU C., NETTER P., MINN A.

Publication en préparation pour *Neuroscience Letters*

A. Mise en évidence des cyclo-oxygénases 1 et 2 dans la muqueuse olfactive et les bulbes olfactifs

Dans les BO, la protéine COX-1 est faiblement exprimé. Elle est localisée dans les cellules granulaires et les cellules mitrales. A l'opposé, aucun marquage pour COX-1 n'est observé dans la MO (Figure 32).

La protéine COX-2 est fortement exprimée dans les BO et la MO (Figure 33). Cette protéine est localisée dans les cellules granulaires et mitrales des BO et dans les cellules sustentaculaires et les neurones olfactifs dans la MO.

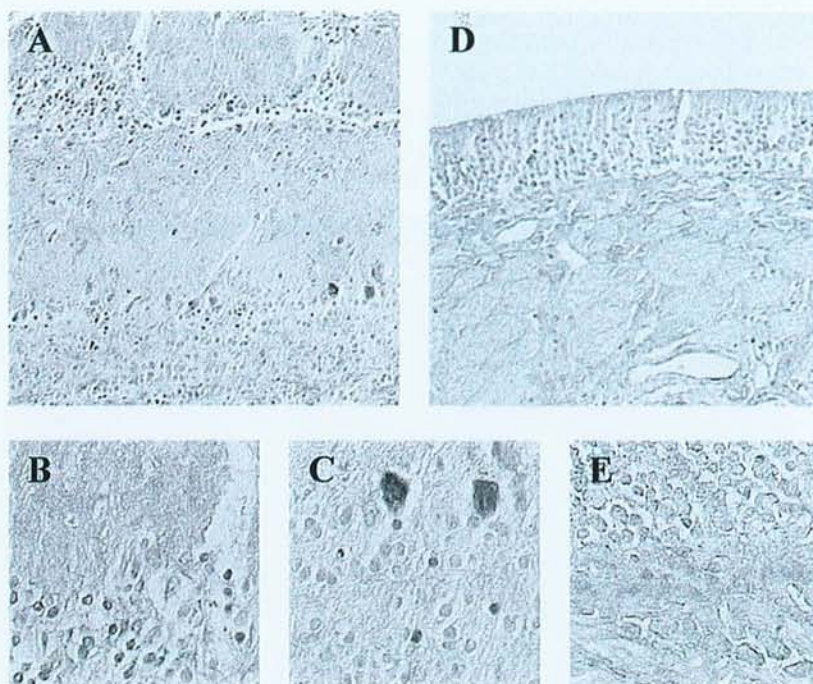


Figure 32 : Immunohistochimie de COX-1 dans les bulbes olfactifs (A, B et C) et dans la muqueuse olfactive (D et E). B et C sont, respectivement, des agrandissements de la couche glomérulaire et de la couche de cellules mitrales. E est un agrandissement de la muqueuse olfactive. A et D : grossissement 160 fois, B,C et E : grossissement 640 fois.

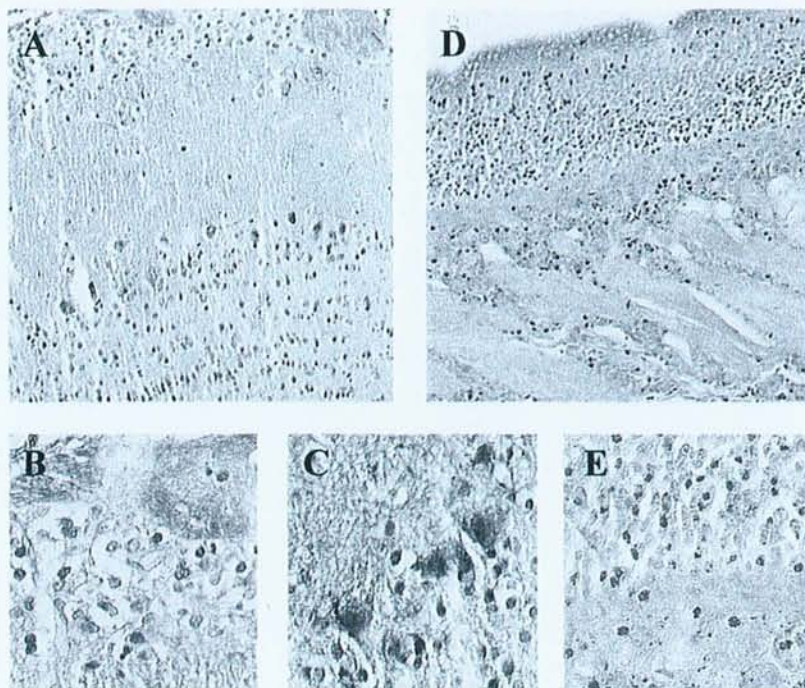


Figure 33 : Immunohistochimie de COX-2 dans les bulbes olfactifs (A, B et C) et dans la muqueuse olfactive (D et E). B et C sont, respectivement, des agrandissements de la couche glomérulaire et de la couche de cellules mitrales. E est un agrandissement de la muqueuse olfactive. A et D : grossissement 160 fois, B,C et E : grossissement 640 fois.

B. Conjugaison des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les microsomes d'astrocytes, les homogénats de muqueuse olfactive, de bulbes olfactifs et de cerveau

Le kétoprofène est l'AINS le mieux conjugué par les UGT astrocytaires (Figure 34). Le naproxène et l'ibuprofène sont également conjugués. Par contre, aucune activité de glucuronoconjugaison envers l'aspirine ou le paracétamol n'est détectée. Dans la MO, le kétoprofène, le naproxène et l'ibuprofène sont faiblement conjugués chez les rats de 1 jours. L'activité de glucuronoconjugaison de ces AINS est maximale pour les rats âgés de deux semaines à trois mois puis elle diminue. L'activité de glucuronoconjugaison envers le kétoprofène et l'étodolac est du même ordre de grandeur. L'activité des UGT dans les BO pour les AINS est très faible. L'étodolac est l'AINS le mieux conjugué, la plus forte activité est observée chez les rats de 1 jour. Dans le cerveau, l'activité de glucuronoconjugaison des AINS est indétectable. L'efficacité des AINS en particulier celle sur les COX pourrait être moduler par leur glucuronoconjugaison.

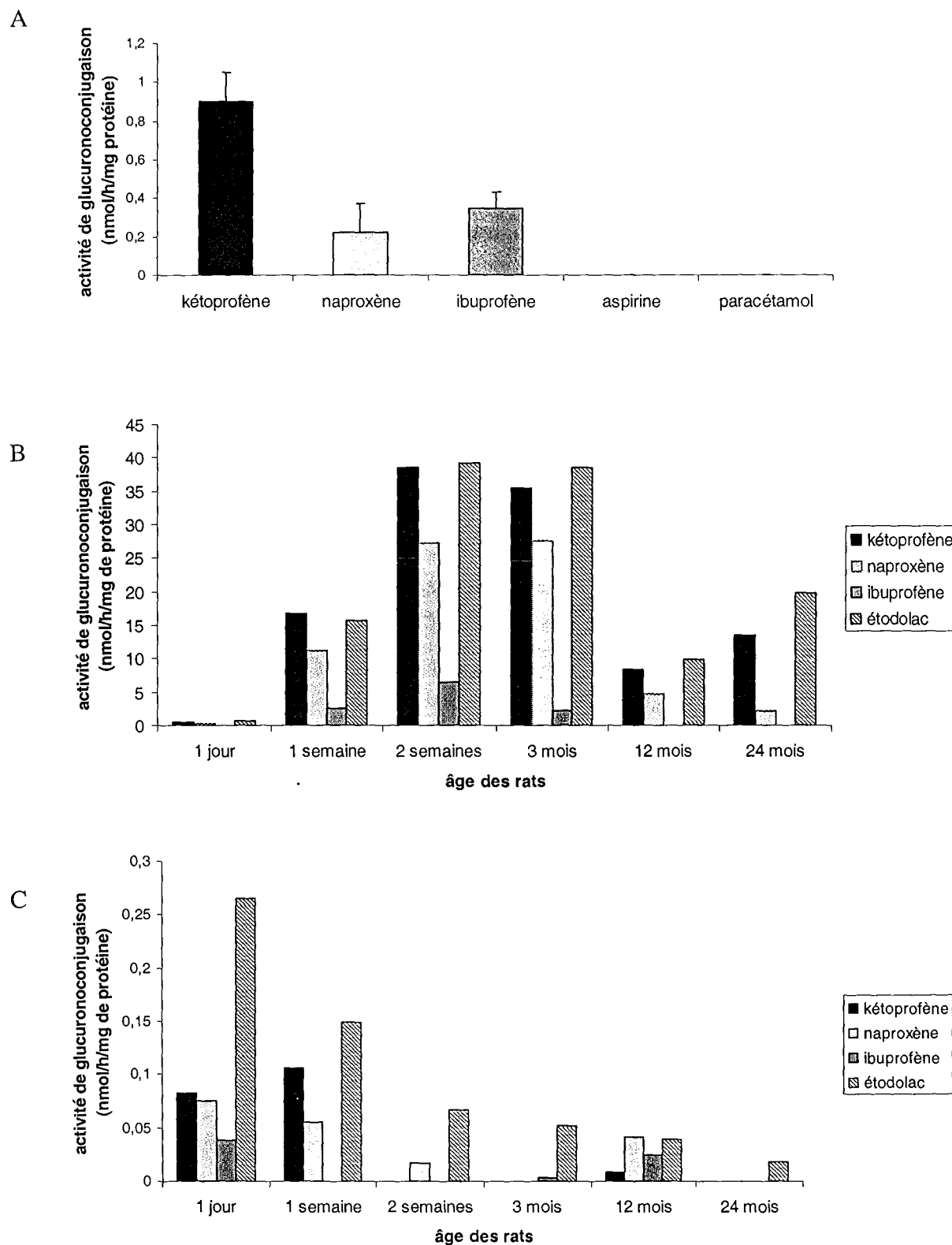


Figure 34 : Activité de glucuroconjugaison, par chromatographie sur couche mince, des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les microsomes d'astrocytes (A), dans les homogénats de muqueuse olfactive (B), et dans ceux de bulbes olfactifs (C). Aucune activité n'a été détectée dans les homogénats de cerveau.

4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

4.1. Localisation de l'UGT1A6 dans la muqueuse olfactive par hybridation *in situ*

L'expression de l'UGT1A6 a été démontré dans la MO (publication 1). Cependant, il n'existe aucune donnée sur la localisation cellulaire de cette enzyme. Par hybridation *in situ*, nous avons cherché à identifier les cellules exprimant cette isoforme. Les ARNm de l'isoforme UGT1A6 sont localisés dans les cellules sustentaculaires et dans les neurones olfactifs sensoriels (Figure 35).

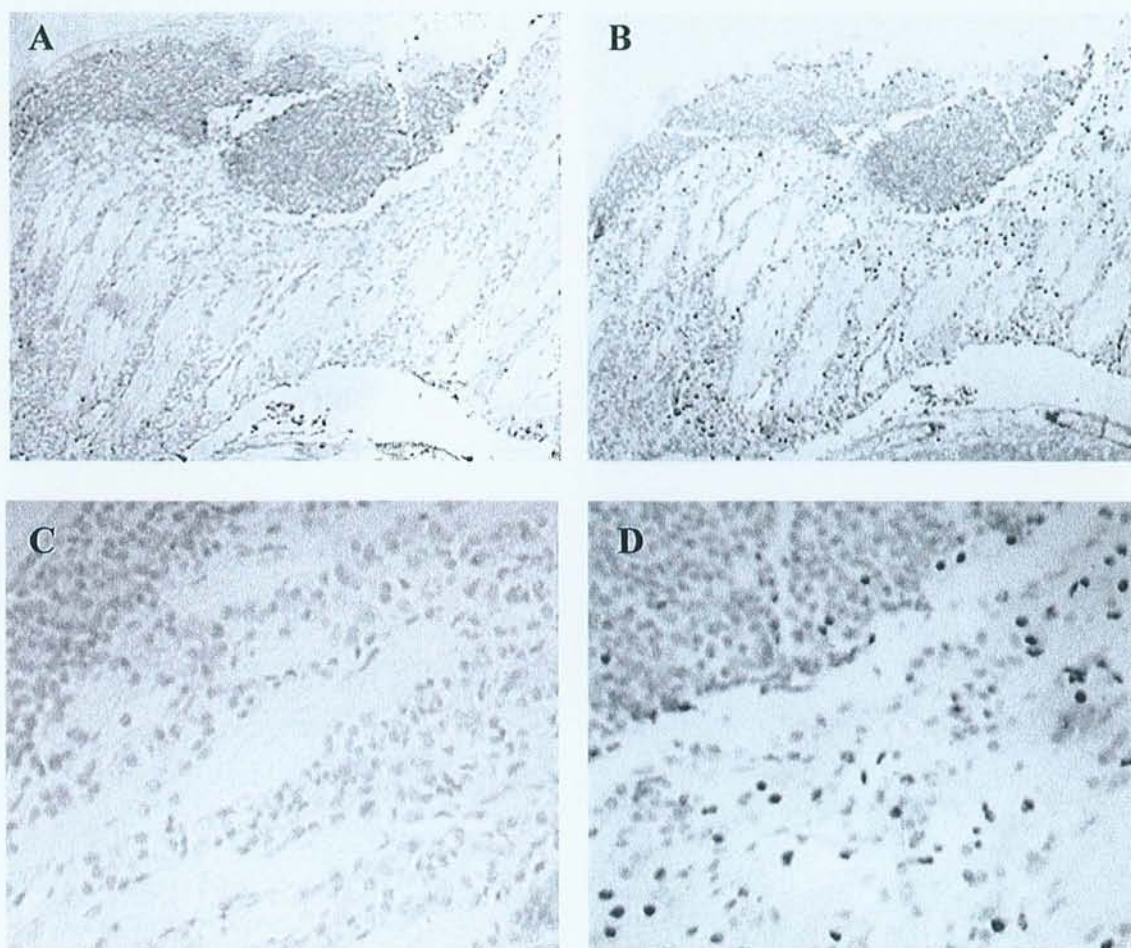


Figure 35 : Localisation des ARNm de l'UGT1A6 dans la muqueuse olfactive de rat par hybridation *in situ*. Les coupes ont été hybridées avec la sonde UGT1A6 sens (A et C) et avec la sonde UGT1A6 anti-sens (B et D). A et B : grossissement 160 fois, C et D : grossissement 640 fois.

4.2. Activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol dans les microsomes d'astrocytes

L'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol, mesurée par fluorimétrie, est onze fois supérieure dans les microsomes de foie par rapport aux microsomes de cellules gliales en culture primaire, respectivement 3 400 et 306 nmol/h/mg de protéine. La lignée d'astrocytes immortalisés C6 est très facile à cultiver et constitue ainsi un outil potentiel pour modéliser *in vitro* le métabolisme de médicaments. Nous avons donc entrepris une étude comparative des activités de conjugaison dans ces cellules et dans les astrocytes en culture primaire. Les UGT présentes dans les cellules immortalisées C6 ont une activité très faible (1,36 nmol/h/mg de protéine), même après activation par du Triton X-100, détergent qui facilite l'accès du substrat au site actif de l'enzyme. Les cellules C6 ne peuvent donc pas constituer un modèle *in vitro* d'étude de la conjugaison cérébrale (Figure 36).

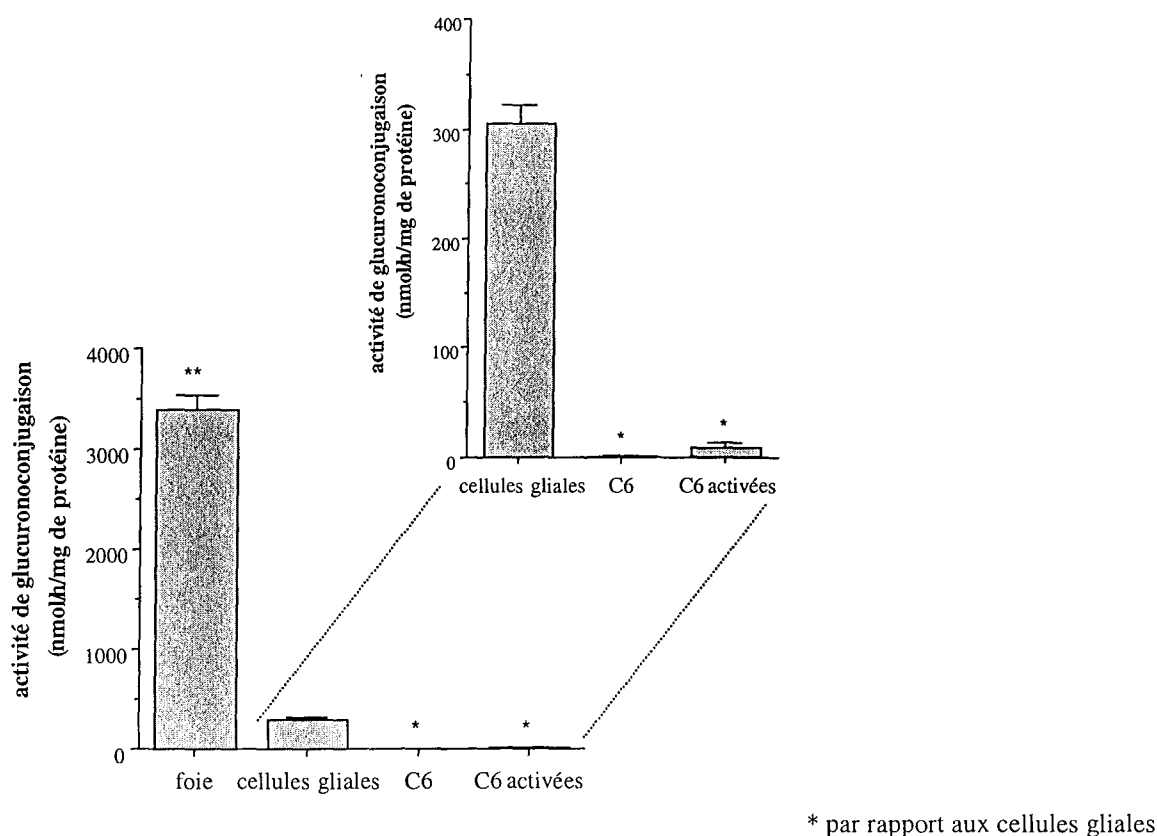


Figure 36 : Activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol par fluorimétrie dans des microsomes de foie de rats, de cellules gliales (astrocytes de rats nouveau-nés en culture primaire), de cellules immortalisées C6 et de cellules C6 activées par du Triton X-100 ($n=3$, test t-Student, ** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$ par rapport aux astrocytes en culture primaire).

4.3. Conjugaison des catéchols dans les microsomes d'astrocytes, et dans les homogénats de muqueuse olfactive, de bulbes olfactifs et de cerveau

Dans la publication 4, nous avons fait une étude détaillée de la conjugaison de l'apomorphine et d'autres catéchols, dont certains ont des propriétés thérapeutiques, dans le cerveau et dans le foie. Ayant démontré (publication 1 et 3) de fortes activités de conjugaison dans la MO et les BO, nous avons également étudié la conjugaison de catéchols dans ces tissus. Après analyse par CCM (Figure 37), nous observons que le 4-nitrocatechol et la 8-hydroxyquinoline sont les catéchols les mieux conjugués par les UGT présentes dans les microsomes d'astrocytes (respectivement, 272,3 et 352,1 nmol/h/mg de protéine). Ces deux substrats sont plus conjugués que le 1-naphtol (13,51 nmol/h/mg de protéine). Dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité de glucuronoconjugaison est pratiquement indétectable pour la dopamine, la l-dopa, la noradrénaline, l'adrénaline et l'acide gallique. A l'opposé, l'apomorphine, le pyrocatechol, la dobutamine, le pyrogallol, le 4-hydroxyestradiol et le 2-hydroxyestrone sont conjugués par les UGT astrocytaires. Ces UGT métabolisent le pyrogallol en deux glucuronides. Le pyrogallol possède, dans sa structure moléculaire, deux sites possibles de réaction avec l'UDPGA. Les trois capones, entacapone, nitécapone et tolcapone, sont faiblement conjuguées par les microsomes d'astrocytes, l'entacapone étant la mieux conjuguée.

Dans la muqueuse olfactive (Figure 38), le 4-nitrocatechol est fortement conjugué mais moins que le naphtol et ceci pour tous les âges. L'activité de glucuronoconjugaison envers l'apomorphine est plus faible que celle des précédents substrats. Le même profil de conjugaison est observé pour ces différents catéchols. L'activité de conjugaison est faible pour les rats de 1 jour, elle augmente ensuite jusqu'à l'âge de 3 mois puis diminue et réaugmente légèrement chez les vieux rats de 24 mois. Dans les BO, les UGT ont une activité métabolique environ 50 fois plus faible que celle trouvée dans la MO. L'activité de glucuronoconjugaison dans les homogénats de cerveau est du même ordre de grandeur que celle des BO. De plus, le 4-nitrocatechol dans ces deux organes est plus conjugué que le 1-naphtol. L'apomorphine est faiblement conjuguée. Dans les BO et le cerveau, les UGT ont une forte activité chez les jeunes rats qui décroît avec le développement post-natal.

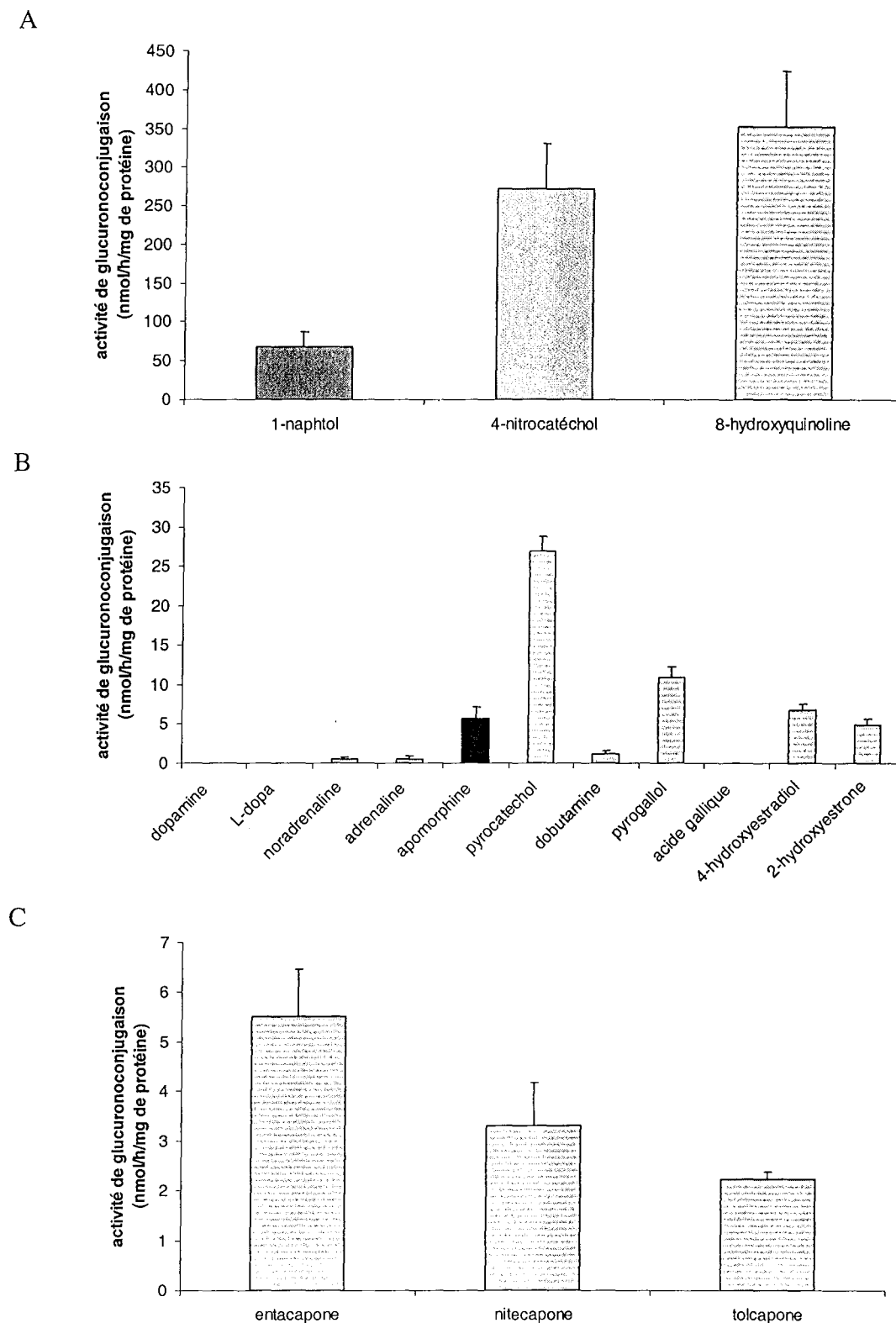


Figure 37 : activité de glucuroconjugaison, par chromatographie sur couche mince, du 1-naphtol dans des microsomes de foie, du 1-naphtol, du 4-nitrocatechol et de la 8-hydroxyquinoline dans des microsomes d'astrocytes. (B) : activité de conjugaison de la dopamine, de la l-dopa, de la noradrénaline, de l'apomorphine, du pyrocatechol, de la dobutamine, du pyrogallol, de l'acide gallique, du 4- hydroxyestradiol et de la 2-hydroxyestrone dans les microsomes d'astrocytes. (C) : activité de l'entacapone, de la nitecapone et de la tolcapone dans les microsomes d'astrocytes.

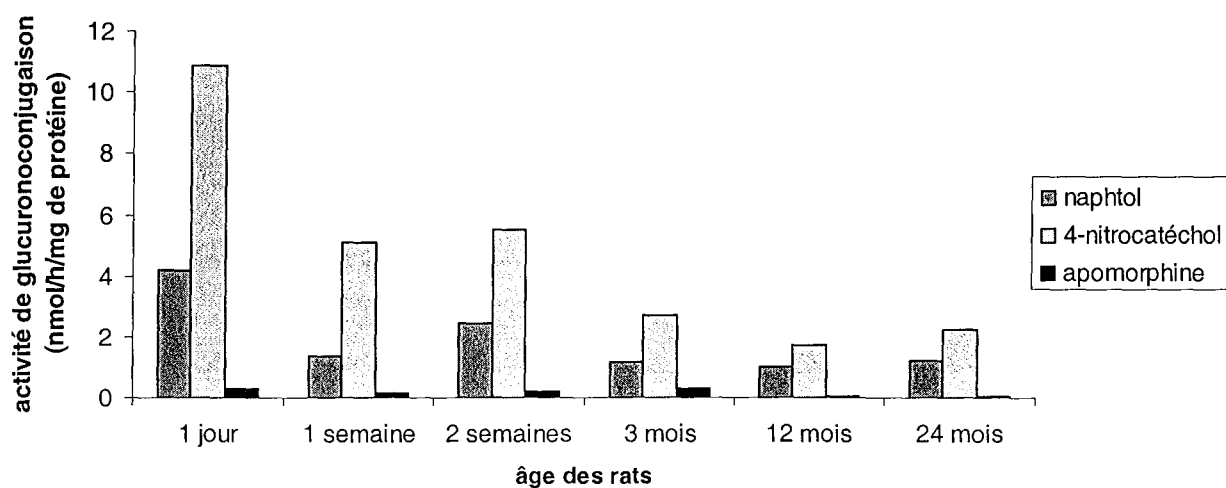
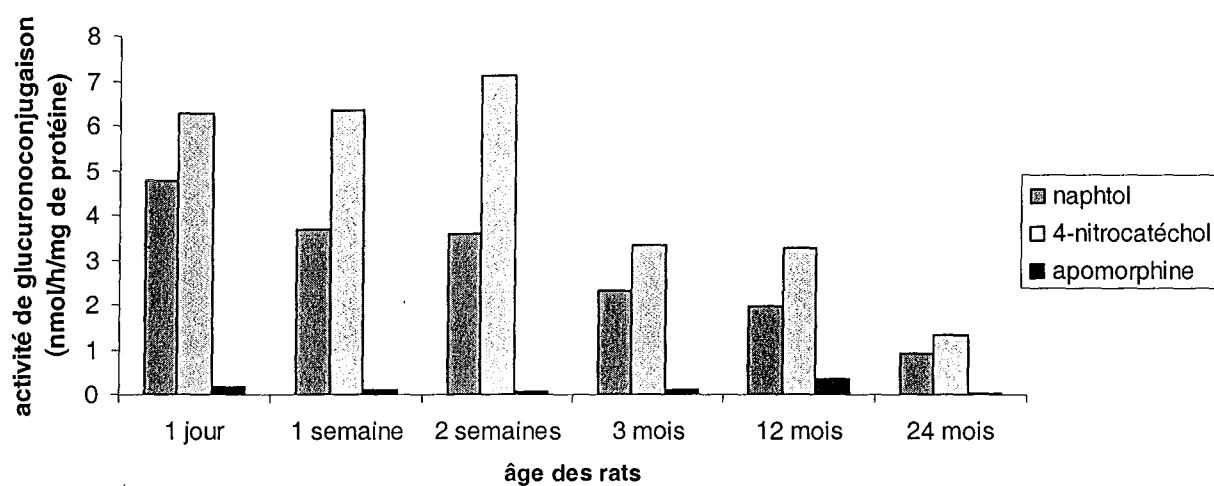
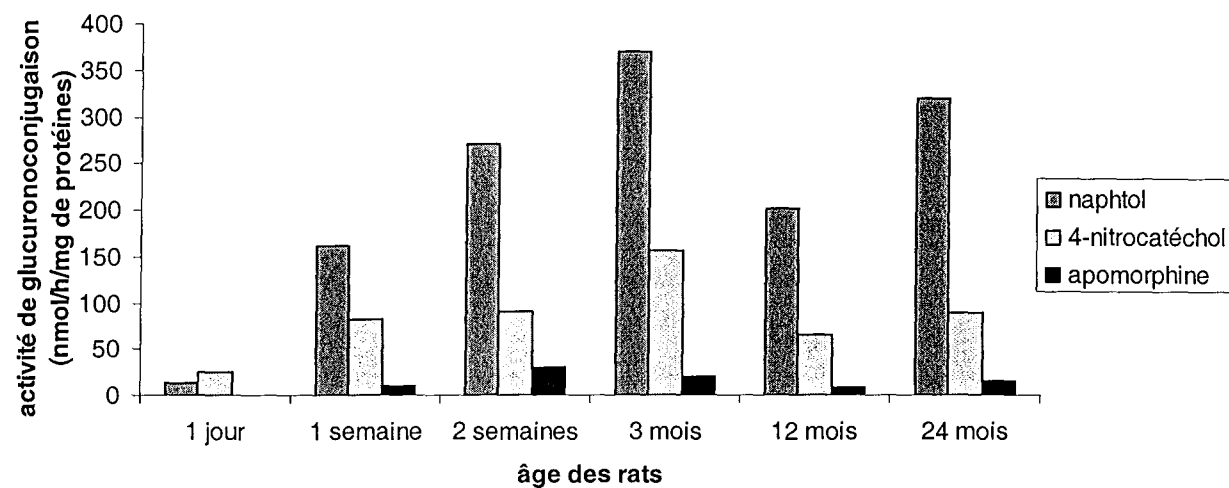


Figure 38: activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol, du 4-nitrocatechol et de l'apomorphine dans des homogénats de muqueuse olfactive (A), de bulbe olfactif (B), et de cerveau (C), par chromatographie sur couche mince.

DISCUSSION

1. ACTIVITE DE GLUCURONOCONJUGAISON ENVERS DES MOLECULES ODORANTES ET EXPRESSION DES ARNm DES ISOFORMES UGT2A1 ET UGT1A6

1.1. Activité de glucuronoconjugaison

La terminaison du message olfactif résulte de l'activation de plusieurs systèmes, entre autres, de la présence d'enzymes très actives dont certaines sont spécifiques, qui vont rapidement métaboliser les molécules odorantes pour qu'elles ne soient plus capables de stimuler les récepteurs olfactifs et en prévenant leur saturation (Lancet, 1991 ; Burchell, 1991 ; Lazard *et al.*, 1991). Ces enzymes présentes dans la MO, mais aussi à un niveau d'expression plus faible dans les BO et le cerveau, conjuguent les différentes molécules odorantes à des taux variables selon l'âge des rats et selon le tissu étudié. La plupart des molécules que nous avons utilisées sont glucuronoconjuguées dans la MO, alors que dans les BO et le cerveau, le nombre de molécules conjuguées et l'intensité de la conjugaison sont plus faibles. Les résultats obtenus suggèrent que la MO joue effectivement un rôle important dans la régulation de la concentration des molécules qui pénètrent par la voie nasale, sauf pour les rats nouveau-nés où l'activité des UGT dans les BO est similaire à celle trouvée dans la MO.

Les UGT, les CYP, les GST et d'autres enzymes du métabolisme des médicaments ont été détectées au niveau des plexus choroïdes et de la BHE où elles ont un rôle de détoxification et de barrière en métabolique envers les xénobiotiques. Ces enzymes également présentes dans la MO peuvent participer à la biotransformation des molécules odorantes et autres molécules étrangères, et donc contribuer à la barrière métabolique en limitant l'entrée possible des xénobiotiques dans le cerveau (Hussain, 1998 ; El Bachà et Minn, 1999). La forte activité de glucuronoconjugaison, en particulier chez les rats de 3 mois, dans la MO conforte cette hypothèse. De plus, l'activité enzymatique des UGT pour le 1-naphtol plus forte dans la MO que dans le foie suggère un rôle important de détoxification. La glucuronoconjugaison de molécules odorantes a aussi été détectée dans les BO et le cerveau. Les activités présentes dans ces deux tissus contribuent certainement aussi à la barrière métabolique mais ne sont probablement pas impliqués dans la fonction olfactive puisque ces deux organes transmettent le message sous formes de potentiel d'action.

1.2. Comparaison de l'activité de glucuronoconjugaison et de l'expression des transcrits d'UGT

Le profil d'expression de l'UGT2A1, dans la MO, est similaire à celui de l'activité des UGT. Comme l'expression des ARNm de l'UGT2A1 est largement supérieure à celle des ARNm de l'UGT1A6, l'isoforme UGT2A1 semble majoritaire. Son activité doit masquer l'activité des autres UGT présentes dans la MO, ce qui expliquerait les profils identiques.

A l'opposé, dans les BO, il ne semble pas exister de corrélation entre l'expression des ARNm de l'UGT2A1 et ceux de l'UGT1A6 et les changements d'activité de glucuronoconjugaison. L'expression des ARNm de l'UGT2A1 est 10 fois plus faible que dans la MO. Les activités de conjugaison observées pour les différentes molécules résultent, comme dans la MO, des activités de l'UGT1A6, de l'UGT2A1 et d'autres isoformes certainement exprimées dans ces tissus. Mais contrairement à ce qui se passe dans la MO, une isoforme ne semble pas prédominer par rapport aux autres, d'où un profil d'activité de glucuronoconjugaison différent de celui de l'expression de chaque isoforme.

De même, dans le cerveau, aucune corrélation n'apparaît entre l'expression des ARNm de l'UGT1A6 et l'activité de glucuronoconjugaison. Comme l'enzyme recombinante UGT1A6 est incapable de métaboliser le carvacrol (Jackson *et al.*, 1988), une autre isoforme encore inconnue doit être exprimée dans le cerveau, comme l'a déjà été proposé Suleman *et al.*, (1998). Les différences observées dans les activités de glucuronoconjugaison suggèrent un processus de régulation différent pour l'expression de l'UGT1A6 et UGT2A1 dans les différents tissus, et implique la présence d'autres isoformes qui restent à identifier.

1.3. Relation entre la glucuronconjugaison et la fonction olfactive

Comme l'expression des UGT et l'odorat varient avec l'âge, nous avons cherché s'il existait une corrélation entre les activités enzymatiques et la fonction olfactive. Les cellules mitrales sont des neurones qui font relais dans les BO en transmettant l'activité électrique des récepteurs olfactifs au cortex pyriforme. Les interactions synaptiques dans les BO moduleraient les décharges des cellules mitrales et faciliteraient la discrimination des molécules odorantes (Friedman *et al.*, 2000). L'équipe du Docteur Martine Cattarelli a enregistré l'activité électrique de cellules mitrales en réponse à différentes molécules

odorantes choisies parmi les substrats des isoformes d'UGT exprimées dans les tissus olfactifs. Les études électrophysiologiques ont été réalisées sur des rats anesthésiés. Il est probable que l'anesthésie diminue les réponses du BO. Les amplitudes des réponses observées varient de manière identique pour l'acétate d'isoamyle et l'anisole, la valeur la plus faible étant obtenue à trois mois. Comme l'expression de l'UGT2A1 est maximale à cet âge, la faible amplitude des réponses positives à cet âge peut résulter d'une forte conjugaison des molécules odorantes. La glucuronoconjugaison entraînerait une modification de la structure moléculaire de ces molécules et modulerait ainsi leur interaction avec les récepteurs (Ben-Arie *et al.*, 1993).

1.4. Localisation des isoformes UGT2A1 et UGT1A6

La technique d'hybridation *in situ* nous a permis de détecter précisément la localisation cellulaire des ARNm de l'UGT2A1 dans la MO et les BO de rat. L'UGT2A1 est localisée par immunohistochimie dans les glandes de Bowman et les cellules sustentaculaires de la MO (Lazard *et al.*, 1990; Lazard *et al.*, 1991). Un même immunomarquage a été observé pour de nombreuses autres enzymes du métabolisme des médicaments dont les CYP, les GST et les phénol sulfotransférases. Nous avons montré la présence d'ARNm de l'UGT2A1 principalement dans les cellules sustentaculaires et un faible marquage dans les cellules des glandes de Bowman. Les transcrits de l'UGT2A1 sont également présents dans les neurones sensoriels olfactifs, une localisation qui n'a encore jamais été décrite par immunohistochimie pour les enzymes du métabolisme des médicaments.

Peu de choses sont connues sur l'expression et la localisation cellulaire des enzymes du métabolisme des médicaments dans les BO, même si ce tissu présente des activités métaboliques très élevées pour différents substrats modèles. Plusieurs CYP ont été caractérisés par hybridation *in situ* et immunohistochimie. Par exemple, l'expression du CYP2D4 a été montrée dans les cellules granulaires (Hedlund *et al.*, 1996). Nous avons localisé les transcrits de l'UGT2A1, principalement dans ces neurones. Ceci suggère un rôle métabolique spécialisé des cellules granulaires des BO. Par RT-PCR quantitative, le taux d'ARNm de l'UGT2A1 est six fois plus faible dans les BO que dans l'épithélium olfactif. Ceci n'avait jamais été montré auparavant, l'UGT2A1 étant considérée comme une enzyme spécifiquement et exclusivement exprimée par la MO (Lazard *et al.*, 1991; Lancet, 1991). Aucune expression de l'UGT2A1 n'a cependant été trouvée dans le cerveau, le foie, les

poumons, les reins ou l'intestin. L'UGT2A1 ne semble être exprimée que dans les organes olfactifs. Elle doit probablement y exercer un rôle spécifique dans la barrière métabolique et le processus olfactif.

Brands *et al.* (2000) ont confirmé l'expression des ARNm de l'isoforme UGT1A6 dans le cerveau. Ils ont trouvé un marquage dans le cytoplasme des cellules de Purkinje et dans les cellules pyramidales de l'hippocampe. Dans la MO, les ARNm de l'UGT1A6 sont localisés dans les mêmes cellules que ceux de l'UGT2A1. Ceci suggère que les cellules sustentaculaires aient un rôle métabolique important. Les neurones semblent également avoir ce rôle. Ces deux types cellulaires pourraient donc intervenir dans la détoxification et la barrière contre les molécules étrangères qui pénètrent par la MO et les BO vers le SNC.

2. GLUCURONOCONJUGAISON DU 1-NAPHTOL DANS LES BULBES OLFACTIFS ET DANS LES ASTROCYTES

Les métaux lourds peuvent également pénétrer dans le SNC par la voie olfactive, et y induire une anosmie et des désordres neurologiques (Hasting et Evans, 1991). Cette voie est aussi une voie d'entrée directe des xénobiotiques potentiellement toxiques dans le cerveau. Ceux-ci ou certains de leurs métabolites réactifs peuvent engendrer une toxicité dans les BO eux-mêmes ou dans le cerveau entraînant une anosmie ou une neurodégénérescence. La présence d'enzymes du métabolisme des médicaments comme les UGT, les CYP et les GST représente une protection contre ces molécules étrangères et aussi un facteur de risque dans la mesure où certains métabolites formés peuvent être réactifs. Dans la publication 3, nous montrons que l'activité spécifique des UGT pour le 1-naphtol est très forte dans les BO (39,61 nmol/h/mg de protéine), comparée à celle du cerveau. Ceci suggère une régio-localisation des UGT dans cet organe et implique un rôle protecteur des BO contre l'entrée de phénols potentiellement toxiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la publication 1. En effet, pour les deux publications, la plus forte activité de glucuronoconjugaison pour le 1-naphtol est observée chez les rats de 1 jour, dans les BO et le cerveau. De plus, cette activité de glucuronoconjugaison pour le 1-naphtol diminue avec l'âge jusqu'à 3 mois. Les légères différences observées dans les résultats de ces publications s'expliquent par des conditions expérimentales différentes.

2.1. L'isoforme UGT1A6

Dans les BO, la présence de l'UGT1A6 a été mise en évidence par western blot et RT-PCR, cette isoforme ayant déjà été caractérisée dans le cerveau et dans des cellules cérébrales (neurones et astrocytes) en culture (Suleman *et al.*, 1998). Mais son rôle physiologique est encore inconnu, car ses substrats endogènes n'ont pas été identifiés à ce jour. Aucun changement d'expression des ARNm de l'UGT1A6 n'a été observé dans les BO et le cerveau en fonction de l'âge. Les différences expérimentales rapportées dans les publications 1 et 3 résultent probablement de l'utilisation de conditions méthodologiques différentes.

Des isoformes d'UGT de la famille 1 et 2, autres que l'isoforme UGT1A6, peuvent conjuguer le 1-naphtol mais à des taux plus faibles (Mulder, 1992 ; Mackenzie *et al.*, 1997). Certaines de ces isoformes doivent être exprimées dans les BO et le cerveau. Les activités correspondantes pourraient expliquer les différences observées entre les profils d'activité et d'expression des ARNm de l'UGT1A6.

2.2. Glucuronoconjugaison cérébrale du 1-naphtol

L'activité de glucuronoconjugaison varie selon le type de cellules cérébrales. L'activité 1-naphtol est plus importante dans les cellules gliales que dans les neurones qui ont eux-mêmes une plus forte activité que les cellules endothéliales cérébrovasculaires (Suleman *et al.*, 1998 ; Gradinaru, 1995). Suleman *et al.* (1998) ont aussi montré que l'expression de l'UGT1A6 est supérieure dans les astrocytes à celle des neurones en culture primaire. Ceci explique pourquoi nous avons choisi de caractériser les astrocytes comme modèle d'étude de la glucuronoconjugaison dans le cerveau. Les astrocytes que nous avons utilisé proviennent soit de la lignée C6 isolée d'un gliome de rat, soit de cultures primaires. Par mesure fluorimétrique de l'activité UGT, nous avons montré que l'activité de glucuronoconjugaison du 1-naphtol est quasiment inexistante dans les microsomes de cellules C6, même quand ceux-ci sont activés par du Triton X100. Le détergent favorisant l'accès du substrat à l'enzyme, l'activité est augmentée, mais elle reste toujours inférieure à celle observée dans les microsomes d'astrocytes en culture primaire. La lignée C6 semble avoir perdu une grande partie de l'activité de l'isoforme UGT1A6. La capacité d'expression de l'UGT1A6 est donc pratiquement perdue dans ces cellules. Cette lignée immortalisée est cependant très utilisée comme modèle d'étude *in vitro* des astrocytes, par exemple, dans les études de récepteurs dont

celui du glutamate (Albasanz *et al.*, 1997), dans les études d'expression de certains gènes (Wu *et al.*, 1997), de métabolisme comme le stress oxydant (Tsai *et al.*, 1997) et de régulation de l'expression de la NO synthase (Esposito *et al.*, 2001). Nos résultats montrent que ces cellules ne peuvent pas servir pour la modélisation *in vitro* de la glucuronoconjugaison cérébrale. Nous avons donc utilisé pour la suite de ce travail des microsomes d'astrocytes en culture primaire. La lignée C6 n'exprimant pas ou très peu d'UGT, ce résultat doit être pris en compte dans le choix d'un modèle d'étude de cytotoxicité cérébrale.

3. GLUCURONOCONJUGAISON DE CATECHOLS

Les catéchols sont connus comme neurotransmetteurs ou médicaments permettant de compenser les désordres neurologiques et des maladies neurodégénératives liés à ces neurotransmetteurs. A présent, les médicaments de type nitrocatéchol sont développés comme inhibiteurs de COMT, et il a été montré qu'ils sont métabolisés par glucuronoconjugaison (Lautala *et al.*, 1997). Nous avons étudié la glucuronoconjugaison de l'apomorphine et d'autres catéchols ayant éventuellement un intérêt thérapeutique, dans le foie et le cerveau. L'apomorphine est conjuguée par les microsomes de foie mais à un taux plus faible que le 1-naphtol. Les microsomes de foie sont connus pour avoir une forte activité de glucuronoconjugaison envers le 1-naphtol, les benzépines, l'apomorphine et l'halopéridol (Tedford *et al.*, 1991). Une seule isoforme, l'UGT1A6, a été récemment détectée dans des microsomes de cerveau, dans des cultures d'astrocytes et dans des homogénats de neurones. Cette isoforme métabolise préférentiellement les phénols plans comme le 1-naphtol. L'activité de glucuronoconjugaison de l'apomorphine n'est pas détectée dans les microsomes de cortex cérébral, de mésencéphale, de BO, d'astrocytes, ni dans les homogénats de plexus choroïdes, d'hippocampe, d'hypophyse, de pie mère, de dure mère, ou de capillaires cérébraux, même quand les microsomes ou les homogénats sont activés avec du triton X-100. L'absence de conjugaison de l'apomorphine dans les préparation de CNS et dans les cellules V79 exprimant l'UGT1A6, et la forte différence de conjugaison entre l'apomorphine et le 1-naphtol suggère que l'isoforme principalement responsable de la conjugaison de l'apomorphine ne soit pas l'UGT1A6.

L'isoforme hépatique UGT2B1, inductible par le phénobarbital, conjugue la morphine et les acides carboxyliques dont les AINS et les acides gras. Les cellules V79 transfectées avec le gène de l'UGT2B1 conjuguent l'apomorphine, mais à un taux plus faible que le 4-

hydroxybiphényle. Un seul glucuronide d'apomorphine correspondant au premier pic sur le chromatogramme d'HPLC est formé par l'isoforme UGT2B1, suggérant que d'autres UGT hépatiques soient impliquées dans la formation du deuxième glucuronide.

Dans le foie, l'apomorphine est métabolisée par *O*-glucuronidation, *O*-méthylation, et *O*-sulfatation (Di Chiara *et al.*, 1978 ; van der Geest *et al.*, 1997). Beaucoup de techniques d'HPLC pour détecter l'apomorphine, utilisant les UV, la fluorescence ou la détection électrochimique ont été décrites. Ces techniques permettent une quantification indirecte des glucuronides d'apomorphine. En effet, la quantité de glucuronides synthétisés est obtenue par soustraction de la quantité d'apomorphine libre à la quantité totale d'apomorphine après incubation avec les β -glucuronidases, les glucuronides d'apomorphine n'étant pas disponibles dans le commerce pour réaliser une gamme étalon (van de Geest *et al.*, 1997). Dans ce cas, la quantité totale de glucuronides d'apomorphine formés est mesurée. Cette méthode ne permet pas de détecter la formation éventuelle d'isomères ou de glucuronides. Dans notre étude, deux glucuronides d'apomorphine ont été identifiés, après action des β -glucuronidases, par HPLC avec un détecteur UV-visible, et par spectrométrie de masse. Les deux glucuronides d'apomorphine synthétisés dans les microsomes de foie de rat présentent la même masse moléculaire, confirmant que se sont des monoglucuronides. Chez le lapin, une étude avait déjà montré que les produits métaboliques majeurs de l'apomorphine isolés à partir d'urine sont deux monoglucuronides (Kaul *et al.*, 1961). Les considérations stériques suggèrent que le glucuronide majoritairement formé soit le 3-*O*-glucuronide, la position 3 étant moins encombrée que la position 4.

La glucuronoconjugaison d'autres catéchols a été testée dans les microsomes de foie. Ils sont tous glucuronoconjugués, le 4-nitrocatéchol étant le meilleur substrat. L'activité de glucuronoconjugaison du 1-naphtol est environ 3 fois plus forte que celle du 4-nitrocatéchol dans les microsomes de foie, et 2,5 fois plus forte dans les microsomes activés de cortex cérébral. Seul le 4-nitrocatéchol est efficacement conjugué dans les microsomes de cerveau, alors que des traces de glucuronides de catéchol et de 4-hydroxyestradiol ont été détectées. Ce résultat est en accord avec le fait que le cerveau, par la présence de l'UGT1A6, conjugue principalement les phénols plans.

Wang *et al.* (1983) ont trouvé des glucuronides de dopamine, un important neurotransmetteur de plusieurs régions cérébrales, dans le LCR de rats, et concluent que la glucuronoconjugaison constituait une voie métabolique importante pour la dopamine endogène d'origine centrale. Nous ne pouvant pas partager cette opinion car, dans nos

conditions expérimentales, la dopamine n'est pas glucuronoconjuguée par les microsomes de cerveau.

La noradrénaline et l'adrénaline, deux autres neurotransmetteurs, ne sont pas significativement conjugués par les microsomes d'astrocytes. La dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline ne semblent donc pas être les substrats endogènes de l'UGT1A6. Comme le montrent les résultats de la publication 4, le 4-nitrocatéchol est fortement glucuronoconjugué, de façon significativement plus importante que le 1-naphtol, l'un des substrats préférentiels de l'UGT1A6. L'activité de glucuronoconjugaison de la 8-hydroxyquinoline est également supérieure à celle du 1-naphtol. Cette vitesse de réaction, au moins trois fois supérieure, peut provenir d'une meilleure affinité du 4-nitrocatéchol ou de la 8-hydroxyquinoline envers l'UGT1A6 ou envers d'autres isoformes d'UGT présentes dans les microsomes d'astrocytes.

Le pyrogallol est, quant à lui, moyennement conjugué par les UGT astrocytaires et est métabolisé en deux glucuronides ayant des vitesses de formation différentes. Le métabolite le plus polaire est préférentiellement produit, à une vitesse cinq fois supérieure à celle de l'autre glucuronide. Ceci peut être dû soit à la présence de deux isoformes différentes soit à un encombrement stérique différent en fonction du groupement hydroxyle présenté à l'enzyme. En effet, le pyrogallol possède trois groupements hydroxyles dont l'un pourrait être plus accessible pour l'enzyme et serait donc conjugué plus rapidement.

Nous avons trouvé que l'apomorphine est glucuronoconjuguée par les microsomes d'astrocytes, contrairement aux résultats décrits dans la publication 4. Cette différence s'explique par des conditions expérimentales différentes. Dans la publication 4, seul l'UDPGA radiomarqué est utilisé dans le milieu réactionnel alors que pour l'autre expérience, une dilution isotopique, qui augmente la concentration réelle du co-substrat est utilisée pour la mesure. Les conditions réactionnelles sont donc plus favorables à la formation de glucuronides. D'autre part, dans les deux types d'expériences, deux souches de rats différentes, Sprague-Dawley et Wistar, ont été utilisées. Il existe peut-être une différence d'expression des isoformes d'UGT dans ces deux souches qui pourraient expliquer la différence de résultats. La glucuronoconjugaison de l'apomorphine dans les astrocytes implique l'expression d'une autre isoforme, différente de l'isoforme UGT1A6, puisque celle-ci ne métabolise pas ce substrat (publication 4).

La L-dopa, également utilisée pour traiter la maladie de Parkinson, n'est pas glucuronoconjuguée dans les astrocytes. Les autres catéchols, 4-hydroxyestradiol et 2-hydroxyestrone sont faiblement conjugués. L'entacapone, la nitécapone et la tolcapone qui sont des inhibiteurs de COMT sont faiblement conjugués par les UGT astrocytaires. La

conjugaison de la plupart des catéchols testés peut s'expliquer par la présence de l'isoforme UGT1A6 dans les microsomes d'astrocytes.

La glucuronoconjugaison du 4-nitrocatéchol et de l'apomorphine a également été testée dans des homogénats de MO, de BO et de cerveau. Dans la MO, le 4-nitrocatéchol est moins bien glucuronoconjugué que le 1-naphtol contrairement à ce qui est observé dans les BO et le cerveau. L'activité observée montre en fait l'activité de l'ensemble des isoformes présentes dans les tissus étudiés. Il peut exister, dans la MO, une isoforme qui conjugue le 1-naphtol et pas le 4-nitrocatéchol, isoforme qui ne serait pas exprimée dans les autres tissus. Une autre hypothèse serait que l'UGT2A1 a plus d'affinité pour le 1-naphtol que pour le 4-nitrocatéchol et comme cette isoforme semble majoritairement exprimée dans la MO, l'activité globale observée relate l'activité de cette isoforme. Dans les BO et le cerveau, une isoforme ne prédominerait pas par rapport aux autres, donc le métabolisme par une isoforme particulière ne masque pas l'activité des autres isoformes présentes. L'apomorphine est moyennement conjuguée dans la MO, mais très peu dans les BO et le cerveau. Dans la MO, des isoformes peu ou non exprimées dans les autres tissus et qui conjuguent l'apomorphine doivent exister. La présence de l'isoforme UGT2B1 a été identifiée, par RT-PCR semi-quantitative, dans la MO (communication personnelle de J.M. Heydel). Cette isoforme conjugue les acides carboxyliques, la morphine et l'apomorphine. Le 4-nitrocatéchol et l'apomorphine ont néanmoins le même profil de glucuronoconjugaison que les molécules odorantes aux différents âges suggérant que ce soient les mêmes enzymes qui les métabolisent.

4. GLUCURONOCONJUGAISON D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS

Dans cette partie, nous avons étudié le métabolisme cérébral de molécules médicamenteuses qui passent la BHE. Les AINS sont principalement métabolisés par glucuronoconjugaison et de plusieurs études montrent qu'ils peuvent pénétrer dans le LCR et le SNC par passage de la BHE (Netter *et al.*, 1985). Le naproxène et le paracétamol sont conjugués en partie par l'isoforme UGT1A6 exprimée dans le foie et dans le cerveau ainsi que dans les astrocytes en culture primaire (Suleman *et al.*, 1998). Le kétoprofène est fortement conjugué par les microsomes d'astrocytes par rapport au naproxène et à l'ibuprofène. Les éventuels glucuronides d'aspirine et de paracétamol ne sont pas détectables par

chromatographie sur couche mince. Ces deux AINS ne sont donc que faiblement ou pas conjugués par les microsomes d'astrocytes. Malgré le passage de ces cinq AINS dans le cerveau après administration périphérique, tous ne semblent pas être métabolisés par les UGT astrocytaires.

Ceci suggère que ces molécules, ainsi que l'aspirine et le paracétamol, sont certainement conjuguées par d'autres systèmes enzymatiques que les UGT comme les COMT, les SULT, les GST et les méthyltransférases (Leininger-Muller et coll., 1994). Ces différents systèmes enzymatiques ainsi que la glucuronoconjugaison participent à la protection métabolique du cerveau. La glucuronoconjugaison constitue, néanmoins, le mécanisme principal de conjugaison (Mulder *et al.*, 1992 ; Leininger-Muller *et al.*, 1994).

Comme le kétoprofène, le naproxène et l'ibuprofène sont conjugués dans les microsomes d'astrocytes, nous avons cherché s'ils étaient aussi conjugués dans les homogénats de MO, de BO et de cerveau, les UGT astrocytaires en particulier l'UGT1A6 étant exprimés dans ces tissus. Ces trois AINS ainsi que l'étodolac sont glucuronoconjugués dans la MO et, à un taux beaucoup plus faible dans les BO. L'activité de conjugaison de l'étodolac est supérieure à celle du kétoprofène dans les BO alors que son activité a un taux similaire au kétoprofène dans la MO. Par contre aucune activité n'est détectée dans les homogénats de cerveau. Ce résultat n'est pas surprenant, puisque l'activité est très faible dans les microsomes d'astrocytes qui constituent une forme partiellement purifiée d'enzymes. Les UGT se trouvant dans les homogénats sont plus diluées que dans les microsomes. De plus, les astrocytes ont une activité de glucuronoconjugaison plus forte que le cerveau total, certainement parce que les autres cellules du cerveau expriment moins ou pas d'UGT. Le même profil d'activité de glucuronoconjugaison est observé pour les AINS et les molécules odorantes.

Le resvératrol, anti-inflammatoire et inhibiteur de l'expression du gène *cox2*, est glucuronoconjugué dans la MO (communication personnelle de N. Sabolovic). Ce substrat et les AINS étant métabolisés par les UGT présentes dans la MO et les BO, nous avons recherché la présence des enzymes cibles de ces anti-inflammatoires c'est-à-dire COX-1 et/ou COX-2. Par immunohistochimie, nous avons montré que COX-2 est fortement exprimée dans les deux tissus à l'état basal. Par contre, le nombre de cellules marquées pour COX-1 est plus faible que pour COX-2. De plus, comme dans le cerveau, si COX-2 est exprimée constitutivement dans la MO et les BO, elle peut certainement y être induite lors d'une toxicité ou inflammation de la MO provoquées par les produits chimiques de l'environnement.

Le travail que nous avons réalisé montre donc que les UGT présentes dans les microsomes d'astrocytes en culture primaire conjuguent la majorité des catéchols et AINS testés. Leur administration par voie nasale doit se limiter à un traitement local, les glucuronoconjugés d'AINS étant réactifs, car capable de se lier de façon covalente aux protéines (Terrier et al., 1999). Ce modèle d'étude in vitro semble donc être approprié pour les études de glucuronoconjugaison dans le cerveau. Il pourrait permettre d'avoir une première approche sur le métabolisme de médicaments pouvant traverser la BHE.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il nous a paru important d'étudier le métabolisme des UGT dans la MO parce que le voie nasale est une voie d'administration des médicaments. Cette voie est très étudiée actuellement, car elle représente une alternative aux autres modes de délivrance classique (administration orale, parentérale...). L'administration de médicaments par la voie nasale a plusieurs intérêts. Cette voie est non invasive, aisée pour l'administration de médicaments notamment chez les enfants, les adultes handicapés ou les personnes âgées, et enfin, n'induit pas de risque d'infection.

Nous avons détecté une activité de glucuronoconjugaison du 1-naphtol dans les homogénats de MO de rats de 3 mois supérieure à celle trouvée dans les homogénats de foie. Les UGT hépatiques assurant une protection contre les molécules étrangères, il est donc probable que les UGT olfactives participent également à la détoxification de l'organisme en particulier celle des voies respiratoires et du SNC. En effet, la MO est une voie d'entrée directe des xénobiotiques dans le cerveau. Elle est également la première protection des voies respiratoires contre les polluants atmosphériques et autres molécules étrangères potentiellement toxiques. Dans les BO et le cerveau, l'activité de glucuronoconjugaison est plus faible que dans la MO. Les UGT présentes dans le cerveau et les BO peuvent intervenir dans la protection du SNC et des BO contre les xénobiotiques mais n'auraient aucun rôle dans l'olfaction. Il semble donc que les UGT présentes dans les BO, le SNC mais surtout dans la MO aient un rôle de barrière métabolique contre l'entrée de molécules étrangères dans l'organisme, limité cependant aux molécules qui peuvent atteindre l'espace intracellulaire. La protection ne s'explique pas aux molécules capables de rejoindre le LCR après diffusion par voie paracellulaire. Mais, la voie olfactive étant une voie d'entrée directe des xénobiotiques dans le cerveau, l'importance de cette barrière doit être précisée et approfondie. Enfin, l'entrée de xénobiotiques, en particulier de médicaments, par la voie nasale et leur métabolisme peut entraîner un risque de toxicité. Une étude approfondie de ce risque semble indispensable.

Les UGT présentes dans la MO ont une forte activité envers les molécules odorantes, ce qui laisse supposer qu'elles ont un rôle important dans l'olfaction. Cette hypothèse est confortée par d'autres résultats. En effet, la plupart des molécules odorantes testées sont glucuronoconjuguées. De plus, il semblerait qu'une forte conjugaison des molécules odorantes soit corrélée à une diminution d'amplitude des réponses positives enregistrées dans les cellules mitrales quand un rat est soumis à une odeur particulière. Les UGT pourraient transformer les molécules odorantes pour qu'elles ne stimulent plus les récepteurs, et ainsi interviendraient dans l'arrêt du signal olfactif. Elles pourraient également prévenir la

saturation des récepteurs olfactifs et réguler la concentration des molécules qui pénètrent par la voie nasale. Dans la MO et les BO, la présence des isoformes UGT2A1 et 1A6 ont été démontrées par RT-PCR quantitative. Il serait intéressant d'étudier la part de chacune de ces isoformes dans la conjugaison des molécules odorantes. Pour cela, des cellules ou des levures devront être transfectées avec le gène de l'UGT2A1 de rat. Nous possédons déjà des cellules V79 transfectées avec le gène de l'isoforme l'UGT1A6. Une étude structure-fonction de l'UGT2A1 pourrait être envisagée. Les transcrits de l'UGT2A1 ont été localisés dans les cellules sustentaculaires, les glandes de Bowman et les neurones sensoriels olfactifs. Dans les BO, les ARNm de l'isoforme UGT2A1 sont présents dans les neurones. L'expression des ARNm de l'UGT2A1 n'a pas été détectée dans aucun autre organe. Cette isoforme devrait donc jouer un rôle spécifique dans l'olfaction.

Les catéchols testés sont tous glucuronoconjugués dans le foie. L'apomorphine est conjuguée par l'isoforme UGT2B1 mais pas par l'UGT1A6. Dans le foie, elle est métabolisée en deux monoglucuronides. Dans les microsomes d'astrocytes en culture primaire, l'apomorphine est faiblement conjuguée. Une autre isoforme encore non identifiée, certainement l'UGT2B1, doit être exprimée dans ces microsomes puisque l'UGT1A6 ne conjugue pas ce substrat. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour préciser ce point.

Nous avons montré que les cellules C6, utilisées dans de nombreuses études, ne conviennent pas à l'étude de la glucuronoconjugaison cérébrale, l'UGT1A6 étant quasiment inexistante dans ces cellules. Par contre, les astrocytes en culture primaire expriment cette isoforme. Les UGT astrocytaires conjuguent de nombreux catéchols, en raison de la présence de l'UGT1A6. Par contre, la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline ne semblent pas être des substrats endogènes de cette isoforme puisqu'ils ne sont pas conjugués par les microsomes d'astrocytes.

Nous avons également testé la glucuronoconjugaison de molécules qui passent la BHE et qui peuvent altérer l'olfaction, les AINS. Ces molécules sont conjuguées dans les microsomes d'astrocyte, les homogénats de MO et à un taux plus faible dans les homogénats de BO. Il serait intéressant d'étudier le rôle d'un état inflammatoire sur les modifications d'expression des UGT présentes dans la MO

Un même profil dans les activités de glucuronoconjugaison est observé dans la MO, les BO et le cerveau pour les différentes catégories de molécules testées (molécules odorantes, catéchols et AINS) et ceci pour les différents âges. Il semble donc que les UGT soient régulées d'une manière différente selon le tissu. La glucuronoconjugaison de plusieurs familles de molécules

renforce l'hypothèse que les UGT participent à une barrière métabolique dans ces différents tissus. Cette hypothèse est développée et discutée dans la publication 6.

Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier.
--

MINN A., LECLERC S., HEYDEL J.M., MINN A.L., DENIZOT C., M. CATTARELLI, NETTER P., GRADINARU D.

The Journal of Drug Targeting, 2002, *sous presse*.

Le transport de médicaments et d'autres xénobiotiques dans le SNC dépend des propriétés spécifiques des vaisseaux cérébraux formant la BHE et des plexus choroïdes formant la barrière sang-LCR. Il dépend également des propriétés physicochimiques de ces substances, lesquelles sont susceptibles d'être métabolisées durant leur transport en métabolites pharmacologiquement inactifs. Enfin, l'entrée de médicaments peut être empêchée par des systèmes de transport actif qui catalysent un transport ATP-dépendant de nombreux médicaments et xénobiotiques à l'extérieur du SNC. Cependant, la voie nasale est souvent utilisée pour l'administration systémique de médicaments. Cette voie permet aussi le passage de nombreuses molécules directement dans le SNC. Cette revue résume les récentes connaissances sur les facteurs contrôlant cette voie, en particulier le métabolisme de xénobiotiques de l'environnement et de médicaments dans la muqueuse olfactive, les bulbes olfactifs et le cerveau, qui pourraient constituer une barrière métabolique, ainsi qu'une source potentielle de toxicité.

Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier.

Alain MINN^{*,1}, Séverine LECLERC¹, Jean-Marie HEYDEL², Anne-Laure MINN²,
Claire DENIZOT³, Martine CATTARELLI⁴, Patrick NETTER¹, and Daniela GRADINARU²

¹ : Laboratoire de Pharmacologie, UMR N° 7561 CNRS-Université Henri-Poincaré-Nancy 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France;

² : Groupe de Biochimie-Pharmacologie-Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Dijon, France;

³ : Institut de Recherche Servier, 25/27 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France ;

⁴ : Centre Européen des Sciences du Goût, FRE CNRS N° 149, Dijon, France.

*: corresponding author. Address: Laboratoire de Pharmacologie, UMR N° 7561 CNRS-Université Henri-Poincaré-Nancy 1, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Tel : (33) 383 592 753 – Fax: (33) 383 592 621 – E-mail : minn@medecine.uhp-nancy.fr

Number of pages: 26

Number of figures: 1

Number of tables: 1

Key words: blood-brain barrier, drug transport, olfactory mucosa; olfactory bulb; drug metabolism.

Abstract:

It is generally accepted that the rate of entry into and distribution of drugs and other xenobiotics within the central nervous system (CNS) depends on the particular anatomy of the brain microvessels forming the blood-brain barrier, and of the choroid plexus forming the blood-cerebrospinal fluid barrier, which possess tight junctions preventing the passage of most polar substances. Drug entry to the CNS also depends on the physicochemical properties of the substances, which can be metabolised during this transport to pharmacologically inactive, non-penetrating polar products. Finally, the entry of drugs may be prevented by multiple complex specialized carriers, which are able to catalyse the active transport of numerous drugs and xenobiotics out of the CNS. Nasal delivery is currently considered as an efficient tool for systemic administration of drugs that are poorly absorbed via the oral route, and increasing evidence suggests that numerous drugs and potentially toxic xenobiotics can reach the CNS by this route. This short review summarizes recent knowledge on factors controlling the nasal pathway, focusing on drug metabolising enzymes in olfactory mucosa, olfactory bulb and brain, which should constitute a CNS metabolic barrier.

Abbreviations: BBB, blood-brain barrier; CNS, central nervous system; CSF, cerebro-spinal fluid; CYP, cytochrome P450; EH, epoxide hydrolase; GST, glutathione S-transferase; MRP, multidrug resistance-associated protein; OAT, organic anion transporters; Pgp, P-glycoprotein; ST, sulfotransferase, UGT, UDP-glucuronosyltransferase; VMAT, vesicular monoamine transporter.

1. Introduction

Delivery of drugs to the central nervous system (CNS) remains a challenge, despite impressive advances during the last decade in our understanding of the mechanisms involved in the maintenance of brain homeostasis. The brain functions correctly only within a precisely controlled and specific environment. The mechanisms that control this stable environment result from the particular properties of the interfaces that allow exchanges of substances between the brain and the blood. As a consequence, specific and efficient barriers prevent the influx of numerous xenobiotics at brain interfaces.

Drugs must be administered for the therapy of a wide range of neurological diseases or disorders, which impact on CNS regions responsible for memory, cognition, language and voluntary movements. Disorders associated with CNS dysfunction include neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, epilepsy, psychiatric disorders, stroke-promoted anoxia, pain and cancer. Drugs are generally administered by oral or parenteral routes, which allow their passage into the blood of the general circulation. However, the ability to deliver these active molecules systematically is hampered by possible hepatic first-pass metabolism or by gastro-intestinal metabolism prior to reaching the CNS. A second difficulty appears at the blood-brain barrier (BBB), which constitutes the main interface between blood and brain. A complex multidrug resistance system prevents the influx of numerous drugs, due to liposolubility, molecular size, and the substrate properties for numerous drug metabolism enzymatic systems and ATP-dependent efflux transport systems (El-Bachá & Minn, 1999; Minn et al., 2000) (Table 1). Furthermore, numerous recent data provide evidence that the choroid plexus, which is the main interface between the blood and the cerebro-spinal fluid (CSF), also possesses efficient physical and metabolic barriers, and also displays efficient multidrug resistance-associated protein (MRP) and organic anion transporter (OAT)-dependent transport systems that prevent the entry into the CSF of numerous drugs present in the circulating blood (Gao et al., 1999; Ghersi-Egea & Strazielle, 2001). As most drugs produce their pharmacological effect in a concentration-dependent manner, it is often not possible to reach and maintain a suitable therapeutic concentration for a sufficient time to achieve the therapeutic effect. Moreover, as the steady-state concentration of a drug results from equilibrium between its rate of influx and its rate of efflux, the brain interface properties result in a poor delivery to the brain, or a rapid elimination, thus reducing or suppressing the therapeutic potential of the drug.

Drug administration by the nasal pathway is currently considered as a particular systemic delivery method, allowing either administration of drugs that are poorly absorbed by the oral route, or for the local therapy of nasal-pharyngeal sphere diseases (Marttin et al., 1998). The nasal epithelium displays a relatively high permeability to drugs (McMartin et al., 1987), due to the presence of a dense blood vessel network. The advantages of this route of administration are also a rapid absorption and onset of the pharmacological response, avoidance of hepatic first-pass metabolism, high systemic availability and an easy administration route suitable for self-medication (Hussain, 1998; Li et al., 2000). For vaccines, nasal administration also offers an attractive alternative allowing the use of smaller doses and to deliver the formulation directly to nose-associated lymphoid tissues (Illum & Davis, 2001). Therefore, nasal administration is an attractive route, also allowing an easy and non-invasive delivery of drugs to old people or children.

Curiously, scientists working on systemic drug delivery by the nasal route generally pay little attention to the eventual entry of the drug into the brain, even after nasal administration of drugs devoted to CNS pathology such as dihydroergotamine for migraine therapy (Marttin et al., 1997) or anticonvulsants for the treatment of status epilepticus (Schols-Hendricks et al., 1995; Li et al., 2000). Numerous recent reviews on drug transport into the mammalian CNS only consider drug transport through the blood-brain barrier (BBB) or through the blood-cerebrospinal fluid barrier (see for example Habgood et al., 2000; Saunders et al., 1999; Spector, 2000; Ghersi-Egea & Strazielle, 2001). In the same way, the use of cocaine hydrochloride for local anaesthesia of the nasal and laryngeal cavities has been reported (Dyke et al., 1977; Behl et al., 1998), and the resulting plasma concentration of cocaine described, but no data concerning the resulting cerebral concentration were given in these reports. However, everyone is aware of the immediate psychotropic effects of cocaine intake by the nasal pathway, which is the most frequently used administration route by cocaine addicts. Recent evidence has been presented that a proportion of nasally administered cocaine is transported directly to the brain, as at 1 min after administration, the olfactory bulb-to-plasma cocaine concentration ratios are three times those obtained after iv administration (Chow et al., 1999). Several studies indicate that hydrophilic or relatively large molecules such as proteins (Shipley, 1985; Pardridge, 1991; Thorne et al., 1995), viruses (Tomlinson & Esiri, 1983) or dextrans with a molecular weight up to 20 KDa (Sakane et al., 1995) can be directly transported from the nasal cavity to the CSF using neuronal anterograde and retrograde transport, and that the transport of large molecules to the CSF is dependent on their

molecular weights (for recent reviews, see Mathison et al., 1998; Illum, 2000). Convincing evidence has been also presented that some heavy metals like manganese and cadmium can directly enter the brain by the nasal pathway, promoting delayed, but severe neurotoxicity and neurodegeneration (Perl & Good, 1987; Hastings & Evans, 1991; Sunderman, 2001).

Thus a drug administered by the nasal route may enter either into the blood of the general circulation, or into the brain, or in many cases into both, but many of the factors controlling the passage through each of these pathways remain unclear (Fig. 1). Therefore, in the present short review, we will summarize the recent knowledge of factors controlling the cerebral influx of chemicals through the nasal pathway, focusing on drug metabolising enzymes in the olfactory mucosa, olfactory bulb and the brain itself, which should constitute a CNS metabolic barrier.

2. Physical factors controlling the nasal entry of drugs into the brain

Mucus: the mammalian nasal cavity is lined with three types of epithelia: squamous, respiratory and olfactory. A mucus layer secreted by Bowman's gland and both epithelial and specialized goblet cells covers these epithelia. Mucus consists of a ~95% water solution of serum proteins, glycoproteins, lipids and electrolytes. Its secretion rate, composition, fluidity, viscosity and pH can rapidly change with inflammation, disease state, and exposure to chemicals, resulting in an alteration of the ability to perceive odorants. Thus airborne hydrophobic odorants have to cross the aqueous layer of mucus covering the olfactory epithelium before reaching the olfactory receptors, a mechanism which reflects the evolutionary origin of this system in a marine environment. The absorption of drugs from the nasal mucosa will hence depend on the time of contact and on the solubility of the drug in the mucus, and also on the rate of nasal mucus clearance. However, in a study of the transport of a series of sulfonamides into the CSF after either i.v. or intranasal administration, Sakane et al. (1991) showed that the nasal transport promotes higher drug concentrations in the CSF in comparison with those after i.v. administration, and that drug concentration in the CSF increased with the lipophilicity of the drugs, as measured by their partition coefficient between isoamyl alcohol and phosphate buffer, pH 7.4.

Nasal mucus clearance also allows the removal of foreign substances, odorants and fine particulate matter brought by the inspired air from the nasal cavity (Marttin et al., 1998). The mean half time of clearance is about 20 min in humans (Gizurason, 1990), but mucus

clearance may be altered by the drug administered, or by other components of the drug formulation such as macromolecular components that increase mucus viscosity, or by absorption enhancers (bile salts, detergents). However, even though the first step of drug absorption by the nasal pathways involves the passage through an aqueous phase, representing an advantage for polar drugs, experimental evidence shows that lipophilic molecules rapidly enter both CSF and blood stream after nasal administration (Sakane et al., 1991).

- *Odorant binding proteins*: for a substance to have an odour, it must be volatile and a sufficient number of molecules must reach the olfactory receptors which are covered with a mucus layer (Max, 1992). While polar odorants¹ or drugs can readily dissolve in the aqueous mucus, this is not the case for most small, hydrophobic odorants (Paysan & Breer, 2001). Odorant-binding proteins (OBP), a sub-class of the lipocalin superfamily, are considered to fulfil this transport role (Tegoni et al., 2000). OBP bind and solubilise hydrophobic molecules, increasing their local concentration thus increasing the sensitivity of the olfactory process (for a recent review, see Tegoni et al., 2000). Several other functions have been suggested for these proteins. They may remove the odorants after message transduction, i.e. after interaction of the molecule with an olfactory receptor on the surface of the olfactory neuron dendrite, allowing an efficient control of the quality, intensity and discrimination of the olfactory message produced. When these proteins are present at high concentration, they probably have a scavenger function in binding excess of odorant molecules to prevent saturation of the olfactory receptors (Burchell, 1991). Moreover, as OBP bind with high affinity terpenes, aldehydes, and aromatic hydrocarbons that are potentially cytotoxic and carcinogenic (Pevsner et al., 1990), they can protect the nasal mucosa from chemical and oxidative injuries. Finally, a functional role in the transport of odorants to the cellular endoplasmic reticulum for biotransformation by drug metabolising enzymes and efficient signal termination has been suggested (Burchell, 1991).

- *Nasal cavity epithelia*: the main part of the nasal cavity is covered by a typical airway epithelium, formed by epithelial cells possessing motile cilia, which are appendages extending from their surface, but the anterior part of the nasal cavity is covered by a non-ciliated respiratory epithelium. The olfactory epithelium containing ciliated nerve endings is found in the posterior part of the nasal cavity, whereas the respiratory epithelium is the major lining of

¹ Odorants do not represent a well-defined class of molecule, as virtually all volatile lipophilic chemicals having a molecular weight lower than 400 Da can be recognized as odorants by olfactory receptors, independently of their chemical structure and properties.

the nasal cavity. For a detailed description of the structure of these epithelia, please see Holley & McLeod (1977); Sarkar (1992); Morrison & Moran (1995); or Illum (2000).

- The respiratory epithelium is a pseudostratified, columnar epithelium with an abundance of secretory cells lying on a basement membrane. It consists of three major cell types: basal cells, columnar cells covered by microvilli and either ciliated or not, and secretory goblet cells. It is considered the main site for drug absorption into the systemic circulation (Illum, 2000). Intranasally delivered drugs show a rapid rise to peak blood concentrations (Schipper et al., 1991), due to a high permeability of the nasal epithelia for relatively large molecules (McMartin et al., 1987; Fisher et al., 1992; Huang & Donovan, 1998) and to the presence of an important microvasculature. As relatively large, water-soluble peptides possess a significant nasal bioavailability, it has been suggested that the transepithelial pathway for these peptides is paracellular, i.e. through intercellular junctional zones (Bagger et al., 2001).

Absorption enhancers are frequently used to obtain a higher bioavailability of a drug with limited nasal absorption. However, the chronic use of these preparations may promote epithelial damage: bile salts enhance nasal permeability by removing the epithelial cells, which constitute the major permeability barrier, rather than causing a biochemical or physiological modification of these cells (Hersey & Jackson, 1987). On the other hand, some disturbances of smell, such as a decreased smell threshold (hyposmia), smell distortion or complete loss of smell sensation (anosmia) may appear as secondary effects of nasal drug application (Henkin, 1994; Norès et al., 2000), possibly reflecting local toxicity resulting from xenobiotic metabolism (Reed, 1993).

- the olfactory epithelium has a pseudostratified, columnar structure, and also contains three main cell types: bipolar olfactory neurons with a bulbous, ciliated dendrite covered by olfactory receptors that project above the epithelial surface and an axon that connects to neurons in the olfactory bulb, sustentacular cells that have microvilli on their apical surface and ensheath the olfactory neurons, and basal cells (Lewis & Dahl, 1995). Basal cells are stem cells for the olfactory neurons that undergo spontaneous apoptosis, involving a renewal every 3-4 weeks (Graziadei & Monti-Graziadei, 1985; Farbman et al., 1999). The underlying lamina propria contains mucus-secreting Bowman's glands and olfactory nerve fascicles that converge on ipsilateral mitral or tufted cells in the olfactory bulb. Mitral or tufted cells possess axons that project to the amygdala, the prepyriform cortex, the entorhinal cortex, the hippocampus and the thalamus (Jones, 2001). Therefore, olfactory neurons represent a

functional connection between the limbic and paralimbic brain and the environment, as translocation of substances from the mucosa to the olfactory bulb along olfactory neurons, including metals, lectins, amino acids, catecholamines, alkaloids, toxins, and viruses, has been widely demonstrated (Margolis, 1974; Tomlinson & Esiri, 1983; Hastings & Evans, 1991; Baker, 1995; Brittebo & Eriksson, 1995; Larsson & Tjalve, 2000; Dahlin et al., 2001; Klocker et al., 2001). However, the transneuronal pathway only allows a slow access to the brain, as molecules or metals reach the brain between 24h and 7 days after administration into the nasal cavity (Hastings & Evans, 1991; Tjalves & Henriksson, 1999; Brenneman et al., 2000; van Ginkel et al., 2000), thus does not explain the rapid appearance of some drugs such as cocaine (Chow et al., 1999) in the CSF and brain.

- *Cerebrospinal fluid:* CSF is secreted at the four choroid plexi, located in the lateral and third and fourth ventricles. Once formed, it leaves the ventricle via the foramina of Magendie and perfuses the brain in a rostral to caudal direction. CSF is an isotonic aqueous solution containing less than 0.5 % protein, while the concentrations of the major solutes are practically identical to those found in the plasma, excepted for K^+ and Ca^{2+} (Wright, 1978). However, its composition may subsequently change as a result of transport processes occurring at all the membranes exposed to the CSF. After nasal administration, some substances, such as amino acids, dyes, drugs, and solvents are rapidly transported into the olfactory bulb, without evidence of transneuronal transport (Baker, 1995). Unfortunately, no studies of the exact mechanism of transport are presently available. Paracellular passage, followed by transport through the olfactory perineural space, that may be continuous with a subarachnoid extension that surrounds the olfactory nerve as it penetrates the cribriform plate, has been suggested (Jackson et al., 1985). Indeed, drainage of the CSF has been reported from the cisterna magna to the olfactory bulb and through the cribriform plate into the nasal cavities (Gomez et al., 1985; Brinker et al., 1997). By contrast, Lowhagen et al. (1994) demonstrated CSF drainage from the nasal cavity to the olfactory bulb. Therefore, substances may also enter the brain after paracellular passage by flushing with the CSF re-entering again into the brain extracellular space at the cribriform plate.

3. Metabolic factors controlling the nasal entry of drugs into the brain

More or less precise dosages of drugs may be administered into the nasal cavity by instillation, spraying, powder application, emulsions, and liposomes or microsphere

formulations (Behl et al., 1998). Therefore, this pathway of drug administration may result in high local exposure of the nasal mucosa. On the other hand, numerous xenobiotics are present as pollutants in the inspired air as vapours or aerosols, but also as dust or very small particles formed during combustion of organic materials, such as diesel fuel and tobacco (Kleeman et al., 1999). It has been shown that some of these pollutants or drugs can induce nasal lesions or tumours in experimental animals following metabolic activation by drug metabolising enzymes present in the nasal epithelia (Brittebo, 1993; Reed, 1993). The metabolism of drugs, atmospheric pollutants, and other xenobiotics that can reach the nasal cavity results in the grafting of functional groups into their molecules, a process known as phase 1 of drug metabolism, and the subsequent conjugation with highly polar moieties (phase 2). This process results in a decrease in toxicity and pharmacological properties of xenobiotics or drugs, in an increase in their water solubility (Mulder, 1992), in a probable loss of odorant characteristics (Burchell, 1991), and allows the subsequent renal or biliary excretion. Xenobiotic metabolism is a complex process catalysed by a series of specialised enzymes. A higher activity of these enzymes has been previously demonstrated in isolated brain capillaries forming the blood-brain barrier and choroid plexus, as compared to the brain, suggesting their involvement in enzymatic protection at blood-brain interfaces (Minn et al., 1991; Ghersi-Egea et al., 1994; El-Bachá and Minn, 1999; Minn et coll., 2000; Ghersi-Egea and Strazielle, 2001). As some drugs can enter the brain by the nasal pathway, the nasal epithelium also represents a brain/outside interface.

Among phase 1 enzymes, nasal cytochrome P450 (CYP)-dependent substrate biotransformation was demonstrated 20 years ago (Brittebo, 1982; Dahl et al., 1982). CYPs belong to a multigenic family of enzymes displaying broad substrate specificity, and catalysing a NADPH-dependent monooxygenation of lipophilic xenobiotics or endogenous substrates. CYPs may also dealkylate or dehalogenate chemicals. In some cases, this may result in the formation of reactive metabolites such as epoxides that are carcinogenic, or of reactive oxygen species, thus explaining the development of nasal toxicity or carcinogenesis (Reed, 1993). Alternatively, some CYP isoforms and NADPH:cytochrome P450 reductase may catalyse a reductive process possibly accompanied by the formation of oxygen reactive species (Lagrange et al., 1994; Livertoux et al., 1996). Some other phase 1 enzymes promoting nasal toxicity have been described, such as carboxylesterase, which is expressed at high levels in the nasal mucosa, and promotes tumorigenesis by *in situ* hydrolysis of vinyl acetate to acetaldehyde and acetic acid (Kuykendall et al., 1993).

Phase 1 products are generally substrates for phase 2 enzymes. The most important family of conjugating enzymes in mammals are UDP-glucuronosyltransferases (UGT), that catalyse the grafting of a highly water-soluble glucose derivative, UDP-glucuronic acid, to xenobiotics bearing a hydroxyl, *N*-oxide or *S*-oxide group. Other conjugating enzymes include epoxide hydrolases (EH), sulfotransferases (ST) and glutathione *S*-transferases (GST). The inactive, polar xenobiotic conjugates should be cleared from the cell by an active transport process, frequently referred to as phase 3 of drug metabolism.

- *olfactory mucosa*²: this epithelium contains high activity (Bond et al., 1988; Gervasi et al., 1991; Voigt et al., 1993; Brittebo, 1993; Reed, 1993) and expression (Gu et al., 1998; Longo et al., 2000) of a series of CYP isoforms, including ubiquitous isoforms well characterised in the liver such as CYP1A2, 2A and 2B, which metabolise aryl hydrocarbons, 2C, 2E that is the fasting-inducible isoform which metabolises ethanol, and 3A, responsible for the metabolism of numerous drugs. CYP1A1, the isoform inducible by aryl hydrocarbons, is not constitutively expressed, but appears after inducing treatment, suggesting the presence of the Ah receptor in this tissue (Longo et al., 2000). Despite a relatively low enzyme concentration, nasal CYPs display a higher activity than hepatic CYPs in the metabolism of most of the substrates investigated (Reed, 1993). A tissue-specific, highly active isoform, called CYP2G, has also been identified (Lazard et al., 1990; Nef et al., 1990). Accordingly, the metabolism of a wide range of substrates has been shown, as well as numerous toxic responses resulting from the formation of reactive metabolites from polyaromatic hydrocarbons, phenols, semi-quinones and quinones that are present as pollutants in the inspired air (Brittebo, 1993; Reed, 1993). Moreover, the presence and activity in rabbit olfactory epithelium of flavin-containing monooxygenases, that also may produce reactive metabolites, has been demonstrated (Genter et al., 1995).

NADPH-cytochrome P450 reductase is highly active in the olfactory epithelium (Reed et al., 1986; Gervasi et al., 1991). The ratio of NADPH-cytochrome P450 reductase to CYP content is less than 1:10 in the liver, whereas this ration is 1:2 to 1:3 in the olfactory epithelium (Reed et al., 1986), as it is in the brain parenchyma (Gherzi-Egea et al., 1989). As the NADPH-cytochrome P450 reductase-dependent supply of electrons represents the rate-limiting step of CYP oxidoreductase cycle, the higher relative content of NADPH-cytochrome P450 reductase

² As the respiratory mucosa allows systemic administration of drugs, whereas the olfactory mucosa is connected to the CNS, we will only discuss here the metabolic properties of the olfactory mucosa.

allows a more efficient catalytic activity (Sarkar, 1992). Moreover, NADPH-cytochrome P450 reductase activity could be harmful to the nasal mucosa, since it may produce different toxic metabolites during monoelectronic reduction of nitrocompounds, semi-quinones or quinone derivatives that are present in airborne fine particles formed during the combustion of different organic materials, as well as reactive oxygen species (Livertoux et al., 1996).

Bond (Bond, 1983; Bond et al. 1988) first described high EH, UGT, and GST activities in the nasal cavity epithelium, using styrene oxide, umbelliferone that is an odorant substrate, and styrene oxide as substrates, respectively. Most of these activities were very high, similar to those measured in the liver, and in some cases even higher. Both soluble and microsomal EH activities were recorded, but activity for propylene oxide could be determined only in microsomes isolated from the olfactory epithelium (Faller et al., 2001).

The occurrence of six different GST isoenzymes able to metabolise several odorant molecules has been demonstrated in this tissue (Ben-Arie et al., 1993; Banger et al., 1993). As is the case for EH, both soluble and microsomal GST have been described, and the olfactory microsomal GST displays activities that reach the same levels as the hepatic isoform (Banger et al., 1993). The physiological role of olfactory GSTs remains unclear, but it has been suggested that they may have a role in olfaction, by rapid cleaning of odorants to maintain acuity of olfaction (Banger et al., 1996). They also should provide a first line of defence for the brain by limiting axonal transport from the olfactory nerve cells, which are exposed directly to the environment, to the olfactory bulb (Ghantous et al., 1990). The activities of both EH and GST appear to be mainly devoted to the detoxification of reactive metabolites mainly formed by CYP-dependent activities (Ganthous et al., 1990), but also in some cases by UGT and ST.

UGT-related activities toward different substrates have been described in the olfactory mucosa (Bond et al., 1988), and the expression of tissue specific isoforms has been established both in rats (Lazard et al., 1990) and humans (Jedlitschky et al., 1999). The expression of two UGT isoforms, UGT1A6 (Gradinaru et al., 1999; Heydel et al., 2001) and UGT2A1 (Heydel et al., 2001), which was previously identified as a tissue specific isoform, expressed uniquely in the olfactory mucosa (Lazard et al., 1990), has been recently demonstrated using the RT-PCR procedure. The olfactory epithelium displays efficient and age-dependent glucuronidation activities toward a series of chemically unrelated odorants (Leclerc et al., 2001). These activities are of the same order of magnitude as that recorded in the liver suggesting an involvement of the conjugation activities in olfaction and termination of the olfactory signal, but also in the metabolic transformation of odorant molecules to polar

products, that will be extruded from the cells into the mucus by an active process. Moreover, a significant glucuronidation of non steroidal anti-inflammatory drugs like ketoprofen has been observed (Leclerc et al., unpublished results).

Sulfotransferases include enzymes conjugating endogenous chemicals and xenobiotics, phase I metabolites, or some drugs, to a sulphate group from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate (PAPS). At least four cytosolic STs have been identified and characterized from human tissues, which sulfonate steroids and environmental chemicals, and are involved in hormone homeostasis and detoxication (or activation) of chemicals (Falany, 1997). By contrast, STs that are bound to endoplasmic reticulum sulfonate endogenous molecules involved in intracellular communication and signalling, like glycosaminoglycans and glycoproteins. They show a considerable similarity among mammalian species, suggesting that these enzymes constitute a supergene family (Kakuta et al., 1998). Aryl sulfotransferase and estrogen sulfotransferase are shown to belong to a single gene family (ST1) which consists of at least four subfamilies, whereas, based on the sequence similarity, hydroxysteroid sulfotransferases constitute a distinct family (ST2). Exactly as for CYP and UGT, a specific, highly active, ST isoform called mOlfST, as been identified in mouse olfactory epithelium, as its immunopositive localisation is identical with that for odorant receptors (Tamura et al., 1998). Mouse nasal cytosol shows high ST activities toward phenolic aromatic odorants, but low activities for most alcoholic aromatic odorants, suggesting the participation of multiple ST isoforms in the sulfation of odorants by mouse nasal epithelial cells (Matsui et al., 1998). Therefore, the existence of STs active for the phenolic odorants in olfactory mucosa suggests, as has been proposed for UGTs, a role in odorant perception, and in the signal termination process.

- *olfactory bulb*: Mammalian olfactory bulb consists of two anatomically and functional different systems, the main and accessory olfactory bulbs³. The rat main olfactory bulb shows a well-defined, laminated structure containing several distinct neuronal populations (Holley & McLeod, 1977). It is the only nervous structure that displays lifelong neuron turnover, as new interneurons are continuously provided by the subventricular zone and the rostral migratory system (Altman, 1969). This ongoing replenishment of neurons may be necessitated by the

³ Pheromones are specific odorant signatures produced by an animal, which trigger specific genetically programmed behavioural responses related to mating and reproduction or territorial defence, but also maternal and social behaviours in conspecific animals. These chemicals stimulate receptors in the vomeronasal organ, that project via the accessory olfactory bulb, to medial hypothalamic nuclei (for reviews, see Dulac, 2000; Brennan,

fact that the olfactory system is exposed to the external environment and is, therefore, susceptible to damaging air-borne chemicals (Baker, 1995). As a consequence of the possibility of access of drugs or chemicals to the olfactory bulb, which is a part of the CNS, we studied the activity and expression of some of the drug-metabolising enzymes we had previously characterized within the brain.

The olfactory bulb displays CYP activities toward resorufin derivatives, which are higher than in the brain itself (Perrin et al., 1990), suggesting the expression of CYP1A and CYP2B isoforms. Several CYP isoforms are constitutively expressed in the olfactory bulb, for instance, CYP2D1 immunoreactivity and the CYP2D1 mRNA signal were detected (Norris et al., 1996), whereas other isoforms like 2A1 and 2E1, are only detectable after inducing treatment (Warner et al., 1993). The expression of CYP1A1, the aryl hydrocarbon receptor (AHR), and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) has been demonstrated in different brain regions including olfactory bulb using semi quantitative RT-PCR and Western blotting (Huang et al., 2000).

NADPH-cytochrome P450 reductase is also expressed in this structure (Norris et al., 1994) but is not inducible by classical hepatic inducers (Gradinaru, unpublished results). Sulfotransferase activity toward styrene oxide is relatively homogenous in the different regions of the CNS, but the rat olfactory bulb displays a two-fold higher cytosolic GST activity as compared to the cerebral cortex (Suleman, unpublished results). In the same way, a high 1-naphthol conjugation activity was recorded in the olfactory bulb, that was 2-fold higher than that measured in the rat cerebral cortex (Leininger et al., 1991). In accordance with substrate conjugation assays, the expression of the UGT1A6 isoform has been recently demonstrated in the olfactory bulb (Gradinaru et al., 1999; Heydel et al., 2001). Curiously, the expression of the isoform UGT2A1, which was considered as specific for the olfactory mucosa (Lazard et al., 1990), has also been found in the olfactory bulb, using RT-PCR and in-situ hybridisation techniques (Heydel et al., 2001; Leclerc et al., 2001).

- *Brain:*

The activities of drug metabolising enzymes recorded in the brain are generally low as compared to those in the liver or in the nasal mucosa (Minn et al., 1991). However, psychotropic drugs may undergo local cerebral metabolism which could have pharmacological and/or toxicological consequences (Voirol et al., 2000). Moreover,

2001). Pheromones will not be considered here, as they are involved in the protection and survival of animal species, and to our knowledge, not in toxic events endangering one individual.

microsomal and mitochondrial brain CYPs respond only weakly to classical inducers that strongly increase both protein expression and activity in the liver (Gherzi-Egea et al., 1987; Morse et al., 1998). As these enzymes frequently produce reactive metabolites, the low inducibility level could be a protective mechanism against the risk of neurotoxicity resulting from a high CYP activity. Studies on the expression of CYP isoforms in the mammal olfactory bulb were generally carried out regarding this structure as part of the brain (Perrin et al., 1990; Hannsson et al., 1990; Warner et al., 1993), therefore, practically all isoforms described in the olfactory bulb are also expressed within the brain. A series of recent papers and reviews describe the different CYP isoforms expressed in the CNS (Hedlund et al., 1996; Norris et al., 1996; Strobel et al., 1997; Morse et al., 1998; Ravindranath, 1998; Dhawan et al., 1999; Voirol et al., 2000; Rosenbrock et al., 2001).

Concerning phase 2 enzymes, their protective role has already been suggested in a previous review (Leininger-Muller et al., 1994). Expression of the UGT1A6 isoform has been demonstrated in the rat brain (Suleman et al., 1998; Gradinaru et al., 1999). Immunohistochemical evidence of UGT1A6 presence in human brain has also been presented (King et al., 1999). The same authors also showed the presence of UGT2B7 in the human brain. UGT2A1 is not detectable in brain tissue, with the exception of the olfactory bulb (Heydel et al., 2001).

3. Active factors

It is generally accepted that the highly polar conjugates formed during drug metabolism, especially glucuronides, sulfates, and GSH conjugates, cannot leave the cell where they have been formed by diffusion alone, but require active transport. Several transport proteins are responsible for the transfer of this broad spectrum of compounds across the cell membranes. These proteins, which confer multidrug resistance to cells overexpressing them, are the 170 kDa P-glycoprotein (Pgp) and the 190 kDa organic anion/multidrug-resistance associated proteins (MRP) and belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of transporter proteins. These transporters use the energy of ATP hydrolysis to actively transport polar molecules across plasma membranes (for a recent review, see for instance Borst et al., 1999). To our knowledge, only one paper has presented evidence of the presence of MDR1 and MRP1 in the human nasal respiratory mucosa (Wioland et al., 2000). No data are available concerning the expression and the role of MDR-related transporters in the olfactory epithelium. Similarly, no data concerning expression of organic anion transporters (OATs),

that are very active in the choroid plexus and cerebral capillaries (Gao et al., 1999), are presently available.

Very recently, a new vesicular amine transporter 2 (VMAT2) that displays sequence homology with mammalian Pgp has been described in vesicles of monoaminergic neurons (Peter et al., 1995). VMAT2 can detoxify cells by transporting toxins such as MPP⁺ from the cytosol of monoaminergic neurons into vesicles where they remain entrapped until exocytosis (Staal et al., 2001). Nevertheless, the expression of VMAT2 by olfactory epithelium and bulb, and its functional involvement in detoxification of the monoaminergic neurons present in these tissues, remain to be demonstrated.

4. Toxic consequences of nasal drug or chemical application

The mammalian olfactory mucosa displays very high drug metabolising enzyme activities involved in the biotransformation of many xenobiotic compounds. These high activities are probably essential in maintaining an efficient olfactory message coding, and in protecting the underlying brain tissue from environmental chemical insults. However, in some instances, phase 1 and phase 2 drug metabolism results in the formation of reactive intermediates that are capable of covalently binding DNA, RNA and proteins, causing carcinogenic responses. If these high activities trigger the formation of reactive metabolites, specific olfactory tissue damage, loss of olfactory neurons, and mutagenesis may occur. Numerous examples of nasal toxicity resulting from local metabolism of inhaled drugs or environmental xenobiotics have been reviewed (Dahl and Hadley, 1991; Reed, 1993; Brittebo, 1993; Lewis and Dahl, 1995; Genter et al., 1998; Green et al., 2001). In most cases, inhibition of the CYP isoforms involved in bioactivation, or general inhibition of CYP-dependent activities by metyrapone, result in a suppression of this site-dependent toxicity. However, this is not always true, as a consequence of the overlapping activities of several CYP isoforms toward the same substrates. For example, the deletion of the *Cyp1a2* gene in mouse does not suppress acetaminophen toxicity in the olfactory mucosa, due to CYP2E1, CYP2A5 and the olfactory-specific CYP2G1 high activities toward acetaminophen (Genter et al., 1998).

The high activities of CYP expressed in the nasal cavity may also promote toxicity and degeneration of olfactory neurons due to the local metabolism of drugs administered by classical systemic methods. For example, intraperitoneal administration of coumarin, a

fragrant compound used as a food additive and drug for the treatment of some cancers (Marshall et al., 1994), causes some hepatotoxicity, but also tissue-selective depletion of CYP and cytotoxicity in the olfactory mucosa of rat and mouse (Gu et al., 1997). This effect was attributed to the highly expressed CYP isoform metabolising coumarin in the nasal mucosa, and to the presence of high levels of NADPH-cytochrome P450 reductase (Reed et al., 1986). Another example concerns drugs like methimazole, that are used for the treatment of hyperthyroidism in humans, which frequently promotes smell and taste distortions in humans (Henkin, 1994; Norès et al., 2000). Methimazole metabolism by flavin-containing monooxygenases (Genter et al., 1995) and CYP (Bergman & Brittebo, 1999) has been reported to promote covalent binding of the drug to and extensive lesion of the olfactory mucosa as well as an important increase of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of neurotoxic insult, in the olfactory mucosa and bulb after ip administration (Bergman & Brittebo, 1999). The toxic effect to both olfactory mucosa and bulb is completely prevented by metyrapone, an inhibitor of CYP-related activity, suggesting that the toxicity results from a metabolic activation of the compound to a reactive intermediate at this site.

The increase in the use of fossil fuels is responsible for the atmospheric increase of polyaromatic hydrocarbons (PAH) from diesel engine exhaust particles. Numerous solvents produced by chemical plants are also ejected into the environment. PAH are substrates for CYP1A, and solvents for CYP2E1, which convert them to mutagenic epoxides responsible for tumors if not efficiently detoxified by epoxide hydrolases. Moreover, chronic exposure to engine smokes has been suspected to increase the incidence of Alzheimer's disease (Freed & Kandel, 1988; Ferreyra-Moyano & Barragan, 1989). In the same way, chronic occupational exposure to solvents that are substrates for CYP2E has been suspected to be responsible for regional neurotoxicity and dementia (Freed & Kandel, 1988).

A special interest concerns the occupational exposures to inhalation of certain metal dusts or aerosols. Inhaled metals are often responsible for loss of olfactory acuity, atrophy of the nasal mucosa, or sinonasal cancer (Sunderman, 2001). Anosmia and hyposmia have been observed in workers exposed to Ni- or Cd-containing dusts in alkaline battery factories, nickel refineries, and cadmium industries (Hastings & Evans, 1991). In animals, several metals (Cd, Co, Hg, Mn, Ni, Zn) have been shown to pass via olfactory receptor neurons from the nasal cavity to the olfactory bulb. Transport of the metal via olfactory axons can occur rapidly, and the olfactory bulb can accumulate certain metals with greater avidity than other regions of the

brain (Sunderman, 2001). This may result in definitive anosmia, and lead to chemically induced, Parkinson's disease-like, neurodegeneration that does not respond to L-DOPA treatment (Hastings & Evans, 1991).

5. Concluding remarks:

The olfactory system is unique because the primary neurons of the olfactory pathway project directly to the cerebral cortex. As a consequence, the olfactory epithelium allows the influx of some drugs into the olfactory bulb using axonal transport, and further movement into the CNS. The entry of drugs into the olfactory bulb is also possible probably by direct diffusion into the surrounding CSF, allowing a very rapid appearance of some molecules, or their metabolites, in the CNS. The distribution of drugs from the nasal membrane into the CSF appears to be controlled by a combination of their molecular properties. However, the exact mechanism(s) regulating the passage of drugs or xenobiotics into the brain remains obscure.

The presence of a series of highly active, or tissue-specific drug metabolising enzymes in the olfactory mucosa serves different purposes. The first one is the protection of this sensory system, which is of paramount importance among terrestrial mammals in food acquisition, predator avoidance, and mating behavior. The second concerns the protection from exposure to substances and xenobiotics, including odorant molecules. Drug metabolism, associated with removal of odorants by mucus OBP, and replacement of damaged neurons with new cells derived from basal cells, are involved in the life-long efficiency of olfaction. Obviously, these activities could hamper the use of the olfactory pathway for drug delivery to the CNS. They may also be responsible for local toxicity, resulting in olfactory deficits or anosmia, or produce toxins that reach the brain and may produce neurotoxicity and/or neurodegeneration.

It is generally accepted that the nasal route circumvents the first-pass liver metabolism and elimination associated with oral drug delivery. We would stress that, as already outlined by Sarkar (1992), the high activities of drug metabolising enzymes in the nasal mucosa and in the olfactory bulb constitute a nasal first-pass metabolism, probably modifying the pharmacokinetic parameters of some drugs at this level. Nevertheless, this metabolism only concerns drugs that penetrate by the transcellular pathway, either through sustentacular cells or olfactory neurons, as drug metabolising enzymes are located inside the cells. Moreover, despite the very high mucosal enzymes activities, their capacity appears to be relatively limited as compared to the hepatic one, but remains sufficient to promote serious local toxicity. Therefore, detailed studies of the metabolism by the nasal epithelia and olfactory

bulb of the drugs that are designed for nasal delivery are needed to prevent serious side effects, both at the nasal and CNS levels. Finally, the mechanisms involved in the loss of olfactory function in dementing diseases –or the relations between anosmia and neurodegeneration–, especially in the neurodegenerative Parkinson's and Alzheimer's diseases (Murphy, 1999), remain to be elucidated.

6. Acknowledgements

Fellowships from the Région Bourgogne (D.G.), Région Lorraine (S.L.), and the Laboratoires Servier (A.L.M.) are gratefully acknowledged. This research was supported in part by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale.

7. References

- Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 137, 433-457.
- Bagger, M.A., Nielsen, H.W. and Bechgaard, E. (2001) Nasal bioavailability of peptide T in rabbits: absorption enhancement by sodium glycocholate and glycofurol. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14, 69-74.
- Baker, H. (1995) Transport phenomena within the olfactory bulb. In "Handbook of Olfaction and Gustation" (Doty, R.L., ed.) Marcel Dekker, New York, pp. 173-190.
- Banger, K.K., Lock, E.A., Reed, C.J. (1993) The characterization of glutathione S-transferases from rat olfactory epithelium. *Biochem. J.*, 290, 199-204.
- Banger, K.K., Lock, E.A. and Reed, C.J. (1996) Regulation of rat olfactory glutathione S-transferase expression. Investigation of sex differences, induction, and ontogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 52, 801-808.
- Behl, C.R., Pimplaskar, H.K., Sileno, A.P., de Meireles, J. and Romeo, V.D. (1998) Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 29, 89-116.
- Ben-Arie, N., Khen, M. and Lancet, D. (1993) Glutathione S-transferases in rat olfactory epithelium: purification, molecular properties and odorant biotransformation. *Biochem. J.*, 292, 379-384.
- Bergman, U. and Brittebo, E.B. (1999) Methimazole toxicity in rodents: covalent binding in the olfactory mucosa and detection of glial fibrillary acidic protein in the olfactory bulb. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 155, 190-200.
- Bond, J.A. (1983) Some biotransformation enzymes responsible for polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in rat nasal turbinates: effects on enzyme activities of in vitro modifiers and intraperitoneal and inhalation exposure of rats to inducing agents. *Cancer Res.*, 43, 4805-4811.
- Bond J.A., Harkema, J.R. and Russell V.I. (1988) Regional distribution of xenobiotic metabolizing enzymes in respiratory airways of dogs. *Drug Metab. Dispos.*, 16, 116-124.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J. (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1461, 347-357.
- Brennan, P.A. (2001) The vomeronasal system. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 546-555.
- Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA, Costa ER, Gross EA, Dorman DC. (2000) Direct olfactory transport of inhaled manganese ((54)MnCl(2)) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 169, 238-248.

- Brinker, T., Ludemann, W., Berens von Rautenfeld, D. and Samii, M. (1997) Dynamic properties of lymphatic pathways for the absorption of cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 94, 493-498.
- Brittebo, E.B. (1982) N-Demethylation of aminopyrine by the nasal mucosa in mice and rats. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, 51, 227-232.
- Brittebo, E.B. (1993) Metabolism of xenobiotics in the nasal olfactory mucosa: implications for local toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, 72, 50-52.
- Brittebo, E.B. and Eriksson, C. (1995) Taurine in the olfactory system: effects of the olfactory toxicant dichlobenil. *Neurotoxicology*, 16, 271-280.
- Burchell, B. (1991) Turning on and turning off the sense of smell. *Nature*, 350, 16-17.
- Chow, H.S., Chen, Z. and Matsuura, G.T. (1999) Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *J. Pharm. Sci.*, 88, 754-758.
- Dahl, A.R., Hadley, W.M. (1991) Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants. *Crit. Rev. Toxicol.*, 21, 345-372.
- Dahl, A.R., Hadley, W.M., Hahn, F.F., Benson, J.M. and McClellan, R.O. (1982) Cytochrome P-450-dependent monooxygenases in olfactory epithelium of dogs: possible role in tumorigenicity. *Science*, 216, 57-59.
- Dahlin, M., Jansson, B. and Björk, E. (2001) Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14, 75-80.
- Dhawan, A., Parmar, D., Dayal, M. and Seth P.K. (1999) Cytochrome P450 (P450) isoenzyme specific dealkylation of alkoxyresorufins in rat brain microsomes. *Mol. Cell. Biochem.*, 200, 169-176.
- Dulac, C. (2000) Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 511-518.
- Dyke, C.V., Barash, P.G., Jatlow, P.I. and Byck, R. (1977) Cocaine: plasma concentration after intranasal application in man. *Science*, 195, 859.
- El-Bachá, R.D.S. and Minn, A. (1999) Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Molec. Biol.*, 45, 15-23.
- Faller, T.H., Csanady, G.A., Kreuzer, P.E., Baur, C.M. and Filser, J.G. (2001) Kinetics of propylene oxide metabolism in microsomes and cytosol of different organs from mouse, rat, and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172, 62-74.
- Farbman, A.I., Buchholz, J.A., Suzuki, Y., Coines, A. and Speert, D. (1999) A molecular basis of cell death in olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.*, 414, 306-314.
- Falany, C.N. (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, 11, 206-216.
- Ferreira-Moyano, H. and Barragan, E. (1989) The olfactory system and Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.*, 49, 157-197.
- Fisher, A.N., Illum, L., Davis, S.S. and Schacht, E.H. (1992) Di-iodo-L-tyrosine-labelled dextrans as molecular size markers of nasal absorption in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44, 550-554.
- Freed, D.M. and Kandel, E. (1988) Long-term occupational exposure and the diagnosis of dementia. *Neurotoxicology*, 9, 391-400.
- Gao, B., Stieger, B., Noé, B., Fritschy, J.M. and Meier, P.J. (1999) Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 1255-1264.
- Genter, M.B., Deamer, N.J., Blake, B.L., Wesley, D.S., Levi, P.E. (1995) Olfactory toxicity of methimazole: dose-response and structure-activity studies and characterization of flavin-containing monooxygenase activity in the Long-Evans rat olfactory mucosa. *Toxicol. Pathol.*, 23, 477-486.
- Genter, M.B., Liang, H.C., Gu, J., Ding, X., Negishi, M., McKinnon, R.A. and Nebert, D.W. (1998) Role of CYP2A5 and 2G1 in acetaminophen metabolism and toxicity in the olfactory mucosa of the Cyp1a2(-/-) mouse. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 1819-1826.
- Gervasi, P.G., Longo, V., Naldi, F., Panattoni, G. and Ursino, F. (1991) Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. *Biochem. Pharmacol.*, 41, 177-184.

- Ghantous, H., Dencker, L., Gabrielsson, J., Danielsson, B.R. and Bergman, K. (1990) Accumulation and turnover of metabolites of toluene and xylene in nasal mucosa and olfactory bulb in the mouse. *Pharmacol. Toxicol.*, 66, 87-92.
- Gherzi-Egea, J.F. and Strazielle, N. (2001) Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistance at the choroid plexus. *Microsc. Res. Techniq.*, 52, 83-88.
- Gherzi-Egea, J.F., Leininger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G. and Minn, A. (1994) Localization of several drug-metabolizing enzymes activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J. Neurochem.*, 62, 1089-1096.
- Gherzi-Egea, J.F., Minn, A. and Siest, G. (1987) Inducibility of rat brain drug metabolizing enzymes. *Europ. J. Drug Met. Pharmacokin.*, 12, 263-266.
- Gherzi-Egea J.F., Minn A., Daval J.L., Jayyosi Z., Arnould V., Souhaili-El Amri H. and Siest G. (1989) NADPH:cytochrome P-450(c) reductase: biochemical characterization in rat brain and cultured neurones and evolution of activity during development. *Neurochem. Res.*, 14, 883-888.
- Gizurarson, S. (1990) Animal models for intranasal drug delivery studies. *Acta Pharm. Nord.*, 2, 105-122.
- Gomez, D.G., Fenstermacher, J.D., Manzo, R.P., Johnson, D. and Potts, D.G. (1985) Cerebrospinal fluid absorption in the rabbit: olfactory pathways. *Acta Otolaryngol.*, 100, 429-436.
- Gradinaru, D., Suleman, F.G., Leclerc, S., Heydel, J.M., Grillasca, J.P., Magdalou, J. and Minn, A. (1999) UDP-glucuronosyltransferase in the rat olfactory bulb: identification of the UGT1A6 isoform and age-related changes in 1-naphthol glucuronidation. *Neurochem. Res.*, 24, 997-1002.
- Graziadei, P.P., Monti-Graziadei, G.A. (1985) Neurogenesis and plasticity of the olfactory sensory neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 457, 127-142.
- Green, T., Lee, R., Toghill, A., Meadowcroft, S., Lund, V. and Foster, J. (2001) The toxicity of styrene to the nasal epithelium of mice and rats: studies on the mode of action and relevance to humans. *Chem. Biol. Interact.*, 137, 185-202.
- Gu J, Su T, Chen Y, Zhang QY, Ding X. (2000) Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165, 158-162.
- Gu, J., Walker, V.E., Lipinkas, T.W., Walker, D.M. and Ding X. (1997) Intraperitoneal administration of coumarin causes tissue-selective depletion of cytochromes P450 and cytotoxicity in the olfactory mucosa. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 134-143.
- Gu, J., Zhang, Q.Y. Genter, M.B., Lipinkas, T.W., Negishi, M., Nebert, D.W., Ding, X. (1998) Purification and characterization of heterologously expressed mouse CYP2A5 and CYP2G1: role in metabolic activation of acetaminophen and 2,6-dichlorobenzonitrile in mouse olfactory mucosal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 1287-1295.
- Habgood, M.D., Begley, D.J. and Abbott, N.J. (2000) Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20, 231-253.
- Hansson, T., Tindberg, N., Ingelman-Sundberg, M. and Kohler, C. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 34, 451-463.
- Hastings, L. and Evans, J.E. (1991) Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into the CNS. *Neurotoxicology*, 12, 707-714.
- Hedlund, E., Wyss, A., Kainu, T., Backlund, M., Kohler, C., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J.A. and Warner, M. (1996) Cytochrome P4502D4 in the brain: specific neuronal regulation by clozapine and toluene. *Mol. Pharmacol.*, 50, 342-350.
- Henkin, R.I. (1994) Drug-induced taste and smell disorders. Incidence, mechanisms and management related primarily to treatment of sensory receptor dysfunction. *Drug Safety*, 11, 318-377.
- Hersey, S.J. and Jackson, R.T. (1987) Effect of bile salts on nasal permeability in vitro. *J. Pharm. Sci.* 76, 876-879.
- Heydel, J.M., Leclerc, S., Bernard, P., Pelczar, H., Gradinaru, D., Magdalou, J., Minn, A., Artur, Y. and Goudonnet, H. (2001) Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: in situ mRNA localization and quantitative analysis. *Mol. Brain Res.*, 90, 83-92.

- Holley, A. and MacLeod, P. (1977) Transduction and coding of olfactory information (in French). *J. Physiol. (Paris)*, 73, 725-848.
- Huang, Y. and Donovan, M.D. (1998) Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 29, 147-155.
- Huang, P., Rannug, A., Ahlbom, E., Hakansson, H. and Ceccatelli, S. (2000) Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of cytochrome P450 1A1, the aryl hydrocarbon receptor, and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in rat brain and pituitary. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 169, 159-167.
- Hussain, A.A. (1998) Intranasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 29, 135-146.
- Illum, L. (2000) Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11, 1-18.
- Illum, L. and Davis, S.S. (2001) Nasal vaccination: a non-invasive vaccine delivery method that holds great promise for the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51, 1-3.
- Jackson, R.T., Tigges, J. and Arnold, W. (1985) Subarachnoid space of the CNS, nasal mucosa and lymphatic system. *Arch. Otolaryngol.*, 105, 180-184.
- Jedlitschky, G., Cassidy, A.J., Sales, M., Pratt, N. and Burchell, B. (1999) Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem. J.*, 340, 837-843.
- Jones, N. (2001) The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51, 5-19.
- Kakuta, Y., Pedersen, L.G., Pedersen, L.C. and Negishi, M. (1998) Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 129-130.
- King, C.D., Rios, G.R., Assouline, J.A. and Tephly, T.R. (1999) Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365, 156-162.
- Kleeman, M.J., Hughes, L.S., Allen, J.O., and Cass, G.R. (1999) Source contributions to the size and composition distribution of atmospheric particles: southern California in September 1996. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 4331-4341.
- Klöcker, N., Hanschke, W., Toussaint, S. and Verse, T. (2001) Scopolamine nasal spray in motion sickness: a randomised, controlled, and crossover study for the comparison of two scopolamine nasal sprays with oral dimenhydrinate and placebo. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 227-232.
- Kuykendall, J.R., Taylor, M.L. and Bogdanffy M.S. (1993) Cytotoxicity and DNA-protein crosslink formation in rat nasal tissues exposed to vinyl acetate are carboxylesterase-mediated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123, 283-292.
- Lagrange, P., Livertoux, M.H., Grassiot, M.C. and Minn, A. (1994) Superoxide anion formation during monoelectronic reduction of various xenobiotics by microvessels and choroid plexus preparations from rat brain. *Free Radical Biol. Med.*, 17, 355-359.
- Larsson, P. and Tjalve, H. (2000) Intranasal instillation of aflatoxin B(1) in rats: bioactivation in the nasal mucosa and neuronal transport to the olfactory bulb. *Toxicol. Sci.*, 55, 383-391.
- Lazard, D., Tal, N., Rubinstein, M., Khen, M., Lancet, D. and Zupko, K. (1990) Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase. *Biochemistry*, 29, 7433-7440.
- Leclerc, S., Heydel, J.M., Amossé, V., Gradinaru, D., Pelczar, H., Netter, P., Artur, Y., Cattarelli, M., Goudonnet, H., Magdalou, J. and Minn, A. (2002) Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system. Activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation with mitral cell activity. *Mol. Brain Res.*, in press.
- Leininger, B., Ghersi-Egea, J.F., Siest, G. and Minn, A. (1991) In vivo study of the elimination from brain tissue of an intracerebrally-formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl- β -D-glucuronide. *J. Neurochem.*, 56, 1163-1168.
- Leininger-Muller B, Siest G, Minn A. (1994) Drug conjugation in the brain (in French). *Thérapie*, 49, 499-507.
- Lewis, J.L. and Dahl, A.R. (1995) Olfactory mucosa: composition, enzymatic localization, and metabolism. In: "Handbook of Olfaction and Gustation" (Doty, R.L., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 33-52.

- Li, L., Gorukanti, S., Choi, Y.M. and Kim, K.H. (2000) Rapid-onset intranasal delivery of anticonvulsants: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation in rabbits. *Int. J. Pharm.*, 199, 65-76.
- Livertoux, M.H., Lagrange, P. and Minn, A. (1996) Superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes: dependence on the reduction potentials. *Brain Res.*, 725, 207-216.
- Lowhagen, P., Johansson, B.B. and Nordborg, C. (1994) The nasal route of cerebrospinal fluid drainage in man. A light-microscope study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20, 543-550.
- Longo, V., Ingelman-Sundberg, M., Amato, G., Salvetti, A. and Gervasi, P.G. (2000) Effect of starvation and chlormethiazole on cytochrome P450s of rat nasal mucosa. *Biochem. Pharmacol.*, 59, 1425-1432.
- Margolis F.L. (1974) Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science*, 184, 909-911.
- Marshall, M.E., Mohler, J.L., Edmonds, K., Williams, B., Butler, K., Ryles, M., Weiss, L., Urban, D., Bueschen, A., Markiewicz, M. and Cloud, G. (1994) An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120, S39-S42.
- Marttin, E., Romeijn, S.G., Verhoef, J.C. and Merkus, F.W. (1997) Nasal absorption of dihydroergotamine from liquid and powder formulations in rabbits. *J. Pharm. Sci.*, 86, 802-807.
- Marttin, E., Verhoef, J.C., Schipper, N.G. and Merkus, F.W. (1998) Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 29, 13-38.
- Mathison S., Nagilla R. and Kompella U.B. (1998) Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: fact or fiction? *J. Drug Target.*, 5, 415-441.
- Matsui, M., Tamura, H., Nagai, F., Homma, H., Miyawaki, A. and Mikoshiba, K. (1998) On the nature of rat hepatic and mouse olfactory sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.*, 109, 69-80.
- Max, B. (1992) This and that: the essential pharmacology of herbs and spices. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 15-20.
- McMartin, C., Hutchinson, L.E., Hyde, R. and Peters G.E. (1987) Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.*, 76, 535-540.
- Minn A., Dos Santos-El-Bachá R., Bayol-Denizot C., Lagrange P., Suleman G.F., and Gradinaru D. (2000) Drug metabolism in the brain: benefits and risks. In: *Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS* (Eds: Begley D., Bradbury M.W. and Kreuter J.) Marcel Dekker, New York, pp. 145-170.
- Minn A., Ghersi-Egea J.F., Perrin R., Leininger B. and Siest G. (1991) Drug metabolizing enzymes in the rat brain and brain microvessels. *Brain Res. Rev.*, 16, 65-82.
- Morrison, E.E. and Moran, D.T. (1995) Anatomy and ultrastructure of the human olfactory neuroepithelium. In "Handbook of Olfaction and Gustation" (Doty, R.L., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 75-101.
- Morse, D.C., Stein, A.P., Thomas, P.E. and Lowndes, H.E. (1998) Distribution and induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 in rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152, 232-239.
- Mulder, G.J. (1992) Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32, 25-49.
- Murphy, C. (1999) Loss of olfactory function in dementing disease. *Physiol. Behav.*, 66, 177-182.
- Nef, P., Larabee, T.M., Kagimoto, K. and Meyer, U.A. (1990) Olfactory-specific cytochrome P-450 (P-450olf1; IIG1). Gene structure and developmental regulation. *J. Biol. Chem.*, 265, 2903-2907.
- Norès, J.M., Biacabe, B. and Bonfils, P. (2000) Troubles olfactifs d'origine médicamenteuse : Analyse et revue de la littérature. *Rev. Med. Interne*, 21, 972-977.
- Norris, P.J., Hardwick, J.P. and Emson, P.C. (1994) Localization of NADPH cytochrome P450 oxidoreductase in rat brain by immunohistochemistry and in situ hybridization and a comparison with the distribution of neuronal NADPH-diaphorase staining. *Neuroscience*, 61, 331-350.
- Norris, P.J., Hardwick, J.P. and Emson, P.C. (1996) Regional distribution of cytochrome P450 2D1 in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 366, 244-258.
- Pardridge W.M. (1991) in: *Peptide Drug Delivery to the Brain*. Raven Press, New York, pp. 99-122.
- Paysan, J. and Breer, H. (2001) Molecular physiology of odor detection: current views. *Pflugers Arch.*, 441, 579-586.

- Perl, D.P. and Good, P.F. (1987) Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. *Lancet*, 1(8540), 1028.
- Perrin, R., Minn, A., Gherzi-Egea, J.F., Grassiot, M.C. and Siest, G. (1990) Distribution of cytochrome P-450 activities towards alkoxyresorufin derivatives in rat brain regions, subcellular fractions and cerebral microvessels. *Biochem. Pharmacol.*, 40, 2145-2151.
- Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N. and Edwards, R.H. (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J. Neurosci.*, 15, 6179-6188.
- Pevsner, J., Hou, V., Snowman, A.M. and Snyder, S.H. (1990) Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J. Biol. Chem.*, 265, 6118-6125.
- Ravindranath, V. (1998) Metabolism of xenobiotics in the central nervous system: implications and challenges. *Biochem. Pharmacol.*, 56, 547-551.
- Reed, C.J. (1993) Drug metabolism in the nasal cavity: relevance to toxicology. *Drug Metab. Rev.*, 25, 173-205.
- Reed, C.J., Lock, E.A. and De Matteis, F. (1986) NADPH: cytochrome P-450 reductase in olfactory epithelium. Relevance to cytochrome P-450-dependent reactions. *Biochem. J.*, 240, 585-592.
- Rosenbrock, H., Hagemeyer, C.E., Ditter, M., Knoth, R. and Volk, B. (2001) Expression and localization of the CYP2B subfamily predominantly in neurones of rat brain. *J. Neurochem.*, 76, 332-340.
- Sakane, T., Akizuki, M., Yamashita, S., Nadai, T., Hashida, M. and Sezaki, H. (1991) The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: the relation to the lipophilicity of the drug. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 39, 2456-2458.
- Sakane, T., Akizuki, M., Taki, Y., Yamashita, S., Sezaki, H. and Nadai, T. (1995) Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 47, 379-381.
- Sarkar, M.A. (1992) Drug metabolism in the nasal mucosa. *Pharm. Res.*, 9, 1-9.
- Saunders, N.R., Habgood, M.D. and Dziegielewska, K.M. (1999) Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26, 11-19.
- Schipper, N.G., Verhoef, J.C. and Merkus, F.W. (1991) The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery. *Pharm. Res.*, 8, 807-814.
- Schols-Hendricks, M., Lohman, J., Janknegt, R., Korten, J. and Merkus, F. (1995) Absorption of clonazepam after intranasal and buccal administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 39, 449-451.
- Shipley, M.T. (1985) Transport of molecules from nose to brain: transneuronal anterograde and retrograde labeling in the rat olfactory system by wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase applied to the nasal epithelium. *Brain Res. Bull.*, 15, 129-142.
- Spector, R. (2000) Drug transport in the mammalian central nervous system: multiple complex systems. A critical analysis and commentary. *Pharmacology*, 60, 58-73.
- Staal, R.G., Yang, J., Hait, W.N. and Sonsalla, P.K. (2001) Interactions of 1-methyl-4-phenylpyridinium and other compounds with P-glycoprotein: relevance to toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res.*, 910, 116-125.
- Strobel, H.W., Geng, J., Kawashima, H. and Wang, H. (1997) Cytochrome P450-dependent biotransformation of drugs and other xenobiotic substrates in neural tissue. *Drug Metab. Rev.*, 29, 1079-1105.
- Suleman, F.G., Abid, A., Gradinaru, D., Daval, J.L., Magdalou, J. and Minn, A. (1998) 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.
- Sunderman, F.W. Jr. (2001) Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 31, 3-24.
- Tamura, H.O., Harada, Y., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. and Matsui, M. (1998) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an olfactory-specific mouse phenol sulphotransferase. *Biochem. J.*, 331, 953-958.
- Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Ramoni, R. and Cambillau, C. (2000) Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482, 229-240.

- Thorne, R.G., Emory, C.R., Ala, T.A. and Frey W.H. II. (1995) Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.*, 692, 278-282.
- Tjalve, H. and Henriksson, J. (1999) Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology*, 20, 181-195.
- Tomlinson, A.H. and Esiri, M.M. (1983) Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory pathways in mice. *J. Neurol. Sci.*, 60, 473-484.
- van Ginkel, F.W., Jackson, R.J., Yuki, Y. and McGhee, J.R. (2000) Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J. Immunol.*, 165, 4778-4782.
- Voigt, J.M., Guengerich, F.P. and Baron, J. (1993) Localization and induction of cytochrome P450 1A1 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in rat nasal mucosa. *J. Histochem. Cytochem.*, 41, 877-885.
- Voirol, P., Jonzier-Perey, M., Porchet, F., Reymond, M.J., Janzer, R.C., Bouras, C., Strobel, H.W., Kosel, M., Eap, C.B. and Baumann, P. (2000) Cytochrome P-450 activities in human and rat brain microsomes. *Brain Res.*, 855, 235-243.
- Warner, M., Stromstedt, M., Wyss, A. and Gustafsson, J.A. (1993) Regulation of cytochrome P450 in the central nervous system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 47, 191-194.
- Wioland, M.A., Fleury-Feith, J., Corlieu, P., Commo, F., Monceaux, G., Lacau-St-Guily, J. and Bernaudin, J.F. (2000) CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. *J. Histochem. Cytochem.*, 48, 1215-1222.
- Wright E.M. (1978) Transport processes in the formation of the cerebrospinal fluid. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 83, 1-34.

Drugs / Xenobiotics entering the nostril as:

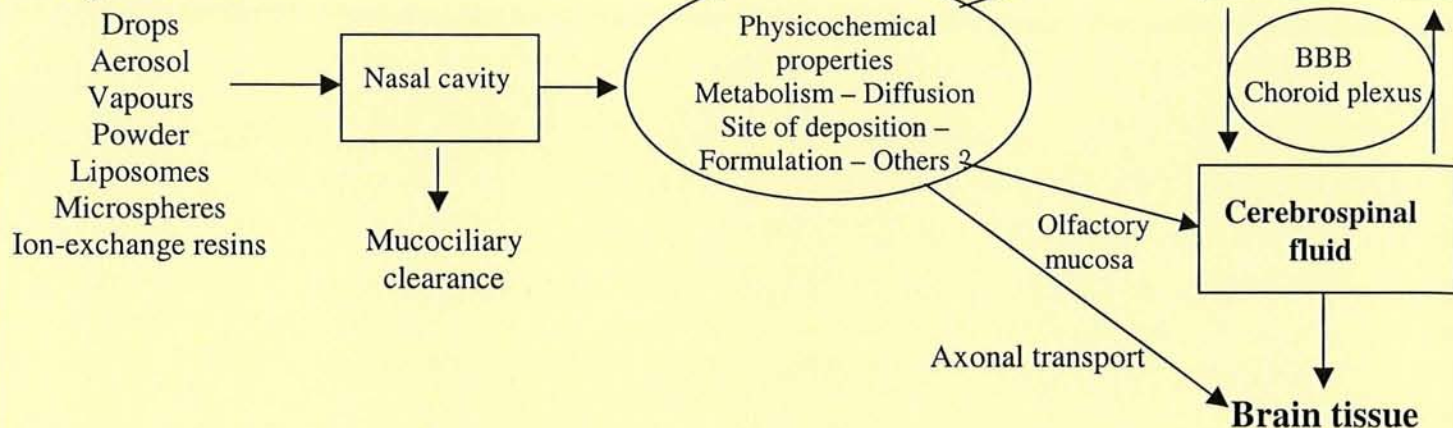


Figure 1. Possible fate of a drug administered by the nasal pathway. The passage of a chemical into the cerebrospinal fluid or into the brain depends on numerous factors, such as liposolubility/polarity, which will allow the dissolution in the mucus, or the binding to specific olfactory binding proteins (OBP), or its metabolism by drug metabolising enzymatic systems, and probably on other unknown factors.

In addition, the transport of a drug from nasal cavity to blood and to brain (or from brain to blood) through the blood-brain barrier (BBB) or the choroid plexus may also occur.

Table 1: Multidrug resistance barriers for the protection of the CNS at the blood-brain barrier and choroid plexus.

Physical (passive) barriers:

Molecular weight > 600 Da
Water solubility
Binding to plasma proteins
Absence of specific transport systems
Storage in tissue lipids

Metabolic barriers (increasing drug polarity):

Phase 1 enzyme activities
(Cytochromes P450, flavin-dependent oxygenases,
monoamine oxidases, reductases, hydrolases, ...)
Phase 2 enzyme activities (conjugating enzymes)

Active barriers (ATP-dependent efflux):

P-glycoprotein (P-gp)
Multidrug resistance protein (MDR)
Organic anion transporters (OAT)
Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) (?)

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

ABBOTT F.V., PALMOUR R.M. Morphine-6-glucuronide: analgesic effects and receptor binding profile in rats. *Life Sci.*, 1988, 43, 1685-1695.

ABBRUSCATO T., DAVIS T. Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain Res.*, 1999, 842, 277-286.

ALBASANZ J.L., ROS M., MARTIN M. Characterization of metabotropic glutamate receptors in rat C6 glioma cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 326, 85-91.

ANDERSEN K., LAUNER L.J., OTT A., HOES A.W., BRETELER M.M., HOFMAN A. Do non steroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? *The Rotterdam Study*. *Neurology*, 1995, 45 (8), 1441-1445.

ASTIC L., SAUCIER D. Anatomical mapping of neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res. Bull.*, 1986, 16 (4), 445-454.

AXEL R. De la molécule à l'odeur. *Pour la Science*, 1995, 218, 60-65.

B

BAEZ S., SEGURA-AGUILAR J., WIDERSTEN M., JOHANSSON A.S., MANNERVIK B. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem. J.*, 1997, 324 (Pt 1), 25-28.

BAKALYAR H.A., REED R.R. Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 1990, 250 (4986), 1403-1406.

BANSAL S.K., GESSNER T. A unified method for assay of uridine diphosphoglucuronyl-transferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-¹⁴C]glucuronic acid. *Anal. Biochem.*, 1980, 109, 321-329.

BARBER P.C., DAHL D. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve. *Exp. Brain Res.*, 1987, 65 (3), 681-685.

BARBER P.C., LINDSAY R.M. Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience*, 1982, 7 (12), 3077-3090.

BATTAGLIA E., PRITCHARD M., OUZZINE M., FOURNEL-GIGLEUX S., RADOMINSKA 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.*, 1994, 309 (2), 266-272.

BELANGER A., HUM D.W., 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. Mol. Biol.*, 1998, 65 (1-6), 301-310.

BEN-ARIE N., KHEN M., LANCET D. Glutathione S-transferases in rat olfactory epithelium: purification, molecular properties and odorant biotransformation. *Biochem. J.*, 1993, 292 (Pt 2), 379-384.

- BEN-SHACHAR D., ZUK R., GLINKA Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J. Neurochem.*, 1995, 64 (2), 718-723.
- BHAGWAT S., BOYD M., RAVINDRANATH V. Multiple forms of cytochrome P450 and associated monooxygenase activities in human brain mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 59, 573-582.
- BHAMRE S., BHAGWATH S.V., SHANKAR S.K., WILLIAMS D.E., RAVINDRANATH V. Cerebral flavin-containing monooxygenase-mediated metabolism of antidepressants in brain: immunochemical properties and immunocytochemical localization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, 267 (1), 555-559.
- BIANCHET M.A., BAINS G., PELOSI P., PEVSNER J., SNYDER S.H., MONACO H.L., AMZEL L.M. The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, 3 (11), 934-939.
- BLAIN H., JOUZEAU J.Y., NETTER P., JEANDEL C. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev. Med. Interne*, 2000, 21, 978-988.
- BOEKHOFF I., KRONER C., BREER H. Calcium controls second-messenger signalling in olfactory cilia. *Cell Signal*, 1996, 8 (3), 167-171.
- BONIFACIO M.J., VIEIRA-COELHO M.A., BORGES N., SOARES-DA-SILVA P. Kinetics of rat brain and liver solubilized membrane-bound catechol-O-methyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 384 (2), 361-367.
- BOOHER J., SENSENBRENNER M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiol.*, 1972, 2, 97-105.
- BORCHARDT R.T. N- and O-methylation. *Enzymatic Basis of detoxication*. London : Academic Press, ed. Jakoby W.B, 1980 : 43-62.
- BOUVET J.F., DELALEU J.C., HOLLEY A. Olfactory receptor cell function is affected by trigeminal nerve activity. *Neurosci. Lett.*, 1987, 77 (2), 181-186.
- BRAND G. La latéralisation olfactive chez l'homme. *Neurophysiol. Clin.*, 1999, 29, 495-506.
- BRANDS A., MUNZEL P., BOCK K.W. *In situ* hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 59, 1441-1444.
- BREER H., BOEKHOFF I., TAREILUS E. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* 1990, 345 (6270), 65-68.
- BREER H., KLEMM T., BOEKHOFF I. Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuroreport*, 1992, 3 (11), 1030-1032.
- BREER H., RAMING K., KRIEGER J. Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1224, 277-287.
- BRENNAN P.A. The vomeronasal system. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2000, 58, 546-555.

BRIAND L., NESPOULOUS C., PEREZ V., REMY J.J., HUET J.C., PERNOLLET J.C. Ligand-binding properties and structural characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267 (10), 3079-3089.

BROUARD B. L'olfaction : à l'aube d'une révolution. *Biofutur*, février 1992, 18-29.

BROWN C.E., ROERIG S.C., BURGER V.T., CODY R.B., FUJIMOTO R.M. Analgesic potencies of morphine 3- and 6-sulfates after intracerebroventricular administration in mice: relationship to structural characteristics defined by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *J. Pharm. Sci.*, 1985, 74 (8), 821-824.

BRUCH R.C., KANG J., MOORE M.L. Jr, MEDLER K.F. Protein kinase C gene expression in olfactory receptor neurons. *J. Neurobiol.*, 1997, 33 (4), 387-394.

BUCK L., AXEL R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, 65 (1), 175-187.

BURCHELL B. Turning on and turning off the sense of smell. *Nature*, 1991, 350, 16-17.

BURCHELL B., COUGHTRIE M.W. UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol. Ther.*, 1989, 43 (2), 261-289.

BURKE W.J., CHUNG H.D., MARSHALL G.L., GILLEPSIE K.N., JOH T.H. Evidence for decreased transport of PNMT protein in advanced Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1990, 38 (12), 1275-1282.

BUROVA T.V., CHOISET Y., JANKOWSKI C.K., HAERTLE T. Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein. *Biochem.*, 1999, 38 (45), 15043-15051.

BURSAUX E. Connaître les cyclooxygénases pour mieux contrôler les effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Méd./Sci.*, 1994, 10, 468-470.

C

CARABAZA A., CABRE F., GARCIA A.M., ROTLLAN E., GARCIA L., MAULEON D. Stereoselective inhibition of rat brain cyclooxygenase by dexketoprofen. *Chirality*, 1997, 9 (3), 281-285.

CHENG Z., RADOMINSKA-PANDYA A., TEPHLY T.R. Studies on substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab. Dispos.*, 1999, 27 (10), 1165-1170.

CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162, 156-159.

D

DAVSON H., WELCH K., SEGAL M.B. Secretion of cerebrospinal fluid. *The Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid.*, 1987, Churchill Livingstone, London, 201.

DE JONG R., VISSER J.H. Integration of olfactory information in the Colorado potato beetle brain. *Brain Res.*, 1988, 447 (1), 10-17.

DECKNER M.L., RISLING M., FRISEN J. Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat. *Exp. Neurol.*, 1997, 143 (1), 132-140.

DI CHIARA G., GESSA G.L. Pharmacology and neurochemistry of apomorphine. *Adv. Pharmacol. Chemotherapy*, 1978, 15, 87-160.

E

EL BACHA R.S., DAVAL J.L., KOZIEL V., NETTER P., MINN A. Toxic effects of apomorphine on rat cultured neurons and glial C6 cells, and protection with antioxydants. *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 66, 73-85.

EL BACHA R.S., MINN A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol.*, 1999, 45 (1), 15-23.

EL MOUELHI M., BECK S., BOCK K.W. Stereoselective glucuronidation of (R)- and (S)-naproxen by recombinant rat phenol UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) and its human orthologue. *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 46 (7), 1298-1300.

ESPOSITO G., IZZO A.A., DI ROSA M., IUUVONE T. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *J. Neurochem.*, 2001, 78 (4), 835-841.

F

FARIN F.M., OMIECINSKI C.J. Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *J. Toxicol. Environ Health*, 1993, 40 (2-3), 317-335.

FLOWER D.R. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, 1996, 318 (1), 1-14.

FRIEDMAN D., STROWBRIDGE B.W. Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J. Neurophysiol.*, 2000, 84, 39-50.

FULLE H.J., VASSAR R., FOSTER D.C., YANG R.B., AXEL R., GARBERS D.L. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92 (8), 3571-3575.

G

GAO B., STIEGER B., NOE B., FRITSCHY J.M., MEIER P. Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, 47 (10), 1255-1263.

GARBERS D.L., KOESLIN D., SCHULTZ G. Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Biol. Cell*, 1994, 5 (1), 1-5.

GENTER M.B., OWENS D.M., DEAMER N.J. Distribution of microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in the rat olfactory mucosa: relevance to distribution of lesions caused by systemically-administered olfactory toxicants. *Chem. Senses*, 1995, 20 (4), 385-392.

GETCHELL M.L., GETCHELL T.V. Immunohistochemical localization of components of the immune barrier in the olfactory mucosae of salamanders and rats. *Anat. Rec.*, 1991, 231 (3), 358-374.

GHERSI-EGEA J.F., STRAZIELLE N. Brain drug delivery, drug metabolism, and drug resistance at the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.*, 2001, 52 (1), 83-88.

GHERSI-EGEA J.F., WALTHER B., DECOLIN D., MINN A., SIEST G. The activity of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase in the brain. *Neuropharmacol.*, 1987, 26 (4), 367-372.

GOLDSTEIN G.W., BETZ A.L. The blood-brain barrier. *Sci. Am.*, 1986, 255, 70-79.

GOMEZ G., RAWSON N.E., COWART B., LOWRY L.D., PRIBITKIN E.A., RESTREPO D. Modulation of odor-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ by inhibitors of protein kinases A and C in rat and human olfactory receptor neurons. *Neuroscience*, 2000, 98 (1), 181-189.

GONG Q.H., CHO J.W., HUANG T., POTTER C., GHOLAMI N., BASU N.K., KUBOTA S., CARVALHO S., PENNINGTON M.W., OWENS I.S.; POPESCU N.C. Thirteen UDP-glucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics*, 2001, 11 (4), 357-368.

GOUZE J.N., BORDJI K., GULBERTI S., TERLAIN B., NETTER P., MAGDALOU J., FOURNEL-GIGLEUX S., OUZZINE M. Interleukin-1 β -down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis : influence of glucosamine on interleukin-1 β -mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44 (2), 351-360.

GRADINARU D. Ageing and reactive oxygen species-induced modifications in rat brain glucuronidation process. Rapport de stage pour la Fondation Sandoz, Centre du médicament, Nancy, 1995.

GRADINARU D., HEYDEL J.M., MAGDALOU J., NETTER P., GOUDONNET H., ARTUR Y., MINN A. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in the rat choroids plexus. Effects of inducers and bacterial lipopolysaccharide. *Neuropharmacol.*, 2001, soumis.

GRANCHAROV K., NAYDENOVA Z., LOZEVA S., GOLOVINSKY E. Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol. Therapeut.*, 2001, 89, 171-186.

GU J., DUDLEY C., SU T., SPINK D., ZHANG Q.Y., MOSS R., DING X. Cytochrome P450 and steroid hydroxylase activity in mouse olfactory and vomeronasal mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 1999, 266, 262-267.

GU J., SU T., CHEN Y., ZHANG Q.Y., DING X. Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000, 165, 158-162.

H

HAASIO K., SOPANEN L., VAALAVIRTA L., LINDEN I.B., HEINONEN E.H. Comparative toxicological study on the hepatic safety of entacapone and tolcapone in the rat. *J. Neural. Transm.*, 2001, 108 (1), 79-91.

HAMMOND C., TRITSH D. Les cellules gliales. *Neurobiologie Cellulaire*, Edition Doin, 1990, chap. 3, 61-73.

HASTINGS L., EVANS J. Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into CNS. *Neurotoxicol.*, 1991, 12, 707-714.

HEDLUND E., WYSS A., KAINU T., BACKLUND M., KOHLER C., PELTO-HUIKKO M., GUSTAFSSON J.A., WARNER M. Cytochrome P450 2D4 in the brain: specific neuronal regulation by clozapine and toluene. *Mol. Pharmacol.*, 1996, 50, 342-350.

HENKIN R. Drug-induced taste and smell disorders. Incidence, mechanisms and management related primarily to treatment of sensory receptor dysfunction. *Pharmacoepidemiology*, 1994, 11 (5), 318-377.

HEYDEL J.M., LECLERC S., BERNARD P., PELCZAR H., GRADINARU D., MAGDALOU J., MINN A., ARTUR Y., GOUDONNET H. Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: in situ mRNA localization and quantitative analysis. *Mol. Brain Res.*, 2001, 90, 83-92.

HOLCOMB J.D., GRAHAM S., CALOF A. C. Neuronal homeostasis in mammalian olfactory epithelium: a review. *Am. J. Rhinol.*, 1996, 10, 125-134.

HOLLEY A., Mc LEOD P. Transduction et codage des informations olfactives chez les vertébrés. *J. Physiol. Paris*, 1977, 73, 725-828.

HOOVELD G.J., VAN MONTFOORT J.E., MEIJER D.K., MULLER M. Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur. J. Pharm Sci.*, 2001, 12 (4), 525-543.

HUSSAIN A.A. Intranasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, 29, 39-49.

I

ILLUM L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, 11, 1-18.

ISHIKAWA T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trens Biochem. Sci.*, 1992, 17 (11), 463-468.

J

JACKSON M.R., FOURNEL-GIGLEUX S., HARDING D., BURCHELL B. Examination of the substrate specificity of cloned rat kidney phenol UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells. *Mol. Pharmacol.*, 1988, 34, 638-642.

JEDLITSCHKY G., CASSIDY A., SALES M., PRATT N., BURCHELL B. Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem. J.*, 1999, 340, 837-843.

JONES D.T., REED R.R. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, 1989, 244 (4906), 790-795.

JONES N., ROG D. Olfaction : a review. *J. Laryngol. Otol.*, 1998, 112, 11-24.

JORGA K., KROODSMA J.M., FOTTELER B., HEIZMANN P., MEYER J., RASCH M., VAN HATTUM J. Effect of liver impairment on the pharmacokinetics of tolcapone and its metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1998, 63 (6), 646-654.

JOURDAN F., DIDIER A., CORONAS V., MOYSE E., ROUILLER D. Apoptose neuronale et neurogenèse chez l'adulte : le modèle du système olfactif périphérique. *Rencontres IPSSEN en ORL*, 1997, tome 1, éditeurs Christen Y., Collet L., Droy-Lefaix M.T.

JUILFS D.M., FULLE H.J., ZHAO A.Z., HOUSLAY M.D., GARBERS D.L., BEAVO J.A. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (7), 3388-3395.

K

KARHUNEN T., TILGMANN C., ULMANEN I., JULKUNEN I., PANULA P. Distribution of catechol-*O*-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1994, 42 (8), 1079-1090.

KATO T., YOKOUCHI K., FUKUSHIMA N., KAWAGISHI K., LI Z., MORIIZUMI T. Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats. *Neurosci. Letters*, 2001, 307, 17-20.

KAWASHIMA C., TERAYAMA K., LI M., OKA S., KAWASAKI T. Characterization of a glucuronyltransferase: neolactotetraosylceramide glucuronyltransferase from rat brain. *Glycoconj. J.*, 1992, 9 (6), 307-314.

KEPPLER D., LEIER G., JEDLITSCHKY G., KONIG J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chemico-Biol. Int.*, 1998, 111-112 (0), 153-161.

KEPPLER D., LEIER I., JEDLITSCHKY G. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.*, 1997, 378 (8), 787-791.

KEVERNE E. The vomeronasal organ. *Science*, 1999, 286 (5440), 716-720.

KHIRI H., REYNIER P., PEYROL N., LERIQUE B., TORRESANI J., PLANELLIS R. Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. *Mol. Cell Probes*, 1996, 10 (3), 201-211.

KIM K.Y., CHUNG H.J. Flavor compound of pine sprout tea and pine needle tea. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48 (4), 1269-1272.

KING A., RICHARD DICKINSON J. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 2000, 16 (6), 499-506.

KING C.D., RIOS G.R., ASSOULINE J.A., TEPHLY T.R. Expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 365 (1), 156-162.

KINOSAKI M., MASUKO T., SOGAWA K., IYANAGI T., YAMAMOTO T., HASHIMOTO Y., FUJII-KURIYAMA Y. Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells. *Cell Struct. Funct.*, 1993, 18 (1), 41-51.

KOBAL G., KETTENMANN. Olfactory functional imaging and physiology. *Int. J. Psychophysiol.*, 2000, 36, 157-163.

KREUTER J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 47 (1), 65-81.

KRISTENSSON K., OLSSON Y. Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropathol.*, 1971, 19 (2), 145-154.

KURAHASHI T., MENINI A. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature*, 1997, 385 (6618), 725-729.

L

LACAZETTE E., GACHON A.M., PITIOT G. A novel odorant-binding protein gene family from genomic duplicon at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9 (2), 289-301.

LAI C.T., YU P. Dopamine and L-β-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and oxidative factors. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, 53 (3), 363-372.

LANCET D. The strong scent of success. *Nature*, 1991, 351 (6324), 275-276.

LAUTALA P., KIVIMAA M., SALOMIES H., ELOVAARA E., TASKINEN J. Glucuronidation of entacapone, nitecapone, tolcapone, and some other nitrocatechols by rat liver microsomes. *Pharmacol. Res.*, 1997, 14 (10), 1444-1448.

LAZARD D., TAL N., RUBINSTEIN M., KHEN M., LANCET D., ZUPKO K. Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450 IIA and UDP-glucuronosyl transferase. *Biochem.*, 1990, 29, 7433-7440.

LAZARD D., ZUPKO K., PORIA Y., NEF P., LAZAROVITS J., HORN S., KHEN M., LANCET D. Odorant signal termination by UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, 1991, 349, 790-793.

LEBEL C.P., BONDY S.C. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 1991, 13 (3), 341-346.

LEIER I., JEDLITSCHKY G., BUCHOLZ U., COLE S.P., DEELEY R.G., KEPPLER D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 (45), 27807-27810.

LEININGER-MULLER B., SIEST G., MINN A. La conjugaison des médicaments dans le cerveau. *Thérapie*, 1994, 49 (6), 499-507.

LEININGER-MULLER B., GHERSI-EGEA J.F., SIEST G., MINN A. (b) Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neurosci. Letters*, 1994, 175 (1-2), 37-40.

LORIG T. S. The application of electroencephalographic techniques to the study of human olfaction : a review and tutorial. *Int. J. Psychophysiol.*, 2000, 36, 91-104.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.

LU A.Y., MIWA G.T. Molecular properties and biological functions of microsomal epoxide hydase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1980, 20, 513-531.

M

- MACKAY-SIM A., KITTEL P. Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographics study. *J. Neurosci.*, 1991, 11 (4), 979-984.
- MACKENZIE P.I. Expression of chimeric cDNA in cell culture defines a region of UDP-glucuronosyltransferase involved in substrate selection. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 3432-3435.
- MACKENZIE P.I., OWENS I., BURCHELL B., BOCK K.W., BAIROCH A., BELANGER A., FOURNEL-GIGLEUX S., GREEN M., HUM D., IYANAGI T., LANCET D., LOUISOT P., MAGDALOU J., CHOWDHURY J.R., RITTER J., SCHACHTER H., TEPHLY T., TIPTON K., NEBERT D. The UDP glycosyltransferase gene superfamly: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 1997, 7, 255-269.
- MAJEWSKA M.D., SCHWARTZ R.D. Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the γ -aminobutyric receptor complex in the brain ? *Brain Res.* 1987, 404 (1-2), 355-360.
- MALNIC B., HIRONO J., SATO T., BUCK L. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 1999, 96, 713-723.
- MANDELL J.M., GOCAN N.C., VANDENBERG S.R. Mechanical trauma induces rapid astroglial activation of ERK/MAP kinase: Evidence for paracrine signal. *Glia*, 2001, 34 (4), 283-295.
- MARIEB E. Anatomie et physiologie humaines. De Boeck Université 2^{ème} édition, 1993.
- MARTIN G.N. Human electroencephalographic (EEG) response to olfactory stimulation: Two experiments using the aroma of food. *Int. J. Psychophysiol.*, 1998, 30, 287-302.
- MASMOUDI T., MOUNIE J., ARTUR Y., MAGDALOU J., GOUDONNET H. Comparative quantification of two hepatic UDP-glucuronosyltransferase bilirubin isoforms mRNAs in various thyroid states in rat. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, 53 (7), 1013-1007.
- MAYER R., KARTENBECK J., BUCHLER M., JEDLITSCHKY G., LEIER I., KEPPLER D. Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in the transport-deficient mutant hepatocytes. *J. Cell Biol.*, 1995, 131, 137-150.
- McGURK K.A., BRIERLEY C.H., BURCHELL B. Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem. Pharmacol.*, 1998, 55 (7), 1005-1012.
- MENINI A. Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1999, 9, 419-426.
- MERCADANTE S. The role of morphine glucuronides in cancer pain. *Palliat. med.*, 1999, 13 (2), 95-104.
- MERKUS F.W., VERHOEF J.C., SCHIPPER N.G., MARTTIN E. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, 29 (1-2), 13-38.
- MINN A., EL-BACHA R., BAYOL-DENIZOT C., LAGRANGE P., SULEMAN F.G., GRADINARU D. Drug metabolism in the brain: Benefits and risks. *Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS*, edited by Begley d., Bradbury M., Kreuter J., 1999, chap. 9, 145-170.
- MINN A., GHERSI-EGEA J.F., PERRIN R., LEININGER B., SIEST G. Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res. Rev.*, 1991, 16, 65-82.

MOMBAERTS P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 1999, 286 (5440), 707-711.

MOMBAERTS P., WANG F., DULAC C., CHAO S., NEMES A., MENDELSON M., EDMONDSON J., AXEL R. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 1996, 87, 675-686.

MONCRIEFF R.W. Effect of odours on EEG records. *Perfum. Essentiel Oil Res.*, 1962, 53, 757-760.

MOON C., SUNG Y.K., REDDY R., RONNETT G. Odorants induced the phosphorylation of cAMP response element binding protein in olfactory receptor neurons. *Neurobiol.*, 1999, 96 (25), 14605-14610.

MORI K., NAGAO H., YOSHIHARA Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 1999, 286, 5440, 711-715.

MULDER G.J. Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1992, 32, 25-49.

MULDER G.J., COUGHTRIE M., BURCHELL B. Glucuronidation. *Conjugation reactions in drug metabolism*, 1990, edition Mulder, chap 4, 51-105.

MURPHY C. Loss of olfactory function in dementing disease. *Physiol. Behav.*, 1999, 66 (2), 177-182.

N

NETTER P., LAPICQUE F., BANNWARTH B., TAMISIER J.N., THOMAS P., ROYER R.J. Diffusion of intramuscular ketoprofen into the cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1985, 29, 319-321.

NORES J.M., BIACABE B., BONFILS P. Troubles olfactifs et pathologie générale. *Analyse et revue de la littérature. Rev. Med. Interne*, 2000, 21, 95-104.

NORES J.M., BIACABE B., BONFILS P. (b) Troubles olfactifs d'origine médicamenteuse : analyse et revue de la littérature. *Rev. Med. Interne*, 2000, 21, 972-977.

O

OFFEN D., PANET H., GALILI-MOSBERG R., MELAMED E. Catechol-O-methyltransferase decreases levodopa toxicity in vitro. *Clin. Neuropharmacol.*, 2001, 24 (1), 27-30.

OLANOW C.W., HAUSER R.A., GAUGER L., MALAPIRA T., KOLLER W., HUBBLE J., BUSHENBARK K., LILIENFELD D., ESTERLITZ J. The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 1995, 38(5), 771-777.

OLSON J.A., MOON R.C., ANDERS M.W., FENSELAU C., SHANE B. Enhancement of biological activity by conjugation reactions. *J. Nutr.*, 1992, 122 (3), 615-624.

P

PARDRIDGE W.M. *Peptide drug delivery to brain*. Raven Press, New York, 1991, 99-122.

PELOSI P. Odorant-binding proteins: Structural aspects. *Ann. NY Acad. Sci., Olfaction and Taste XII*, 1998, 855, 281-293.

PERRIN R., MINN A., GHERSI-EGEA J.F., GRASSIOT M.C., SIEST G. Distribution of cytochrome P450 activities towards alkoxyresorufin derivatives in rat brain regions, subcellular fractions and isolated cerebral microvessels. *Biochem. Pharmacol.*, 1990, 40 (9), 2145-2151.

PESCHANSKI M., CALVINO B., RIVOT J.P. La macroglie. *Méd./Sci., lexique neurobiologique*, 1992, 35-36.

PLEWKA A., KAMINSKI M., PLEWKA D. The influence of age and some inducers on UDP-glucuronosyltransferase activity. *Exp. Gerontol.*, 1997, 32 (3), 305-313.

PONTE P., ENGEL J., GUNNING P., KEDES L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 1687-1696.

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.*, 1994, 45 (1), 42-50.

PROKAI L., PROKAI-TATRAI K., BODOR N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med. Res. Rev.*, 2000, 20 (5), 367-416.

R

RADOMINSKA-PANDYA A., CZERNIK P., LITTLE J., BATTAGLIA E., MACKENZIE P. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug metabolism reviews*, 1999, 31 (4), 817-899.

RAMONI R., VINCENT F., GROLLI S., CONTI V., MALOSSE C., BOYER F.D., NAGNAN-LE MAEILLOUR P., SPINELLI S., CAMBILLAU C., TEGONI M. The insect attractant, 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant binding protein. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (10), 7150-7155.

RAO V., DAHLHEIMER J., BARDGETT M., SNYDER A., FINCH R., SARTORELLI A., PIWNICA-WORMS. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 3900-3905.

RESSLER K.J., SULLIVAN S.L., BUCK L.B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 1993, 73 (3), 597-609.

RESTREPO D., TEETER J.H. Olfactory neurons exhibit heterogeneity in depolarisation-induced calcium changes. *Am. J. Physiol.*, 1990, 258 (6 Pt 1), C1051-1061.

RESTREPO D., TEETER J.H., SCHILD D. Second messenger signalling in olfactory transduction. *J. Neurobiol.*, 1996, 30 (1), 37-48.

REUTER S.F., VASILIOU V., PUGA A., NEBERT D.W. Characterization of the murine dioxin-inducible UDP-glucuronosyltransferase (Ugt1-06) gene. *Toxicologist*, 1994, 14, 410-410.

RIACHI N.J., HARIK S.I. Strain differences in systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice correlate best with monoamine oxidase activity at the blood-brain barrier. *Life Sci.*, 1988, 42(23), 2359-2363.

ROGINSKY V., BARSUKOVA T., BRUCHELT G., STEGMANN H. The oxidation of catecholamines and 6-hydroxydopamine by molecular oxygen : Effect of ascorbate. *Z. Naturforsch.*, 1997, 52c, 380-390.

ROUET P., ALEXANDROV K., MARKOVITS P., FRAYSSINET C., DANSETTE P.M. Metabolism of benzo[a]pyrene by brain microsomes of fetal and adult rats and mice. Induction by 5,6-benzoflavone, comparison with liver and lung microsomal activities. *Carcinogenesis*, 1981, 2 (9), 919-926.

ROYET J.P., HUDRY J., ZALD D., GODINOT D., GREGOIRE M., LAVENNE F., COSTES N., HOLLEY A. Functional neuroanatomy of different olfactory judgments. *Neuroimage*, 2001, 13, 506-519.

S

SABOLOVIC N., MAGDALOU J., NETTER P., ABID A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells: identification of the UDP-glucuronosyltransferases UGT1A6, 1A3 and 2B7. *Life Sci.*, 2000, 67 (2), 185-196.

SAKANE T., AKIZUKI M., YAMASHITA S., SEZAKI H., NADAI T. Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47 (5), 379-381.

SAVIC I. Processing of odorous signals in humans. *Brain Res. Bull.*, 2001, 54 (3), 307-312.

SCHAEREN-WIEMERS N., VAN DER BIJL P., SCHWAB M.E. The UDP-galactose: Ceramide galactosyltransferase: Expression pattern in oligodendrocytes and schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *J. Neurochem.*, 1995, 65, 2267-2278.

SCHANDAR M., LAUGWITZ K.L., BOEKHOFF I., KRONER C., GUDERMANN T., SCHULTZ G., BREER H. Odorants selectively activate distinct G protein subtypes in olfactory cilia. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 (27), 16669-16677.

SCHIFFMAN S.S. Taste and smell losses in normal aging and disease. *JAMA*, 1997, 278 (16), 1357-1362.

SCHOENFELD T.A., CLANCY A.N., FORBES W.B., MACRIDES F. The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: receptor neuron projections to the main olfactory bulb. *Brain Res. Bull.*, 1994, 34 (3), 183-210.

SCHULTE S., STOFFEL W. Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: Purification, cloning, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, 90, 10265-10269.

SEGAL M. Transport of nutrients across the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.*, 2001, 52, 38-48.

SHEPHERD G.M. Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. *Neuron*, 1994, 13 (4), 771-790.

SMITH D., DUNCAN H. Primary olfactory disorders: anosmia, hyposmia, and dysosmia. *Science of olfaction*, edited by Serby and Chobor, 1992, 439-466.

SPAHN-LANGGUTH H., BENET L.Z. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as detoxification mechanism? *Drug Metab. Rev.*, 1992, 24 (1), 5-47.

SPINELLI S., RAMONI R., GROLLI S., BONICEL J., CAMBILLAU C., TEGONI M. The structure of monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochem.*, 1998, 37 (22), 7913-7918.

STERN K., McCLINTOCK M.K. Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature*, 1998, 392 (6672), 177-179.

STRASSBURG C., NGUYEN N., MANNS M., TUKEY R. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*, 1999, 116, 149-160.

STROLIN-BENEDETTI M. Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam. Clin. Pharm.*, 2001, 15, 75-84.

SULEMAN F., ABID A., GRADINARU D., DAVAL J.L., 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.*, 1998, 358 (1), 63-67.

SULEMAN F., GHERSI-EGEA J.F., LEININGER-MULLER B., MINN A. Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes. *Neurosci. Lett.*, 1993, 161 (2), 219-222.

SUTHERLAND L., BIN SENAFI S., EBNER T., CLARKE D.J., BURCHELL B. Characterisation of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase stably expressed in hamster lung fibroblast cell cultures. *FEBS Lett.*, 1992, 308 (2), 161-164.

T

TAMURA H., MIYAWAKI A., ONOH N., HARADA Y., MIKOSHIBA K., MATSUI M. High sulfotransferase activity for phenolic aromatic odorants present in the mouse olfactory organ. *Chem Biol. Interact.*, 1997, 104, 1-9.

TANIGAWARA Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther. Drug Monit.*, 2000, 22 (1), 137-140.

TEDFORD C.E., RUPERTO V.B., BARNETT A. Characterization of a rat liver glucuronosyltransferase that glucuronidates the selective D1 antagonist, SCH 23390, and other benzazepines. *Drug Metab. Dispo.*, 1991, 19 (6), 1152-1159.

TEGONI M., PELOSI P., VINCENT F., SPINELLI S., CAMPANACCI V., GROLLI S., RAMONI R., CAMBILLAU C. Mammalian odorant binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 2000, 1482, 229-240.

TEGONI M., RAMONI R., BIGNETTI E., SPINELLI S., CAMBILLAU C. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, 3 (10), 863-867.

TERRIER N., BENOIT E., SENAY C., LAPICQUE F., RADOMINSKA-PANDYA A., MAGDALOU J., FOURNEL-GIGLEUX S. Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are target of ketoprofen acylglucuronide. *Mol. Pharmacol.*, 1999, 56 (1), 226-234.

TSAI K.L., WANG S.M., CHEB C.C., FONG T.H., WU M.L. Mechanism of oxidative stress-induced intracellular acidosis in rat cerebellar astrocytes and C6 glioma cells. *J. Physiol.*, 1997, 502 -Pt 1), 161-174.

V

- VAN ASPEREN J., MAYER U., VAN TELLINGEN O., BEIJNEN J.H. The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86 (8), 881-884.
- VAN DER GEEST R., KRUGER P., GUBBENS-STIBBE J.M., VAN LAAR T., BODDE H.E., DANHOF M. Assay of R-apomorphine, S-apomorphine, apocodeine, isoapocodeine and their glucuronide and sulfate conjugates in plasma and urine of patients with Parkinson's disease. *J. Chromato. (B) Biomed. Sci. Appl.*, 1997, 702 (1-2-), 131-141.
- VASSAR R., NGAI J., AXEL R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 1993, 74 (2), 309-318.
- VIENNEAU D.S., DEBONI U., WELLS P.G. Potential genoprotective role for UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis: initiation of micronuclei by benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene in UDP-glucuronosyltransferase-deficient cultured rat skin fibroblasts. *Cancer Res.*, 1995, 55 (5), 1045-1051.
- VILLARD P.H., HERBER R., SEREE E.M., ATTOLINI L., MAGDALOU J., LACARELLE B. Effect of cigarette smoke on UDP-glucuronosyltransferase activity and cytochrome P450 content in liver, lung and kidney microsomes in mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 1998, 82 (2), 74-79.
- VOGL A., NOE J., BREER H., BOEKHOFF I. Cross-talk between olfactory second messenger pathways. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267 (14), 4529-4535.
- VOIROL P., JONZIER-PEREY M., PORCHET F., REYMOND M., JANZER R., BOURAS C., STROBEL H., KOSEL M., EAP C., BAUMANN P. Cytochrome P450 activities in human and brain microsomes. *Brain Res.*, 2000, 855, 235-243.
- VORE M., MONTGOMERY C., MEYERS M. Steroid D-ring glucuronides: Characterization of a new class of cholestatic agents. *Drug Metab. Rev.*, 1983, 14 (5), 10005-1019

W

- WALTHER B., GHERSI-EGEA J.F., JAYYOSI Z., MINN A., SIEST G. Ethoxyresorufin *O*-deethylase activity in rat brain subcellular fractions. *Neurosci. Lett.*, 1987, 76, 58-62.
- WANG P.C., KUCHEL O., BUU N.T., GENEST J. Catecholamine glucuronidation: an important metabolic pathway for dopamine in the rat. *J. Neurochem.*, 1983, 40 (5), 1435-1440.
- WANG Q., HASAN G., PIKIELNY C. Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of drosophila melanogaster, the antennae. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 (15), 10309-10315.
- WIJNHOLDS J., DE LANGE E., SCHEFFER G., VAN DEN BERG D.J., MOL C., VAN DER VALK M., SCHINKEL A., SCHEPER R., BREIMER D., BORST P. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contribute to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Clin. Invest.*, 2000, 105 (3), 279-285.
- WIJNHOLDS J., SCHEFFER G., VAN DER VALK M., VAN DER VALK P., BEIJNEN J., SCHEPER R., BORST P. Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and testicular tubules against drug-induced damage. *J. Exp. Med.*, 1998, 188 (5), 797-808.

WILLER J.C., DE BROUCKER T., BUSSEL B., ROBY-BRAMI A., HARREWYN J.M. Central analgesic effect of ketoprofen in humans : electrophysiological evidence for a supraspinal mechanism in a double-blind and cross-over study. *Pain*, 1989, 38, 1-7.

WILSON J. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, 75, 1149-1163.

WIXTROM R.N., HAMMOCK B.D. Membrane-bound and soluble-fraction epoxide hydrolases. Methodological aspects. *Biochem. Pharmacol. Toxicol.*, eds Zakim D, Vessey DA, 1, New York: John Wiley, 1985, 1-93.

WRIGHT S.R., BOAG A.H., VALDIMARSSON G., HIPFNER D.R., CAMPLING B.G., COLE S.P., DEELEY R.G. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clin. Cancer Res.*, 1998, 4 (9), 2279-2289.

WU A., PANGALOS M.N., EFTHIMIOPOULOS S., SHIOI J., ROBAKIS N.K. Appican expression induced morphological changes in C6 glioma cells and promotes adhesion of neuronal cells to extracellular matrix. *J. Neuroscience*, 1997, 17, 4987-4993.

Y

YOKOE H., ANHOLT R.R. Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 (10), 4655-4659.

YOSHIHARA Y., MORI K. Basic principles and molecular mechanisms of olfactory axon pathfinding. *Cell Tissue Res.*, 1997, 290(2), 457-463.

Z

ZALD D., PARDO J. Functional neuroimaging of the olfactory system in humans. *Int. J. Psychophysiol.*, 2000, 36, 165-181.

Prénom, Nom :

Séverine LECLERC



Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 27 DEC. 2001 n° 612

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Claude BURLET

RESUME

L'odorat est un sens fondamental dans le règne animal, parce qu'il sert à reconnaître ou détecter la nourriture, les prédateurs et les partenaires sexuels permettant la survie des espèces. Pour beaucoup d'entre elles, les odeurs permettent de communiquer efficacement et d'interpréter l'environnement. La perception olfactive est divisée en deux étapes : la reconnaissance de l'odeur et son traitement neuronal. La première étape s'effectue au niveau de l'épithélium olfactif qui tapisse les fosses nasales. L'information olfactive est ensuite transmise sous la forme d'un signal électrique aux bulbes olfactifs puis à des zones spécifiques du cerveau. La présence d'UDP-glucuronosyltransférases (UGT) a été détectée dans la muqueuse olfactive de bœuf et de rat par Lazard *et al* (1990). Ces enzymes impliquées dans la biotransformation de substances intracellulaires et dans le métabolisme des médicaments moduleraient la concentration de molécules odorantes au niveau de l'épithélium olfactif et l'interaction de ces molécules avec leurs récepteurs.

Dans cette étude, nous avons caractérisé le rôle des UGT dans le système olfactif. Nous avons, dans un premier temps, identifié et déterminé l'expression des isoformes UGT2A1 et UGT1A6, dans la muqueuse olfactive, les bulbes olfactifs et le cerveau, par RT-PCR quantitative, puis nous avons localisé ces isoformes par hybridation *in situ*. Dans un deuxième temps, les activités de glucuronoconjugaison envers de nombreux substrats (molécules odorantes, catéchols et anti-inflammatoires non stéroïdiens) ont été mises en évidence par chromatographie sur couche mince dans ces tissus. Ces études ont été réalisées au cours du développement, du stade post-natal au stade adulte, chez le rat. Les résultats ont montré une glucuronoconjugaison très supérieure dans la muqueuse olfactive par rapport aux bulbes olfactifs et au cerveau. De plus, cette activité qui est la plus élevée de l'organisme suggère un rôle important de la glucuronoconjugaison dans le système olfactif, voie d'entrée de nombreux xénobiotiques vers le système nerveux central. Nous avons également caractérisé la glucuronoconjugaison cérébrale, cette activité métabolique pouvant moduler la toxicité ou l'efficacité des médicaments pénétrant dans le SNC. Nous avons donc déterminé, sur un modèle cellulaire *in vitro*, la culture primaire d'astrocytes, la glucuronoconjugaison de catéchols (neurotransmetteurs et des médicaments) et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Nous montrons finalement que la plupart des catéchols sont glucuronoconjugués à l'exception des neurotransmetteurs. En revanche, un faible métabolisme est détecté pour les AINS, le kétoprofène étant le mieux conjugué. Les UGT cérébrales permettraient ainsi une détoxification des catéchols mais ne modifieraient pas l'efficacité des AINS.