



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 POINCARE – NANCY I

2008

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 28 novembre 2008

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

HENRI POINCARE – NANCY I

Mention Science du Médicament

Par

Dong LI

Titulaire de diplôme d'Etudes Approfondies

Microbiologie, Enzymologie et Nutrition

Sujet :

Etudes Structurales et Fonctionnelles des UDP-glucuronosyltransférases

Humaines de la Famille 1A

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : Monsieur le Professeur Michael WH COUGHTRIE, Dundee, UK

Monsieur le Professeur Etienne BENOIT, Lyon

Juges : Monsieur le Professeur Karl Walter BOCK, Tübingen, Allemagne

Monsieur le Docteur Eric BATTAGLIA (MCU), Metz

Monsieur le Docteur Mohamed OUZZINE (DR2 INSERM), Vandoeuvre-lès-Nancy

Monsieur le Docteur Jacques MAGDALOU (DR1 CNRS), Vandoeuvre-lès-Nancy

Membre invité : Madame le Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX (DR2 INSERM), Vandoeuvre-lès-Nancy

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Pharmacologie Moléculaire, Structure-Fonction de l'UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy-1, sous la responsabilité scientifique de Jacques Magdalou et Mohamed Ouzzine.

Il a bénéficié du financement de l'IFR 111 Bioingénierie et du Contrat Plan Etat-Région « Protéines d'Intérêt Thérapeutique ».

Il a bénéficié également d'échanges fructueux avec les équipes de :

- Professeurs Brian Burchell, Michael WH Coughtrie, Université de Dundee, UK**
- Professeur Anna Radomska, Université de Little-Rock, AR, USA**
- Docteur Moshe Finel, Université d'Helsinki, Finlande**

Remerciements

A Messieurs le Professeur Michael WH Coughtrie et le Professeur Etienne Benoit, qui ont accepté d'évaluer cette thèse en qualité de rapporteur. Qu'ils acceptent ici mes remerciements les plus respectueux.

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

A Monsieur le Professeur Karl Walter Bock et le Docteur Eric Battaglia, qui ont eu la gentillesse d'accepter d'être membre du jury. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Jacques Magdalou pour m'avoir accueilli au laboratoire. Je tiens à le remercier pour sa disponibilité et son encadrement tout au long de ces années ; sans lui, je ne serais pas là aujourd'hui. Je tiens également à le remercier pour ses conseils toujours avisés, sa grande expérience scientifique et son soutien quotidien. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Mohamed Ouzzine pour la qualité de son encadrement et sa grande disponibilité. Je tiens à le remercier pour ses conseils, son soutien et son engagement au quotidien dans mes travaux. Je tiens également à le remercier de toutes les connaissances techniques qu'il m'a transmises. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements sincères et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux pour avoir accepté d'être membre du jury. Je tiens à la remercier pour la qualité de ses conseils et sa gentillesse sans limite. Qu'elle trouve ici l'expression de remerciements sincères.

A Monsieur le Docteur Guillermo Mulliert pour ses conseils en modélisation moléculaire. Qu'il trouve ici l'assurance de mes sincères remerciements.

A Lydia Barré pour son amitié et son soutien quotidien. Je tiens également à la remercier de toutes les connaissances techniques qu'elle m'a transmises. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance pour son implication dans ce travail et l'expression de mes plus vifs remerciements.

A Nadia Bezaï pour son aide précieuse au montage du manuscrit.

Je remercie également Catherine Bui, Ibtissam Talhaoui, Jean-Baptiste Vincourt, Sandrine Gulberti, Magali Fondeur-Gelinotte, Marie Hélène Piet, Virginie Lattard, Franck Daligault pour leur collaboration quotidienne et leur sympathie, ainsi que l'ensemble du personnel de l'UMR 7561.

A mes parents et ma tante

A toute ma famille

A mes amis

A Rong



Sommaire

Contexte et buts du travail	17
Chapitre I. Le métabolisme des xénobiotiques : place des	
UDP-glucuronosyltransférases	19
I.1. Le métabolisme des xénobiotiques	19
I.1.1. Biotransformation des xénobiotiques	19
I.1.2. Propriétés générales des enzymes du métabolisme des xénobiotiques	21
I.1.3. Les réactions de fonctionnalisation (phase I)	22
I.1.4. Les réactions de conjugaison (phase II)	22
I.2. La glucuroconjugaison et les UDP-glucuronosyltransférases	24
I.2.1. La réaction de glucuroconjugaison	27
I.2.2. La famille des UGTs	30
I.2.3. Nomenclature	31
I.2.4. La superfamille multigénique des UGTs	33
I.2.4.1. La famille UGT1A	33
I.2.4.2. La famille UGT2	38
I.3. Propriétés générales des UGTs	39
I.3.1. Spécificité de substrat de la famille 1A	39
I.3.2. Spécificité de substrat de la famille 2B	40
I.4. Organisation structurale et fonctionnelle des UGTs dans les membranes du réticulum	
endoplasmique	42
I.4.1. Structure primaire des UGTs	42
I.4.2. Topologie membranaire	43
I.4.3. Implication de transporteurs membranaires dans la fonction des UGTs	44
I.4.4. Organisation oligomérique des UGTs	46

Chapitre II. Etudes fonctionnelles, mécanistiques et structurales de l'UGT1A6 humaine	47
II.1. Rôle de l'UGT1A6	47
II.2. Structure de l'UGT1A6	48
II.3. Le marquage par des sondes de photoaffinité	50
II.4. Les modifications chimiques et mutagenèse dirigée	50
Chapitre III. Expression des UGTs dans les chondrocytes	54
III.1. Glucuroconjugaison des AINS carboxyliques et du paracétamol.....	55
III.2. Effets de l'estradiol sur le cartilage articulaire chez l'homme	58
III.3. Métabolisation des estrogènes.....	60
III.4. La glucuroconjugaison des estrogènes	60
But du travail et stratégie utilisée	63
Chapitre IV. Matériels et Méthodes	64
IV.1. Matériels.....	64
IV.1.1 Réactifs biochimiques	64
IV.1.2. Réactifs de biologie cellulaire	66
IV.1.3. Réactifs de biologie moléculaire	66
IV.2. Culture cellulaire (Isolement et culture des chondrocytes).....	67
IV.3. Expression hétérologue de l'UGT recombinante chez la levure <i>Pichia pastoris</i> (<i>P. pastoris</i>)	67
IV.3.1. Système d'expression.....	67
IV.3.2. Constructions des plasmides	68
IV.3.3. Mutagenèse dirigée	70
IV.3.4. Transformation de bactéries et préparation d'ADN plasmidique	74
IV.3.4.1. Transformation de bactéries compétentes	74
IV.3.4.2. Mini-préparation d'ADN plasmidique.....	74
IV.3.4.3. Maxi-préparation d'ADN plasmidique	75

IV.3.4.4. Préparation des levures <i>P. pastoris</i> compétentes	75
IV.3.4.5. Transformation de la levure <i>Pichia pastoris</i>	76
IV.3.5. Culture de levures	77
IV.4. Analyse des Protéines	77
IV.4.1. Préparation d'homogénat de chondrocytes	77
IV.4.2. Préparation des microsomes de levure <i>Pichia pastoris</i>	77
IV.4.3. Dosage des protéines	78
IV.4.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	78
IV.4.5. Electrotransfert	79
IV.4.6. Immunoblot	79
IV.4.7. Dosage de l'activité de glucuroconjugaison	80
IV.4.7.1. Dosage de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-méthylumbelliféron	80
IV.4.7.2. Glucuroconjugaison d'autres phénols : Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	81
IV.4.8. Cinétique enzymatique	82
IV.4.9. Modification chimique des résidus carboxyliques par le DCCI	82
IV.4.10. Alignement de séquences et structure secondaire	84
IV.5. RT-PCR	84
IV.5.1. Extraction des ARN totaux	84
IV.5.2 Transcription inverse des ARNm (RT)	85
IV.5.3 PCR semi-quantitative	85
Chapitre V. Résultats	88
A. Identification des acides aminés responsables de la catalyse et de la spécificité de substrat accepteur	88
V.1. Système d'expression dans <i>Pichia pastoris</i>	88
V.2. Alignement des séquences des UGTs pour la détermination des acides carboxyliques	

conservés	89
V.3. Analyse de l'effet des mutations des résidus aspartiques de l'UGT1A6 sur l'expression et l'activité enzymatique	91
V.3.1. Analyse de l'expression de l'UGT1A6 sauvage et des mutants acide aspartique-alanine.....	91
V.3.2. Analyse de l'activité enzymatique de l'UGT1A6 sauvage et des mutants acide aspartique-alanine (mutations non conservatives).....	91
V.3.3. Détermination des constantes cinétiques de l'UGT1A6 sauvage et des mutants acide aspartique-alanine	94
V.3.4. Analyse de l'expression et de l'activité enzymatique des mutants acide aspartique-acide glutamique (mutations conservatives)	94
V.4. Analyse de l'effet des mutations des résidus glutamiques de l'UGT1A6 sur l'expression et l'activité enzymatique	96
V.4.1. Analyse de l'expression des mutants acide glutamique-alanine	96
V.4.2. Analyse de l'activité enzymatique des mutants acide glutamique-alanine ...	96
V.4.3. Détermination des constantes cinétiques des mutants acide glutamique-alanine	97
V.4.4. Analyse de l'expression et de l'activité enzymatique des mutants acide glutamique-acide aspartique.....	98
V.5. Modification chimique de l'UGT1A6 sauvage et des mutants par le DCCI.....	99
V.6. Analyse de l'importance D488 et D150 de l'UGT1A6 dans la fonction catalytique.....	102
V.6.1. Analyse du rôle du résidu D488	102
V.6.2. Analyse du rôle du résidu D150	104
V.7. Effet de la mutation du résidu D148 de l'UGT1A9 sur la fonction de l'enzyme	105
V.8. Importance du résidu D152 de l'UGT1A4 dans la fonction de l'enzyme.....	106
V.9. Effet de la mutation du résidu D151 de l'UGT1A1 sur la fonction de l'enzyme	107
V.10. Alignement de séquences des UGTs avec des glycosyltransférases GT-B cristallisées et exploration du rôle de l'histidine 38 (UGT1A6).....	109

V.10.1. Alignement de séquences au niveau du résidu 38 (UGT1A6)	109
V.10.2. Analyse du rôle du résidu His38 de l'UGT1A6	110
V.11. Analyse du rôle du résidu Pro40 de l'UGT1A4	113
V.12. Analyse du rôle du résidu His40 de l'UGT1A3	117
V.13. Analyse du rôle du résidu His39 de l'UGT1A1	120
V.14. La modélisation des UGTs	122
B. Expression des UGTs dans les chondrocytes	125
V.15. Identification des UGTs exprimées dans les chondrocytes par RT-PCR.....	125
V.16. Effet de Bap et TCDD sur l'expression des UGTs chondrocytaires	126
V.17. Analyse de l'expression des UGTs chondrocytaires par Western blot et l'activité de glucuronoconjugaison par CCM	127
Chapitre VI. Discussion	128
VI.1. Système d'expression : Pichia pastoris	128
VI.2. La comparaison UGTs/GTs	129
VI.3. Mécanisme réactionnel catalysé par l'UGT1A6 recombinante humaine	134
VI.3.1. Analyse du rôle des résidus carboxyliques conservés	135
VI.3.2. Analyse du rôle de résidu histidine conservés (His38 en UGT1A6)	140
VI.3.3. Autres résidus ou domaines importants pour l'activité des UGTs.....	143
VI.4. UGTs et chondrocytes.....	144
Chapitre VII. Conclusion et Perspectives	145
Références bibliographiques	146
Publication et communication issues de ce travail	168

Liste des illustrations

Figures :

Figure 1 : Principales voies de biotransformation des xénobiotiques et des molécules endogènes.....	21
Figure 2 : Fonctions physiologiques des UGTs et implications pharmacologiques et toxicologiques.....	25
Figure 3 : (A) Réaction de la synthèse de l'UDP-GlcA; (B) Réaction de glucuroconjugaison.....	28
Figure 4 : Dendogramme de la super famille multigénique des UGTs.....	32
Figure 5A : Représentation de l'organisation génétique du locus UGT1 humain.....	36
Figure 5B : Organisation du locus UGT2 humain.....	36
Figure 6 : Représentation des principaux domaines des UGTs.....	42
Figure 7 : Représentation de l'organisation membranaire des UGTs dans le RE.....	45
Figure 8 : Stratégies développées pour identifier les bases moléculaires de la glucuroconjugaison par l'UGT1A6.....	49
Figure 9 : Exemple de la glucuroconjugaison d'un AINS (kétoprofène).....	57
Figure 10 : Les différentes voies d'élimination du paracétamol avec la voie principale de la glucuroconjugaison.....	58
Figure 11 : Les différentes voies du métabolisme de l'estradiol.....	62
Figure 12 : Structure des substrats utilisés.....	65
Figure 13 : Stratégie de production des UGTs et de leurs mutants dans la levure méthyloprote P. pastoris.....	69
Figure 14 : Modification chimique des résidus acides carboxyliques par le DCCI.....	83
Figure 15: Alignement des séquences en acides aminés de quelques isoformes d'UGTs humaines et de rat.....	90

Figure 16 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide aspartique-alanine.	92
Figure 17 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide aspartique-acide glutamique.	95
Figure 18 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide glutamique-alanine. ...	97
Figure 19 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide glutamique-acide aspartique.	98
Figure 20 : Cinétique d'inactivation de l'UDP-glucuronosyltransférase 1A6 recombinante humaine par le DCCI.	100
Figure 21 : Effet de la mutation du résidu D488 de l'UGT1A6.	103
Figure 22 : Modèle hypothétique de la topologie de l'UGT1A6 dans la membrane du RE. Position relative de D150 et D488.	103
Figure 23 : Effet de la mutation du résidu D150 de l'UGT1A6.	104
Figure 24 : Effet de la mutation du résidu D148 sur l'activité de l'UGT1A9.	105
Figure 25 : Effet de la mutation du résidu D152 sur l'activité de l'UGT1A4.	106
Figure 26 : Effet de la mutation du résidu D151 sur l'activité de l'UGT1A1.	108
Figure 27 : Alignement de séquences de l'UGT1A6 humaine avec des glycosyltransférases de structure GT-B au niveau de régions importantes pour la catalyse.	109
Figure 28 : Alignement de séquences des UGT1A au niveau de l'His38 de l'UGT1A6.	110
Figure 29 : Analyse par immunoblot de l'expression de divers mutants en position 38 de l'UGT1A6.	110
Figure 30 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A6.	111
Figure 31 : Influence de la mutation H38R sur la spécificité de substrat de l'UGT1A6.	112
Figure 32 : Influence de la mutation H38K sur la spécificité de substrat de l'UGT1A6.	113
Figure 33 : Alignement de séquences de l'UGT1A3 humaine avec l'UGT1A4 humaine.	114
Figure 34 : Analyse par immunoblot de l'expression des mutants en position 40 de l'UGT1A4.	114
Figure 35 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A4.	115
Figure 36 : Analyse de la spécificité de substrat du mutant P40H de l'UGT1A4.	116

Figure 37 : Analyse par immunoblot de l'expression des mutants en position 40 de l'UGT1A3.	117
Figure 38 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A3.....	118
Figure 39 : Effet de la substitution du résidu histidine en position 40 en proline sur l'activité de l'UGT1A3.....	119
Figure 40 : Analyse de l'expression des mutants en position 39 de l'UGT1A1 par immunoblot.	120
Figure 41 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A1.....	121
Figure 42 : Détermination de la spécificité de substrat du mutant UGT1A1, H39P.....	122
Figure 43 : Alignement de séquence primaire de l'UGT1A4 et la chaîne A de l'oléandomycine glycosyltransférase de <i>Streptomyces antibioticus</i>	123
Figure 44 : Alignement de séquence primaire de l'UGT1A4 et la chaîne A de l'UDP-glucose flavonoïde 3-O-glycosyltransférase de la vigne.....	124
Figure 45 : Analyse par RT-PCR afin d'identifier les UGTs présentes dans les chondrocytes	125
Figure 46 : Analyse de l'expression des ARNm des UGTs par RT-PCR dans les chondrocytes humains traités par le DMSO, le Bap et le TCDD pendant 6h.	126
Figure 47 : Les 2 types de mécanismes rencontrés dans la famille des glycosyltransférases	130
Figure 48 : Comparaison structurale et fonctionnelle des glycosyltransférases cristallisées de type GT-A et GT-B.	132
Figure 49 : Structure du domaine C-terminal de l'UGT2B7.....	134
Figure 50 : Prédiction de la structure 2D de l'UGT1A6 humaine à partir de la séquence primaire en utilisant plusieurs méthodes de calculs.	139
Figure 51 : Mécanisme réactionnel hypothétique de la glucuroconjugaison des phénols par l'UGT1A6.	143

Tableaux :

Tableau 1 : Fonctions chimiques pouvant être glucuroconjuguées.....	29
Tableau 2 : Structure chimique de différentes classes d'AINS.....	56
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.	71
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitative et longueurs des amplicons	87
Tableau 5 : Constantes cinétiques apparentes de l'UGT1A6 sauvage et des mutants vis-à-vis du substrat donneur (UDP-GlcA) et accepteur (4-MO).	93
Tableau 6 : Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'UGT1A6 et ses mutants actifs par DCCI.	101

Liste des abréviations

- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
- AZT : 3'azido-3'déoxythymidine
- Bap : Benzo[a]pyrène
- BCIP : *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*
- CCM : Chromatographie sur couche mince
- CE : Catécholestrogène
- COMT : Catéchol-*O*-méthyltransférase
- CYP450 : Cytochrome P450
- DCCI : *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide
- DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- DEPC : Diéthylpyrocarbonate
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- EDTA : Ethlène diamine tétraacétate
- E1 : Estrone
- E2 : Estradiol
- GST : Glutathion-*S*-transférase
- HDCA : Acide hydéoxycholique
- HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pinérazine éthane sulfonique
- 4-MO : 4-méthylumbelliféron
- NBT : *Nitro blue tetrazolium chloride*
- PAPS : 3'-phospho-adenosine-5'-phospho-sulfate
- PBS : *Phosphate Buffer Saline*
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- P. pastoris* : *Pichia pastoris*
- RE : Réticulum endoplasmique

SAM : S-adenosylméthionine

SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

ST : Sulfotransférase

SVF : Sérum de veau fœtal

TBST : *Tris buffer saline tween*

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine

UDP-GlcA : Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique

UGT : Uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase

XRE : Élément de réponse aux xénobiotiques

YPD : *Yeast extract*, peptone, D-glucose

Contexte et buts du travail

Ce travail s'inscrit dans la caractérisation structurale, mécanistique et fonctionnelle des UDP-glucuronosyltransférases humaines, thématique de recherche développée depuis longtemps au laboratoire.

Cette famille de glycosyltransférases joue un rôle déterminant dans le métabolisme des xénobiotiques, en particulier celui des médicaments. Son activité contribue de façon importante à moduler l'action pharmacologique ou toxicologique de ces substances.

Le travail comprend deux parties complémentaires :

1- Identification des acides aminés responsables de la catalyse et de la reconnaissance des substrats.

Nous nous sommes intéressés aux isoformes de la famille 1A, et plus particulièrement à l'isoforme recombinante humaine, l'UGT1A6. Cette enzyme est impliquée dans la biotransformation des phénols et exerce activement une barrière métabolique particulièrement efficace.

2- Identification et caractérisation des UGTs exprimés dans le chondrocyte humain.

Nous avons voulu déterminer quelles sont les isoformes d'UGTs présentes dans le chondrocyte, seule cellule du cartilage, et apprécier leur capacité à métaboliser des xénobiotiques, médicaments de type anti-inflammatoire et des substances hormonales qui affectent l'homéostasie de la matrice cartilagineuse.

Le travail effectué tire profit de l'approche pluridisciplinaire mise en place au laboratoire et plus récemment des informations structurales de premier plan disponibles dans la littérature à partir de glycosyltransférases cristallisées. Les résultats obtenus permettent une avancée importante dans la compréhension des mécanismes des UGTs et contribuent à fournir les

bases rationnelles pour améliorer l'efficacité des médicaments et prévenir la toxicité des xénobiotiques.

Chapitre I.

Le métabolisme des xénobiotiques : place des UDP-glucuronosyltransférases

I.1. Le métabolisme des xénobiotiques

L'homme est continuellement exposé à des substances naturellement présentes dans son environnement ou synthétisées de sa propre initiative (xénobiotiques, dont les médicaments, polluants, additifs alimentaires, toxiques). Afin de limiter l'accumulation de ces molécules étrangères, l'organisme a développé de multiples systèmes enzymatiques chargés de les transformer et souvent de les neutraliser. Ces mêmes enzymes sont également impliquées dans le métabolisme de substances endogènes et participent aux grandes fonctions biologiques.

I.1.1. Biotransformation des xénobiotiques

Après absorption (voies orale, nasale, percutanée...), les xénobiotiques, de nature généralement hydrophobe, se distribuent dans différents compartiments et organes de l'organisme où ils subissent une biotransformation en métabolites avant d'être éliminés. Ainsi de nombreux produits chimiques sont métabolisés, principalement dans le foie, les poumons et l'intestin. La peau, les reins et le cerveau participent également à cette transformation.

Les réactions de biotransformation ont été classées en deux principaux types par Williams (1959) :

- les réactions de phase I (fonctionnalisation) correspondent à des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, catalysées par des oxydoréductases (monooxygénases à cytochromes P450) et des hydrolases.

- les réactions de phase II (conjugaison) catalysée par des enzymes de conjugaison (transférases), conduisent à la production d'un conjugué hydrosoluble formé à partir du

xénobiotique fonctionnalisé ou d'un substrat endogène généralement hydrophobe et d'un co-substrat hydrophile.

La biotransformation est un processus généralement séquentiel qui permet la conversion de la molécule-mère en métabolites hydrophiles facilement excr tables dans l'urine ou la bile par l'intermédiaire de transporteurs plus ou moins spécifiques (phase III). Les voies principales de biotransformation chez l'homme sont présentées dans la figure 1. Cependant, pour certains xénobiotiques, une seule de ces réactions est utilisée. Par exemple le benzène subit d'abord une oxydation (réaction de phase I) pour former un phénol, qui se conjugue avec un sulfate (réaction de phase II) ; si le produit administré est un phénol, il y aura directement formation d'un sulfate sans qu'il y ait de réaction de phase I.

La biotransformation est considérée comme un mécanisme de détoxification par l'organisme. Cependant, dans certains cas, les métabolites sont plus toxiques que la molécule-mère et ces réactions sont qualifiées de "bioactivation".

La nature et l'intensité de la biotransformation d'un xénobiotique varient d'une espèce à l'autre, ce qui explique les différences de toxicité constatées entre espèces. L'âge et le sexe de l'animal, l'exposition à d'autres xénobiotiques peuvent également modifier la biotransformation.

La connaissance de l'ensemble des facteurs et des enzymes impliquées présente un intérêt majeur pour une conception rationnelle de médicaments et pour la prédiction de leur métabolisme et de leur toxicité chez l'homme.

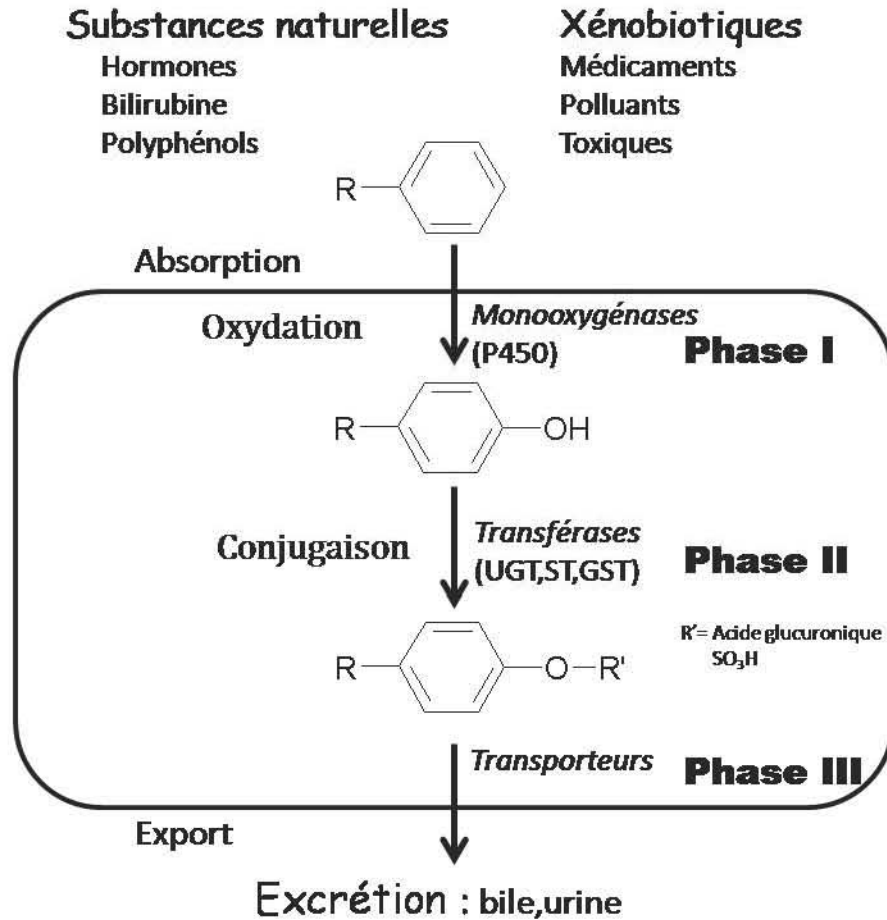


Figure 1 : Principales voies de biotransformation des xénobiotiques et des molécules endogènes. UGT, UDP-glucuronosyltransférase ; ST, Sulfotransférase ; GST, Glutathion-S-transférase.

I.1.2. Propriétés générales des enzymes du métabolisme des xénobiotiques

L'ensemble des enzymes du métabolisme des xénobiotiques présente un certain nombre de propriétés communes :

- Elles constituent des familles multigéniques d'enzymes avec l'expression de nombreuses isoformes.
- Elles contribuent généralement à l'augmentation de l'hydrophilie du xénobiotique facilitant son élimination dans les milieux biologiques aqueux.

- Elles sont responsables à la fois de réaction de détoxification et d'activation.
- Leur niveau d'expression est augmenté (induction) ou diminué (répression) par des médicaments ou des facteurs environnementaux (tabac, polluants).
- Leur expression varie au cours du développement.
- Elles présentent généralement un polymorphisme génétique (métaboliseur lent/rapide).
- Elles sont impliquées dans la biosynthèse et le métabolisme de substances endogènes (hormones, ligands de récepteurs, bilirubine).

I.1.3. Les réactions de fonctionnalisation (phase I)

Ces réactions sont principalement catalysées par les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP450) dépendantes. Ces complexes multienzymatiques, comprenant l'hémoprotéine CYP450 et la NADPH CYP450 réductase, permettent généralement l'oxydation du xénobiotique (introduction d'un atome d'oxygène) à partir d'une molécule d'oxygène en présence de cofacteur réducteur (NADPH). Le xénobiotique ainsi fonctionnalisé pourra subir les réactions de phase II. Il faut souligner la grande diversité des CYP450 humains. Plus de 60 isoformes ont été ainsi identifiées. Cependant, seule une dizaine d'entre-elles sont majoritairement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (CYP 1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4).

I.1.4. Les réactions de conjugaison (phase II)

Les réactions de phase II impliquent plusieurs types de substrats donneurs (hydrophile) qui peuvent former des métabolites (conjugués) avec les xénobiotiques ou leurs dérivés fonctionnalisés. Ces conjugués sont donc généralement plus hydrosolubles et plus facilement excrétables dans les liquides biologiques.

1- **La sulfoconjugaison** est catalysée par des sulfotransférases (ST). Ces enzymes se trouvent dans la fraction cytosolique du foie, du rein et de l'intestin. Le substrat donneur est le

PAPS (3'-phospho-adénosine-5'-phospho-sulfate). Les groupes fonctionnels nécessaires pour la formation de sulfates sont les phénols, les alcools aliphatiques et les amines aromatiques.

2- **La méthylation** est catalysée par des méthyltransférases. Le substrat donneur est la S-adénosylméthionine (SAM). Il faut remarquer que, dans ce cas, les produits méthylés formés sont moins hydrosolubles que les composés parentaux.

3- **L'acétylation** implique le transfert de groupements acétyles sur des amines aromatiques primaires, des hydrazines, des sulfonamides et certaines amines aliphatiques primaires. L'enzyme et le substrat donneur nécessaires sont respectivement les N-acétyltransférases et l'acétyl coenzyme A. Dans certains cas, comme pour l'isoniazide, l'acétylation provoque une diminution de la solubilité de l'amine et augmente sa toxicité.

4- **La conjugaison au glutathion** est catalysée par des glutathion S-transférases (GST) en présence de glutathion comme cofacteur. Les conjugués subissent ultérieurement une coupure enzymatique et une acétylation pour former des dérivés N-acétylcystéine (acides mercapturiques), facilement excrétés dans l'urine. Le glutathion peut se conjuguer avec des électrophiles réactifs qui se forment au cours de la biotransformation des xénobiotiques. Certains de ces métabolites peuvent réagir spontanément avec des constituants cellulaires (protéines, ADN) et causer la mort de la cellule ou induire la formation de tumeurs. Le rôle du glutathion est de réagir avec ces métabolites électrophiles et de prévenir ainsi leurs effets nocifs sur les cellules. Cependant, l'exposition à de grandes quantités de ces produits réactifs peut diminuer la quantité de glutathion disponible et provoquer des effets toxiques marqués.

5- **La glucuroconjugaison** est la forme de conjugaison la plus courante et la plus importante chez l'homme. Elle est catalysée par une famille d'enzyme, les UDP-glucuronyltransférase (UGTs), en présence de l'acide uridine-5'-diphospho- α -D-glucuronique (UDP-GlcA) comme substrat donneur. Les UGTs sont principalement localisées dans le réticulum endoplasmique (RE). Les substrats majeurs de ces enzymes sont représentés par quatre classes chimiques de substances : les alcools aliphatiques ou aromatiques, les acides carboxyliques, les composés soufrés et les amines (primaires, secondaires et tertiaires).

I.2. La glucuroconjugaison et les UDP-glucuronosyltransférases

La glucuroconjugaison est quantitativement la plus importante des réactions de phase II. Elle est considérée comme une voie de détoxification puissante développée par l'homme et les autres espèces animales afin de neutraliser et d'éliminer de l'organisme les composés toxiques présents dans l'environnement. En effet, les UGTs interviennent de façon prépondérante dans le métabolisme des polluants, des pesticides, des additifs alimentaires et des médicaments (Fig. 2). Un grand nombre de classes thérapeutiques majeures (anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), hypolipémiant, antiviraux) est métabolisé principalement sous forme de glucuronides pharmacologiquement inactifs. C'est le cas du 3'azido-3'déoxythymidine (AZT) dont le métabolisme rapide en glucuroconjugué inactif rend nécessaires des administrations répétées du médicament pour maintenir des concentrations thérapeutiques efficaces (Haumont *et al.*, 1990 ; Barbier *et al.*, 2000a). La glucuroconjugaison joue donc un rôle important dans la biodisponibilité des agents thérapeutiques. La majorité des substances biotransformées par cette famille d'enzymes est inactivée de cette façon. Il existe cependant des exceptions où l'ajout d'acide glucuronique augmente l'effet pharmacologique. C'est le cas de la morphine. Ainsi, l'activité analgésique de la morphine-6-glucuronide est 20 fois plus importante que celle de la morphine non conjuguée (Coffman *et al.*, 1997).

Les UGTs interviennent également dans la biotransformation de nombreux composés endogènes. L'élimination de la bilirubine, produit toxique issu de dégradation de l'hémoglobine et des hémoprotéines, se fait exclusivement par glucuroconjugaison. Des perturbations dans l'expression de l'isoforme UGT1A1 prenant en charge cette molécule peuvent conduire à une concentration plasmatique en bilirubine anormalement élevée, sans conséquences cliniques importantes dans la maladie de Gilbert (Debinski *et al.*, 1996), mais plus grave dans le cas du syndrome de Crigler-Najjar (Crigler et Najjar, 1952).

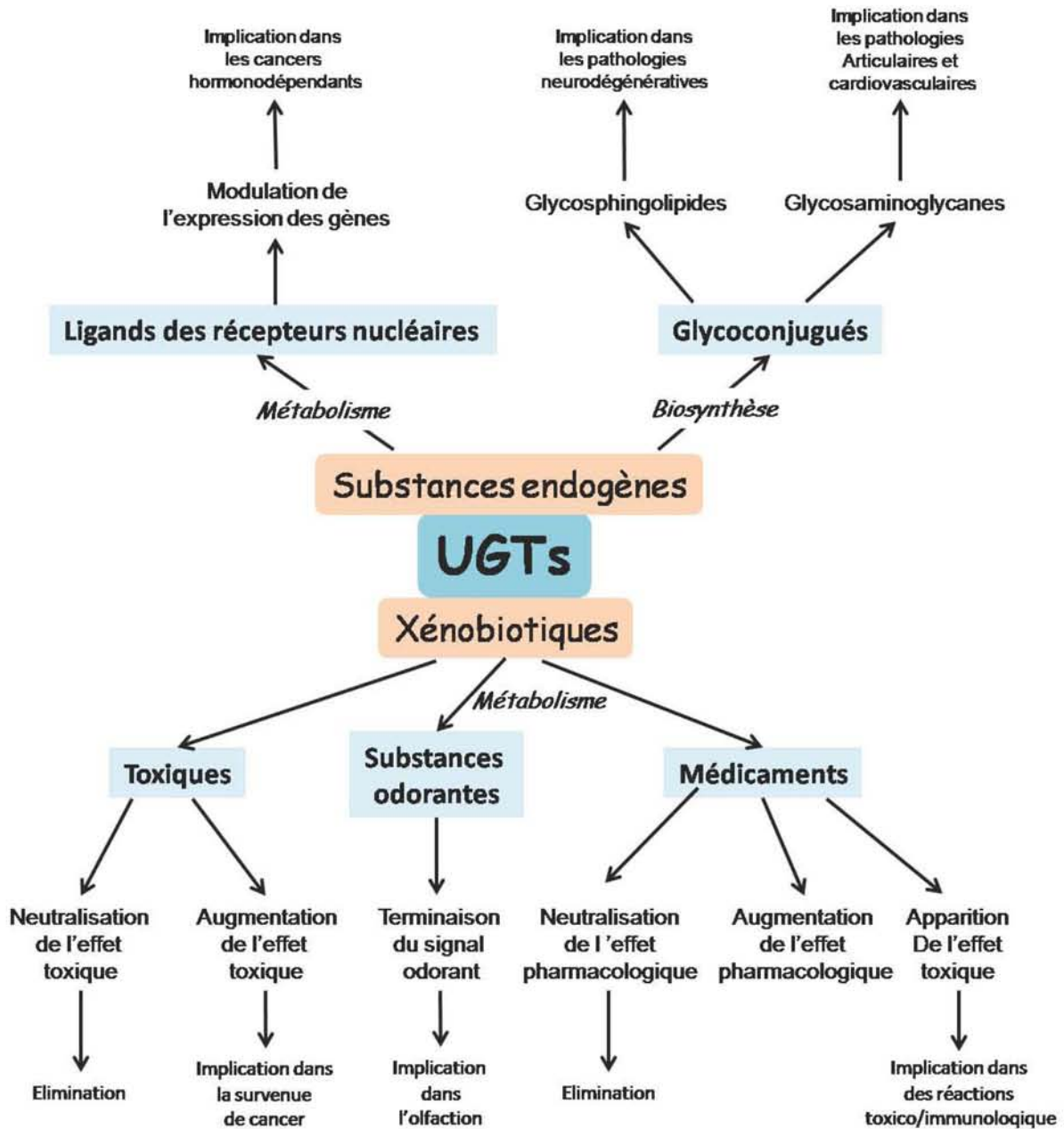


Figure 2 : Fonctions physiologiques des UGTs et implications pharmacologiques et toxicologiques. Les UGTs sont un carrefour obligé pour le métabolisme de nombreuses substances ayant des effets divers sur l'organisme.

Certains ligands des récepteurs nucléaires impliqués dans l'activation des gènes tels que l'acide rétinoïque, les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, les acides gras à courte chaîne sont également substrats des UGTs (Xie W *et al.*, 2003). Par conséquent, les UGTs contribuent à l'homéostasie du taux de ces substances dans l'organisme (Mackenzie, 1986), modulant ainsi la concentration d'agents responsables de la croissance et de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, des molécules odorantes telles que le bornéol ou l'eugénol sont activement glucuroconjugées par l'UGT2A1, exprimée de façon spécifique dans la muqueuse nasale (Lazard *et al.*, 1991), ce qui aurait pour conséquence de diminuer l'activité adénylate cyclase stimulée par ce type de molécules et de terminer la transduction de signaux correspondants à l'odeur.

Enfin, certaines UGTs interviennent dans la biosynthèse de macromolécules par insertion d'un motif acide glucuronique sur des molécules polysaccharidiques de type protéoglycanes. L'organisation des protéoglycanes au sein des matrices extracellulaires et leurs interactions avec des molécules telles que les facteurs de croissance conditionnent des activités cellulaires diverses (prolifération, différenciation, adhérence, migration). Certaines formes d'UGTs, localisées dans l'appareil de Golgi, travaillent de concert avec d'autres glycosyltransférases et sont particulièrement impliquées dans la synthèse des glycosaminoglycanes, constituants majeurs des protéoglycanes (Lind *et al.*, 1997). Ainsi le niveau d'expression des UGTs pourrait être associé à l'apparition de pathologies liées à des modifications qualitatives et quantitatives du métabolisme des protéoglycanes (atteintes articulaires, progression tumorale, athérosclérose, fibrose). Les UGTs participent également à la synthèse des glycosphingolipides du système nerveux central et périphérique (glycoprotéines de la myéline des axones) qui sont la cible d'auto-anticorps développés lors de neuropathies dégénératives (Das *et al.*, 1991).

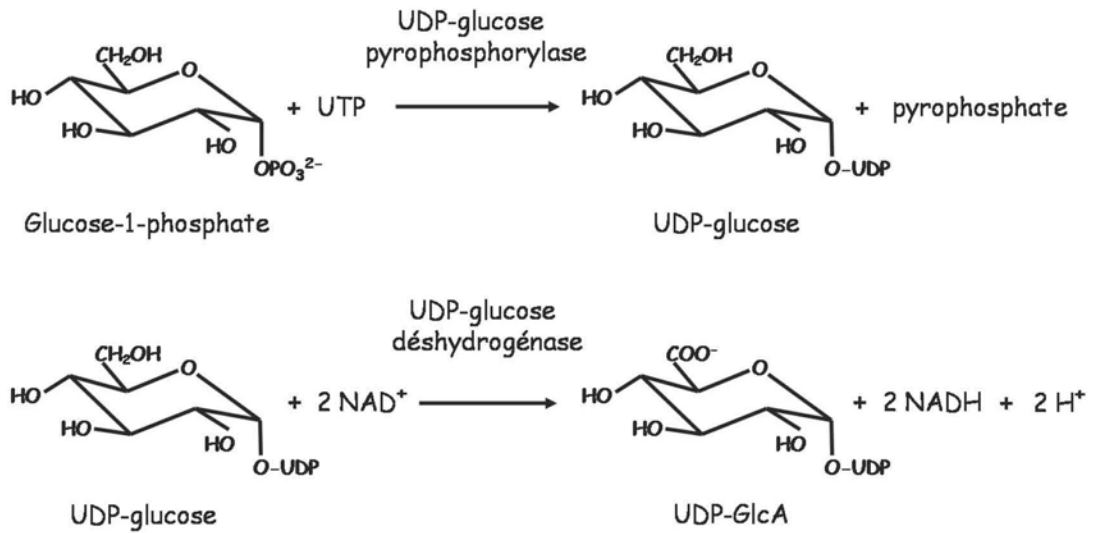
Par conséquent, il apparaît que le rôle des UGTs est multiple. Il ne se limite pas à des actions pharmacologiques et toxicologiques. Elles sont également impliquées dans des processus physiologiques de première importance.

I.2.1. La réaction de glucuroconjugaison

La réaction de glucuroconjugaison est une réaction de condensation qui fait intervenir deux substrats : un substrat donneur commun à l'ensemble des isoformes, l'UDP-GlcA, et des substrats accepteurs de structures diverses appelés aglycones (médicaments, acides gras, polluants, xénobiotiques) possédant un groupement nucléophile. Cette biotransformation a lieu principalement dans le foie mais sa présence est détectée dans de nombreux organes et tissus tels que les reins, la muqueuse intestinale et gastrique, les poumons, le cerveau et la peau. Elle a lieu à l'échelle cellulaire au niveau du RE et probablement de la membrane nucléaire (Kitchin *et al.*, 1984 ; Koster *et al.*, 1985 ; Radomska-Pandya *et al.*, 1999). L'UDP-GlcA représente la forme activée de l'acide α -D-glucuronique. Il est synthétisé en deux étapes dans le cytoplasme (Fig. 3A). La première étape, catalysée par une phosphorylase (EC 2.7.7.9), correspond à la formation de l'UDP-glucose à partir des précurseurs, le glucose-1-phosphate et l'UTP. L'UDP-glucose est oxydé en UDP-GlcA lors de la deuxième étape par une deshydrogénase (EC 1.1.1.22) en présence de NAD^+ (Dutton, 1966).

La glucuroconjugaison consiste en une attaque nucléophile d'un hétéroatome (O, N, S) de l'aglycone sur le carbone C1 de l'acide α -D-glucuronique. La réaction conduit selon un mécanisme de substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}2$ à la formation d'un β -D-glucuronide avec inversion de configuration et à la libération de l'UDP, facilitée par la présence de magnésium (Fig. 3B). La fixation du groupement glucuronate a pour conséquence d'augmenter l'hydrophilie de l'aglycone. La nature des substrats conjugués étant très variée (alcools, acides carboxyliques, amines, thiols), les produits de glucuroconjugaison sont alors respectivement des éther-glucuronides, des acyl(esters)glucuronides (O-glucuronides), des N-glucuronides ou encore des S-glucuronides (Tableau 1).

A



B

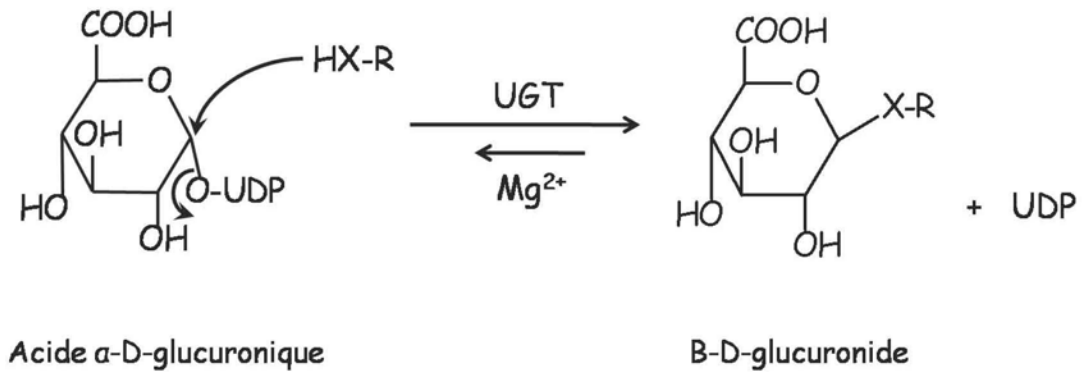


Figure 3 : (A) Réaction de la synthèse de l'UDP-GlcA; (B) Réaction de glucuronoconjugaison (HX-R = aglycone) (d'après Dutton, 1966).

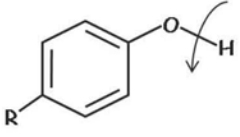
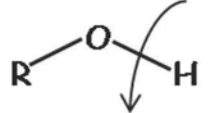
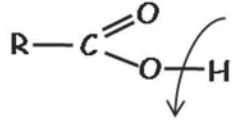
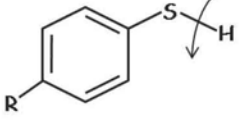
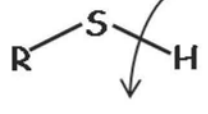
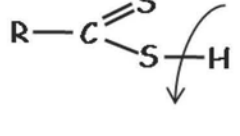
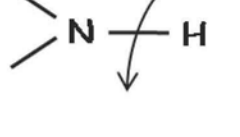
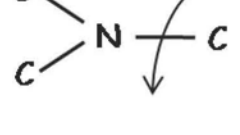
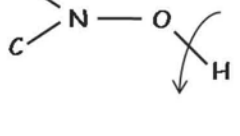
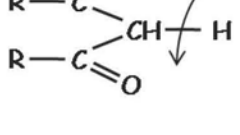
Nature du glucuronide	Fonctions	Classe chimique	Exemples
O-glucuronides		Phénols Catéchols	<i>4-Méthylombelliférone</i> <i>Tétrachlorocatéchol</i> <i>4-Nitrophénol</i> <i>Resvératrol</i>
		Alcool Enol	<i>Menthol</i> <i>Oxazéпам</i>
		Acide carboxylique	<i>AINS</i> <i>Bilirubine</i> <i>Rétinoïdes</i> <i>Acides biliaires</i>
S-glucuronides		Thiophénol	<i>Thiophénol</i>
		Thiol	<i>2-Mercapto- benzothiazole</i>
		Acide carbamique	<i>Acide diéthylthio- carbamique</i>
N-glucuronides		Amine aromatique Hydroxylamine	<i>Aniline</i>
		Amine tertiaire	<i>Cyproheptadine</i> <i>Trifluoroperazine</i>
		Hydroxylamine	<i>N-hydroxy-2- naphtylamine</i>
C-glucuronides		1,3-Dicarbonyle	<i>Sulfinpyrazone</i> <i>Phénylbutazone</i>

Tableau 1 : Fonctions chimiques pouvant être glucuroconjuguées.

En général, les β -D-glucuronides formés sont des métabolites chimiquement stables, en particulier les éther-glucuronides. En revanche, les acylglucuronides formés à partir de composés à groupement carboxyle sont des entités électrophiles réactives instables à pH physiologique. C'est le cas des acylglucuronides formés à partir des AINS de la série des profènes (possédant un motif acide 2-phénylpropionique comme le kétoprofène). Cette réactivité conduit à la formation d'adduits covalents aux protéines qui seraient à l'origine de manifestations allergiques *via* la formation d'anticorps, voire de chocs anaphylactiques que l'on rencontre lors de l'utilisation de cette classe de composés (Spahn-Langguth et Benet, 1992). Terrier *et al.* (1999) ont montré que les UGTs elles-mêmes pouvaient être la cible du glucuronide de kétoprofène. Il a été également suggéré que les acylglucuronides pourraient être à l'origine d'une génotoxicité par formation d'adduits sur l'ADN (Sallustio *et al.*, 1997).

I.2.2. La famille des UGTs

Le clonage des ADNc des UGTs a définitivement démontré l'existence de nombreuses isoformes. L'expression hétérologue dans des lignées cellulaires eucaryotiques a été la technique la plus appropriée pour étudier les propriétés des différentes UGTs (Harding *et al.*, 1988 ; Fournel-Gigleux *et al.*, 1991). Ces études ont permis de déterminer la spécificité de substrat de chacune des UGTs clonées.

Les UGTs sont codées par une superfamille de gènes ayant évolué par duplication conversion génique à partir d'un gène ancestral commun. En effet, des séquences homologues ont été trouvées chez les mammifères, les plantes et les bactéries. Actuellement, il a été recensé plus de 115 ADNc codant pour des UGTs animales, végétales ou de microorganismes. Ceci a justifié la mise en place d'une nomenclature officielle similaire à celle utilisée pour les CYP450, basée sur le pourcentage d'homologie. Ainsi, chez l'homme, deux familles principales ont été identifiées sur la base des homologues de séquences en acide aminés prédites à partir des ADNc. La famille 1A comprend les isoformes conjuguant essentiellement les phénols, les hydroxyquinones et la bilirubine. Les membres de la famille 2 sont plus hétérogènes et

correspondent aux UGTs responsables de la conjugaison de molécules odorantes (2A) et aux UGTs responsables de la conjugaison des stéroïdes, des acides biliaires et des acides carboxyliques (2B).

I.2.3. Nomenclature

A ce jour, 19 UGTs ont été identifiées chez l'homme, et la comparaison des séquences protéiques a mené à la définition de deux familles (UGT1 et UGT2) et trois sous-familles (UGT1A, UGT2A et UGT2B) identifiées par une lettre suivie d'un chiffre, permettant de distinguer chacune des enzymes (Mackenzie *et al.*, 2005). Les membres de familles différentes présentent moins de 50% d'homologie de séquence, alors qu'à l'intérieur d'une même famille, l'homologie est supérieure à 50%. L'homologie des membres d'une même sous-famille doit être supérieure à 60%. Il est suggéré d'utiliser l'abréviation UGT, non plus seulement pour les UDP-glucuronosyltransférases, mais pour toutes les UDP-glycosyltransférases de cette superfamille. De plus, les protéines présentant moins de 3% de divergence sont considérées comme des variants alléliques (Mackenzie *et al.*, 1997). En raison de leur structure génomique et de la spécificité de substrat des enzymes de la famille UGT1A, il est possible d'identifier des formes orthologues au sein de différentes espèces. Par conséquent on trouve plusieurs enzymes ayant le même nom, mais clonées chez des espèces différentes, comme l'UGT1A1 et UGT1A6 humaines, de rat et de souris (Fig. 4).

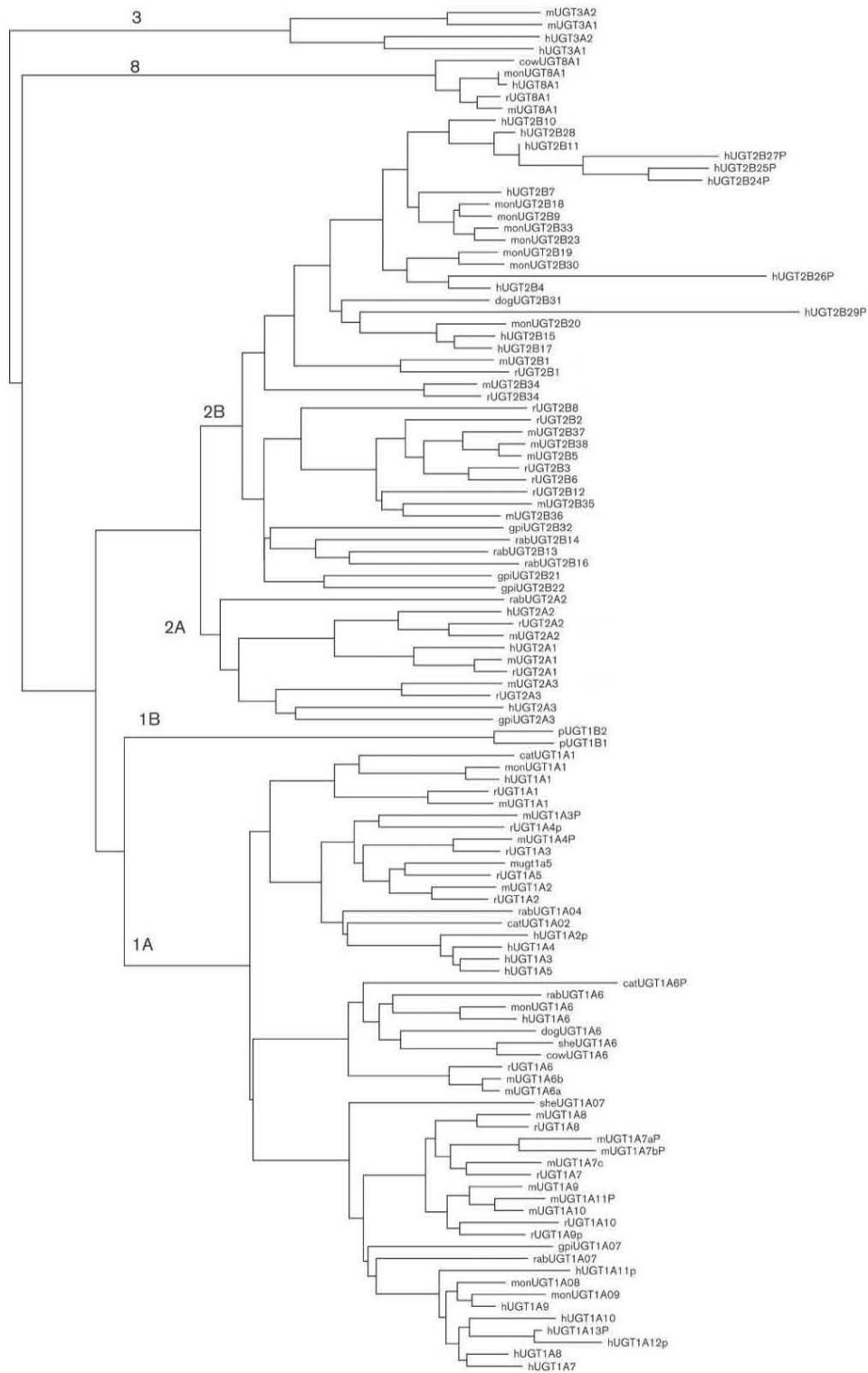


Figure 4 : Dendrogramme de la super famille multigénique des UGTs (D'après Mackenzie *et al*, 2005).

I.2.4 La superfamille multigénique des UGTs

I.2.4.1 La famille UGT1A

Les isoformes de la famille 1A humaine sont toutes codées par un gène unique *ugt1*, localisé sur le chromosome 2 dans la région q37 et qui s'étend sur plus de 198 kb. L'organisation génique des gènes codant pour les UGTs de la famille 1A est représentée dans la figure 5A (Gong *et al.*, 2001). Ils sont composés de cinq exons. Les différentes isoformes résultent d'un épissage pseudo alternatif comprenant un des treize exons 1 fusionné avec les exons 2 à 5. Ainsi, 13 transcrits peuvent être générés à partir du seul locus *UGT1*, contenant une extrémité 5' propre à chaque isoforme et une extrémité 3' identique entre les isoformes. Les exons 2 à 5 sont communs à l'ensemble des membres de cette famille et codent pour les 246 acides aminés de la partie C-terminale de la protéine qui comprend le site de fixation du co-substrat commun, l'UDP-GlcA (Tephly, 1990). Au contraire, l'exon 1 diffère d'une isoforme à l'autre et code pour les 288 acides aminés de la partie N-terminale de la protéine. Cette partie qui interagirait avec l'aglycone, serait responsable de la spécificité de substrat des UGTs. Toutefois, quatre des 13 exons 1 (UGT1A2P, UGT1A11P, UGT1A12P et UGT1A13P) contiennent des mutations et sont désignés comme pseudogenes. Ce mécanisme d'épissage différentiel génère 9 UGT1A actives (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9) dont les domaines N-terminaux ont entre 37% et 90% d'homologie et les domaines C-terminaux sont identiques (Ritter *et al.*, 1992). L'ensemble de ces isoformes est majoritairement exprimé dans le foie, sauf l'UGT1A8 et UGT1A10 qui sont préférentiellement exprimées dans l'intestin.

Dans des conditions hépatiques normales, l'UGT1A1 est responsable de l'inactivation de la bilirubine et de son excrétion dans la bile. L'excrétion de la bilirubine de l'organisme est d'une grande importance puisque, à forte concentration, celle-ci cause des dommages neurologiques irréversibles. Un grand nombre de mutations génétiques sont à l'origine de troubles métaboliques liés à un défaut de conjugaison de la bilirubine par l'UGT1A1, les syndromes de

Crigler-Najjar (CN) et de Gilbert. Le syndrome de Crigler-Najjar se manifeste par une hyperbilirubinémie, rare mais fréquemment fatale, menant irréversiblement vers une encéphalopathie chez le nouveau-né (Crigler et Najjar, 1952). Les personnes atteintes de cette maladie peuvent être classées en type 1 (CN1) et en type 2 (CN2) selon les niveaux sériques de bilirubine non conjuguée (Daly, 1995 ; Meech et Mackenzie, 1997a). Généralement, le CN1 se produit lorsque les deux allèles présents sur le chromosome 2 contiennent des mutations non-sens ou des changements de cadre de lecture, donnant naissance à une protéine UGT1A1 tronquée. Des mutations ponctuelles ont également été rapportées comme étant responsables du CN1 (Mackenzie *et al.*, 1997). Les patients atteints du CN 2 présentent des symptômes plus modérés, causés par une réduction importante de l'activité UGT1A1 hépatique. Le syndrome de Gilbert est une forme d'hyperbilirubinémie trouvée chez 5 à 10 % de la population (Black et Billing, 1969). Ce syndrome bénin n'est relié à aucune symptomatologie à l'exception de la jaunisse. Dans ce syndrome, l'élimination de la bilirubine est diminuée en raison de la présence d'une mutation rare dans les régions codante et promotrice du gène *UGT1A1* (Mackenzie *et al.*, 1997). Le promoteur du gène *UGT1A1* est caractérisé par la présence d'une boîte TATA de la forme (TA)₆TAA (située à 22 nucléotides en amont de la coiffe du messenger). Chez les patients atteints du syndrome de Gilbert, une répétition supplémentaire du dinucléotide TA produit une boîte TATA de type (TA)₇TAA qui réduit l'expression basale du gène *UGT1A1* (Beutler *et al.*, 1998).

Ce polymorphisme est susceptible d'affecter le métabolisme et la toxicité des médicaments qui sont métabolisés par l'UGT1A1. Ainsi, l'irinotécan est un agent anti-cancéreux administré à des patients souffrant du cancer du colon. Le métabolite actif de cet agent, le SN-38, est glucuronoconjugué par l'UGT1A1. Une dose non appropriée de médicament peut engendrer des effets secondaires indésirables de type diarrhée qui seraient en relation avec une mauvaise élimination biliaire du SN-38. Iyer *et al.* (1998) ont identifié un facteur de prédisposition pour le métabolisme de l'irinotécan. Ainsi, les patients présentant une activité UGT1A1 faible liée au polymorphisme inhérent à cette isoforme, ont une sensibilité plus importante aux effets toxiques

de cet anticancéreux. Deux polymorphismes dans le gène *UGT1A1*, les mutations $-3156G>A$ et $-3279T>G$ ont été liés à une variation de la glucuroconjugaison de SN-38. (Innocenti *et al.*, 2002; Sugatani *et al.*, 2002).

D'autre part, des polymorphismes génétiques des UGTs 1A7 et 1A9, isoformes également capable de glucuroconjuguer le SN-38, ont également été identifiés dans la population caucasienne. Parmi ceux-ci, les mutations $-2152C>T$, $-275T>A$, et $M^{33}T$ ($98T>C$) ont été associés à une modification de l'expression des gènes ou de l'efficacité catalytique (Villeneuve *et al.*, 2003; Girard *et al.*, 2004). Une autre équipe a montré que la répétition $-118T_{9>10}$ de l'UGT1A9 est associée à une augmentation de l'expression des gènes dans les cellules hépatiques HepG2 (Yamanaka *et al.*, 2004) qui serait liée à une incidence plus élevée de la toxicité et une augmentation de la réponse à l'irinotécan chez les patients cancéreux (Carlini *et al.*, 2005).

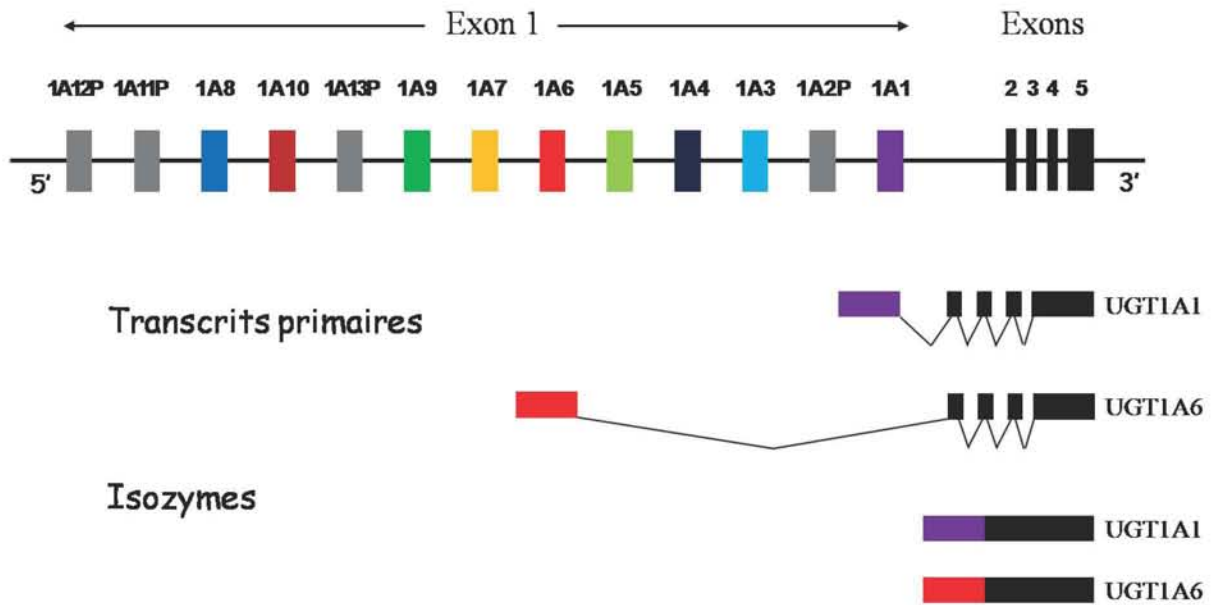


Figure 5 A : Représentation de l'organisation génétique du locus *UGT1* humain : chaque isoforme est générée par épissage pseudo alternatif des exons 1 et 2 à 5 (P, pseudogène).

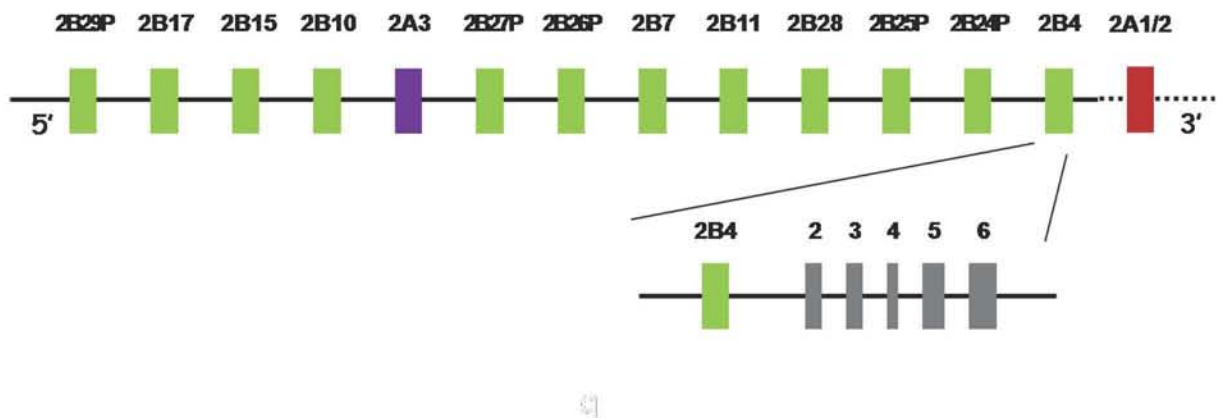


Figure 5 B : Organisation du locus *UGT2* humain : chaque isoforme est codée par un gène unique.

Dans le cas de l'UGT1A6, deux polymorphismes du gène ont été identifiés et décrits par Ciotti *et al.* (1997). Il s'agit de deux mutations sur un seul allèle conduisant à un génotype hétérozygote dans la population avec le remplacement du résidu thréonine en position 181 par une alanine et de l'arginine en position 184 par une sérine. La caractérisation *in vitro* des variants de l'UGT1A6 montre que ces mutations affectent la glucuroconjugaison des phénols et des β -bloquants et conduisent à un décalage du pH optimum de la réaction de glucuroconjugaison. Les conséquences *in vivo* restent à établir.

I.2.4.2. La famille UGT2

Les UGTs de la famille 2 sont codées par des gènes uniques. Ces gènes sont constitués de six exons et sont localisés sur les régions q28 et q13 du chromosome 4 humain (Riedy *et al.*, 2000) (Fig. 5B). La famille 2 comprend actuellement 29 membres répartis en trois sous-familles UGT2A, UGT2B et UGT2C. Les UGT2A ne possèdent que deux membres et semblent être impliqués dans l'olfaction (Jedlitschky *et al.* 1999). Elles sont localisées dans la muqueuse olfactive et prennent en charge des substrats odorants, contribuant ainsi à la terminaison du signal olfactif. Elles ont été caractérisées chez le rat, l'homme, la souris et le porc (Lazard *et al.*, 1991 ; Jedlitschky *et al.*, 1999 ; Smith *et al.*, 1999 ; Heydel *et al.*, 2001).

La sous-famille UGT2B est composée de 24 membres dont les ADNc ont été isolés chez cinq espèces différentes : l'homme, le rat, la souris, le lapin et le singe (Mackenzie *et al.*, 1997). Les UGT2B comprennent des enzymes qui conjuguent les acides carboxyliques, les alcools, les amines et les thiols. Ainsi, les AINS de la série des profènes, la morphine, les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, les acides gras à courte chaîne sont majoritairement pris en charge par cette sous-famille chez l'animal et chez l'homme. Ils existent 7 gènes fonctionnels chez l'homme (*UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B10*, *UGT2B11*, *UGT2B15*, *UGT2B17* et *UGT2B28*) ainsi que 5 pseudogènes (*UGT2B24p* à *UGT2B27p* et *UGT2B29p*). L'analyse des séquences de ces derniers a révélé la présence d'un codon stop dans chacun des

exons 1 (Turgeon *et al.*, 2000). Parmi ces gènes, celui de l'UGT2B7 humaine a été cloné et caractérisé. Le haut degré de conservation d'organisation génique des UGT2B entre elles renforce l'hypothèse selon laquelle les gènes des membres de la famille 2B proviennent d'un gène ancestral commun (Carrier *et al.*, 2000).

La première évidence d'un polymorphisme affectant les propriétés cinétiques d'une enzyme de la sous-famille 2B a été obtenue grâce à l'identification de l'allèle UGT2B15(Y⁸⁵) (Levesque *et al.*, 1997). Celui-ci conjugue mieux les androgènes que la forme UGT2B15(D⁸⁵) isolée précédemment, alors que sa spécificité enzymatique demeure inchangée. Toutefois, le clonage d'un variant de l'UGT2B7 ne possédant qu'un acide aminé différent en position 268 (H268Y) a révélé une spécificité enzymatique différente, suggérant qu'un seul résidu peut modifier l'activité transférase des enzymes appartenant à cette sous-famille. La récente caractérisation de l'UGT2B4(E⁴⁵⁸) indique que le gène *UGT2B4* est également polymorphique et que trois allèles différents sont issus de ce gène. Des différences significatives au niveau du métabolisme d'un acide biliaire (acide hyodéoxycholique) ont été rapportées *in vitro* puisqu'un des variants alléliques est incapable de conjuguer ce composé (Levesque *et al.*, 1999). Jusqu'à présent, aucune pathologie ne semble être associée aux UGTs appartenant à la famille 2. Barré et al (2007) ont montré que la substitution de la phénylalanine 33 de l'UGT2B par la leucine abolit l'activité enzymatique vis-à-vis de l'acide hyodéoxycholique (HDCA) et produit une diminution de la glucuroconjugaison de plusieurs substrats, y compris le 4-hydroxyestronne et le 17-épiestriol. Dans le cas de l'UGT2B7, le remplacement de la tyrosine 33 par la leucine réduit fortement l'activité envers tous les substrats testés, sauf le 17-épiestriol. En revanche, la mutation de la tyrosine 33 en phénylalanine présente des activités similaires ou un peu plus élevées que l'UGT2B7 sauvage. Par conséquent, les résultats suggèrent fortement que la présence d'un résidu aromatique en position 33 est importante pour l'activité et la spécificité de substrat des isoformes UGT2B4 et UGT2B7 (Barré *et al.*, 2007).

La sous-famille 2C comprend une unique isoforme de lapin dont la séquence diverge des

autres membres de la sous-famille 2B de lapin (Tukey *et al.*, 1993). Cette UGT diffère des autres isoformes identifiées chez cette espèce, et le nom provisoire d'UGT2C1 lui a été attribué, afin d'indiquer les divergences de séquences avec les membres de la sous-famille 2B.

I.3. Propriétés générales des UGTs

I.3.1. Spécificité de substrat de la famille 1A

Les enzymes de cette famille interviennent dans la glucuroconjugaison de nombreux substrats et leur spécificité est très variable. Au sein de la famille 1A, l'UGT1A9 est décrite comme l'isoforme ayant le plus large spectre d'activité. Cette isoforme métabolise *in vitro* des composés structurellement différents comme les phénols encombrés, les anthraquinones, les flavonoïdes, des composés hydroxylés aromatiques et quelques médicaments à structure carboxylique (Ebner et Burchell, 1993). En revanche, l'activité enzymatique de l'UGT1A6 humaine est plus stricte. Cette isoforme conjugue spécifiquement les petits phénols plans et courts (Fournel-Gigleux *et al.*, 1991). Un seul composé endogène est décrit comme substrat de l'UGT1A6, la sérotonine (King *et al.*, 1999) mais ce résultat n'a jamais pu être confirmé au laboratoire. L'UGT1A3 humaine est surtout impliquée dans la conjugaison de certains œstrogènes et des hydrocarbures polycycliques mais également des acides carboxyliques d'origine endogène et exogène (Mojarrabi *et al.*, 1996 ; Green *et al.*, 1998). L'UGT1A1 prend en charge surtout des acides carboxyliques. C'est une enzyme d'une importance majeure car elle est responsable de l'élimination de la bilirubine et de certains catéchols estrogènes, et de certains médicaments comme l'irinotécan. L'UGT1A4 forme les N-glucuronides des amines primaires, secondaires et tertiaires et joue un rôle majeur dans le métabolisme de médicaments anti-psychotiques. En ce qui concerne les UGT1A5 et UGT1A7 humaines, aucun substrat n'a été mis en évidence. Cheng *et al.* (1999) ont étudié les spécificités de substrat de deux UGTs extrahépatiques les UGT1A8 et UGT1A10. L'UGT1A8 prend en charge les catéchols estrogènes, les coumarines, les flavonoïdes, les anthraquinones et les composés phénoliques de

façon plus importante que l'UGT1A10. De plus l'UGT1A8 conjugue les opioïdes, les acides biliaires, les acides gras et des médicaments comme le diflunisal.

Nous avons vu que certaines UGTs présentent des polymorphismes pouvant conduire à une modification importante de leur activité. Cependant, leurs spécificités de substrat chevauchantes limitent généralement l'impact de ces mutations. Certains polymorphismes ont en revanche des conséquences importantes. C'est le cas de l'UGT1A1, seule isoforme impliquée dans la glucuroconjugaison de la bilirubine.

I.3.2. Spécificité de substrat de la famille 2B

Parmi les isoformes de la famille 2B, l'UGT2B7 humaine présente le spectre d'activité le plus large, elle conjugue aussi bien des molécules endogènes (des acides biliaires dont l'HDCA, des stéroïdes dont l'androstérone et des estrogènes) qu'exogènes (des opioïdes dont la morphine, l'antirétroviral AZT, des AINS carboxyliques) (Coffman *et al.*, 1998). L'UGT2B4 présente une homologie de séquence de 84% avec l'UGT2B7, la majorité des différences étant localisées dans la partie N-terminale de la protéine. Cette isoforme présente une spécificité de substrat chevauchante avec l'UGT2B7 mais conjugue une variété restreinte de substrats. En effet l'UGT2B4 conjugue, comme l'UGT2B7, l'HDCA et des hormones stéroïdiennes (estriol), mais présente des activités faibles pour les substrats exogènes (Pillot *et al.*, 1993). Les UGTs 2B4 et 2B7 jouent des rôles physiologiques et pharmacologiques importants. L'UGT2B4 par exemple est responsable de 90% de la conjugaison de l'HDCA au niveau hépatique (Pillot *et al.*, 1993). Cet acide biliaire toxique est très fortement glucuroconjugué, et il a été observé que le taux de son glucuronide augmente dans les urines en cas de malabsorption et de cholestase. De plus, l'HDCA serait impliqué dans l'induction de l'apoptose (Araki *et al.*, 2001). D'autre part, l'UGT2B7 joue un rôle de première importance dans le métabolisme de nombreuses molécules. Ainsi, c'est la seule enzyme connue à ce jour impliquée dans la formation du 6-O-glucuronide de morphine au niveau du cerveau (Coffman *et al.*, 1997). Elle intervient également dans la

glucuronoconjugaison de l'acide rétinoïque tout-*trans*, permettant ainsi de moduler la concentration intercellulaire de ce ligand et sa fixation sur son récepteur nucléaire ou cytosolique, et influence ainsi son action dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires (Sani *et al.*, 1992). L'UGT2B7 conjugue efficacement l'androstérone. Une diminution de cette activité liée à des polymorphismes conduit à l'accumulation de cette hormone stéroïdienne au niveau des organes périphériques cibles (prostate) et pourrait ainsi être un facteur prédisposant au cancer de la prostate hormonodépendant (Belanger *et al.*, 1998). Enfin l'UGT2B7 est la seule isoforme capable de conjuguer l'AZT dirigé contre le virus d'immunodéficience humaine (VIH) (Barbier *et al.*, 2000a) ainsi que certains AINS carboxyliques de manière efficace, ce qui renforce l'intérêt de son étude.

Les UGTs 2B15 et 2B17 sont largement décrites pour prendre en charge des stéroïdes. Quant à l'UGT2B28, l'activité de glucuronoconjugaison rapportée par Lévesque *et al.* (2001) semble indiquer son implication dans la prise en charge des androgènes et estrogènes au niveau du foie et de la prostate. Récemment, il a été montré que l'UGT2B10 serait responsable de la glucuronoconjugaison de la nicotine dans le foie (Kaivosari *et al.*, 2007). Pour l'UGT2B11 dernièrement clonée, aucun substrat n'a été encore mis en évidence (Beaulieu *et al.*, 1998 ; Turgeon *et al.*, 2001).

I.4. Organisation structurale et fonctionnelle des UGTs dans les membranes du réticulum endoplasmique

I.4.1. Structure primaire des UGTs

Les principaux domaines constituant les UGTs sont représentés dans la figure 6. La structure primaire de ces enzymes est essentiellement constituée de deux domaines structuraux de taille similaire : une région amino-terminale responsable de la liaison au substrat, et une région carboxy-terminale qui fixe le cofacteur, l'UDP-GlcA. La partie amino-terminale est moins conservée d'une isoenzyme à l'autre, et cette portion variable semble conférer la spécificité enzymatique aux UGTs. Chez les membres de la famille des UDP-glycosyltransférases, une région consensus, située entre les résidus 352 et 403 responsable de la liaison de l'UDP des sucres donneurs (exemple : acide UDP-glucuronique, UDP-glucose, UDP-galactose.) a été identifiée (Mackenzie *et al.*, 1997). Une étude a montré que la glycosylation des UGTs de la famille 2B est importante pour l'activité de glucuroconjugaison (Barbier *et al.*, 2000b).

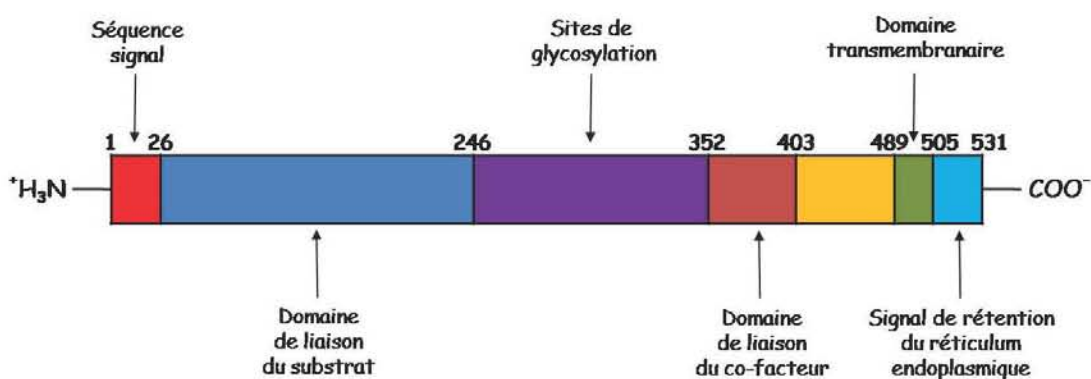


Figure 6 : Représentation des principaux domaines des UGTs (sites hypothétiques de fixation des substrats).

I.4.2. Topologie membranaire

Les UGTs sont des protéines membranaires. Elles sont localisées dans la membrane du RE. Ce sont des enzymes phospholipidodépendantes, dont la structure et l'activité sont modulées par les constituants membranaires (Zakim *et al.*, 1988). La lipidodépendance et le caractère membranaire de ces enzymes rend difficile leur purification sous forme active (Burchell *et al.*, 1995). L'état natif des UGTs au niveau de la membrane du RE est dit latent (Dutton, 1966). Il peut être activé par des agents physiques (sonication) ou chimiques (détergents). Ces agents, en désorganisant la structure de la membrane lipidique, augmentent jusqu'à 20 fois l'activité catalytique basale des UGTs. Cette activation résulterait soit d'un changement conformationnel de l'enzyme (hypothèse conformationnelle, Zakim et Dannenberg, 1992), soit d'une augmentation de l'accessibilité de l'UDP-GlcA au site actif (hypothèse compartimentale, Tephly et Burchell, 1990), soit les deux.

La protéine mature de 505 résidus après clivage du peptide signal est classée comme une protéine transmembranaire de type I (N endo ; C cyto), le domaine luminal de la protéine représente 95% de la chaîne polypeptidique, le domaine cytoplasmique comporte seulement 20 acides aminés. Un motif dilysine situé à l'extrémité C-terminale localisée du côté cytosolique interviendrait dans la rétention des UGTs dans cet organite (Jackson *et al.*, 1990). L'enzyme est ancrée à la membrane par un segment de 17 acides aminés hydrophobes, situés dans la partie C-terminale, qui vont former une hélice α transmembranaire. L'organisation membranaire des UGTs dans le RE est présentée dans la figure 7. Des expériences utilisant des protéines tronquées et des protéines chimériques ont démontré que d'autres régions, situées du côté luminal, sont impliquées dans de fortes interactions avec la membrane du RE. Des expériences réalisées au laboratoire ont montré que l'enzyme déletée du motif dilysine cytoplasmique et du segment trans-membranaire était néanmoins adressée et retenue dans la membrane (Ouzzine *et al.*, 1999a et b). Cela suggère l'existence d'autres mécanismes de rétention dans la membrane du RE et vraisemblablement la présence d'éléments topogéniques internes (Meech et Mackenzie, 1998). Des expériences au laboratoire sur l'UGT1A6 humaine ont montré que ces

éléments sont situés du côté N-terminal entre les acides aminés 120 et 240 de l'UGT1A6. Cette séquence de 120 acides aminés placée en amont d'une protéine reporter cytoplasmique est capable de diriger l'adressage de cette dernière au niveau de la membrane du RE (Ouzzine *et al.*, 1999a). D'autre part, le rôle topogénique de la séquence d'arrêt de transfert contenant le segment d'ancrage transmembranaire et la séquence cytosolique (TMD/CT) de l'UGT1A6 a été étudié par des techniques de protéines chimériques et d'immunolocalisation. Elles ont permis de montrer que ce domaine joue le rôle de signal de rétention dans le RE. L'analyse du rôle du motif dilysine KSKTH localisé au niveau de la séquence cytosolique (CT) montre qu'il retient la protéine au niveau du RE en opérant par recyclage de celle-ci à partir des compartiments post-RE. D'autre part, ces auteurs ont montré que le segment TMD seul est capable de retenir la protéine dans le RE et que la séquence TMD/CT est capable d'adresser et d'assurer la translocation des domaines en amont bien qu'elle soit située en position C-terminale (Barré *et al.*, 2005 ; 2006).

Enfin, il semblerait que le domaine cytosolique des UGTs soit impliqué dans la formation de dimères d'UGTs et de complexes avec d'autres enzymes membranaires du métabolisme des médicaments (P450, époxyde hydrolase...). Meech et Mackenzie (1997b) ont en effet montré que la délétion du domaine C-terminal de l'UGT2B1 cause la disparition d'un complexe de haut poids moléculaire après migration sur gel de polyacrylamide en condition non réductrice.

L'ensemble de ces travaux démontrent que l'organisation membranaire et la fonctionnalité des UGTs sont assurées par l'intervention de plusieurs éléments topogéniques.

I.4.3. Implication de transporteurs membranaires dans la fonction des UGTs

La localisation et l'orientation des UGTs du côté luminal du RE implique la présence de transporteurs membranaires capables de faire transiter l'UDP-GlcA, hydrophile, du cytosol vers la lumière du RE (Fig. 7). De même, le passage du glucuronide polaire formé du côté luminal vers le cytoplasme nécessite un autre transporteur. Ces deux systèmes de transport fonctionnent de concert pour assurer l'efficacité de la machinerie enzymatique. Des études utilisant des

préparations microsomales révèlent l'existence d'un système anti-transport responsable de l'échange d'une molécule d'UDP-GlcA cytosolique avec une substance glucuroconjugée présente dans la partie luminale (Banhegyi *et al.*, 1996). Ce transport semble être équimolaire puisqu'une quantité équivalente d'UDP-GlcA et de glucuronide circule à travers la membrane du RE. Battaglia *et al.* (1996) ont suggéré l'existence de deux systèmes de transport avec des affinités différentes pour l'UDP-GlcA. Cette équipe a également montré l'implication directe d'acides aminés histidines dans le système de transport de l'UDP-GlcA dans des microsomes hépatiques de rat (Battaglia *et Radominska-Pandya.*, 1998).

D'autre part Ikushiro *et al.* (1997) ont suggéré que les hétérodimères d'UGTs pourraient jouer le rôle de canaux permettant le transport de l'UDP-GlcA à travers la membrane du RE.

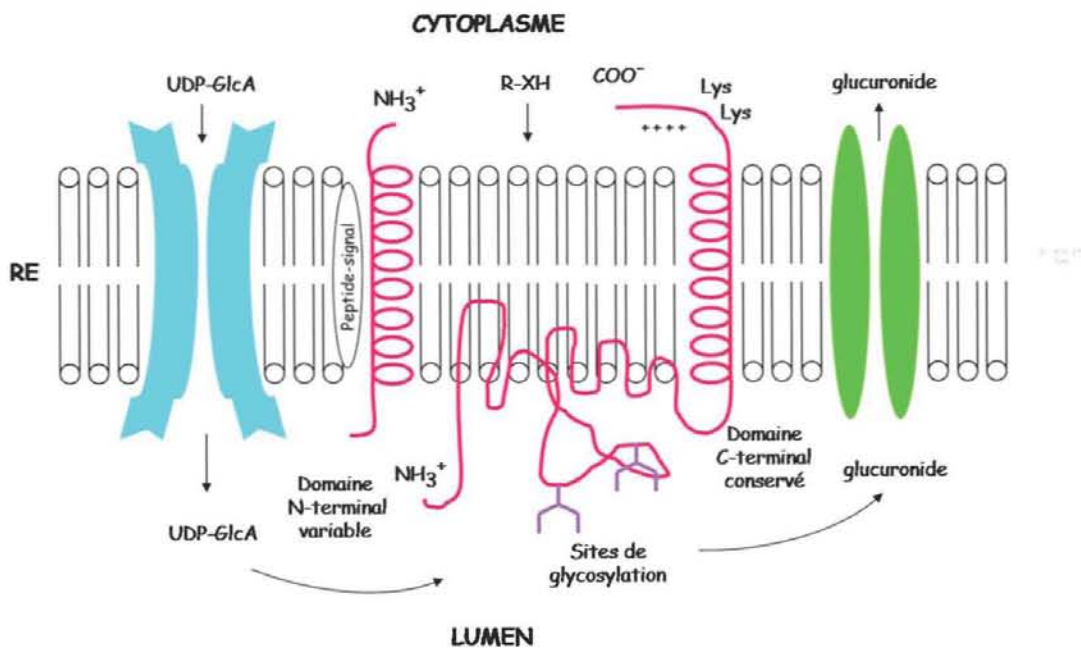


Figure 7 : Présentation de l'organisation membranaire des UGTs dans le RE (d'après Burchell et Coughtrie, 1989). Les deux transporteurs membranaires pour l'UDP-GlcA et les glucuronides sont indiqués.

I.4.4. Organisation oligomérique des UGTs

Les UGTs sont des enzymes capables de former des structures macromoléculaires par association de plusieurs isoformes identiques ou différentes (homo/hétérodimères). Ces résultats ont d'abord été établis sur la base d'inactivation des UGTs membranaires in situ par irradiation avec du ^{60}Co (Peters *et al.*, 1984 ; Gschaidmeier et Bock, 1994). Plus récemment, la technique de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) ainsi que des approches de co-précipitation ont été utilisées pour étudier l'oligomérisation d'UGT1A dans les hépatocytes. Cette technique a montré que les UGTs 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10 peuvent s'oligomériser (homodimériser). Elle a aussi permis de montrer que l'UGT1A1 est capable de se lier avec les isoformes 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10 (Operana et Tukey, 2007).

Enfin, les UGTs peuvent aussi interagir avec d'autres enzymes qui sont responsables du métabolisme des médicaments, comme les CYP450 et l'époxyde hydrolase microsomale. Une telle coopération, favorisée par l'état de la fluidité de la bicouche phospholipidique, assure le couplage topologique et fonctionnel entre enzymes de phases I et II et optimise ainsi la biotransformation des xénobiotiques (Ishii *et al.*, 2005).

Chapitre II.

Etudes fonctionnelles, mécanistiques et structurales de l'UGT1A6 humaine

Nos travaux ont principalement été consacrés à l'étude de l'isoforme UGT1A6 humaine. Cette isoforme nous a servi de modèle afin d'élucider le mécanisme réactionnel, d'identifier les domaines et les acides aminés impliqués dans la catalyse, la reconnaissance des substrats et dans l'interaction avec la membrane. Nous décrivons ci-après les propriétés de cette isoforme qui, par la nature des substrats conjugués, joue un rôle prépondérant en pharmacologie et toxicologie.

II.1. Rôle de l'UGT1A6

L'UGT1A6 est impliquée de façon prépondérante dans le métabolisme des substances phénoliques planes, parmi lesquelles des composés de structures polycycliques aromatiques cancérigènes (phénols, quinones, quinols). Exprimée de façon importante dans le foie, ainsi qu'aux interfaces de l'organisme avec l'environnement (poumons, intestin, peau, muqueuse nasale), l'UGT1A6 assure une barrière de détoxification efficace contre l'intrusion de molécules potentiellement agressives. Du fait de sa spécificité stricte vis-à-vis des phénols plans, elle participe également, mais de façon plus modérée au métabolisme de médicaments (paracétamol) et de substances endogènes (sérotonine). Le paracétamol (acétaminophène) est largement utilisé comme médicament analgésique. Trois isoformes sont impliqués dans sa conjugaison, l'UGT1A6, l'UGT1A1 et l'UGT1A9 (Bock *et al.*, 1993 ; Court *et al.*, 2001). La comparaison des trois isoformes vis-à-vis du métabolisme du paracétamol montre que l'UGT1A6 est la plus efficace à des faibles concentrations en substrat (<50 μ M, concentration atteinte dans le sérum après l'ingestion de 1000 mg de paracétamol). La sérotonine a été récemment identifiée comme

un substrat spécifique de l'UGT1A6 (Krishnaswamy *et al.*, 2003). Elle est conjuguée dans l'épithélium intestinal ainsi que dans le cerveau (hippocampe et cervelet) (Köhle *et al.*, 2005 ; Brands *et al.*, 2000 ; King *et al.*, 1999 ; Martinasevic *et al.*, 1998), qui sont deux tissus exprimant l'UGT1A6.

Les arylamines comme la 2-naphtylamine et le 4-aminobiphényle sont des cancérigènes avérés (Miller et Miller, 1981). L'utilisation de cellules exprimant l'UGT1A6 recombinante a permis de démontrer que cette isoforme est capable de conjuguer les N-hydroxy, dérivés de ces substances cancérigènes de façon importante (Orzechowski *et al.*, 1994). De même, la glucuroconjugaison par l'UGT1A6 des phénols et des hydroquinones (métabolites toxiques du benzène cancérigène) a été démontré par Schrenk *et al* (1996).

II.2. Structure de l'UGT1A6

En l'absence de résolution de la structure tridimensionnelle, plusieurs techniques complémentaires ont été mises en œuvre afin d'étudier la structure et la fonction de l'UGT1A6 humaine. La stratégie globale développée est présentée dans la figure 8.

Elle fait appel à :

- des techniques de génie génétique et protéique (clonage, expression hétérologue, production, purification, mutagenèse dirigée de la protéine recombinante).
- l'analyse cinétique des enzymes sauvages et des mutants.
- la modification chimique des acides aminés.
- la synthèse chimique de substrats, de sondes photoactivables et d'inhibiteurs.
- l'utilisation de l'outil bioinformatique (alignements de séquences, phylogénie).
- la chimie théorique (relations structure-activité).
- la modélisation moléculaire (modélisation par homologie).

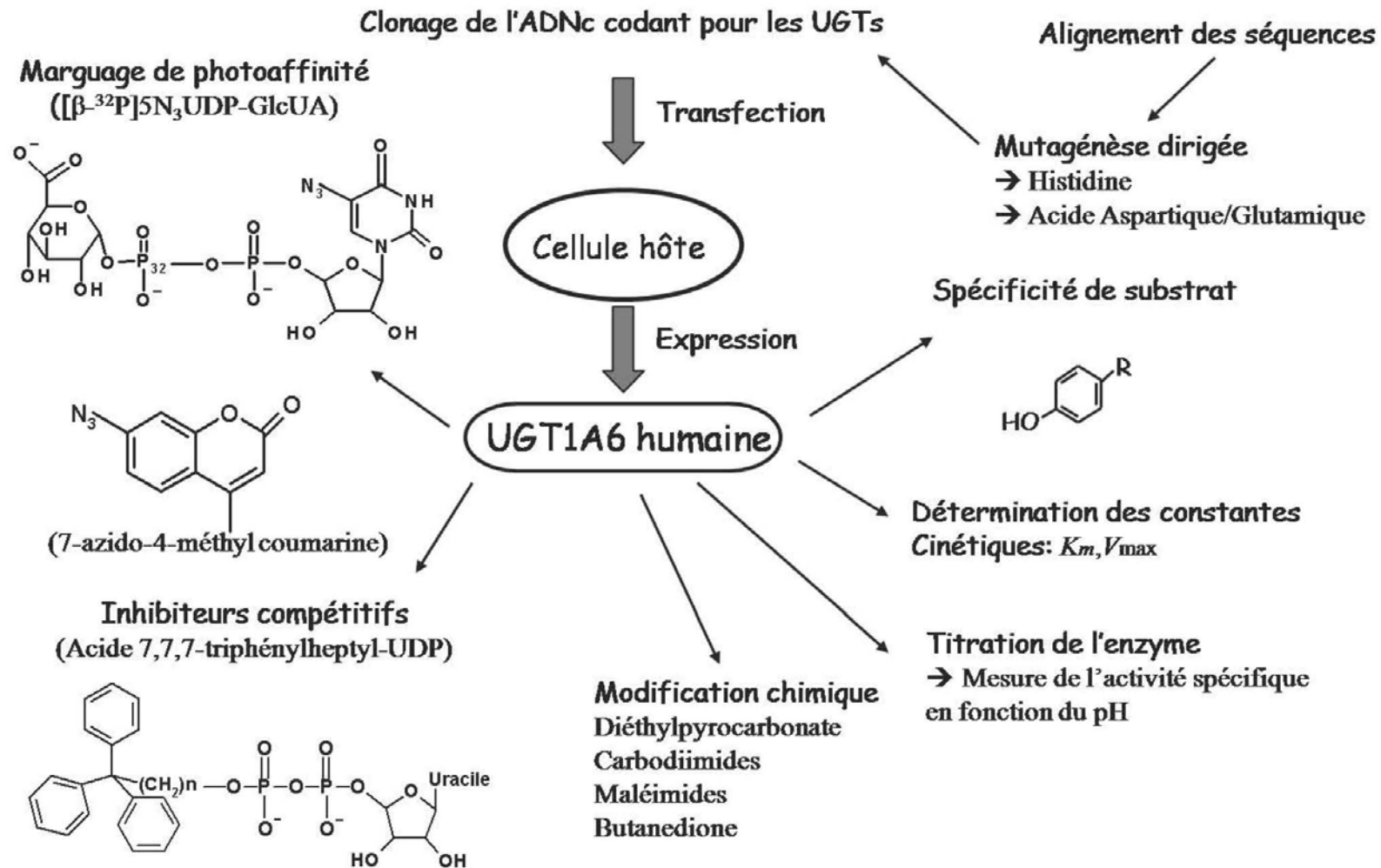


Figure 8 : Stratégies développées pour étudier les bases moléculaires de la glucuroconjugaison par l'UGT1A6.

II.3. Le marquage par des sondes de photoaffinité

Le marquage de photoaffinité a été utilisé pour la caractérisation du site actif des UGTs dans le but d'identifier les acides aminés critiques (Drake et Elbein, 1992; Radomska et Drake, 1994). Cette technique implique l'utilisation d'un substrat ou d'un inhibiteur modifié possédant un groupe photolabile de type azido. La photoactivation de cette sonde se produit *in situ* et conduit à sa fixation covalente au site actif. Le marquage direct de photoaffinité représente une variante précieuse du marquage de photoaffinité. Il a un avantage important sur le marquage indirect car ces composés possèdent une photoréactivité intrinsèque. L'acide rétinoïque [³H] *tout-trans* et [³H]9-*cis* ([³H]-*atRA* et [³H]9*cisRA*) ont été utilisés comme sondes de photoaffinité directes et efficaces (Chen et Radomska-Pandya, 2000; Little et Radomska, 1997; Radomska-Pandya *et al.*, 2000, 2001).

Drake *et al.* (1992) ont synthétisé une sonde photoactivable analogue de l'UDP-GlcA ([β-³²P]5N₃UDP-GlcA) (Fig. 8). Celle-ci a permis, entre autres, de confirmer que le site actif des UGTs est orienté du côté luminal du RE. Une digestion par des endopeptidases de l'UGT1A6 photomarkée par le ([β-³²P]5N₃UDP-GlcA) a permis d'isoler une séquence peptidique correspondant au site de fixation du co-substrat située entre les acides aminés 352 et 400 dans la partie C-terminale de l'UGT1A6. Cette sonde a également été utilisée pour l'étude du transporteur de l'UDP-GlcA (Battaglia *et al.*, 1998).

II.4. Les modifications chimiques et mutagenèse dirigée

Cette approche combinée permet d'identifier des acides aminés importants. La modification chimique d'une protéine consiste en une réaction chimique entre un agent électrophile et la chaîne latérale des acides aminés. La modification chimique d'une enzyme par liaison covalente peut se traduire par la perte irréversible de l'activité si un résidu essentiel à la catalyse de la réaction est bloqué, le site de fixation du substrat est encombré ou la conformation de la

protéine est modifiée. En revanche, si la modification chimique n'affecte en rien l'activité enzymatique, cela signifie qu'il n'y a pas de résidu modifié ou que les résidus modifiés ne jouent de rôle prépondérant ni dans la structure ni dans la fonction de l'enzyme.

Les groupements chimiques les plus réactifs au sein des protéines sont généralement nucléophiles. Ce sont ces mêmes groupes qui sont impliqués dans la catalyse enzymatique. Ces groupes nucléophiles sont les hydroxyles des sérines, thréonines et tyrosines, les résidus amines des lysines et arginines ainsi que le groupement NH_2 terminal des protéines, le cycle imidazole de l'histidine, la fonction thiol des cystéines, la fonction carboxylique des acides aspartique ou glutamique, ainsi que le groupement COOH terminal des protéines. De plus, l'atome de soufre de la méthionine et le cycle aromatique de la tyrosine sont nucléophiles envers les centres faiblement électrophiles. En conséquence, la plupart des agents chimiques utilisés ont un caractère électrophile. L'utilisation de la modification chimique des protéines permet de déterminer le rôle éventuel des acides aminés modifiés dans la réaction enzymatique. Plus précisément, l'analyse des paramètres cinétiques de l'inactivation par les agents chimiques donne des indications sur la fonction structurale ou catalytique de l'acide aminé modifié. L'augmentation du K_m renseigne sur le rôle de l'acide aminé modifié dans l'organisation structurale du site actif de la protéine alors qu'une diminution de la V_{\max} implique plutôt un rôle de l'acide aminé modifié dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. D'autre part, la structure du réactif donne des indications sur le degré d'accessibilité de l'acide aminé modifié et sur le caractère hydrophile ou hydrophobe de son environnement. Cependant, l'inconvénient majeur de l'utilisation des agents de modification chimique reste le manque relatif de spécificité de certains d'entre eux pour un type d'acide aminé ou pour un acide aminé donné localisé dans la protéine.

En 1983, Zakim *et al.* (1983) ont suggéré, après modification chimique des UGTs au moyen de la 2,3-butanedione, l'interaction du groupement COOH de l'UDP-GlcA avec une arginine. Cette approche a été également utilisée pour identifier les acides aminés impliqués dans la catalyse. Ainsi, Battaglia *et al.* (1994a) ont pu montrer l'implication d'un résidu histidine dans le processus catalytique de l'UGT1A6 après inactivation irréversible de l'enzyme

par le diéthylpyrocarbonate (DEPC). Les auteurs ont étudié l'effet du pH sur l'activité de l'UGT1A6 recombinante révélant l'implication de deux résidus catalytiques déprotonés au pH optimum de la réaction enzymatique (pH 7,4). La titration des acides aminés catalytiques a montré que les valeurs de leur pK_a étaient comprises entre 5 et 6. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse qu'un second résidu de nature carboxylique était impliqué, soit un résidu aspartique ou glutamique. En utilisant plusieurs carbodiimides comme agents de modification chimique, l'implication d'acides aminés carboxyliques dans l'activité catalytique de l'UGT1A6 a été confirmée (Battaglia *et al.*, 1994b).

A ce stade des connaissances, une arginine, une histidine et un acide glutamique ou aspartique semblaient importants pour la fonction de l'UGT1A6. L'étape suivante consistait à les localiser au sein de la séquence de l'UGT1A6. Senay *et al.* (1997), se sont plus particulièrement intéressés à deux résidus : l'histidine 54 et l'arginine 52 particulièrement conservés au sein de la famille des UGTs. Les auteurs ont noté que ces deux résidus appartiennent à une séquence consensus située dans une région hydrophobe très conservée du domaine N-terminal variable des UGTs (LX2-R52-G-H54-X3-V-L), laissant penser que ces deux résidus étaient potentiellement cruciaux pour l'activité enzymatique. La substitution de l'histidine 54 par une glutamine conduit à une protéine inactive qui n'est plus reconnue par les anticorps spécifiques de la partie N-terminale de l'UGT1A6. Les mutations de l'histidine 54 et de l'arginine 52 en alanine conduisent à une diminution de la vitesse de glucuroconjugaison de l'UGT1A6 mais elles n'affectent en rien la sensibilité de la protéine aux agents de modification chimique, le DEPC et la 2,3-butanedione. Les mutants UGT1A6H54A et UGT1A6R52A comprennent toujours au sein de leur séquence les acides aminés sensibles à ces agents chimiques. Les techniques combinées de modification chimique et de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que l'arginine 52 et l'histidine 54 de l'UGT1A6, sont des résidus indispensables à l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'UGT1A6 mais ne sont pas directement impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme.

Les études réalisées avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) et le DEPC indiquant que des résidus histidyl et l'acide aspartique/glutamique sont des candidats probables en tant que

base catalytique, nous avons voulu connaître la nature de l'acide aminé impliqué. Dans un premier temps, quatre résidus histidine très conservés (H38, H361, H370, H485) ont été systématiquement mutés en alanine et en glutamine (Ouzzine *et al.*, 2000). Les résultats montrent que H38 et H485 sont cruciaux pour l'activité, car leur substitution conduit à une enzyme inactive. Des études cinétiques des mutants ont permis de montrer que H361 était susceptible d'interagir avec l'UDP-GlcA. De façon intéressante, la mutation du résidu H370 en alanine abolit l'activité, alors qu'une restauration partielle est observée après substitution par la glutamine. De plus ce dernier mutant est insensible à l'action inhibitrice du DEPC, ce qui suggère que ce résidu est la cible de l'agent chimique et qu'il joue un rôle important dans la réaction de glucuroconjugaison.

Une analyse plus fine, après comparaison des séquences incluant celles de la vaste famille des glycosyltransférases (plus de 7200 séquences établies) dont certaines (15) ont été cristallisées, a permis de préciser la fonction de cette histidine dans ce processus (Fournel-Gigleux *et al.*, 2005). Elle interviendrait en fait dans la libération du groupement partant UDP⁻ facilitée par la présence de Mg⁺⁺.

Chapitre III.

Expression des UGTs dans les chondrocytes

Les UGTs sont majoritairement exprimées dans le foie, ainsi que dans d'autres organes tels les poumons, l'intestin ou le rein. Elles sont cependant également présentes dans d'autres tissus (peau, cerveau ...) qui présentent aussi des activités de glucuroconjugaison, chaque tissu exprimant une panoplie d'isoformes quantitativement et quelquefois qualitativement différentes.

Depuis longtemps, notre laboratoire étudie le cartilage articulaire ainsi que les pathologies associées comme l'arthrose. Le tissu cartilagineux est caractérisé par l'existence d'une seule population de cellules, les chondrocytes, qui synthétisent une abondante matrice extracellulaire, principalement composée de collagènes et de protéoglycanes.

L'arthrose, rhumatisme dégénératif, et les arthrites rhumatismales, de nature inflammatoire, arrivent au tout premier rang des maladies articulaires. Ces maladies à la fois chroniques et évolutives, dont la prévalence peut dépasser 90% chez les personnes de plus de 65 ans, altèrent leur qualité de vie et sont une des principales causes de consultation médicale, de consommation médicamenteuse et de handicap. On estime que 4,6 millions de personnes souffrent d'une arthrose symptomatique en France, ce qui génère un coût annuel de 2,6 milliards d'euros pour leur prise en charge et leur hospitalisation, incluant la mise en place de 120 000 prothèses de hanche ou de genou.

La fréquence de ces pathologies augmente du fait de l'allongement de l'espérance de vie, ce qui constitue un problème majeur de santé publique pour les années à venir. Ceci souligne l'importance de leurs diagnostic et dépistage précoces, et nécessite de développer de nouvelles thérapeutiques pour ces pathologies associées au vieillissement. La caractéristique de l'arthrose est une dégradation progressive et irréversible du cartilage articulaire, accompagnée par des douleurs et des raideurs articulaires affectant la qualité de vie. Ces maladies dégénératives débutent par des lésions du cartilage, dont la destruction résulte de la fissuration de la surface vers la profondeur. Ces lésions sont consécutives à un excès du

catabolisme associé à un déficit de l'anabolisme des composants matriciels.

En dépit de leur impact socio-économique important, il n'existe pas actuellement de prise en charge globalement satisfaisante des lésions dégénératives du cartilage. Parmi les traitements médicamenteux, la prescription de médicaments antalgiques et/ou d'anti-inflammatoires au prix parfois d'effets indésirables, soulage la symptomatologie sans enrayer significativement la progression de la maladie.

Dans le but de rechercher de nouvelles thérapeutiques, il est important de mieux comprendre les mécanismes qui concourent à la dégradation du cartilage. Dans ce contexte de nombreux travaux ont souligné le rôle bénéfique des estrogènes sur l'homéostasie des composés matriciels (Tanko *et al.*, 2008).

Les médicaments antalgiques, de type paracétamol (phénol), ou anti-inflammatoire de types kétoprofène (AINS carboxylique), ainsi que les estrogènes et leurs dérivés sont tous des substrats potentiels des UGTs. Il est donc important de connaître l'impact de ces enzymes sur la métabolisation de ces substances au niveau du cartilage, plus précisément au niveau des chondrocytes, en déterminant quelles sont les isoformes exprimées.

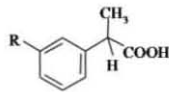
III.1. Glucuronoconjugaison des AINS carboxyliques et du paracétamol

Les AINS constituent une classe thérapeutique très largement prescrite, en particulier dans le traitement des rhumatismes inflammatoires et dégénératifs (Emery, 1996). En dépit de leur diversité structurale, ils possèdent des propriétés physicochimiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques communes (Tableau 2). Les AINS sont de petites molécules liposolubles de nature hydrophobe. Parmi les AINS, les dérivés de l'acide 2-phénylpropionique (profènes) ainsi que certains indolés (étodolac, sulindac) présentent la particularité de posséder un atome asymétrique en position α de la fonction acide carboxylique, conférant une chiralité à ces molécules. Ces composés existent alors sous la forme de deux énantiomères de configuration spatiale opposée *R* (rectus) et *S* (sinister). L'énantiomère *S* est responsable de l'effet anti-inflammatoire observé *in vivo* (Brune *et al.*, 1991). Cependant, les AINS chiraux sont

commercialisés sous forme racémique, à l'exception du naproxène pour lequel seul l'énantiomère *S* est administré.

AINS

Profènes

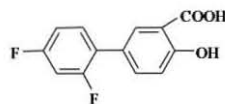


Salicylés

Acide salicylique

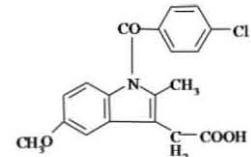


Diflunisal

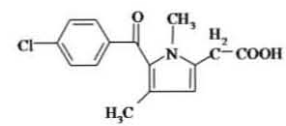


Indoliques

Indométhacine



Zomépirac



Sulindac

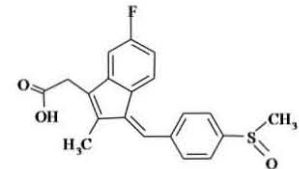


Tableau 2 : Structure chimique de différentes classes d'AINS.

Parmi les isoformes des UGTs humaines de la famille 1A, l'UGT1A6 est capable de métaboliser le *S*-naproxène (Ebner et Burchell, 1993). L'UGT1A9 présente une spécificité de substrat assez large, et métabolise les AINS tels que le kétoprofène, le naproxène, l'ibuprofène, le fénoprofène et le diflunisal (Ebner et Burchell, 1993). Enfin, l'UGT1A3, l'UGT1A7, l'UGT1A8 et l'UGT1A10 métabolisent également certains AINS comme l'ibuprofène, l'acide méfénamique, le diflunisal, le flubiprofène, le fénoprofène, et l'indométacine (Basu *et al.*, 2004). L'UGT1A10 est fortement impliquée dans la conversion des AINS, comme l'acide méfénamique et diflunisal, alors que l'UGT1A8, l'UGT1A7 et l'UGT1A3 conjuguent également l'acide méfénamique (Basu *et al.*, 2004). L'UGT2B7 est capable de conjuguer des AINS (le naproxène, le kétoprofène, l'ibuprofène, le fénoprofène, l'acide tiaprofénique, le bénomprofène, le zomépirac, le diflunisal et l'indométhacine) (Jin *et*

al., 1993). La glucuroconjugaison par l'UGT2B7 est stéréosélective pour certains dérivés de l'acide 2-phénylpropionique. En effet, pour l'UGT2B7, la conjugaison du *S*-ibuprofène est supérieure à celle du *R* alors que le métabolisme du kétoprofène, du naproxène et de l'acide 2-phénylpropionique n'est pas énantiosélectif (Jin *et al.*, 1993).

Les acylglucuronides formés à partir des médicaments carboxyliques sont doués de propriétés réactives, responsables d'effets indésirables d'ordre immunoallergique (Fabien *et al.*, 2004). De nature électrophile, ils subissent des réactions d'hydrolyse, d'isomérisation et sont capable de se fixer de façon covalente sur des protéines (formation d'adduits) (Fig. 9).

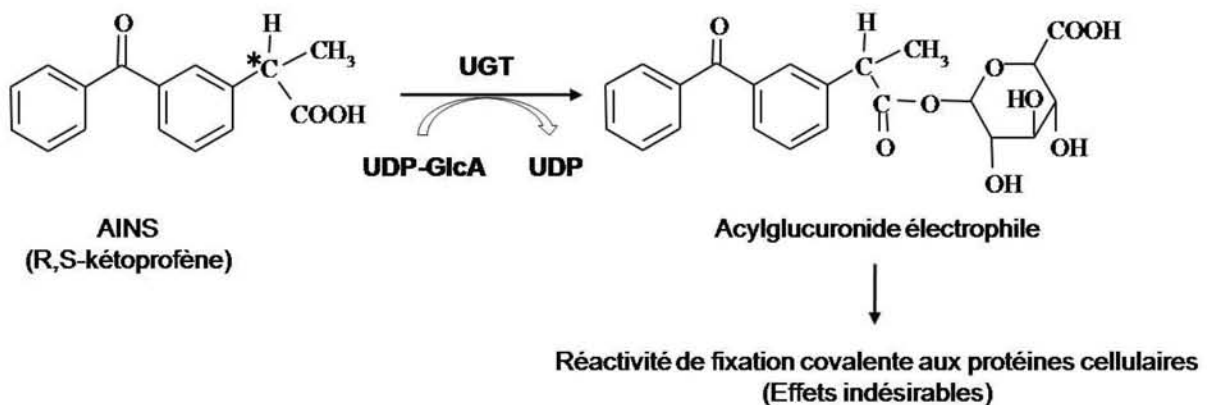


Figure 9 : Exemple de la glucuroconjugaison d'un AINS (kétoprofène). *, carbone asymétrique.

Le paracétamol est un dérivé du para-amino-phénol. C'est le produit le plus utilisé actuellement comme antalgique et antipyrétique. Le paracétamol ne comporte pas de carbone asymétrique et n'a pas de stéréoisomère. Il se distribue de manière comparable dans la plupart des liquides organiques. Au moins 80 % de la dose de paracétamol administrée est excrétée sous forme de métabolites glucuroconjugués ou sulfoconjugués rendus biologiquement inactifs par le foie (Fig. 10). Chez l'homme, le paracétamol est principalement métabolisé par l'UGT1A6, et dans une moindre mesure, par l'UGT1A1 et l'UGT1A9. Cette activité relative, dépend au moins en partie de la concentration du médicament (Court *et al.*, 2001). L'activité

de l'UGT1A6 a été trouvée non seulement dans le foie mais aussi dans le tissu rénal (McGurk *et al.*, 1998).

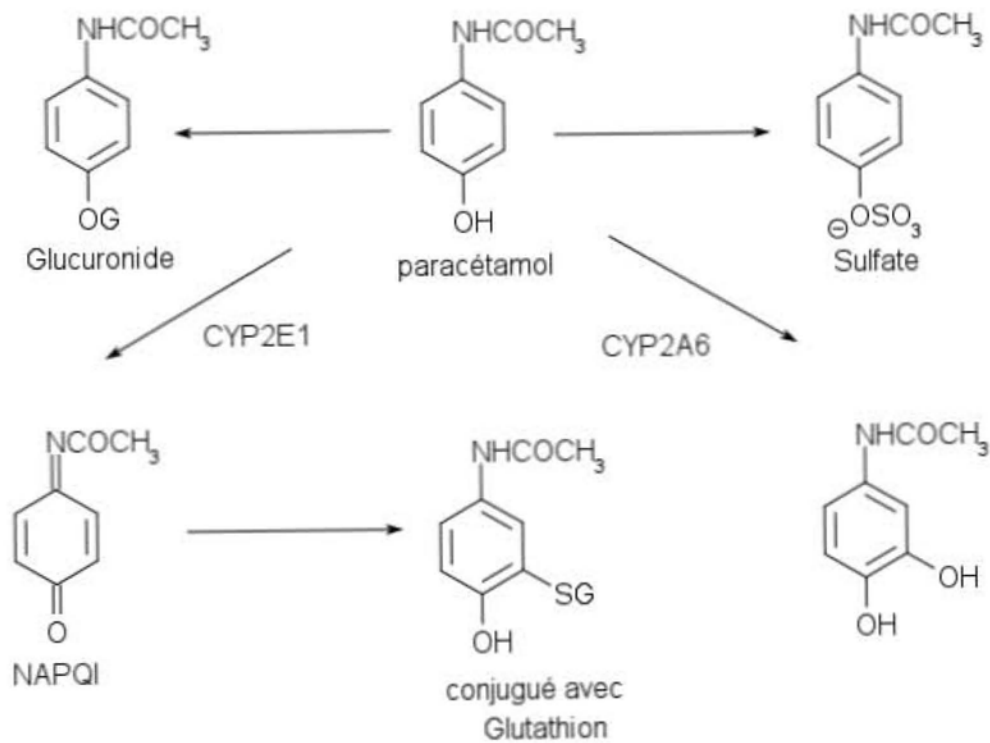


Figure 10 : Les différentes voies d'élimination du paracétamol avec la voie principale de la glucuroconjugaison (en haut à droite la sulfoconjugaison, en bas à gauche la voie menant à la N-acétyl p-benzoquinone imine, responsable de la toxicité, et en bas à droite une voie mineure aboutissant au 3-hydroxyparacétamol) (D'après Prescott, 1996).

III.2. Effets de l'estradiol sur le cartilage articulaire chez l'homme

L'arthrose est un groupe hétérogène de situations pathologiques qui conduisent à des symptômes associés à des défauts d'intégrité du cartilage articulaire, accompagnés de la modification de l'os sous-chondral (Altman *et al.*, 1986). Chez certaines femmes, une arthrose symptomatique des mains et des genoux apparaît rapidement en période de

ménopause. Cette observation a conduit à suggérer que les estrogènes sont impliqués dans la pathologie arthrosique (Cecil et Archer, 1925). Le rôle putatif des estrogènes est confirmé par le fait que la prévalence de l'arthrose est plus élevée chez les femmes post-ménopausée que chez les hommes (Felson et Zhang, 1998 ; Van Saase *et al.*, 1989 ; Felson et Nevitt, 1998). Les estrogènes peuvent avoir un effet sur les tissus associés à l'arthrose du genou par action cellulaire et moléculaire directe sur les synoviocytes, les chondrocytes et les cellules de l'os, sur le maintien de la rigidité des os, ou par le contrôle de l'expression d'un excès de cytokines. L'estradiol (E2), le principal estrogène chez les femmes préménopausées, diminue lors de la ménopause. En outre, les produits du catabolisme de l'estradiol, y compris le 2-hydroxyestrone et le 16-hydroxyestrone, aussi ont un rôle important sur l'arthrose (Pasagian-Macaulay *et al.*, 1996 ; Sowers *et al.*, 2006).

Des récepteurs nucléaires classiques aux estrogènes (α et β) ont été mis en évidence dans les chondrocytes articulaires de rats (Pelletier, 2000), de singes (Richmond *et al.*, 2000), ainsi que chez l'homme (Ushiyama *et al.*, 1999). Les polymorphismes des récepteurs aux estrogènes sont statistiquement associés avec le risque d'arthrose généralisée (Ushiyama *et al.*, 1998). La capacité de fixation de l'estradiol est significativement plus élevée dans les chondrocytes chez les femmes que chez les hommes, pointant des différences entre les sexes dans l'importance relative de l'action de l'estradiol (Nasatzky *et al.*, 1994). De manière intéressante, l'estradiol peut favoriser l'expression des récepteurs nucléaires aux estrogènes dans les chondrocytes, renforçant ainsi ses propres effets sur les chondrocytes (Richmond *et al.*, 2000). Ainsi l'ensemble de ces observations suggèrent un rôle physiologique des estrogènes dans le cartilage (Tanko *et al.*, 2008).

III.3. Métabolisation des estrogènes

Les estrogènes suivent essentiellement trois voies de métabolisation : la sulfoconjugaison, la glucuroconjugaison et la *O*-méthylation, réactions catalysées par des STs, UGTs et la catéchol-*O*-méthyltransferase (COMT), respectivement (Brooks et Horn, 1971; Longcope *et al.*, 1985; Guldborg et Marsden, 1975). Les sulfoconjugués et les glucuronides sont toutefois les métabolites les plus abondants (Raftogianis *et al.*, 2000) (Fig. 11).

III.4. La glucuroconjugaison des estrogènes

Les connaissances sur la spécificité de substrat des UGTs humaines pour les estrogènes ont progressé significativement depuis ces dernières années. Les données indiquent que les membres de la famille UGT1A sont particulièrement impliqués dans le métabolisme des estrogènes, tandis qu'un seul membre de la sous-famille UGT2B (UGT2B7) est actif sur ces molécules (Lepine *et al.*, 2004 ; Gall *et al.*, 1999 ; Cheng *et al.*, 1998 ; Wells *et al.*, 2004 ; King *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 2002). L'enzyme UGT1A1 possède une très haute spécificité pour E₂ et est responsable de la formation du E₂-3-glucuronide (E₂-3G) dans le foie humain (Soars *et al.*, 2003). Jusqu'à récemment, peu d'informations étaient disponibles sur la conjugaison des catécholestrogènes et de leurs métabolites méthoxylés. La glucuroconjugaison des catécholestrogènes peut se produire sur trois sites d'hydroxylation, en position 3, 17 et 2 ou 4 (Lepine *et al.*, 2004). Six UGTs - 1A1, 1A3, 1A8, 1A9, 1A10 et 2B7 – sont capables de conjuguer E₂ et estrone (E₁), ainsi que leur produits dérivés hydroxylés et méthoxylés. La régiosélectivité de la glucuroconjugaison a été démontrée pour E₂, qui est conjugué aux positions 3 et 17 par au moins deux UGTs, UGT1A1 et UGT2B7 (Gall *et al.*, 1999 ; Senafi *et al.*, 1994 ; Fisher *et al.*, 2000 ; Basu *et al.*, 2004). Dans le cas de catécholestrogène (CE), la glucuroconjugaison se produit principalement sur les groupements 3-hydroxyl du 2-OHCEs et 4-hydroxyl du 4-OHCEs. Elle est effectuée par un

petit nombre d'UGTs (Lepine *et al.*, 2004). Ces réactions sont catalysées principalement par l'UGT1A1 et l'UGT1A8, qui ont une préférence pour le 2-hydroxy E₁ et 2-hydroxy E₂, tandis que l'UGT2B7 a une plus grande spécificité pour le 4-hydroxy E₁ et le 4-hydroxy E₂ (Gestl *et al.*, 2002 ; Cheng *et al.*, 1998 ; Albert *et al.*, 1999 ; Mojarrabi *et al.*, 1996).

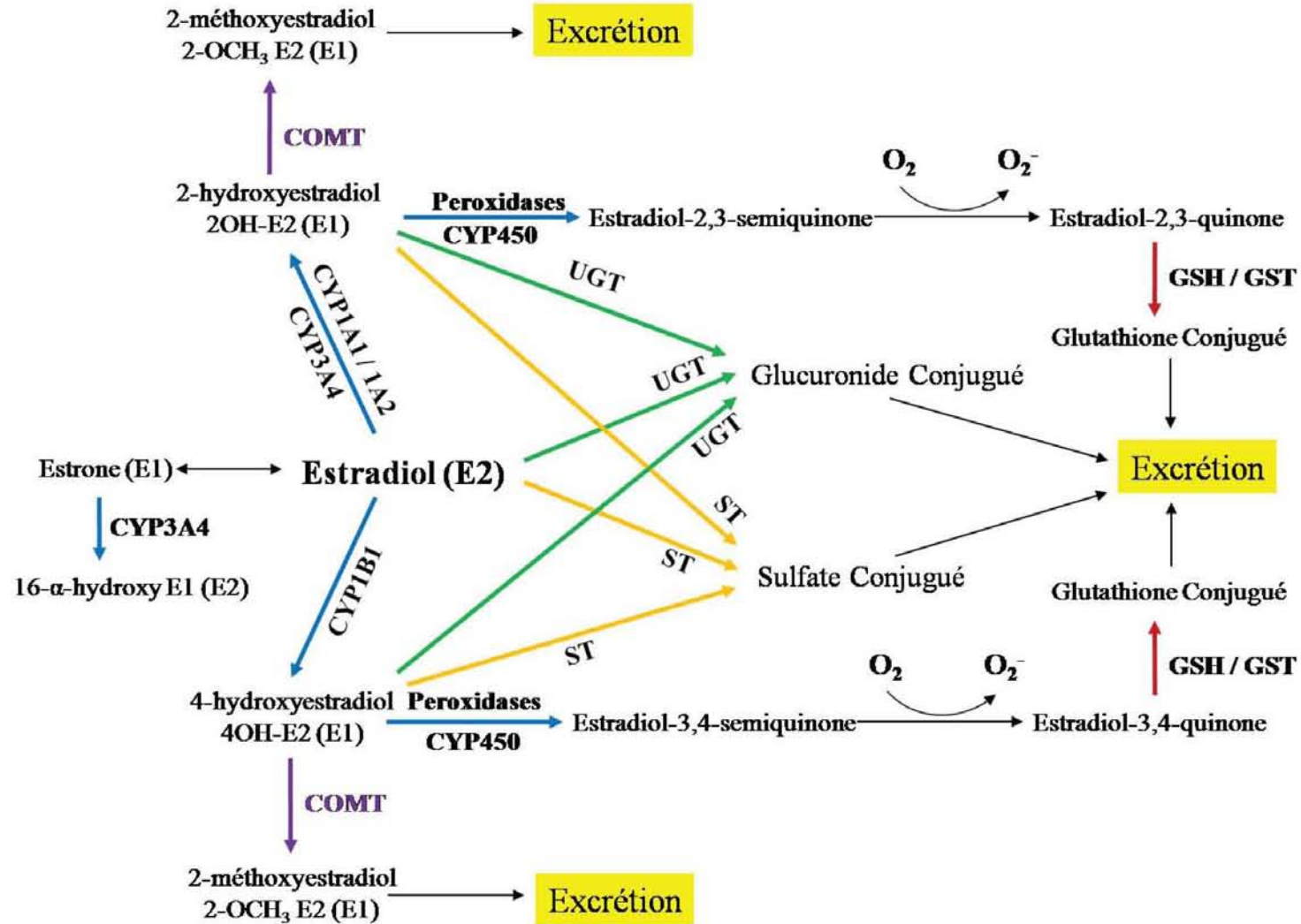


Figure 11 : Les différentes voies du métabolisme de l'estradiol (D'après Lakhani et al, 2003).

But du travail et stratégie utilisée

Notre travail s'inscrit dans l'étude structure-fonction des UGTs humaines, thématique développée depuis longtemps au laboratoire. Il comprend deux parties :

1- Il vise à mieux comprendre les événements moléculaires qui régissent la catalyse enzymatique ainsi que la spécificité de substrat. Plus particulièrement nous nous intéresserons au rôle joué par les acides aminés carboxyliques (acides aspartique et glutamique) ainsi que par les histidines, afin d'identifier la base catalytique et les résidus gouvernant la reconnaissance des substrats de l'isoforme UGT1A6. Cette recherche fait appel à une approche pluridisciplinaire impliquant :

- la production de l'enzyme recombinante sous forme active, en quantité suffisante pour les besoins de l'expérimentation.

- la génération de mutants sur la base d'alignements de séquences (mutagenèse dirigée), et une analyse cinétique de ces mutants.

- la modification chimique de l'enzyme.

- la modélisation moléculaire par homologie avec la structure de glycosyltransférases dont la structure tri-dimensionnelle a été élucidée.

2- Dans une 2^{ème} partie, nous rechercherons les isoformes UGTs qui sont exprimées dans les chondrocytes humains, cellules du cartilage. Ce projet qui rentre dans la thématique de l'UMR 7561 « Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires » doit permettre d'apprécier la contribution de ces isoformes dans le métabolisme de médicaments (AINS, antalgiques) et de substances endogènes (estrogènes) qui jouent un rôle important dans l'homéostasie de la matrice cartilagineuse.

Cette étude fait appel à la culture de chondrocytes humains à partir de pièces opératoires articulaires fournies par le CHU de Nancy (Service d'Orthopédie, Pr. D. Mainard) et à la mesure de l'expression des UGTs par RT-PCR, Western blot et activité enzymatique.

Chapitre IV.

Matériels et Méthodes

IV.1 Matériels

IV.1.1. Réactifs biochimiques

— Les produits suivants proviennent de chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) :

- Les substrats et dérivés :

4-méthylumbelliférol (4MO), α -naphthol, scopolectine, quercétine, 4-nitrophénol, 4-nitrocatéchol, 4-hydroxybiphényl, 2-éthylphénol, 4-éthylphénol, ibuprofène, kétoprofène, 4-aminobiphényl, 2-naphthylamine, diphenylamine, N-desméthylclozapine, cyprohéptadine, doxépine, eugénol, octyl-gallate, β -estradiol, 2-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestrone, acide UDP-glucuronique, glucuronide de 4-MO, D-glucose, benzo(a)pyrène. La structure de ces substrats est montrée dans la figure 12.

- Les tampons, détergents et solvants :

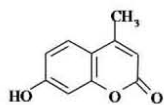
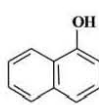
acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthane) sulfonique (HEPES), Tris-HCl, Tris-base, Triton X-100, Tween 20, albumine sérique bovine, agar, isopropanol, glycérol, phosphate de potassium,

- L'agent modificateur des acides aminés : dicyclohexylcarbodiimide (DCCI).

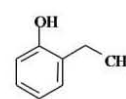
— Autres produits :

Le kétoprofène est fourni par Spécia Rhône Poulenc (France). Le dodécyl sulfate de sodium (SDS), la glycine et l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) proviennent d'Interchim (Montluçon, France). Le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) est fourni par SUPELCO (France).

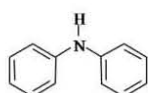
4-Méthylumbelliféone

 α -Naphthol

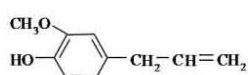
2-Ethylphénol



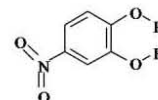
Diphénylamine



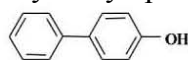
Eugénoï



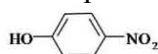
4-Nitrocatechol



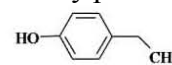
4-Hydroxybiphényl



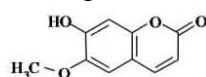
4-Nitrophénol



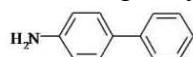
4-Ethylphénol



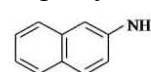
Scopoïétine



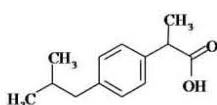
4-Aminobiphényl



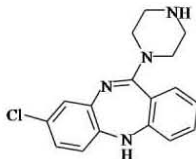
2-Naphthylamine



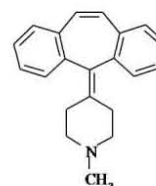
Ibuprofène



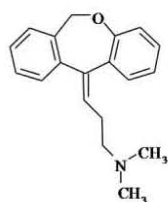
N-desméthylclozapine



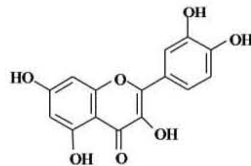
Cyprohéptadine



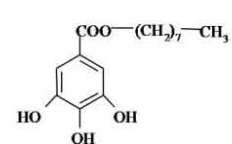
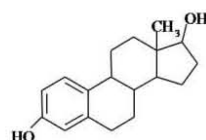
Doxépine



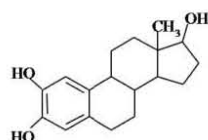
Quercétine



Octyl-gallate

 β -Estradiol

2-Hydroxyestradiol



2-Hydroxyestrone

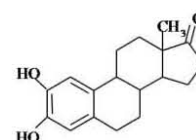


Figure 12 : Structure chimique des substrats utilisés.

IV.1.2. Réactifs de biologie cellulaire

Les réactifs utilisés en culture cellulaire : les milieux de cultures DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) et DMEM F-12, le sérum de veau fœtal (SVF), les antibiotiques pénicilline-streptomycine (10000 U/ml), la glutamine (200 mM), la trypsine-EDTA et le tampon *Phosphate Buffer Saline* (PBS) proviennent de Life Technologies-Gibco BRL (Gaithersburg, MD).

IV.1.3. Réactifs de biologie moléculaire

Les enzymes de restriction sont fournies par New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Les anticorps anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (anti-rabbit IgG) proviennent de Sigma, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-nitrotetrazolium blue (BCIP/NBT) d'Interchim et le mélange acrylamide-bis acrylamide d'Euromedex (Mundolsheim, France). Le kit utilisé pour la mutagenèse dirigée « QuickChange™ site-directed mutagenesis kit » est commercialisé par Stratagene (La Jolla, CA, USA). Le kit de transformation des levures « Pichia Easy Comp Kit » et le plasmide d'expression dans la levure *Pichia pastoris* pPICZB proviennent de chez Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Les kits de mini-préparation « QIAprep® Spin – miniprep » et de maxi-préparation d'ADN plasmidique « QIAGEN® plasmid midi kit » sont fournis par QIAGEN (Courtaboeuf, France). Le bacto™ peptone et l'extrait de levure proviennent de Difco (Le Pont de Claix, France). Le *yeast nitrogen base* est fourni par Sigma et la zéocine par Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

IV.2. Culture cellulaire (Isolement et culture des chondrocytes)

Les chondrocytes humains sont préparés à partir de cartilage (têtes fémorales) humain provenant de déchets opératoires de pose de prothèse de hanche (CHU Nancy). Le cartilage est traité 2 h à 37°C dans une solution de pronase (2mg/ml dans du NaCl (0,9%) contenant 1% (v/v) d'antibiotiques) puis toute la nuit dans la collagénase (1,5mg/ml dans du DMEM-F12 supplémenté par 10% (v/v) de SVF, 1% (v/v) de glutamine et 1% (v/v) d'antibiotiques). Le milieu est alors centrifugé 5 minutes à 300 x g, et le culot cellulaire est remis en suspension dans un volume adéquat de milieu DMEM-F12 complet. Les chondrocytes sont mis en culture à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans des boîtes de Petri.

Lorsque les chondrocytes sont à confluence, les cultures sont rincées par le PBS et traitées pendant 3 minutes à 37°C par la trypsine. Après une centrifugation de 5 minutes à 300 x g, les culots sont repris dans un volume approprié de milieu complet et les cellules sont remises en culture.

IV.3. Expression hétérologue de l'UGT recombinante chez la levure *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)

IV.3.1. Système d'expression

Nous avons choisi de travailler avec une levure méthylothrophique, *P. pastoris*, qui a la capacité d'utiliser le méthanol comme seule source de carbone. La première étape de cette voie métabolique est l'oxydation du méthanol par l'oxygène libre en formaldéhyde; cette réaction est catalysée par l'alcool oxydase (AOX1) dont le gène est sous le contrôle d'un promoteur fortement et exclusivement inductible par le méthanol. Cette enzyme ayant une très faible affinité pour l'oxygène, la levure compense en produisant une large quantité

d'enzyme. L'ADNc codant la protéine que nous souhaitons produire est placé sous le contrôle de ce promoteur, ce qui implique un fort taux d'expression du gène et une importante production de la protéine d'intérêt en l'absence d'autre source de carbone que le méthanol dans le milieu de culture (Fig. 13).

IV.3.2. Construction des plasmides

L'ADNc codant pour l'UGT1A6 humaine (Harding *et al.*, 1988) a été précédemment sous cloné dans les sites *HindIII* - *XbaI* du vecteur pCDNA1.1 (Ouzzine *et al.*, 1994a). Afin d'exprimer l'UGT1A6 dans la levure, l'ADNc a été modifié par PCR dans le but d'ajouter un site de restriction *EcoRI* et une séquence de Kozak en 5' ainsi qu'un site de restriction *XbaI* en 3'. Le fragment de PCR est sous-cloné dans le vecteur PCR2.1 en utilisant le TA cloning kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le vecteur recombinant est alors digéré par les enzymes *EcoRI* et *XbaI*, et le fragment résultant est inséré dans les sites *EcoRI-XbaI* du vecteur d'expression de levure pPICZB afin de générer le vecteur recombinant pPICZ-UGT1A6.

Les séquences codant pour les UGTs 1A1, 1A3, 1A4 et 1A9 humaines ont été isolées à partir de la banque d'ADNc de foie humain (Clonetch, Palo Alto, CA) par PCR. Les ADNc codant pour ces UGTs ont été modifiés par PCR afin d'ajouter un site de restriction *EcoRI* et une séquence de Kozak en 5' ainsi qu'un site de restriction *XbaI* en 3'. Les produits de PCR sont ensuite sous-clonés dans le vecteur PCR2.1 en utilisant le TA cloning kit et séquencés dans les deux sens. Les ADNc sont isolés par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* et *XbaI* et ligués dans les sites *EcoRI-XbaI* du vecteur d'expression de levure pPICZB afin de générer les vecteurs recombinants pPICZ-UGT1A1, pPICZ-UGT1A3, pPICZ-UGT1A4 et pPICZ-UGT1A9.

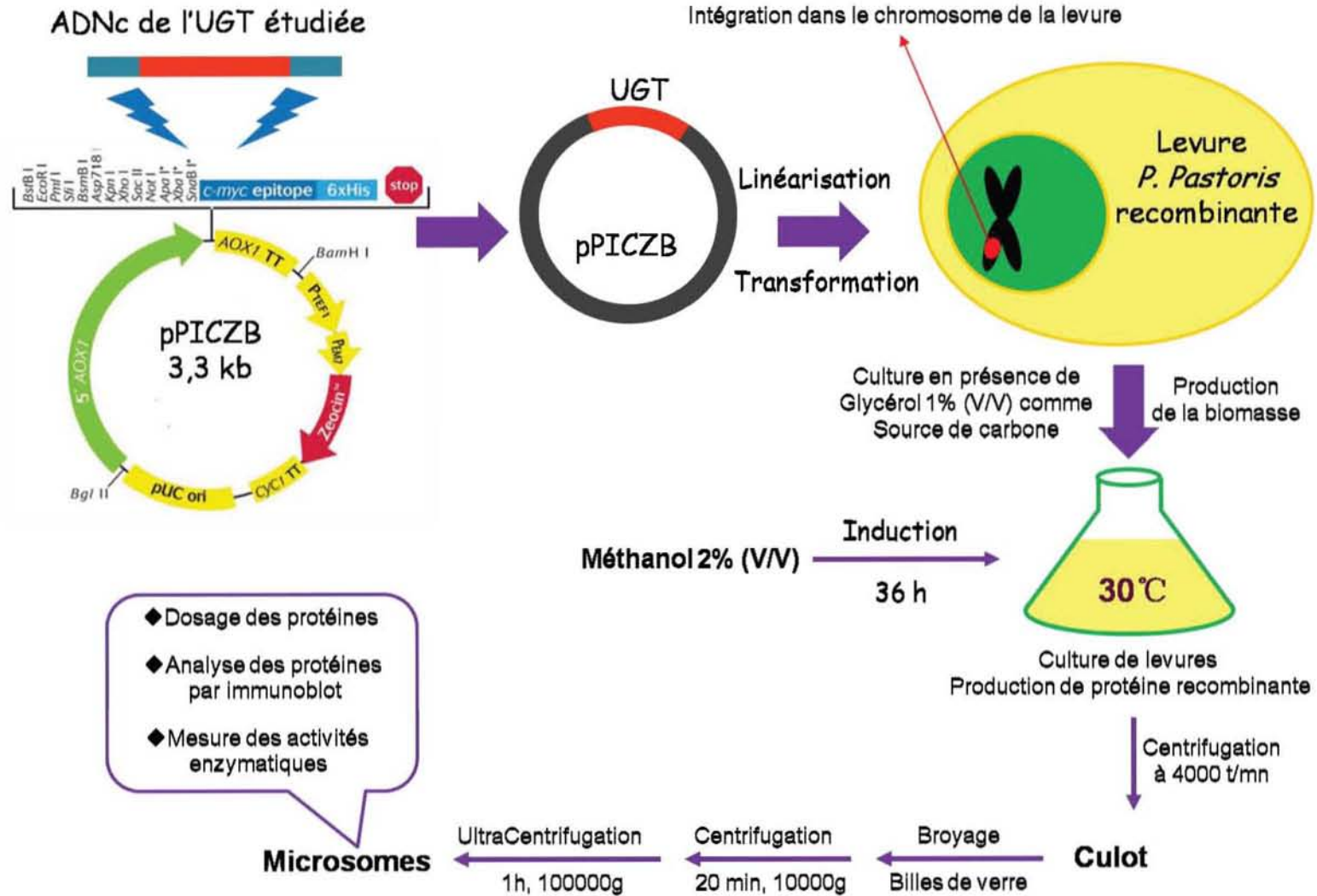


Figure 13 : Stratégie de production des UGTs et de leurs mutants dans la levure méthylotrophe *P. pastoris*.

IV.3.3. Mutagenèse dirigée

Les différentes mutations sont introduites par PCR à l'aide du kit de mutagenèse dirigée Quick ChangeTM (Stratagène, la Jolla, CA). Le mélange réactionnel contient 5 µl du tampon de l'enzyme, 200 µM de dNTP, 5 à 25 ng du vecteur, 10 pmol de l'oligonucléotide sens et 10 pmol de l'oligonucléotide antisens contenant la mutation à introduire (Tableau 3) et 1,5 U de l'ADN polymérase *Pfu* Turbo dans un volume final de 50 µl.

La PCR débute par une étape de dénaturation de la matrice par chauffage à 95°C pendant 30 secondes laquelle est suivie d'une étape d'hybridation avec les oligonucléotides sens et antisens à 55°C pendant 1 minutes et une phase d'élongation à 68°C de 1 min/kb. Le cycle dénaturation-hybridation-élongation est répété 16 fois. Le produit de PCR est digéré par l'enzyme de restriction Dpn I pendant 2 h à 37°C et utilisé pour la transformation de bactéries compétentes *E. coli* (One Shot® TOP10, Invitrogen). Toutes les mutations sont vérifiées par séquençage. Les différents oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée sont représentés dans le tableau 3.

Mutant	Amorce	Séquence
H38A (1A6)	Sens	5'-CA GGA CGGAA GCG <u>CC</u> TGGCTTA GTATGAA G-3'
	Antisens	5'-CTTCATACTAA GCCA <u>GGCG</u> CTTCCGTCTG-3'
H38D (1A6)	Sens	5'-CA GGA CGGAA GCGA <u>CT</u> GCTTA GTATGAA G-3'
	Antisens	5'-CTTCATACTAA GCCA <u>GTCG</u> CTTCCGTCTG-3'
H38N (1A6)	Sens	5'-GA CGGAA GCA <u>ACT</u> GCTTA GT-3'
	Antisens	5'-ACTAAGCCA <u>GTT</u> GCTTCCGTC-3'
H38P (1A6)	Sens	5'-GA CGGAA GCC <u>CT</u> TGGCTTA GT-3'
	Antisens	5'-ACTAAGCCA <u>AGGG</u> CTTCCGTC-3'
H38Q (1A6)	Sens	5'-CCTCA GGA CGGAA GCCA <u>GT</u> GCTTA GTATGAA G-3'
	Antisens	5'-CTTCATACTAA GCCA <u>CTG</u> GCTTCCGTCTGA GG-3'
H38R (1A6)	Sens	5'-GA CGGAA GCC <u>G</u> CTGGCTTA GT-3'
	Antisens	5'-ACTAAGCCA <u>GCGG</u> CTTCCGTC-3'
H38Y (1A6)	Sens	5'-GA CGGAA GCT <u>ACT</u> GCTTA GT-3'
	Antisens	5'-ACTAAGCCA <u>GTA</u> GCTTCCGTC-3'
H38K (1A6)	Sens	5'-GA CGGAA GCA <u>AGT</u> GCTTA GT-3'
	Antisens	5'-ACTAAGCCA <u>CTT</u> GCTTCCGTC-3'
D145A (1A6)	Sens	5'-A GCAA GTTT <u>GCT</u> GCTCTTTTC-3'
	Antisens	5'-GAAAAGA GCA <u>GCAA</u> ACTTGCT-3'
D150A (1A6)	Sens	5'-CTTTTCACA <u>GCCCCA</u> GCCTTA-3'
	Antisens	5'-TAA GGCTGG <u>GGC</u> TGTGAAAAG-3'
D150C (1A6)	Sens	5'-TTTGATGCTCTTTTCA CA <u>TGTC</u> CA GCCTTACCCTGT-3'
	Antisens	5'-CCCA CAGGGTAA GGCTGG <u>ACAT</u> GTGAAAAGA GCATC-3'
D150E (1A6)	Sens	5'-CTTTTCACA <u>GAGCCA</u> GCCTTA-3'
	Antisens	5'-TAA GGCTGG <u>CTC</u> TGTGAAAAG-3'
D150N (1A6)	Sens	5'-TTTGATGCTCTTTTCA CAA <u>ACCCA</u> GCCTTACCCTGT-3'
	Antisens	5'-CCCA CAGGGTAA GGCTGG <u>GTTT</u> GTGAAAAGA GCATC-3'
D150Q (1A6)	Sens	5'-TTTGATGCTCTTTTCA CA <u>CAGCCA</u> GCCTTACCCTGT-3'
	Antisens	5'-CCCA CAGGGTAA GGCTGG <u>CTGT</u> GTGAAAAGA GCATC-3'
D150S (1A6)	Sens	5'-CTTTTCACA <u>TCCCCA</u> GCCTTA-3'
	Antisens	5'-TAA GGCTGG <u>GGAT</u> TGTGAAAAG-3'
D150T (1A6)	Sens	5'-TTTGATGCTCTTTTCA CA <u>ACCA</u> GCCTTACCCTGT-3'
	Antisens	5'-CCCA CAGGGTAA GGCTGG <u>TGTT</u> GTGAAAAGA GCATC-3'
E287A (1A6)	Sens	5'-TTGTCTCA <u>GGCA</u> TTTGAA GCC-3'
	Antisens	5'-GGCTTCAAAT <u>GCCT</u> GAGAA CAA-3'
E289A (1A6)	Sens	5'-CA GGAATTT <u>GCA</u> GCCTACATT-3'
	Antisens	5'-AATGTA GGCT <u>GCAA</u> ATTCCTG-3'
E297A (1A6)	Sens	5'-GCTTCTGGA <u>GCA</u> CATGGAATT-3'
	Antisens	5'-AATTCCAT <u>GTC</u> TCCAGAA GC-3'
E314A (1A6)	Sens	5'-GAAATCCA <u>GCCAA</u> GAAAGCT-3'
	Antisens	5'-AGCTTTCTT <u>GGCT</u> GGAATTTTC-3'

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée. Les mutations sont soulignées.

D357A (1A6)	Sens	5'-CCCCAAAAC <u>GCT</u> CTGCTTGGT-3'
	Antisens	5'-ACCAAGCA <u>GAG</u> CGTTTTGGGG-3'
E378A (1A6)	Sens	5'-CATGGTGTTTAT <u>GCC</u> AGCATATGCAAT-3'
	Antisens	5'-ATTGCATATGCT <u>GGC</u> ATAAACACCATG-3'
E378D (1A6)	Sens	5'-CATGGTGTTTAT <u>GAC</u> AGCATATGCAAT-3'
	Antisens	5'-ATTGCATATGCTGTCATAAACACCATG-3'
E378S (1A6)	Sens	5'-GGTGTTTAT <u>TCAA</u> GCATATGC-3'
	Antisens	5'-GCATATGCTT <u>GAA</u> ATAAACACC-3'
D394A (1A6)	Sens	5'-TTGTTTGGT <u>GCT</u> CA GATGGAC-3'
	Antisens	5'-GTCCATCT <u>GAG</u> CA CCAAACAA-3'
D394E (1A6)	Sens	5'-TTGTTTGGT <u>GAG</u> CA GATGGAC-3'
	Antisens	5'-GTCCATCT <u>GCT</u> CACCAAACAA-3'
D397A (1A6)	Sens	5'-GTGATCA GAT <u>GGCCA</u> ATGCAAA GCGCATG-3'
	Antisens	5'-CATGCGCTTTGCATT <u>GGC</u> CATCTGATCA C-3'
D397E (1A6)	Sens	5'-GGTGATCA GATG <u>GAG</u> AATGCAAAGCGCATG-3'
	Antisens	5'-CATGCGCTTTGCATT <u>CTC</u> CATCTGATCA CC-3'
D420A (1A6)	Sens	5'-ACTTCTGAA <u>GCT</u> TTA GAAAATGCT-3'
	Antisens	5'-AGCATTTTCTAA <u>AGC</u> TTCA GAA GT-3'
D447A (1A6)	Sens	5'-AGCCTTCACAA <u>GGCCC</u> GCCCGGTG-3'
	Antisens	5'-CACCGGGCG <u>GGC</u> CTTGTGAA GGCT-3'
D447E (1A6)	Sens	5'-AGCCTTCACAA <u>GGA</u> ACGCCCGGTGGA-3'
	Antisens	5'-TCCACCGGGCGT <u>TC</u> CTTGTGAA GGCT-3'
D454A (1A6)	Sens	5'-GAGCCGCT <u>GGCC</u> CTGGCCGTG-3'
	Antisens	5'-CACGGCCA <u>GGG</u> CCA GCGGCTC-3'
E461A (1A6)	Sens	5'-GTGTTCTGGGT <u>GGC</u> CTTTGTGATG-3'
	Antisens	5'-CATCA CAAA <u>GGC</u> CA CCCA GAACA C-3'
E461D (1A6)	Sens	5'-GTGTTCTGGGT <u>GAC</u> TTTGTGATGAG-3'
	Antisens	5'-CTCATCA CAAA <u>GT</u> CCA CCCA GAACAC-3'
E461S (1A6)	Sens	5'-TTCTGGGT <u>GTC</u> GTTTGTGATG-3'
	Antisens	5'-CATCA CAAA <u>CGA</u> CACCCA GAA-3'
E461Q (1A6)	Sens	5'-GCCGTGTTCTGGGT <u>GCA</u> GTTTGTGATGAGGCA CA-3'
	Antisens	5'-TGTGCCTCATCAAA <u>ACT</u> GCA CCA GAACA CGGC-3'
D488A (1A6)	Sens	5'-TACCATTCTTGGCCGTGATTGGTTTCC-3'
	Antisens	5'-GGAAA CCAATCAC <u>GGC</u> CAAGGAATGGTA-3'
D488E (1A6)	Sens	5'-CATTCTTGG <u>AG</u> GTGATTGGT-3'
	Antisens	5'-ACCAATCA C <u>CT</u> CCAAGGAATG-3'
D488S (1A6)	Sens	5'-CATTCTTGT <u>CC</u> GTGATTGGT-3'
	Antisens	5'-ACCAATCA C <u>GGA</u> CAAGGAATG-3'

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée (suite). Les mutations sont soulignées.

P40A (1A4)	Sens	5'-GATGGCAGC <u>GCCT</u> GGCTCA GC-3'
	Antisens	5'-GCTGA GCCA <u>GGCGCT</u> GCCA TC-3'
P40H (1A4)	Sens	5'-GATGGCAGC <u>CACT</u> GGCTCA GC-3'
	Antisens	5'-GCTGA GCCA <u>GTGGCT</u> GCCATC-3'
D152A (1A4)	Sens	5'-GTTTTAACA <u>GCCCCG</u> TTAAC-3'
	Antisens	5'-GTTAA CGGGG <u>GCT</u> GTAAAAAC-3'
D152E (1A4)	Sens	5'-GTTTTAACA <u>GAG</u> CCCCGTTAAC-3'
	Antisens	5'-GTTAA CGGG <u>CTCT</u> GTAAAAAC-3'
H40A (1A3)	Sens	5'-ATTGATGGCAGC <u>GCCT</u> GGCTCA GCATG-3'
	Antisens	5'-CATGCTGA GCCA <u>GGCGCT</u> GCCATCAAT-3'
H40P (1A3)	Sens	5'-ATTGATGGCAGC <u>CCCT</u> GGCTCA GCATG-3'
	Antisens	5'-CATGCTGA GCCA <u>GGGGCT</u> GCCATCAAT-3'
H39A (1A1)	Sens	5'-CCA GTGGATGGCAGC <u>GCTT</u> GGCTGA GCATGCTT-3'
	Antisens	5'-AAGCATGCTCA GCCA <u>AGCGCT</u> GCCATCCA CTGG-3'
H39P (1A1)	Sens	5'-CCA GTGGATGGCAGC <u>CCCT</u> GGCTGA GCATGCTT-3'
	Antisens	5'-AAGCATGCTCA GCCA <u>GGGGCT</u> GCCATCCA CTGG-3'
D151A (1A1)	Sens	5'-ATGCTGACGG <u>CCCTTTC</u> CTT-3'
	Antisens	5'-AAGGAAA GGGG <u>CCGT</u> CA GCAT-3'
D151E (1A1)	Sens	5'-ATGCTGACGG <u>AGC</u> CTTTCCTT-3'
	Antisens	5'-AAGGAAA GG <u>CTCC</u> GTCA GCAT-3'
D148A (1A9)	Sens	5'-GCA GTGTTTCTC <u>GCT</u> CCTTTTGATAAC-3'
	Antisens	5'-GTTATCAAAAAGG <u>AGCGA</u> GAAACACTGC-3'
D148E (1A9)	Sens	5'-GCA GTGTTTCTC <u>GAA</u> CCTTTTGATAAC-3'
	Antisens	5'-GTTATCAAAAAGG <u>TTCGA</u> GAAACACTGC-3'

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée (suite). Les mutations sont soulignées.

IV.3.4. Transformation de bactéries et préparation d'ADN plasmidique

IV.3.4.1. Transformation de bactéries compétentes

Les bactéries compétentes sont décongelées dans la glace et mises au contact avec le plasmide pendant 25 minutes dans la glace. Les bactéries sont transformées par choc thermique en plaçant le mélange à 42°C pendant 45 secondes, puis immédiatement refroidies dans la glace pendant 2 minutes. Après 1 h d'incubation dans 150 µl de milieu SOC à 37°C sous agitation, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Petri contenant un milieu LB (5 g/l NaCl), 2% (p/v) d'agar et de la zéocine (100 µg/ml). Les colonies obtenues sont mises en culture dans un volume de 3 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml de zéocine sous agitation à 37°C pendant toute la nuit. Elles sont utilisées pour réaliser des mini-préparations d'ADN plasmidique.

IV.3.4.2. Mini-préparation d'ADN plasmidique

La préparation et la purification d'ADN plasmidique sont réalisées au moyen du kit QIAprep[®] Spin – miniprep (QIAGEN) suivant le protocole fourni par le fabricant. Les cultures sont centrifugées et les bactéries sont remises en suspension dans 250 µl de tampon de resuspension (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), lysozyme 10 µg/ml, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase) puis lysées par une solution alcaline de détergents (1% (p/v) SDS, 200 mM NaOH). Après ajout d'acétate de potassium, seul l'ADN plasmidique se renature. La paroi bactérienne, la membrane plasmique, les acides nucléiques et les protéines précipitent et sont éliminés par centrifugation. Les ARN sont dégradés par la RNase présente dans le tampon de resuspension.

L'ADN plasmidique est ensuite purifié sur une colonne QIAprep[®] Spin selon les instructions du fournisseur. Brièvement, le surnageant obtenu après la précédente centrifugation est déposé sur une colonne de silice et, après filtrage et lavage, l'ADN

plasmidique est élué dans 30 µl d'eau ultrapure. Cette préparation plasmidique est utilisée pour le séquençage. Si la séquence correspond à celle attendue, les bactéries issues du clone étudié sont remises en culture dans 50 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml de zéocine et utilisées ultérieurement pour une maxi-préparation d'ADN.

IV.3.4.3. Maxi-préparation d'ADN plasmidique

Cette étape permet la préparation et la purification d'une grande quantité d'ADN plasmidique au moyen du QIAGEN® plasmid midi kit (QIAGEN). Le principe de la préparation est comparable à celui de la mini-préparation décrite ci-dessus. Après mise en suspension et lyse des bactéries, les différents composants cellulaires sont sédimentés par centrifugation et l'ADN plasmidique est purifié sur une colonne QIAGEN-tip 100 selon le protocole fourni par le fabricant. En résumé, le surnageant obtenu après la première centrifugation est appliqué sur la colonne pré-équilibrée dans un tampon 750mM NaCl, 50mM MOPS (pH 7,0), 15% (v/v) isopropanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100. Le surnageant est déposé sur la colonne et l'ADN est fixé sur la matrice, et est ensuite lavé par un tampon 50 mM MOPS (pH 7,0), 1 M NaCl, 15% (v/v) isopropanol. L'ADN plasmique est élué par un tampon 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1,25 M NaCl, 15% (v/v) isopropanol, précipité par 0,8 volumes d'isopropanol, lavé avec de l'éthanol (70% v/v), séché et repris dans un volume approprié d'eau ultrapure.

IV.3.4.4. Préparation des levures *P. pastoris* compétentes

Les levures compétentes sont préparées à l'aide du Pichia EasyComp™ Kit. Les levures *P. pastoris* sont d'abord cultivées dans un volume de 10 ml de milieu YPD (1% (p/v) extrait de levure, 2% (p/v) peptone, 2% (p/v) D-glucose) pendant une nuit et ensuite sont diluées avec le milieu YPD jusqu'à une densité cellulaire comprise entre DO₆₀₀ 0,1~0,2. Les levures sont cultivées sous agitation à 30°C jusqu'à une densité cellulaire comprise entre DO₆₀₀

0,6~1,0. Les levures sont reprises dans 10 ml de solution I (1,0 M sorbitol, 10 mM bicine (pH 8,35) et 3% (v/v) éthylène glycol) après une centrifugation à 500 x g pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite les levures sont reprises dans 1 ml de solution I après une deuxième centrifugation à 500 x g pendant 5 minutes à température ambiante et les levures deviennent compétentes. Les levures compétentes obtenues sont aliquotées et congelées à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.3.4.5. Transformation de la levure *Pichia pastoris*

Les levures sont transformées à l'aide du Pichia EasyComp™ Kit. Brièvement, les levures compétentes sont mises en contact pendant 1 h à 30°C avec 1 ml de solution II (40% (p/v) polyéthylène glycol et 0,2 M bicine (pH 8,35)) et l'ADN plasmidique purifié préalablement et linéarisé par l'enzyme de restriction *PmeI* dans un tampon contenant 50 mM acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium et 1 mM dithiothreitol (DTT). L'étape de linéarisation du plasmide permet de faciliter son intégration dans le génome de la levure par recombinaison homologue. La transformation est réalisée par choc thermique en plaçant les levures pendant 10 minutes à 42°C. Les cellules transformées sont ensuite remises en culture dans le milieu YPD (1% (p/v) extrait de levure, 2% (p/v) peptone, 2% (p/v) D-glucose). Après 3 à 4 h de culture sous agitation à 30°C, les cellules sont collectées par centrifugation (10 minutes à 3000 x g) et mises en suspension dans 150 µl d'une solution III (0,15 mM NaCl et 10 mM bicine (pH 8,35)). Les levures ainsi transformées sont alors étalées sur boîtes de Petri contenant du milieu YPD, 2% d'agar et la zéocine (100 µg/ml). Les colonies de levures ayant inséré le vecteur recombinant présentent une résistance à la zéocine et poussent sur la boîte en deux jours à 30°C. Les colonies sont alors mises en culture en milieu YPD et testées pour l'expression de la protéine recombinante.

IV.3.5. Culture de levures

Les levures sont cultivées en Erlen-Meyer sous agitation à 215 rpm à 30°C dans un milieu BMGY (1 % (p/v) extrait de levure, 2% (p/v) peptone, 1 % (v/v) glycérol, 100 mM phosphate de potassium (pH 6,0), 1,34% (p/v) *yeast nitrogen base*). La culture est poursuivie environ 36 h jusqu'à une densité cellulaire comprise entre DO_{600} 2~6. L'expression des protéines recombinantes est réalisée par le milieu BMGM contenant 1% (p/v) extrait de levure, 2% (p/v) peptone, 100 mM phosphate de potassium (pH 6,0), 1,34% (p/v) *yeast nitrogen base* et 2% (v/v) méthanol. Les cultures sont poursuivies pendant 48 h à 30°C sous agitation en ajoutant 2% (v/v) de méthanol toutes les 12 h pour maintenir l'induction et la production de la protéine recombinante. En fin de culture, les levures sont collectées par centrifugation (10 minutes à 3000 x g) et les culots sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.4. Analyse des Protéines

IV.4.1. Préparation d'homogénat de chondrocytes

A confluence, les cellules sont rincées une ou deux fois par le PBS. Les boîtes de Petri sont ensuite grattées et les suspensions cellulaires, collectées dans ce même tampon, sont centrifugées 10 minutes à 3000 x g. Les chondrocytes sont repris dans un tampon contenant 5 mM HEPES (pH 7,4) et 250 mM de saccharose. Après trois sonications successives de 10 secondes chacune dans la glace, l'extrait est obtenu par prélèvement de surnageant après une centrifugation de 20 minutes à 10 000 x g. Un dosage de protéines est effectué et l'homogénat obtenu est aliquoté et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.4.2. Préparation des microsomes de levure *Pichia pastoris*

Le milieu de culture contenant les levures est centrifugé à 3000 x g pendant 10 minutes.

Les culots de levures sont mis en suspension dans un tampon 50 mM phosphate de sodium (pH 7,4), 1 mM EDTA, 5% (v/v) glycérol. Les levures sont ensuite cassées par des billes de verre de 0,5 mm de diamètre sous agitation forte de 30 sec et incubées dans la glace pendant 30 secondes. Cette opération est répétée sept fois. Une première centrifugation du lysat cellulaire pendant 20 minutes à 10 000 x g permet d'éliminer les débris cellulaires, les noyaux et les mitochondries. Les microsomes de levures sont obtenus après centrifugation du surnageant à 100 000 x g pendant une heure. Les culots ainsi obtenus sont homogénéisés dans un volume approprié de tampon 5 mM Hepes (pH 7,4), 0,25 M saccharose à l'aide d'un homogénéiseur verre-verre de type « Dounce » et constituent les microsomes de levure. Après homogénéisation, un dosage de protéines est effectué sur la préparation qui est ensuite aliquotée et conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.4.3. Dosage des protéines

La concentration protéique des différentes fractions est déterminée par la technique de Bradford (1976) avec le réactif de Bio-Rad (Ivry sur Seine, France). Le réactif de Bradford se fixe sur les acides aminés basiques et aromatiques ; il se développe une coloration bleue dont l'intensité est fonction de la concentration protéique. La gamme étalon est réalisée avec de l'albumine bovine sérique (Fraction V, Sigma), et l'absorbance est lue à 595 nm sur un spectrophotomètre.

IV.4.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

La séparation des protéines microsomales est réalisée par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide d'après la méthode de Laemmli (1970) dans une mini cuve (Novex, Paris, France). Les protéines sont généralement solubilisées dans un volume minimal de «bleu de dépôt» Laemmli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (p/v) sodium dodécyl sulfate (SDS), 20% glycérol (v/v), 10% β -mercaptoéthanol et 0,1 % bleu de bromophénol (p/v), Sigma) et

portées à 100°C pendant 2 à 3 minutes avant d'être déposées sur le gel. La séparation des protéines est réalisée dans un gel de migration (10 % (v/v) de mélange acrylamide-bis acrylamide, pH 8,8) après passage dans un gel de concentration (5 % (v/v) de mélange acrylamide-bis acrylamide pH 6,8). Les agents de polymérisation : persulfate d'ammonium et *N,N,N',N'*-tétraméthyl-éthylènediamine (Temed) sont ajoutés avant de couler le gel. Le tampon de migration est constitué de 200 mM de glycine, de 25 mM de Tris-base et de 10g de SDS.

La migration des protéines s'effectue parallèlement à celle d'un marqueur de taille présentant une masse moléculaire allant de 10 à 250 kDa (Bio-Rad) sous un ampérage constant de 15 mA pour un gel. La migration est arrêtée lorsque le colorant arrive à la limite inférieure du gel. Les protéines se séparent en fonction de leur masse moléculaire apparente, les protéines de faible masse moléculaire migrant le plus rapidement dans le gel.

IV.4.5. Electrotransfert

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane d'Immobilon^P (Millipore, Bedford, USA) dans un appareil d'électrotransfert Trans-Blot (Bio-Rad) à un voltage constant de 12V pour un gel pendant une heure. La membrane est préalablement rincée 1 à 2 minutes dans le méthanol puis équilibrée dans le tampon de transfert (25 mM Tris-Base, 200 mM glycine, 20% (v/v) méthanol). La technique utilisée pour le transfert est celle du « sandwich » dans laquelle la membrane est placée au contact du gel entre deux couches de trois papiers Whatman® (Whatman International, Maidstone, UK) imbibées de tampon de transfert.

IV.4.6. Immunoblot

Une fois le transfert terminé, la membrane est saturée pendant 1 à 2 h sous agitation à température ambiante par une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 3% (p/v) dans le

tampon TBST (*Tris Buffer Saline Tween* : 150mM Tris-HCl, pH 8,5 ; 10mM NaCl ; 0,5% (v/v) Tween 20 ; 0,02% (p/v) azide de sodium). L'immunorévélation est réalisée par l'incubation de la membrane en présence des anticorps dirigés contre la partie C-terminale de l'UGT1A6 toute une nuit (Pillot *et al.*, 1993; Ouzzine *et al.*, 1994a ; 1994b). Cet anticorps reconnaît toutes les isoformes de la famille 1A.

Une première série de 6 lavages de 5 minutes dans le tampon TBST permet d'éliminer l'excès de premier anticorps qui ne s'est pas fixé à la membrane. Un deuxième anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline est dilué au 1/10 000^{ème} dans le tampon TBST, puis incubé pendant une heure avec la membrane sous agitation à température ambiante. Une deuxième série de lavages (6 lavages de 5 minutes) dans le tampon TBST permet d'éliminer l'excès d'anticorps non couplé.

Finalement, la membrane est révélée après plusieurs lavages rapides dans l'eau distillée par ajout de NBT-BCIP, substrat de la phosphatase alcaline qui développe une coloration bleu-violet lorsqu'il est métabolisé par cette enzyme. La révélation de la membrane se produit jusqu'à apparition de bandes. La présence de l'UGT est confirmée par comparaison des bandes obtenues dans nos échantillons avec celles des marqueurs de masse moléculaire et d'un contrôle positif qui migrent en parallèle des échantillons.

IV.4.7. Dosage de l'activité de glucuroconjugaison

IV.4.7.1. Dosage de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-méthylumbellifénone

La mesure de la glucuroconjugaison de la 4-MO par fluorescence a été réalisée selon une technique décrite dans la littérature par Lilienblum *et al.*, (1982). Cette méthode est basée sur la fluorescence spécifique du glucuronide de 4-MO.

La quantité souhaitée de protéines (en général 50 µg) est incubée en présence de 1 mM de 4-MO dissout dans le DMSO et 5 mM d'UDP-GlcA dissout dans l'eau, dans un tampon 180 mM Tris-HCl (pH 7,4), 28 mM MgCl₂ à 37°C pendant une à deux heures selon la source

enzymatique utilisée. La réaction est stoppée par addition de 800 μ l d'eau glacée. La 4-MO non conjuguée est extraite par ajout de 4 ml d'acétate d'éthyle saturé en eau puis centrifugation de 10 minutes à 2500 x g. Après aspiration de la phase organique supérieure, la lecture au spectrofluorimètre (Hitachi F-2000 Fluorescence Spectrophotometer) aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 320 nm et de 380 nm, respectivement, se fait immédiatement après addition de 1,8 ml de tampon 0,25 M glycine-NaOH, (pH 10,3). Des essais contrôles sont réalisés sans UDP-GlcA, dans les mêmes conditions que les essais. La quantification du glucuronide est faite après établissement d'une gamme étalon en utilisant des concentrations connues de glucuronide de 4-MO commercial (Sigma). Les activités sont exprimées en nmol/min/mg de protéine.

IV.4.7.2. Glucuroconjugaison d'autres phénols : Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'activité enzymatique des UGTs est évaluée selon une méthode de CCM (Bansal et Gessner, 1980), en utilisant l'UDP-[¹⁴C]-GlcA comme substrat, pour séparer et quantifier les différents glucuronides formés. Les protéines (50 μ g) sont incubées en présence d'UDP-GlcA radiomarké (0,1 μ Ci) et de 0,1 mM d'UDP-GlcA froid dans un tampon 100 mM Tris HCl (pH 7,4), 10 mM de MgCl₂ avec 1 mM de substrat accepteur dissout dans le DMSO à 37°C durant une heure. La réaction est arrêtée en ajoutant 40 μ l d'éthanol absolu glacé. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation 10 minutes à 4000 x g à 4°C et le surnageant est déposé sur des plaques de silice (LK6DF silicagel, 250 μ m, Whatman, Clifton, NJ). La migration des produits sur les plaques s'effectue avec une phase mobile contenant du *n*-butanol, de l'acétone, de l'acide acétique, de l'ammoniaque (28%) et de l'eau (70:50:18:1,5:60, v/v) ou avec du *n*-butanol, de l'acétone, de l'ammoniaque (28%) et de l'eau (35:35:10:20, v/v) (dans le cas de l'étude de la conjugaison des amines). Les plaques de silice sont séchées et la présence des glucuronides est visualisée après autoradiographie sur film Bio-Max Kodak (Sigma) exposés pendant 3 jours à -20°C. La quantité de glucuronide

radioactif est mesurée après grattage de la silice correspondante et comptage en scintillation liquide (*cocktail scintillant ULTIMA GOLD*) en utilisant le compteur de radioactivité Tri-Carb 2100 TR (Packard).

IV.4.8. Cinétique enzymatique

Les constantes cinétiques apparentes K_m et V_{max} pour la réaction de glucuroconjugaison vis-à-vis du substrat accepteur (4-MO) et du substrat donneur (UDP-GlcA) ont été déterminées comme suit. Les microsomes (50 μ g de protéines) sont incubés dans les conditions préalablement décrites en présence de concentrations croissantes en 4-MO (0,1-2 mM) pour une concentration fixe d'UDP-GlcA (5 mM). De même, nous avons utilisé des concentrations variant de 0,1 à 7,5 mM en UDP-GlcA pour une concentration fixe de 4-MO (1 mM). Les constantes cinétiques apparentes K_m et V_{max} sont obtenues par analyse en régression non linéaire des données expérimentales à l'aide du logiciel Sigma Plot 9.0 ajustées à l'équation de Michaelis-Menten ($v = V_{max} [S] / K_m + [S]$). Nous avons précédemment déterminé que les cinétiques étaient linéaires en fonction du temps et de la concentration en protéines.

IV.4.9. Modification chimique des résidus carboxyliques par le DCCI

L'inactivation de l'UGT1A6 sauvage et de ses mutants exprimés dans la levure *P. pastoris* par le DCCI est réalisée à 0°C en mettant en présence les protéines microsomales (50 μ g) dans un tampon 50 mM phosphate de sodium/potassium (pH 5,0), 5mM MgCl₂ et des concentrations croissantes de DCCI (0,1 à 0,7mM) dissout dans le DMSO pendant différents temps (de 0 à 4 minutes). La réaction chimique est schématisée dans la figure 14. Il a été montré précédemment que la valeur de pH du tampon utilisé augmente la spécificité du DCCI vis-à-vis des résidus carboxyliques (Battaglia *et al.*, 1994a ; 1994b). La réaction est arrêtée à différents temps en diluant les protéines dans un mélange réactionnel contenant 180 mM

Tris-HCl (pH 7,4), 28 mM MgCl₂, 1 mM 4-MO, 5 mM UDP-GlcA. L'activité enzymatique est mesurée vis-à-vis de la 4-MO comme décrit précédemment. Un contrôle est réalisé simultanément sans DCCI représentant 100% de l'activité enzymatique. Les représentations semi-logarithmiques des activités résiduelles en fonction de la concentration en DCCI sont linéaires.

La constante d'inactivation de pseudo 1^{er} ordre (k_i) est déterminé par l'équation :

$$\log(A/A_0) = -k_i \cdot t$$

A_0 = activité en l'absence d'inhibiteur pour un temps donné.

A/A_0 correspond au rapport de l'activité en présence de l'inhibiteur à un temps donné d'inactivation, et k_i est la constante d'inactivation de pseudo 1^{er} ordre à une concentration donnée de DCCI. L'ordre (n) de réaction d'inactivation est calculé par l'équation :

$$\log k_i = n \log [I] + \log k'_i$$

I est la concentration de DCCI et k'_i est la constante d'inactivation de deuxième ordre.

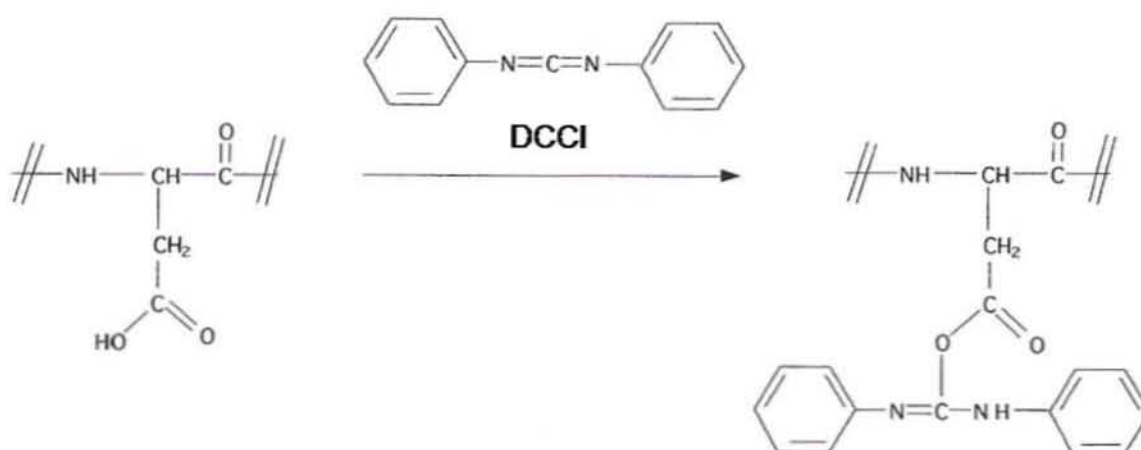


Figure 14 : Modification chimique des résidus acides carboxyliques par le DCCI.

IV.4.10. Alignement de séquences et structure secondaire

Nous avons effectué un alignement des séquences de toutes les familles d'UGTs afin de rechercher les acides aminés carboxyliques conservés qui peuvent être importantes pour la fonction de l'UGT1A6. L'alignement des séquences est réalisé par le logiciel CLUSTALW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html).

La prédiction de la structure secondaire de l'UGT1A6 est effectuée par différentes méthodes sur le site (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl).

IV.5. RT-PCR

IV.5.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des chondrocytes traités ou non sont extraits à l'aide du kit TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cellules sont incubées dans du TRIzol Reagent (1 ml pour 10 cm² de surface) à température ambiante pendant 5 minutes et la suspension est transférée dans un tube siliconé (1,7 ml, RNase-DNase free). Ensuite, 200 µl de chloroforme (Prolabo) sont ajoutés et le mélange est secoué vigoureusement à la main pendant 15 secondes puis centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 12000 x g. La phase aqueuse est transférée dans un autre tube siliconé et 0,5 ml d'isopropanol sont ajoutés pour précipiter les ARN totaux. Après incubation 10 minutes à température ambiante, les ARN sont précipités par une centrifugation pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par 1 ml d'éthanol 75% (v/v) et séché pendant 20 minutes à température ambiante. Le culot d'ARN est ensuite dissout dans 40 µl d'eau distillé et le dosage des ARN totaux est réalisé par spectrophotométrie à 260 nm et à 280 nm. La qualité des ARN totaux a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1% (p/v) dans un tampon TBE (90 mM Tris, 90 mM Borate (pH 8,0), 2 mM d'EDTA) contenant du bromure d'éthidium (BET, 0,5 µg/ml).

IV.5.2 Transcription inverse des ARNm (RT)

La transcription inverse des ARN en ADNc s'effectue par utilisation de la PrimeScript™ Reverse Transcriptase (TaKaRa, Japon). Les ARN (1 µg) sont mélangés à 50 pmol de l'oligonucléotide contenant la séquence poly (dT) et 1 µl de mélange dNTP (10mM chacun) puis chauffés pendant 5 minutes à 65°C et refroidis immédiatement dans la glace. Après dénaturation, le tampon de l'enzyme et 100 U de la transcriptase inverse sont ajoutés au mélange avant incubation pendant 10 minutes à 30°C puis 30~60 minutes à 42°C. La réaction est achevée par l'inactivation de l'enzyme par chauffage pendant 15 minutes à 70°C.

IV.5.3 PCR semi-quantitative

L'amplification des séquences spécifiques des gènes par PCR est réalisée à partir de 2 µl de solution d'ADNc. La PCR est effectuée dans un milieu réactionnel (50 µl) contenant le tampon de PCR (600 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dNTP, thermostable AccuPrime™ protéine, 10% glycérol), 1 U de AccuPrime™ Taq DNA Polymérase High Fidelity (Invitrogen), 0,2 µM de chacune des deux amorces sens et anti-sens du gène à amplifier (Tableau 4) et de l'eau ultrapure (qsp 50 µl). Les tubes contenant le milieu réactionnel sont placés dans un thermocycleur Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf France, Le Pecq) et soumis à 32 cycles. Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes, chaque cycle de PCR comprend successivement : une phase de dénaturation à 94°C, une phase d'hybridation des amorces (réalisée à une température optimale spécifique) et une phase d'élongation à 72°C, chaque phase durant 45 secondes. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) préparé dans un tampon TBE contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Avant d'être déposés, les échantillons sont repris dans du bleu de charge (50% de glycérol, 50% de TBE) contenant du bleu de bromophénol. La migration est réalisée à un voltage constant de 80V pendant 30 minutes environ. Les

fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous rayonnement ultra-violet. La taille des fragments est comparée à un marqueur de taille (Generuler™ DNA Ladder Mix).

Gènes d'intérêts	Amorces sens	Amorces anti-sens	Tm (°C)	Taille (pb)
RP29	5'-aagatgggtcaccag cagctctactg-3'	5'-agacgcggcaagag cga gaa-3'	59	67
UGT1A	5'-tgaaagcatatgcaat ggcgt-3'	5'-tcaatgggtcttggatt tgtg-3'	50	466
UGT1A1	5'-atggctgtggagtccc agggc-3'	5'-ccattgatcccaaaga gaaaacc-3'	50	932
UGT1A3	5'-atggcaatggtgaaca atatg-3'	5'-ggtctgaattggtggt agtaac-3'	58	247
UGT1A4	5'-acgctgggctacact caagg-3'	5'-gacaggtacttagcc agcacc-3'	66	200
UGT1A6	5'-cttttcacagaccag ccttac-3'	5'-tatccacatctctcttg aggaca-3'	58	289
UGT1A7	5'-tggctcgtcaggggt ggactg-3'	5'-ttc gcaatggtgccgt ccagc-3'	63	310
UGT1A8	5'-ctgctgacctgtggct ttgct-3'	5'-ccattgagcagcggc gaaat-3'	63	248
UGT1A9	5'-gaggaacatttattatg ccaccg-3'	5'-ccattgatcccaaaga gaaaacc-3'	50	281
UGT1A10	5'-cctcttctctatgtccc caatga-3'	5'-gcaacaaccaaattg atgtgtg-3'	63	205
UGT2B	5'-aagttctaggagac ccactac-3'	5'-caccacaacaccattt tctcca-3'	58	205
UGT2B4	5'-tctactcttaatttgaa gtttatcctgt-3'	5'-tcagccagcagctc accacaggg-3'	58	278
UGT2B7	5'-agttggaatctc atc atgcaacaga-3'	5'-tcagccagcagctc accacaggg-3'	58	232
UGT2B10	5'-tgacatcgttttgca atgctta-3'	5'-caggtacata ggaag gagggaa-3'	58	152
UGT2B11	5'-cttcattcttttgatc ccaatgatg-3'	5'-tcagccagcagctc accacaggg-3'	58	307
UGT2B15	5'-gtgttgggaatattatg actacagtaac-3'	5'-tcagccagcagctc accacaggg-3'	58	141
UGT2B17	5'-gtgttgggaatattctg actataatata-3'	5'-caggtacata ggaag gagggaa-3'	58	242
UGT2B28	5'-atccaatgacgcatt cactcttaaac-3'	5'-caggtacata ggaag gagggaa-3'	58	340

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitative et longueurs des amplicons (d'après Gardner-Stephen *et al.*, 2004).

Chapitre V.

Résultats

A. Identification des acides aminés responsables de la catalyse et de la spécificité de substrat accepteur

Notre étude est consacrée à l'identification des acides aminés du site actif de l'UGT1A6 humaine qui sont importants pour la catalyse et la reconnaissance des substrats accepteurs (xénobiotiques). Nous présentons tout d'abord la caractérisation du système de levure qui a été introduit dans notre équipe et utilisé comme cellule hôte pour exprimer et produire des UGTs recombinantes et leurs mutants. En effet ce système de production des UGTs sous forme membranaire active en quantité adéquate est un atout majeur pour la réalisation de notre travail.

V.1. Système d'expression dans *Pichia pastoris*

La levure *P. pastoris* est réputé être un système adéquat pour la production de protéines recombinantes d'origine eucaryote supérieure. En effet, la culture de levure est facile à mettre en œuvre, peu coûteuse et produit une biomasse importante, contrairement aux cultures de cellules de mammifère ou d'insecte. De plus, les modifications post-traductionnelles et l'adressage dans les différents compartiments intracellulaires sont globalement respectés. Notre équipe a montré que la levure *P. pastoris* est particulièrement adaptée à l'expression des UGT1A recombinantes. Ces isoformes sont exprimées sous forme active dans le réticulum endoplasmique facilement accessible par les techniques de fractionnement sub-cellulaire classiques (Ouzzine et al., 2000).

V.2. Alignement des séquences des UGTs pour la détermination des acides carboxyliques conservés

L'identification des acides aminés fonctionnellement importants constitue un objectif majeur qui permet une meilleure compréhension des bases moléculaires de la réaction de glucuroconjugaison. En utilisant les carbodiimides comme agents de modification chimique, notre équipe a mis en évidence l'implication d'acides aminés carboxyliques dans l'activité catalytique de l'UGT1A6 (Battaglia *et al.*, 1994b).

En absence de structure 3-D, nous avons réalisé un alignement des séquences de toutes les familles d'UGTs (ne sont montrées que 9 UGTs d'homme et de rat appartenant aux familles 1 et 2), afin de rechercher les résidus carboxyliques conservés (Fig. 15). Cet alignement fait apparaître des résidus acides aspartiques et acides glutamiques conservés aux positions 145, 150, 287, 289, 297, 314, 357, 378, 394, 397, 420, 447, 454, 461, 488 (positions pour l'UGT1A6). Certaines positions sont totalement conservées en acide aspartique (D145, D150, D357, D397, D447, D454 et D488) ou glutamique (E289, E297, E378 et E461). De façon intéressante, l'alignement fait apparaître la présence de D ou E aux positions 287 et 394, ce qui suggère que ces 2 résidus peuvent se substituer l'un à l'autre. Enfin, aux positions 314 et 420 dans certains cas ces résidus sont remplacés par l'alanine ou la glycine, ce qui semblerait indiquer que les acides carboxyliques à ces positions n'ont pas un rôle catalytique mais plutôt conformationnel.

Nous avons dans un premier temps muté tous les acides carboxyliques (D145, D150, E287, E289, E297, E314, D357, E378, D394, D397, D420, D447, D454, E461 et D488) en alanine. Dans un deuxième temps, nous avons muté les résidus D150, D394, D397, D420, D447 et D488 en acide glutamique, E297, E378 et E461 en acide aspartique, E378 et D397 en Sérine, et E461 en glutamine. La mutation en alanine (mutation non conservative) permet d'étudier les effets de l'absence du groupement carboxylique et de la diminution de la longueur de la chaîne latérale. La mutation en acide glutamique ou acide aspartique (mutation conservative) permet de conserver le groupement acide carboxylique et de déterminer si un

allongement ou raccourcissement de la chaîne latérale occasionne un encombrement stérique. La mutation en sérine (mutation partiellement conservative) permet de préciser si le groupement hydroxyle peut remplacer le groupement carboxylique pour assurer la même fonction.

	145	150		287	289	297				
Hum1A6	LNFFKESKFD	DALFTD	PALPCGV	RKDLSQ	EF	EAYINASG	EHGIVV			
Rat1A6	LSFLRENQF	DALFTD	PAMPCGV	KGNLSQ	EF	EAYVNASG	EHGIVV			
Hum1A3	IRHLNATSF	DVVLTD	DPVNLCAA	RKPLSQ	EF	EAYINASG	EHGIVV			
Hum1A9	VEYLKESSE	DAVFLD	PPFNCGL	GKPLPM	EF	EAYINASG	EHGIVV			
Rat2B1	MKKLQGSQF	DVILAD	AVGPCGE	AKPLPR	EME	EFVQSSG	EHGVVV			
Rat2B2	MTKLQESKF	DVLFAD	PVASCOD	AKPLPK	DM	EEFVQSSG	EHGVVV			
Rat2B6	MAKLQESKF	DVLLSD	PVAACGE	AKPLPK	DI	EDFVQSSG	EHGVVV			
Hum2B7	MKKVQESRF	DVIFAD	AIFPCSE	AKPLPK	EME	EDFVQSSG	ENGVVV			
Hum2B11	MKKLQESRF	DIVFAD	AVFPCGE	AKPLPK	EME	EFVQSSG	ENGVVV			
	314	357		378		394	397			
Hum1A6	VSEIP	EKKAM	KWLPQND	LLGHP	GSHGVY	ES	ICNGVPMVMMPLFGD	QMD	NAKRMETKGA	
Rat1A6	VSEIP	EKKAM	KWLPQND	LLGHP	GSHGIY	EG	ICNGVPMVMMPLFGD	QMD	NAKRMETRGA	
Hum1A3	VSEIP	EKKAM	KWLPQND	LLGHP	GSHGVY	ES	ICNGVPMVMMPLFGD	QMD	NAKRMETKGA	
Hum1A9	VSEIP	EKKAM	KWLPQND	LLGHP	GSHGVY	ES	ICNGVPMVMMPLFGD	QMD	NAKRMETKGA	
Rat2B1	VKNLT	E EKAN	KWIPQND	LLGHP	GTNGIY	EAI	YHGIPMIGIPLFAD	QPD	NINHMVAKGA	
Rat2B2	VSNMT	E EKAN	KWLPQND	LLGHP	GANGLY	EAI	YHGIPMIGIPLFGD	QPD	NIAHMVAKGA	
Rat2B6	VSSMT	E EKAN	KWLPQND	LLGHP	GANGVY	EAI	YHGIPMIGIPLFAD	QPD	NIAHMVAKGA	
Hum2B7	VSNMT	E ERAN	KWIPQND	LLGHP	GANGIY	EAI	YHGIPMIGIPLFAD	QPD	NIAHMKARGA	
Hum2B11	ISNMT	A ERAN	KWIPQND	LLGHP	GANGIY	EAI	YHGIPMIGIPLFFD	QPD	NIAHMKAKGA	
	420	447	454	461		488				
Hum1A6	LEMTSE	DLENAL	SSLHK	DRPVEPL	DLAVFWV	EFV	DLTWYQYHSL	D	VIGFLLAVVLT	
Rat1A6	LEMTAD	DLENAL	SSLHK	DRPIEPL	DLAVFWV	EYV	DLTWYQYHSL	D	VIGFLLAIVLT	
Hum1A3	LEMTSE	DLENAL	SSLHK	DRPVEPL	DLAVFWV	EFV	DLTWYQYHSL	D	VIGFLLAVVLT	
Hum1A9	LEMTSE	DLENAL	SSLHK	DRPVEPL	DLAVFWV	EFV	DLTWYQYHSL	D	VIGFLLAVVLT	
Rat2B1	SILSTT	G LLTAL	SRIHHD	QPVKPL	DRAVFWI	EYV	DLSWFQYHSL	D	VIGFLLLCVVG	
Rat2B2	RTMSKL	D FLSAL	STIHHD	QPMKPL	DRAVFWI	E FI	NLPWYQYHSL	D	VIGFLLTCFAV	
Rat2B6	RTMSKS	D LFNAL	STIHHD	QPMKPL	DKAIFWI	EYV	NLPWYQYHSL	D	VIGFLLACLAV	
Hum2B7	NTMSST	D LLNAL	SRIQHD	QPVKPL	DRAVFWI	E FV	DLTWFQYHSL	D	VIGFLLVCVAT	
Hum2B11	NTMSST	D LLNAL	SRIQHD	QPVKPL	DRAVFWI	E FV	DLTWFQYHSL	D	VIGFLLACVAT	

Figure 15: Alignement des séquences en acides aminés de quelques isoformes d’UGTs humaines et de rat. Numéro d’accès Genbank : UGT1A6 Humaine (J04093), UGT1A6 de rat (NP476446), UGT1A3 Humaine (AAG30423), UGT1A9 Humaine (AAG30418), UGT2B1 de rat (P09875), UGT2B2 de rat (P08541), UGT2B6 de rat (P19488), UGT2B7 Humaine (P16662), UGT2B11 Humaine (O75310).

V.3. Analyse de l'effet des mutations des résidus aspartiques de l'UGT1A6 sur l'expression et l'activité enzymatique

V.3.1. Analyse de l'expression de l'UGT1A6 sauvage et des mutants acide aspartique-alanine

Les plasmides codant pour l'UGT1A6 sauvage recombinante et ses mutants D145A, D150A, D357A, D394A, D397A, D420A, D447A, D454A et D488A ont été construits comme indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ». Ces plasmides recombinants ont été utilisés pour transformer les levures *P. pastoris* compétentes et l'expression des protéines recombinantes a été analysée par immunoblot. Les résultats obtenus montrent que toutes les protéines recombinantes sont exprimées et présentent une masse moléculaire d'environ 55 kDa correspondant à la masse de l'UGT1A6 (Fig. 16A). La quantification de l'expression des protéines recombinantes par densitométrie montre que les mutants sont exprimés de manière similaire voir à un niveau plus important que l'UGT1A6 sauvage. En effet, le niveau d'expression des mutants par rapport à l'UGT1A6 varie de 1,5 fois dans le cas du mutant D145A à 3,1 fois dans le cas du mutant D447A (Fig. 16A). Les immunoblot montrent également que l'UGT1A6 est exprimée sous forme de deux polypeptides de masse moléculaire très proche qui pourraient correspondre à une différence de glycosylation de la protéine (Ouzzine *et al.*, 1999b).

V.3.2. Analyse de l'activité enzymatique de l'UGT1A6 sauvage et des mutants acide aspartique-alanine (mutations non conservatives)

Afin d'analyser l'activité enzymatique de l'UGT1A6 et des mutants D145A, D150A, D357A, D394A, D420A, D447A, D454A et D488A, nous avons évalué la capacité de chaque mutant à glucuronoconjuguer la 4-MO, substrat de référence de l'UGT1A6 et comparé son activité à celle de l'UGT1A6 sauvage. La mesure de l'activité enzymatique a été réalisée dans les conditions décrites dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les résultats obtenus

montrent que tous les mutants à l'exception de D150A et D488A présentent une activité enzymatique vis à vis de la 4-MO (Fig. 16B). Cependant, cette activité est plus au moins important suivant les mutants. En effet, le mutant D145A présente une activité 5 fois moins importante que celle de l'UGT1A6 sauvage alors que les mutants D420A, D357A et D454A sont environ deux fois moins actifs. Dans le cas du mutant D447A, l'activité enzymatique est dramatiquement affectée et ne représente que 3% de l'activité du sauvage. De manière intéressante, les mutants D150A et D488A ne présentent aucune activité enzymatique détectable.

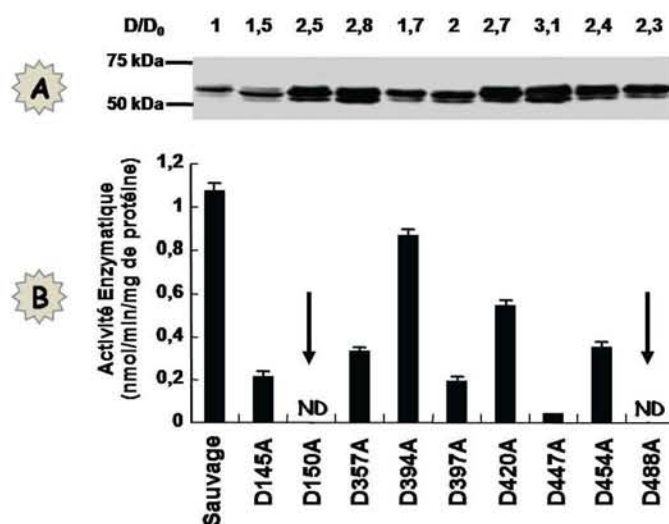


Figure 16 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide aspartique-alanine. (A), Le niveau d'expression des mutants est apprécié par Western blot et par densitométrie (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), L'activité enzymatique a été évaluée dans les microsomes de levures recombinantes en utilisant la 4-MO comme substrat accepteur (1 mM) et l'UDP-GlcA comme substrat donneur (5 mM). Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes ± SD (3 essais). ND, non détectable.

V.3.3. Détermination des constantes cinétiques de l'UGT1A6 sauvage et des mutants acide aspartique-alanine

Afin de mieux comprendre l'effet des mutations alanine sur l'activité de l'UGT1A6, nous avons déterminé les constantes cinétiques K_m et V_{max} des différents mutants. Le K_m et la V_{max} de chacun des mutants vis à vis du substrat 4-MO et du co-substrat UDP-GlcA ont été déterminés et sont rapportés dans le tableau 5. Les résultats montrent que dans le cas des mutants D145A, D357A, D420A et D447A, aucun changement significatif n'est observé pour le K_m du substrat et du co-substrat. La V_{max} est inchangée dans le cas du mutant D420A et est plus ou moins affectée dans le cas des autres mutants. De manière intéressante, le K_m des mutants D394A et D397A vis à vis du co-substrat l'UDP-GlcA est augmenté de 28 et 21 fois, respectivement.

V.3.4. Analyse de l'expression et de l'activité enzymatique des mutants acide aspartique-acide glutamique (mutations conservatives)

— Analyse de l'expression :

Afin de mieux cerner l'importance des résidus aspartiques et en particulier de leur groupement carboxylique dans la fonction de l'UGT1A6, nous avons construit des mutants dans lesquels ces résidus sont remplacés par l'acide glutamique qui permet de conserver le groupement acide carboxylique. L'analyse par immunoblot et par densitométrie montre que tous les mutants (D150E, D394E, D397E, D420E, D447E et D488E) sont exprimés dans la levure à un taux similaire ou plus élevé que celui de l'UGT1A6 sauvage (Fig. 17A).

Enzymes	UDP-GlcA		4-MO	
	Vmax (pmol/min/mg de prot)	Km (mM)	Vmax (pmol/min/mg de prot)	Km (mM)
UGT1A6	1047.3±23.1	0.25±0.01	1130.6±19.7	0.12±0.01
D145A	245.0±4.5	1.05±0.07	235.0±8.1	0.23±0.04
D150A	ND	ND	ND	ND
D150E	3.6±0.2	0.24±0.04	3.3±0.3	0.35±0.10
E287A	637.3±13.0	0.28±0.02	622.6±21.3	0.16±0.02
E289A	610.1±28.2	1.00±0.16	516.7±24.4	0.21±0.03
E297A	776.2±10.5	0.83±0.06	773.9±24.6	0.17±0.02
E297D	815.7±13.9	1.05±0.09	753.5±26.7	0.11±0.02
E314A	133.1±8.2	0.63±0.15	166.0±4.4	0.34±0.03
D357A	421.3±16.4	0.44±0.08	462.6±9.0	0.14±0.01
E378A	30.1±2.0	>10	21.4±1.8	0.51±0.11
E378D	49.8±6.5	>10	48.1±4.6	0.32±0.10
E378S	20.6±3.7	>10	23.9±0.6	0.58±0.09
D394A	2239.5±241.2	6.11±1.89	2096.0±61.8	0.17±0.02
D394E	166.7±3.0	3.52±0.21	163.6±10.8	0.65±0.12
D397A	638.6±34.5	5.28±1.01	549.3±20.3	0.23±0.03
D397S	558.2±51.8	3.79±1.28	478.7±22.2	0.22±0.04
D397E	1061.9±25.5	1.36±0.14	1149.1±72.2	0.29±0.07
D420A	1151.2±20.5	1.03±0.06	1077.0±23.4	0.20±0.01
D420E	1010.5±19.1	0.71±0.07	1190.7±38.0	0.15±0.02
D447A	57.0±1.7	0.17±0.02	46.7±1.3	0.16±0.01
D447E	1027.0±71.5	>10	838.6±29.8	0.11±0.02
D454A	522.5±25.9	0.82±0.15	608.1±44.1	0.48±0.09
E461A	2.7±0.2	0.58±0.14	1.8±0.1	0.16±0.04
E461D	2.4±0.15	0.22±0.06	1.5±0.08	0.09±0.02
E461Q	42.7±1.0	0.11±0.01	36.9±1.4	0.22±0.03
D488A	ND	ND	ND	ND
D488E	129.9±6.9	>10	133.6±7.6	0.14±0.03

Tableau 5 : Constantes cinétiques apparentes de l'UGT1A6 sauvage et des mutants vis-à-vis du substrat donneur (UDP-GlcA) et accepteur (4-MO). Les constantes cinétiques sont calculées depuis la représentation en double inverse de Michaelis-Menten. ND, non détectable.

— Analyse de l'activité enzymatique et détermination des constantes cinétiques :

Nous avons ensuite analysé l'activité enzymatique des différents mutants et déterminé leurs constantes cinétiques. Nos résultats montrent que les mutants D150E et D488E, contrairement aux mutants D150A et D488A, sont actifs vis-à-vis de la 4-MO même si l'activité est très faible dans le cas du mutant D150E (Fig. 17B). Dans le cas des mutants D394E, D397E, D420E et D447E, l'activité enzymatique est comparable à celle de l'UGT1A6 sauvage (Fig. 17B). Alors qu'elle est 10 fois moins importante dans le cas du mutant D394E.

L'analyse des constantes cinétiques des mutants montre que le mutant D394E présente un K_m 13 fois supérieur à celui de l'UGT1A6 sauvage vis-à-vis de l'UDP-GlcA alors que les mutants D447E et D488E ont des K_m pour le co-substrat 40 fois supérieur à celui de l'enzyme sauvage (Tableau 5). Dans le cas des mutants D150E, D397E et D420E, aucune modification significative des K_m n'est observée. Les résultats montrent également que la V_{max} des mutants D397E, D420E et D447E est similaire à celle de l'enzyme sauvage, alors qu'elle est 8 fois et 290 fois plus faible dans le cas des mutants D488E et D150E, respectivement.

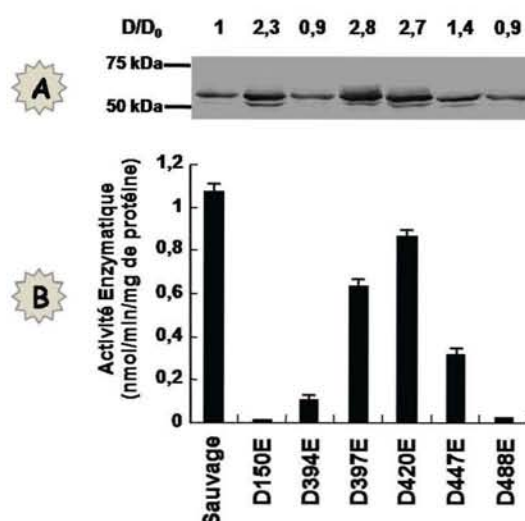


Figure 17 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide aspartique-acide glutamique. (A), Le niveau d'expression des mutants est apprécié par Western blot et par densitométrie (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), L'activité enzymatique a été évaluée dans les microsomes de levures recombinantes en utilisant la 4-MO comme substrat accepteur (1mM) et l'UDP-GlcA comme substrat donneur (5mM). Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes ± SD (3 essais).

V.4. Analyse de l'effet des mutations des résidus glutamiques de l'UGT1A6 sur l'expression et l'activité enzymatique

V.4.1. Analyse de l'expression des mutants acide glutamique-alanine

Les plasmides codant pour l'UGT1A6 sauvage et ses mutants E287A, E289A, E297A, E314A, E378A et E461A ont été utilisés pour transformer les levures *P. pastoris* compétentes. L'expression des protéines recombinantes a été analysée par immunoblot. Les résultats obtenus montrent que toutes les protéines sont exprimées et présentent une masse moléculaire d'environ 55 kDa correspondant à la masse de l'UGT1A6 (Fig. 18A). La quantification de l'expression des protéines recombinantes par densitométrie montre que le niveau d'expression des mutants par rapport à l'UGT1A6 sauvage varie de 0,8 fois dans le cas du mutant E297A à 3,2 fois dans le cas du mutant E287A (Fig. 18A).

V.4.2. Analyse de l'activité enzymatique des mutants acide glutamique-alanine

Afin d'analyser l'activité enzymatique des mutants E287A, E289A, E297A, E314A, E378A et E461A, nous avons évalué la capacité de chaque mutant à glucuroconjuguer la 4-MO et comparé son activité à celle de l'UGT1A6 sauvage. Les résultats obtenus montrent que tous les mutants présentent une activité enzymatique vis à vis de la 4-MO (Fig. 18B). Cependant, cette activité est plus ou moins inférieure à celle de l'UGT1A6 sauvage suivant les mutants. En effet, le mutant E314A présente une activité 8 fois moins importante que celle de l'UGT1A6 sauvage alors que les mutants E289A et E297A sont environ deux fois moins actifs que l'UGT1A6. Dans le cas des mutants E378A et E461A, l'activité enzymatique est dramatiquement affectée et représente moins de 1% et 0,3% respectivement de l'activité du sauvage (Fig. 18B).

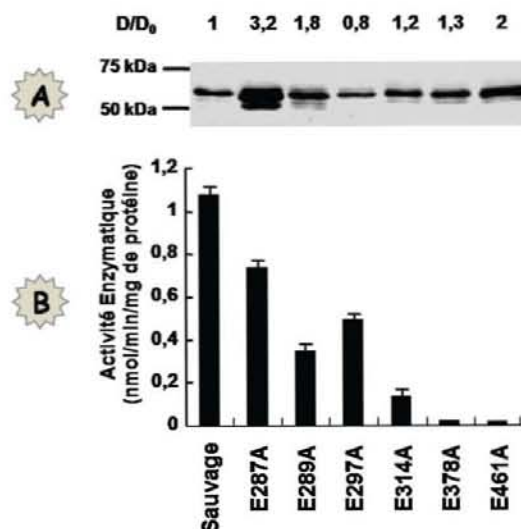


Figure 18 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide glutamique-alanine. (A), Le niveau d'expression des mutants est apprécié par Western blot et par densitométrie (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), L'activité enzymatique a été évaluée dans les microsomes de levures recombinantes en utilisant la 4-MO comme substrat accepteur (1 mM) et l'UDP-GlcA comme substrat donneur (5 mM). Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes \pm SD (3 essais).

V.4.3. Détermination des constantes cinétiques des mutants acide glutamique-alanine

Afin de mieux comprendre l'effet des mutations alanines sur l'activité de l'UGT1A6, nous avons déterminé les constantes cinétiques K_m et V_{max} des différents mutants. Le K_m et la V_{max} de chacun des mutants vis à vis du substrat 4-MO et du co-substrat UDP-GlcA ont été déterminés et sont rapportés dans le tableau 5. Les résultats montrent que dans le cas des mutants E287A, E297A et E314A, aucun changement significatif n'est observé vis-à-vis du K_m du substrat et du co-substrat. Le K_m vis-à-vis du substrat 4-MO et du co-substrat UDP-GlcA est inchangée dans le cas du mutant E461A mais la V_{max} diminue dramatiquement (40 fois) par rapport à l'UGT1A6 sauvage. De manière intéressante, le K_m du mutant E378A vis à vis du co-substrat l'UDP-GlcA est augmenté de plus de 40 fois et la V_{max} est diminué de 30 fois.

V.4.4. Analyse de l'expression et de l'activité enzymatique des mutants acide glutamique-acide aspartique

— Analyse de l'expression :

Afin de mieux cerner l'importance des groupements carboxyliques des résidus glutamiques E297, E378 et E461 dans la fonction de l'UGT1A6, nous avons construit des mutants dans lesquels ces résidus sont remplacés par l'acide aspartique. L'analyse par immunoblot et par densitométrie montre que les trois mutants E297D, E378D et E461D sont exprimés dans la levure à un taux plus élevé que l'UGT1A6 sauvage (Fig. 19A).

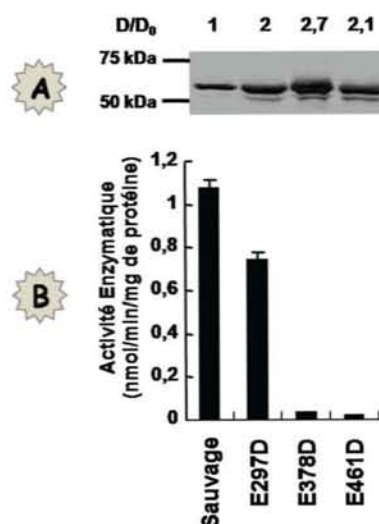


Figure 19 : Expression et activité de l'UGT1A6 et des mutants acide glutamique-acide aspartique. (A), Le niveau d'expression des mutants est apprécié par Western blot et par densitométrie (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), L'activité enzymatique a été évaluée dans les microsomes de levures recombinantes en utilisant la 4-MO comme substrat accepteur (1 mM) et l'UDP-GlcA comme substrat donneur (5 mM). Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes ± SD (3 essais).

— Analyse de l'activité enzymatique et détermination des constantes cinétiques :

Nous avons ensuite analysé l'activité enzymatique et déterminé les constantes cinétiques des mutants. Les résultats montrent que le mutant E297D présente une activité de 20%

inférieur à celle de sauvage alors que l'activité des mutants E378D et E461D représente moins de 1% et 0,3% respectivement de l'activité du sauvage (Fig. 19B). L'analyse des constantes cinétiques montrent que dans le cas des mutants E297D et E461D, aucun changement significatif n'est observé pour le K_m du substrat et du co-substrat. De manière intéressante, le K_m du mutant E378D vis à vis du co-substrat l'UDP-GlcA est augmenté de plus de 40 fois et la V_{max} est diminué de plus de 20 fois (Tableau 5).

V.5. Modification chimique de l'UGT1A6 sauvage et des mutants par le DCCI

La cinétique d'inhibition de l'UGT1A6 sauvage par le DCCI est présentée dans la figure 20. La glucuroconjugaison de la 4-MO catalysée par l'UGT1A6 diminue rapidement en présence de DCCI. L'inhibition de l'UGT1A6 est dépendante du temps et de la concentration de DCCI utilisée, et est caractéristique d'une inhibition irréversible. Une représentation semi-logarithmique de l'activité résiduelle en fonction du temps permet d'aboutir à des droites dont les pentes correspondent aux constantes d'inactivation de pseudo-premier ordre (k_i 0.0069, 0.0125, 0.0176 et 0.0264 min^{-1}) pour les 4 concentrations en réactifs utilisées. La droite $\log k_i$ en fonction de \log en DCCI permet d'obtenir l'ordre d'inactivation ($n = 0,69$). Puis la représentation $\log k_i$ en fonction de \log DCCI, aboutit à une droite permettant de déterminer la constante d'inactivation de pseudo-deuxième ordre k'_i (32,17 $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Tous les mutants sont sensibles à l'inhibition par le DCCI et présentent des droites d'inhibitions comparables (résultats non montrés). Les valeurs des paramètres cinétiques pour l'ensemble des mutants sont présentées dans le tableau 6. Les valeurs de n déterminées expérimentalement sont relativement similaires ; de même pour celles de k'_i . Ces résultats montrent que ces mutants possèdent toujours un résidu carboxylique sensible au DCCI.

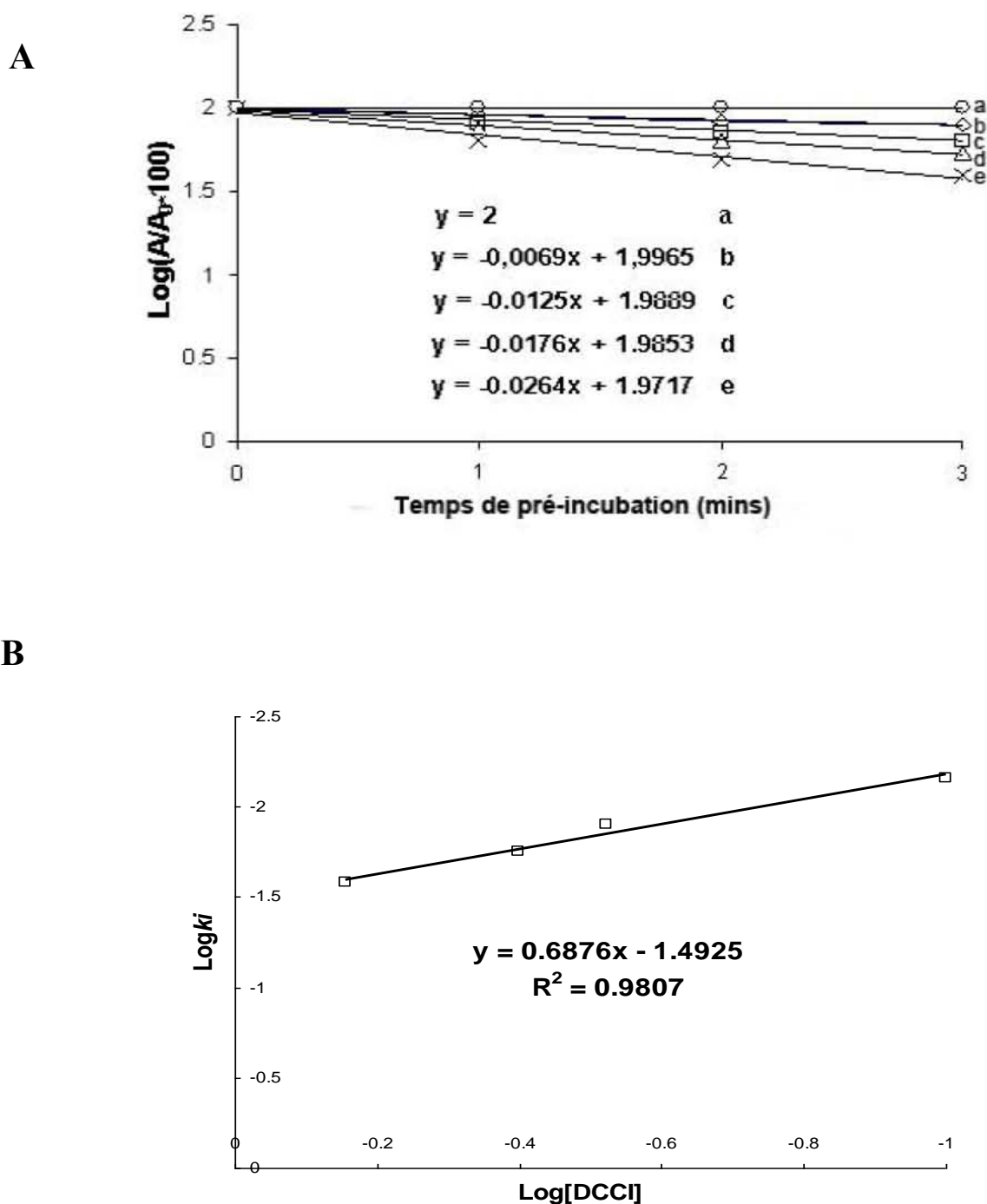


Figure 20 : Cinétique d'inactivation de l'UDP-glucuronosyltransférase 1A6 recombinante humaine par le DCCI. (A), Inhibition de l'activité de l'UGT1A6 par des concentrations croissantes de DCCI (a, sans DCCI; b, 0.1 mM ; c, 0.3 mM ; d, 0.4mM ; e, 0.7mM). L'enzyme est incubée à 0°C dans le tampon sodium/potassium phosphate 50 mM, MgCl₂ 5 mM à pH 5.0 et le DCCI. (B), Représentation logarithmique de la constante de pseudo-premier ordre (k_i) en fonction de la concentration de DCCI. L'équation de la droite obtenue permet la détermination de la constante d'inhibition de deuxième ordre k_i' et l'ordre de la réaction d'inactivation.

Enzymes	n	k_i ($M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
UGT1A6	0,69	32,17
D145A	0,74	67,28
E289A	0,65	55,28
E297A	0,62	54,54
E297D	0,83	131,61
E314A	0,59	60,51
D357A	0,83	83,46
D394A	0,54	40,77
D394E	1,08	275,10
D397A	0,82	55,20
D397S	0,74	277,84
D420A	0,76	338,06
D420E	0,84	60,91
D447E	0,67	123,11
D454A	0,61	59,65

Tableau 6 : Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'UGT1A6 et de ses mutants actifs par DCCI. n , ordre de la réaction d'inactivation. k_i , la constante d'inactivation de deuxième ordre.

V.6. Analyse de l'importance des résidus D488 et D150 de l'UGT1A6 dans la fonction catalytique

V.6.1. Analyse du rôle du résidu D488

Afin de mieux cerner le rôle du résidu D488 de l'UGT1A6, nous avons examiné les effets de son remplacement par des acides aminés de différentes classes tels que l'alanine, la phénylalanine, la sérine, la thréonine et l'acide glutamique sur l'activité de l'enzyme et les paramètres cinétiques. L'analyse de l'expression des différents mutants montre que les mutants (D488A, D488F, D488S, D488T et D488E) sont exprimés de manière efficace (Fig. 21A). Nous avons ensuite analysé leur activité enzymatique vis-à-vis de la 4-MO. Nos résultats montrent qu'à l'exception du mutant D488E, aucune activité enzymatique n'est détectable pour les autres mutants (Fig. 21B). La détermination des paramètres cinétiques révèle que la V_{\max} du mutant D488E est diminuée 8 fois, et son K_m envers le substrat donneur, UDP-GlcA, est fortement augmenté (>10 mM) (Tableau 5). Ces résultats suggèrent que la fonction carboxylique est importante à cette position 488 et joue un rôle dans l'interaction de l'enzyme avec l'UDP-GlcA plutôt que dans la catalyse. La topologie de l'UGT1A6 dans la membrane du RE indique que l'Asp488 est le résidu terminal de l'hélice transmembranaire et situé de côté luminal (Fig. 22). La position de cet acide aminé à l'extrémité luminale du domaine transmembranaire de la protéine, n'est pas très favorable à un rôle catalytique.

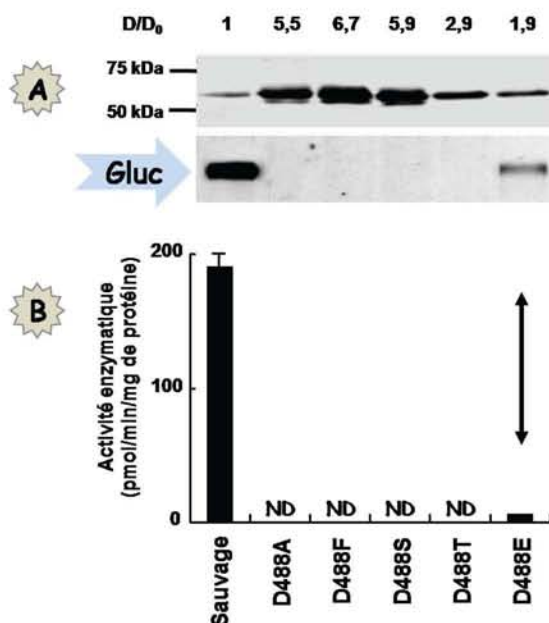


Figure 21 : Effet de la mutation du résidu D488 de l'UGT1A6. (A), Analyse par immunoblot de l'expression des mutants D488 (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de sauvage). (B), Analyse de l'activité des mutants D488 en utilisant la 4-MO comme substrat de référence et les glucuronides sont séparé par CCM (chromatographie sur couche mince). Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes ± SD (3 essais). ND, non détectable.

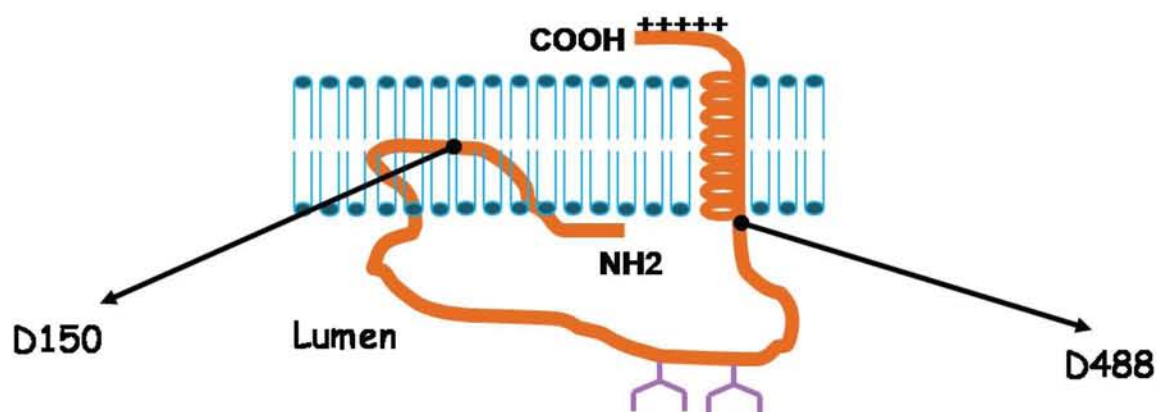


Figure 22 : Modèle hypothétique de la topologie de l'UGT1A6 dans la membrane du RE. Position relative de D150 et D488.

V.6.2. Analyse du rôle du résidu D150

Afin d'identifier le rôle de l'acide aspartique D150 de l'UGT1A6, ce résidu a été muté en différents acides aminés non-conservatifs dont l'alanine, la cystéine, l'asparagine, la glutamine, la sérine et la thréonine et en un résidu conservatif, l'acide glutamique. L'analyse de l'expression montre que tous les mutants sont exprimés de manière plus élevée que l'enzyme sauvage recombinante (Fig. 23A). L'analyse de l'activité enzymatique et la détermination des paramètres cinétiques (Tableau 5) indiquent que les mutations non-conservatives entraînent la perte totale de l'activité enzymatique, alors que lors d'un remplacement par l'acide glutamique D150E l'activité est faible mais détectable (Fig. 23B). De manière intéressante, les études cinétiques ont révélé que le mutant D150E présente une V_{max} 300 fois plus faible que celle de l'UGT1A6 sauvage, mais sans changement en K_m (Tableau 5).

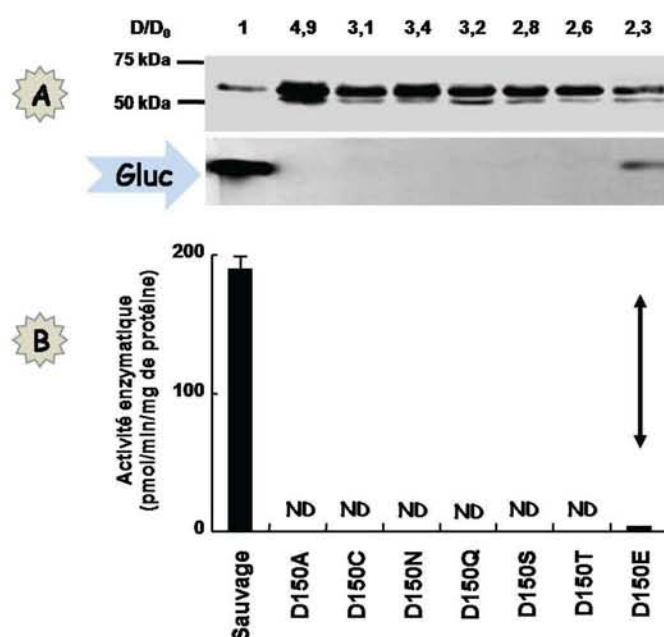


Figure 23 : Effet de la mutation du résidu D150 de l'UGT1A6. (A), Analyse de l'expression de l'UGT1A6 et des mutants D150 par immunoblot et densitométrie (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), Analyse de l'activité de l'UGT1A6 et des mutants D150 en utilisant la 4-MO comme substrat de référence ; les glucuronides sont séparés par CCM. Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes \pm SD (3 essais). ND, non détectable.

V.7. Effet de la mutation du résidu D148 de l'UGT1A9 sur la fonction de l'enzyme

Afin d'évaluer l'importance du résidu D150 de l'UGT1A6 dans la réaction de glucuronidation, nous avons muté le résidu correspondant dans les isoformes UGT1A9, UGT1A4 et UGT1A1, i.e. D148, D152 et D151, respectivement, en alanine et en acide glutamique et mesuré l'activité de l'enzyme vis-à-vis des substrats de référence de chaque isoforme.

Le résidu D148 de l'UGT1A9, correspondant à l'acide aminé D150 de l'UGT1A6, a été muté en alanine (mutation non-conservative, D148A) et en acide glutamique (mutation conservative, D148E). L'analyse de l'expression des mutants par immunoblot montre que tous les mutants sont exprimés de manière efficace (Fig. 24A).

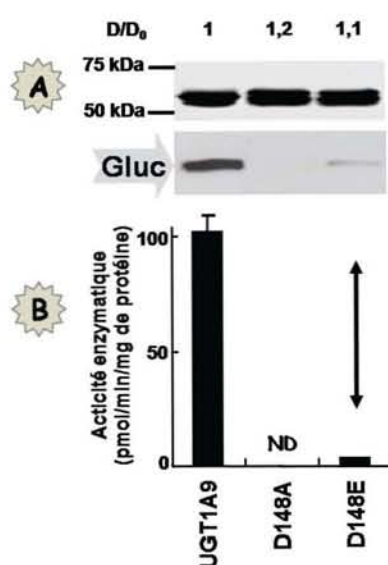


Figure 24 : Effet de la mutation du résidu D148 sur l'activité de l'UGT1A9. (A), Analyse de l'expression de l'UGT1A9 et des mutants par Western blot (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), Analyse de l'activité de l'UGT1A9 et des mutants par CCM en utilisant la 4-MO comme substrat. Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes ± SD (3 essais). ND, non détectable.

De manière intéressante, l'analyse de l'activité des mutants montre que la mutation en alanine entraîne une perte totale de l'activité enzymatique. Par contre, la substitution de l'acide aspartique par l'acide glutamique produit un mutant avec une activité faible mais détectable (Fig. 24B). En effet, l'activité du mutant D148E est de 3,3 pmol/min/mg de protéine au lieu de 104 pmol/min/mg de protéine pour l'UGT1A9 (Fig. 24B). Ces résultats montrent, dans le cas de l'UGT1A9, l'importance du résidu D148 dans la fonction de l'enzyme et la capacité de l'acide glutamique à maintenir l'activité à la place du résidu aspartique.

V.8. Importance du résidu D152 de l'UGT1A4 dans la fonction de l'enzyme

Nous avons ensuite analysé l'effet de la mutation du résidu D152 de l'UGT1A4 en alanine (D152A) et en acide glutamique (D152E). L'analyse de l'expression par immunoblot montre que les deux mutants sont exprimés à un niveau similaire à celui de la protéine sauvage (Fig. 25A).

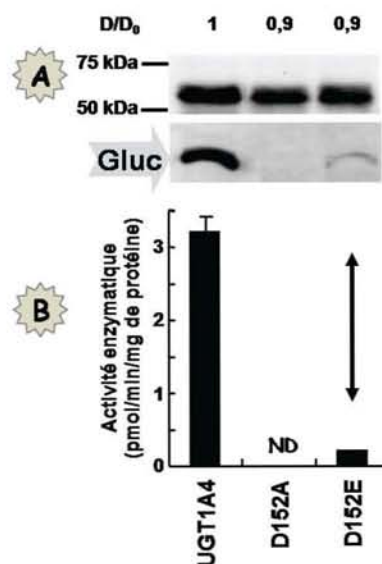


Figure 25 : Effet de la mutation du résidu D152 sur l'activité de l'UGT1A4. (A), Analyse par immunoblot de l'expression de l'UGT1A4 et des mutants (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), Mesure de l'activité de l'UGT1A4 et des mutants D152A et D152E par CCM en utilisant le 4-aminobiphényle comme substrat de référence. Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes ± SD (3 essais). ND, non détectable.

L'analyse de l'activité de l'enzyme vis-à-vis du substrat de référence 4-aminobiphényle montre que la mutation en alanine entraîne une perte complète de l'activité de l'enzyme. D'autre part, la substitution de l'acide aspartique par l'acide glutamique produit un mutant dont l'activité est faible mais détectable (0,21 pmol/min/mg de protéine) (Fig. 25B). Cette activité est inférieure de 16 fois à celle de la protéine sauvage (3,3 pmol/min/mg de protéine).

V.9. Effet de la mutation du résidu D151 de l'UGT1A1 sur la fonction de l'enzyme

Finalelement nous avons évalué l'importance du résidu D151 de l'UGT1A1 dans la fonction de l'enzyme. Nous avons donc construit et exprimé deux mutants du D151, le D151A et le D151E. L'analyse par immunoblot montre que les mutants sont exprimés à un niveau similaire ou supérieur à celui de l'UGT1A1 sauvage (Fig. 26A). L'analyse des activités enzymatiques montre que la mutation du D151 en alanine entraîne une perte complète de l'activité de l'enzyme, alors que la substitution du D151 en acide glutamique (D151E) est capable de maintenir l'activité de l'enzyme vis-à-vis du substrat octylgallate même si le niveau est faible (1 pmol/min/mg de protéine) (Fig. 26B). L'ensemble de ces résultats montre l'importance du résidu D150 de l'UGT1A6 ainsi que son équivalent dans les autres isoformes (i.e. : D148/UGT1A9, D152/UGT1A4 et D151/UGT1A1) dans la fonction de l'enzyme et suggère un rôle dans la catalyse.

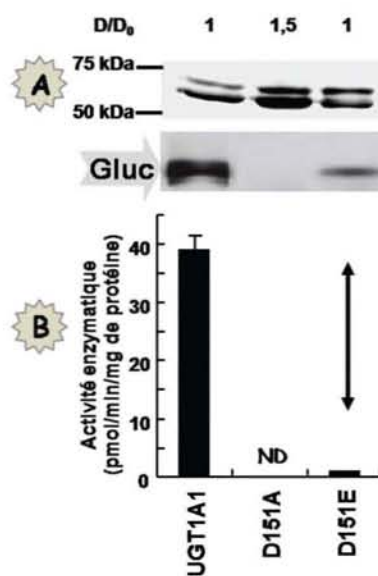


Figure 26 : Effet de la mutation du résidu D151 sur l'activité de l'UGT1A1. (A), Analyse de l'expression de l'UGT1A1 et des mutants D151A et D151E par immunoblot (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage). (B), Mesure de l'activité de l'UGT1A1 et des mutants D152A et D152E par CCM en utilisant l'octylgallate comme substrat de référence. Les valeurs reportées sur la figure correspondent aux valeurs moyennes \pm SD (3 essais). ND, non détectable.

V.10. Alignement de séquences des UGTs avec des glycosyltransférases GT-B cristallisées et exploration du rôle de l'histidine 38 (UGT1A6)

V.10.1. Alignement de séquences au niveau du résidu 38 (UGT1A6)

Par l'alignement de séquences de l'UGT1A6 avec des glycosyltransférases cristallisées présentant une structure de type GT-B (MurG, VvGT1, T4-BGT et UGT71G1), deux résidus importants ont été mis en évidence : une histidine et un acide aspartique qui correspondent à l'histidine 38 et l'acide aspartique 150, respectivement, dans l'UGT1A6 humaine (Fig. 27). D'après l'analyse de la structure 3D de T4-BGT, l'acide aspartique en position 100 jouerait un rôle de base catalytique, et ce résidu correspond à l'acide aspartique 150 dans l'UGT1A6 (Lariviere *et al.*, 2003).

	38	150
hUGT1A6	PQDGS H WLSMK . . .	FDALFT D PALPCG
MurG	GGTGG H LASAL	
VvGT1	FPFST H AAPLL . . .	VSCLV A DAFIWFA
T4_BGT	IYYLFT D IRLPFS
UGT71G1	APGIG H LASAL . . .	VVGLVL D FFCVSM

Figure 27 : Alignement de séquences de l'UGT1A6 humaine avec des glycosyltransférases de structure GT-B au niveau de régions importantes pour la catalyse.

L'analyse de la structure 3D des GT-B MurG, VvGT1 et UGT71G1, suggère qu'un résidu histidine agirait comme une base catalytique qui déprotonerait le groupement hydroxyle du substrat accepteur, et qu'un autre acide aspartique conservé serait nécessaire pour former une chaîne de transfert d'électrons avec la base catalytique (Hu *et al.*, 2003 ; Offèn *et al.*, 2006 ; Shao *et al.*, 2005). L'alignement de séquences indique que ces résidus histidines correspondent à His38 dans l'UGT1A6, His39 dans l'UGT1A1, et His40 dans l'UGT1A3, alors que cette position correspond à un résidu proline (Pro40) dans l'UGT1A4

(Fig. 27 et 28). Nous observons donc que ce résidu n'est pas strictement conservé au sein de la famille des UGTs, ce qui ne favorise pas l'hypothèse selon laquelle cette histidine jouerait le rôle de base catalytique.

	38
hUGT1A6	PQDGS H WLSMK
rUGT1A6	PQDGS H WLSMK
mUGT1A6	PQDGS H WLSMK
hUGT1A1	PVDGS H WLSML
hUGT1A3	PIDGS H WLSMR
hUGT1A4	PTDGS P WLSMR
hUGT1A9	PMDGS H WFTMR

Figure 28 : Alignement de séquences des UGT1A au niveau de l'His38 de l'UGT1A6.

V.10.2. Analyse du rôle du résidu His38 de l'UGT1A6

Afin de déterminer le rôle du résidu His38 de l'UGT1A6, celui-ci a été muté en alanine, acide aspartique, proline, arginine, tyrosine, lysine permettant de générer les mutants H38A, H38D, H38P, H38R, H38Y et H38K respectivement. L'analyse par immunoblot montre que, sauf le mutant H38D qui est exprimé à un niveau similaire par rapport à la protéine sauvage, les autres mutants (H38A, H38P, H38R, H38Y, H38K) sont exprimés à des taux beaucoup plus élevés que la protéine sauvage (Fig. 29).

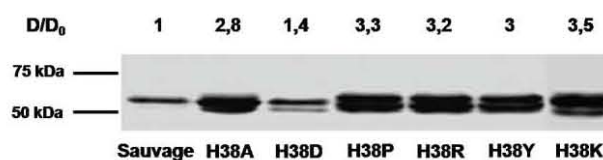


Figure 29 : Analyse par immunoblot de l'expression de divers mutants en position 38 de l'UGT1A6 (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage).

L'activité de l'enzyme sauvage UGT1A6 a été testée vis-à-vis d'une série de substances phénoliques (Fig. 30). Le mélange réactionnel est séparé par chromatographie sur couche

mince et les glucuronides radioactifs sont visualisés par autoradiographie (Fig. 30A). L'analyse de l'activité et la spécificité de substrat indique que l'UGT1A6 sauvage présente des activités élevées envers les substrats 4-MO, α -naphthol, scopolétine, 4-nitrophénol, 4-nitrocatéchol et 4-éthylphénol, et une faible activité vis-à-vis de 2-éthylphénol. Les activités vis-à-vis de la quercétine et du 4-hydroxybiphényle ne sont pas détectables (Fig. 30B).

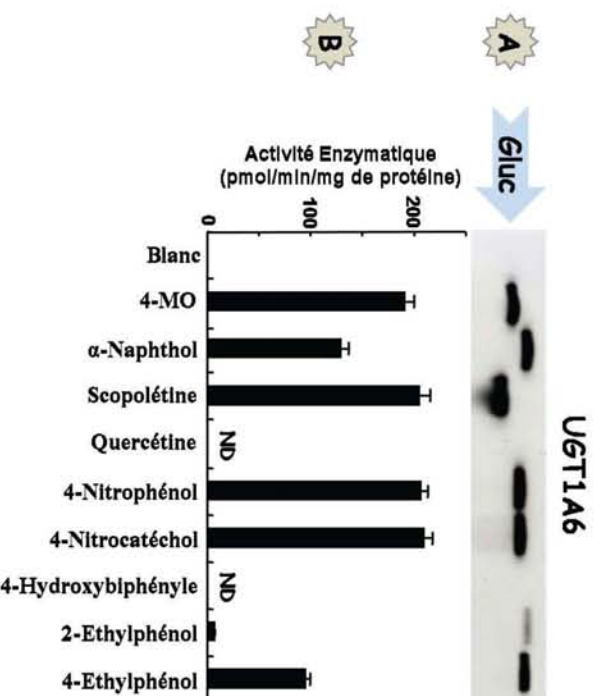


Figure 30 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A6. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substances phénoliques (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

L'analyse de l'activité et la spécificité de substrat indique que, exceptés H38R (Fig. 31) et H38K (Fig. 32), les autres mutants sont inactifs. L'activité du mutant H38R de l'UGT1A6 a été testée vis-à-vis des mêmes substances phénoliques que l'UGT1A6 sauvage (Fig. 31). Le mélange réactionnel est séparé par CCM et les glucuronides radioactifs sont visualisés par autoradiographie (Fig. 31A). L'analyse de l'activité et de la spécificité de substrat indique que le mutant H38R présente une très faible activité enzymatique et une spécificité de substrat différente de celle du sauvage (Fig. 31B). En fait, le mutant H38R présente des activités

faibles mais détectables vis-à-vis des substrats 4-MO, α -naphthol, 4-nitrophénol, 4-nitrocatechol et 4-éthylphénol. De manière intéressante, le mutant H38R ne conjugue plus la scopolétine (Fig. 31B).

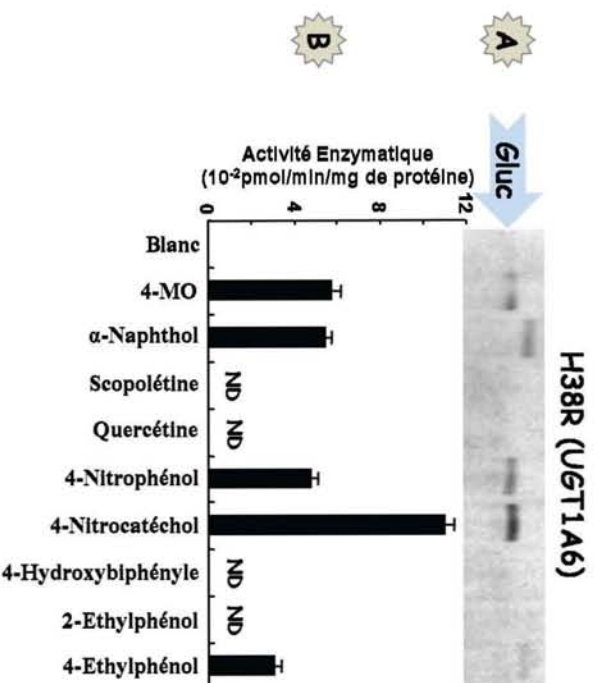


Figure 31 : Influence de la mutation H38R sur la spécificité de substrat de l'UGT1A6. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substances phénoliques (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

Le dosage de l'activité du mutant H38K de l'UGT1A6 a été effectué vis-à-vis des mêmes substances phénoliques que celles de l'UGT1A6 sauvage (Fig. 32). Le mélange réactionnel est séparé par CCM et les glucuronides radioactifs sont visualisés par autoradiographie (Fig. 32A). L'analyse de l'activité et de la spécificité de substrat indique que le mutant H38K présente une activité enzymatique un peu plus élevée que le mutant H38R et une spécificité de substrat différente de celle de l'enzyme sauvage (Fig. 32B). En fait, le mutant H38K présente des activités élevées vis-à-vis des substrats scopolétine et 4-nitrocatechol, et des activités plus faibles vis-à-vis des substrats 4-MO, α -naphthol, 4-nitrophénol, 4-éthylphénol et 2-éthylphénol. De façon intéressante, on observe que le

mutant H38K présente une spécificité de substrat élargie vis-à-vis de la quercétine qui n'est pas métabolisée par l'UGT1A6 sauvage (Fig. 32B). L'ensemble de ces résultats, suggère que le résidu His38 est impliqué dans la détermination de la spécificité de substrat de l'UGT1A6 plutôt que dans le mécanisme catalytique.

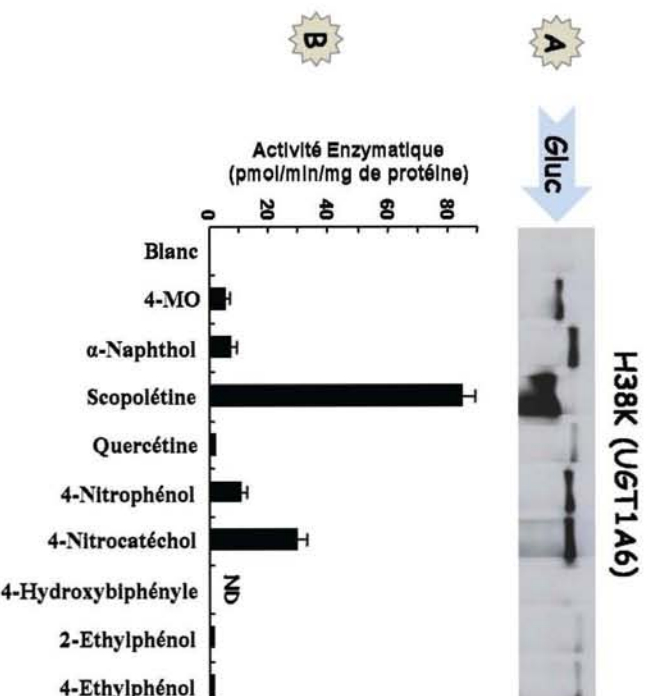


Figure 32 : Influence de la mutation H38K sur la spécificité de substrat de l'UGT1A6. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substances phénoliques (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

V.11. Analyse du rôle du résidu Pro40 de l'UGT1A4

La séquence de l'UGT1A4 humaine est identique à 93% à celle de l'UGT1A3 humaine (Fig. 33), mais ces deux isoformes présentent de grandes différences dans leur spécificité de substrat. L'UGT1A4 conjugue exclusivement des amines (formation de N-glucuronides), tandis que l'UGT1A3 métabolise des phénols et des acides carboxyliques (formation d'éther-glucuronides et d'acyl-glucuronides). Comme indiqué précédemment, l'UGT1A4 contient un résidu proline (Pro40) à la position correspondant à l'His38 de l'UGT1A6 (Fig. 28).

```

hUGT1A3  MATGLQVPLPWLATGLLL LLSVQPWAESGKVLVVP IDGSHWLSMREVLRE LHARGHQAVVLTPEVNMHIKEENFFTLTY 80
hUGT1A4  MARGLQVPLPRLATGLLL LLSVQPWAESGKVLVVP TDGSPWLSMREA LRE LHARGHQAVVLTPEVNMHIKEEKFFTLTA 80
** ***** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** :*****:

hUGT1A3  AISWTQDEFDRHVLGH TQLY FETEH FLKKF FRSMAMLNMSLVYHRS CVELLHNEALIRHLNATSFDVVL TDPVNLCAAV 160
hUGT1A4  AVPTQKEFDRVTLG YTQGF FETEH LLKRY SRSMATMNNVSLALHRC CVELLHNEALIRHLNATSFDVVL TDPVNLCAAV 160
*.:**.* ** .**:* :*****:***: *****:***: **.* ***** ***** ***** ***** ***** :**

hUGT1A3  LAKYLSIPTVFFLRN IPCDLDFKGTQCPNPSSYIP RLTTNSDHMTFMQRVKNMLYPLALS YICHAFSAPYASLASELFQ 240
hUGT1A4  LAKYLSIPAVFFWR YIPC DLDFKGTQCPNPSSYIP KLLTTNSDHMTFLQRVKNMLYPLALS YICHTF SAPYASLASELFQ 240
*****:*** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

hUGT1A3  REVSVDILSHASVWLFRGDFVMDY PRP IMPNMVF IGGINCANKPLSQE FEAYINASGEHGIVV FSLGSMVSEIPEKKA 320
hUGT1A4  REVSVDLVS YASVWLFRGDFVMDY PRP IMPNMVF IGGINCANGKPLSQE FEAYINASGEHGIVV FSLGSMVSEIPEKKA 320
*****:*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

hUGT1A3  MAIADALGKI PQTVLWRYTGTRPSN LANNT ILVKWLPQNDLLGHPMTRAF ITHAGSHGVYES ICNGVPMVMMPLFGDQMD 400
hUGT1A4  MAIADALGKI PQTVLWRYTGTRPSN LANNT ILVKWLPQNDLLGHPMTRAF ITHAGSHGVYES ICNGVPMVMMPLFGDQMD 400
*****:*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

hUGT1A3  NAKRMETKGAGVTLNVLEMT SEDLENALKA VINDKSYKENIMRLS SLHKDRPVEPLDLAVFWVEFVMRHKGAPHLRPAAH 480
hUGT1A4  NAKRMETKGAGVTLNVLEMT SEDLENALKA VINDKSYKENIMRLS SLHKDRPVEPLDLAVFWVEFVMRHKGAPHLRPAAH 480
*****:*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

hUGT1A3  DLTWYQYHSLDVI GFLAVVLTVA FITFKCAYGYRKCLGKKGRVKKAHKSKTH 534
hUGT1A4  DLTWYQYHSLDVI GFLAVVLTVA FITFKCAYGYRKCLGKKGRVKKAHKSKTH 534
*****:*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```

Figure 33 : Aligement de séquences de l'UGT1A3 humaine avec l'UGT1A4 humaine. *, résidus conservés.

Nous avons remplacé ce résidu proline par le résidu histidine (P40H), telle qu'on le trouve dans l'UGT1A6 et l'UGT1A3 ainsi que dans d'autres isoformes d'UGTs, et par le résidu alanine (P40A). Le Western blot montre que le mutant P40H de l'UGT1A4 est exprimé au même niveau que celui de l'enzyme UGT1A4, et le mutant P40A est exprimé à un taux plus élevé que celui de l'UGT1A4 sauvage (Fig. 34).

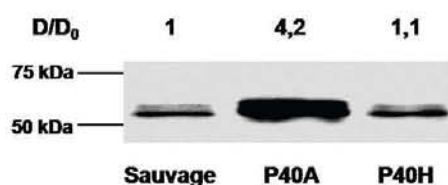


Figure 34 : Analyse par immunoblot de l'expression des mutants en position 40 de l'UGT1A4 (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage).

L'activité de l'enzyme sauvage UGT1A4 a été testée envers des substances phénoliques, des acides carboxyliques et des amines (primaires, secondaires et tertiaires) (Fig. 35). Le mélange réactionnel est séparé par CCM et les glucuronides radioactifs sont visualisés par autoradiographie (Fig. 35A). L'analyse de la glucuronocouplage des amines a nécessité l'utilisation d'une phase mobile adaptée à la séparation des N-glucuronides. L'analyse de l'activité et de la spécificité de substrat indique que l'UGT1A4 sauvage n'est active que vis-à-vis des substrats de type d'amine : 4-aminobiphényle, 2-naphthylamine (amines primaires), diphénylamine (amine secondaire), cyprohéptadine et doxépine (amines tertiaires). L'activité vis-à-vis du N-desméthylclozapine (amine secondaire) n'est pas détectée. L'UGT1A4 sauvage ne présente aucune activité vis-à-vis des composés phénoliques (4-MO, scopolétine, α -naphthol, 4-nitrophénol, quercétine et 4-hydroxybiphényle) et des acides carboxyliques (kétoprofène et ibuprofène) (Fig. 35B). Ces résultats indiquent une spécificité de substrat de l'UGT1A4 sauvage restreinte à la conjugaison des amines.

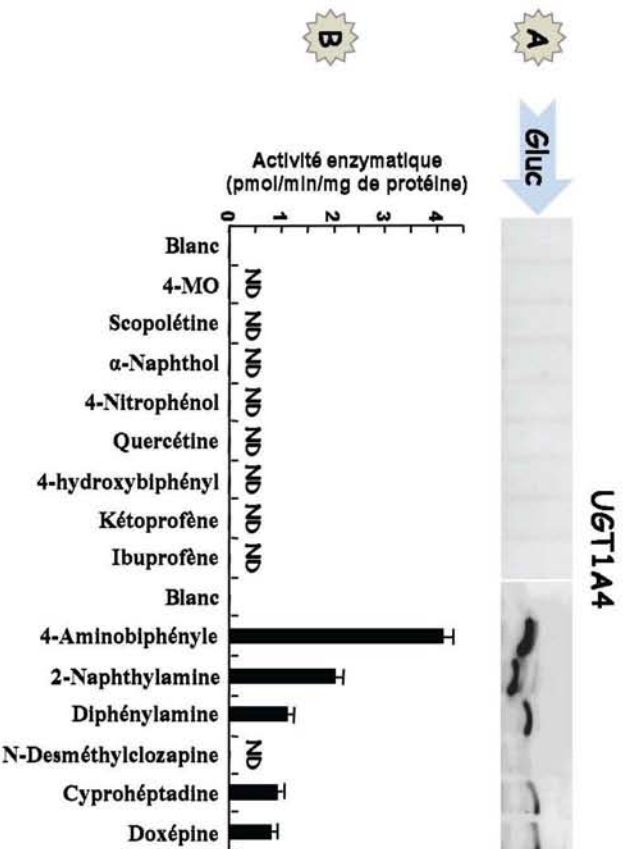


Figure 35 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A4. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substrats accepteurs (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

L'activité du mutant P40H de l'UGT1A4 a été testée envers des substances phénoliques, des acides carboxyliques et des amines (primaires, secondaires et tertiaires) (Fig. 36). Le mélange réactionnel est séparé par CCM et les glucuronides radioactifs sont visualisés par autoradiographie (Fig. 36A). De manière remarquable, l'analyse de l'activité enzymatique vis-à-vis d'une série de composés relève que le mutant P40H de l'UGT1A4 présente une spécificité de substrat élargie à la conjugaison des substrats phénoliques et carboxyliques (Fig. 36B). En effet, le mutant P40H conjugue des phénols (4-MO, α -naphthol, 4-nitrophénol, quercétine, scopolétine) et des acides carboxyliques (kétoprofène, ibuprofène). L'analyse de la spécificité de substrat du mutant P40H vis-à-vis des amines montre que l'activité catalytique est réduite aux amines primaires telles que la 4-aminobiphényle et la 2-naphthylamine. Aucune activité n'est détectée vis-à-vis des amines secondaires telles que la diphenylamine et la N-desméthylelozapine ou les amines tertiaires telles que la cyprohéptadine et la doxépine (Fig. 36B). De manière intéressante, la mutation P40A n'induit pas de changements dans la spécificité de substrat de l'enzyme UGT1A4 sauvage.

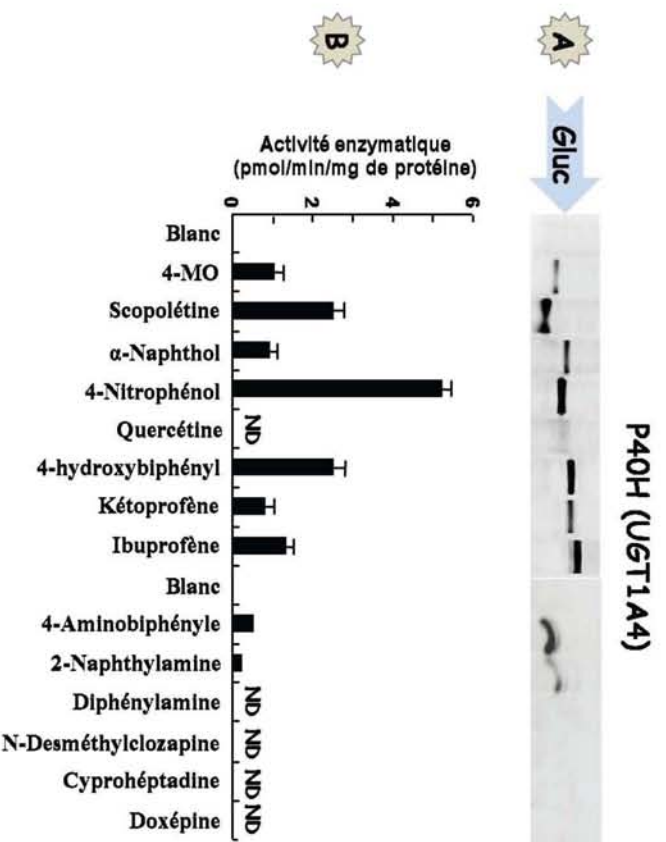


Figure 36 : Analyse de la spécificité de substrat du mutant P40H de l'UGT1A4. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substrats accepteurs (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

Pour confirmer l'importance du résidu Asp152 dans le mécanisme de la glucuroconjugaison, nous avons généré un double mutant P40H-D152A dans l'UGT1A4 et mesuré l'activité de l'enzyme vis-à-vis des substrats décrits ci-dessus. Les résultats obtenus montrent que le double mutant P40H-D152A est totalement inactif, confirmant ainsi le rôle catalytique du résidu aspartique en position 152.

V.12. Analyse du rôle du résidu His40 de l'UGT1A3

Comme indiqué ci-dessus, le remplacement du résidu Pro40 de l'UGT1A4 par une histidine, telle qu'on la trouve dans l'UGT1A3, conduit à un mutant P40H présentant une spécificité de substrat similaire à celle de l'UGT1A3.

En outre, nous avons étudié le rôle du résidu His40 de l'UGT1A3 dans la spécificité de substrat de l'enzyme. Nous avons substitué le résidu His40 de l'UGT1A3 en proline (tel qu'on le trouve dans l'isoforme UGT1A4) et en alanine, générant les mutants H40P et H40A. L'analyse par Western blot montre que les mutants de l'UGT1A3 sont exprimés au même niveau que celui de l'enzyme sauvage (Fig. 37).

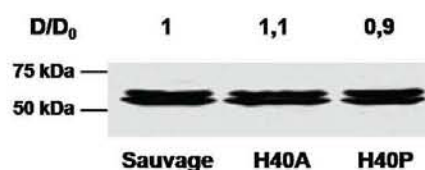


Figure 37 : Analyse par immunoblot de l'expression des mutants en position 40 de l'UGT1A3 (D, densitométrie des mutants ; D_0 , densitométrie de l'enzyme sauvage).

En premier lieu, la spécificité de substrat de l'UGT1A3 sauvage a été déterminée vis-à-vis de substances phénoliques, d'acides carboxyliques et d'amines primaires (Fig. 38). Les résultats indiquent que l'UGT1A3 sauvage présente une activité détectable vis-à-vis de tous les substrats, tels que des composés phénoliques (4-MO, scopolétine, α -naphthol et 4-nitrophénol), des acides carboxyliques (kétoprofène et ibuprofène) et des amines primaires (4-aminobiphényle et 2-naphthylamine) (Fig. 38B). Les activités les plus élevées sont observées avec les substrats phénoliques (4-MO, scopolétine et 4-nitrophénol).

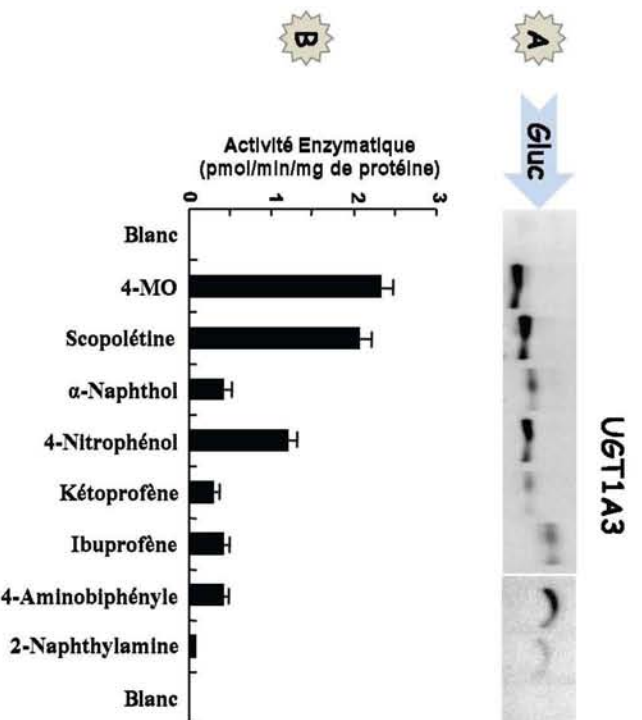


Figure 38 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A3. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis de substrats accepteurs (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM).

L'activité du mutant H40P de l'UGT1A3 a été testée envers les mêmes substrats phénoliques, acides carboxyliques et amines primaires que l'enzyme sauvage (Fig. 39). De manière intéressante, l'analyse de la spécificité de substrat du mutant H40P révèle qu'elle se rapproche de celle de l'UGT1A4 sauvage. En effet, le mutant H40P est actif vis-à-vis des amines 4-aminobiphényle et 2-naphthylamine, mais inactif vis-à-vis des composés phénoliques (4-MO, scopolétine, α -naphthol et 4-nitrophénol) et des composés acides carboxyliques (kétoprofène et ibuprofène) (Fig. 39B). Des résultats similaires ont été obtenus lors de la mutation du résidu histidine 40 en alanine (H40A) (non montrés).

L'ensemble des résultats portant sur l'étude des mutants de l'UGT1A3 et l'UGT1A4 confirme l'hypothèse selon laquelle le résidu en position 40 joue un rôle important dans la spécificité de substrat des UGT1A.

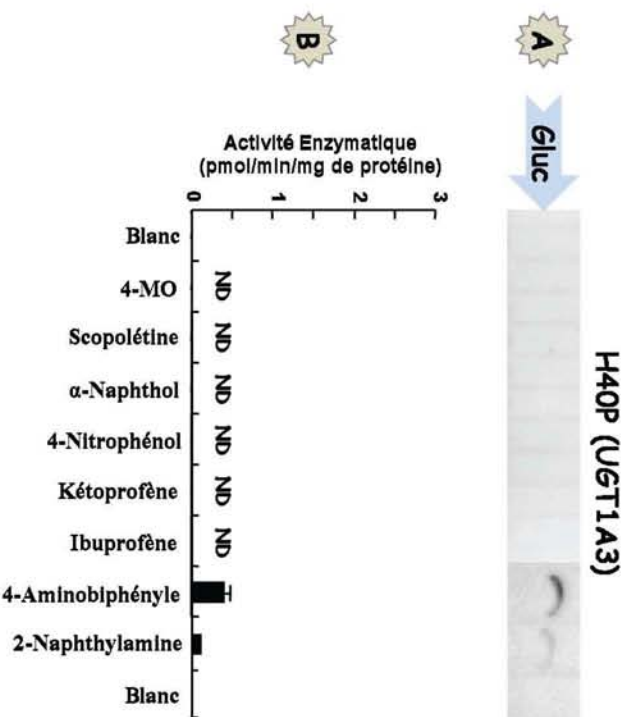


Figure 39 : Effet de la substitution du résidu histidine en position 40 par un résidu proline sur l'activité de l'UGT1A3. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substrats accepteurs (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

V.13. Analyse du rôle du résidu His39 de l'UGT1A1

Afin de confirmer l'importance du résidu en cette position (His38 en UGT1A6, Pro40 en UGT1A4 et His40 en UGT1A3) dans la spécificité de substrat, nous avons finalement remplacé ce résidu histidine par un résidu proline (H39P), telle qu'on le trouve dans l'UGT1A4, et par le résidu alanine (H39A) dans l'UGT1A1. L'analyse par Western blot montre que le mutant H39P de l'UGT1A1 est exprimé au même niveau que celui de la protéine sauvage, et le mutant H39A est exprimé à un taux un peu plus faible que la protéine sauvage UGT1A1 (Fig. 40).

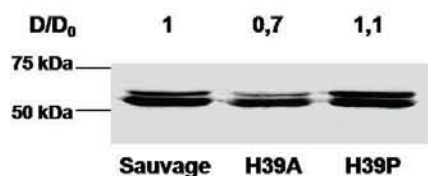


Figure 40 : Analyse de l'expression des mutants en position 39 de l'UGT1A1 par immunoblot (D, densitométrie des mutants ; D₀, densitométrie de l'enzyme sauvage).

L'activité de l'enzyme sauvage UGT1A1 a été testée vis-à-vis de substances phénoliques et d'estrogènes (Fig. 41). L'analyse des activités de l'UGT1A1 montre que l'enzyme sauvage catalyse la glucuroconjugaison de composés phénoliques (4-MO, scopolétine, α -naphthol, eugénol, octylgallate et 4-nitrophénol) et d'estrogènes (β -estradiol, 2-hydroxyestradiol et 2-hydroxyestrone) (Fig. 41B).

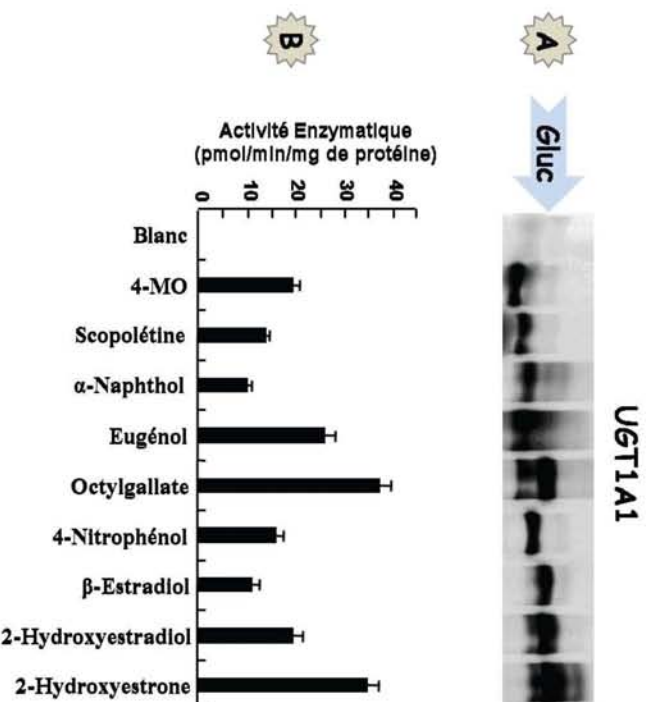


Figure 41 : Analyse de la spécificité de substrat de l'UGT1A1. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis de différents substrats accepteurs (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM).

L'analyse de l'activité du mutant UGT1A1 H39P indique que le remplacement du résidu His39 par la proline conduit à une perte de conjugaison des composés phénoliques (4-MO, scopolétine, α -naphthol, eugénol, octylgallate, 4-nitrophénol), mais pas de celle des estrogènes (β -estradiol, 2-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestrone) (Fig. 42). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'His39 a été remplacée par l'alanine (non montrés). L'ensemble des données indiquent que l'acide aminé à la position 40 dans l'UGT1A3 et l'UGT1A4 et à la position 39 dans l'UGT1A1 est un élément structural déterminant pour la glucuronocouplage des composés phénoliques et des acides carboxyliques.

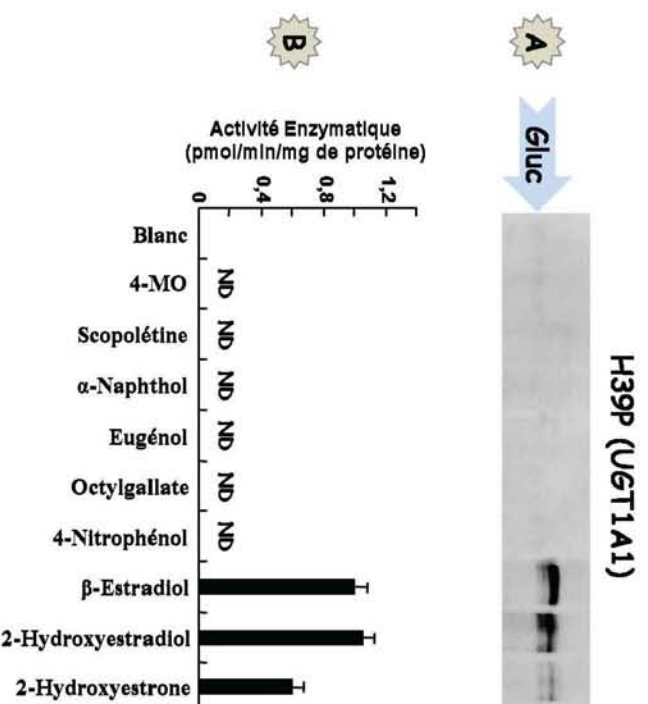


Figure 42 : Détermination de la spécificité de substrat du mutant UGT1A1, H39P. (A), Chaque valeur obtenue après quantification de la radioactivité associée au glucuronide correspond à la moyenne \pm SD (3 essais). (B), L'activité de l'enzyme mutée a été testée vis-à-vis des substrats accepteurs (1,0 mM) en présence d'UDP-GlcA radioactif (0,1 μ Ci) et froid (0,1 mM). ND, non détectable.

V.14. La modélisation des UGTs

Dans l'objectif de mieux comprendre le rôle du résidu proline en position 40 caractéristique de l'UGT1A4, nous avons tenté d'établir un modèle de la structure 3D de cette protéine.

Plusieurs modèles de l'UGT1A4 ont été réalisés avec le serveur *LOOPP* (*Learning, Observing and Outputting Protein Patterns*, <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx> (Teodorescu *et al.*, 2004)). Ce serveur génère des modèles atomiques de protéines à partir d'une structure primaire en utilisant un alignement de séquences entre la séquence d'intérêt et celles des protéines présentes dans la *Protein Data Bank* (PDB). Cet alignement et le modèle

sont réalisés avec le logiciel *MODELLER* (Marti-Renom *et al.*, 2000). La structure finale est évaluée en utilisant un score d'énergie. Ce serveur a proposé différents modèles de l'UGT1A4. Le principal problème rencontré au cours de cette étude réside dans le fait que les structures 3D des glycosyltransférases cristallisées incomplètes ne permettent pas de générer des modèles satisfaisants.

Le meilleur résultat proposé par LOOPP est obtenu en utilisant la chaîne A de la structure de l'oléandomycine glycosyltransférase de *Streptomyces antibioticus* (code pdb 2IYF). L'alignement obtenu est présenté dans la figure 43.

```

ugt1a4 30 KVLVVPDGS PWLS--MREALRELHARGHQAVVLTPEVNMHIKEEKFFTLTAYAVPWTQKEFDRVTLGYTQGGFFETEHL 107
2IYF_A 7 AHIAMFSIAAHGHVNP SLEVI RELVARGHRVTYAIPPVFADKVAATGPRFVLYHSTLPGPDAD-----PEAWGST---- 76

ugt1a4 108 KRYSRSM AIMNNVSLALHRCCEVLLHNEALIRHLNATSFDVVL TDPVNLGAVLAKYLSIPAVFFWRYIPCDLDFKGTQC 187
2IYF_A 77 -----LLDNVEPF LNDAIQALPQ---LADAYADDI PDLVLHDI TSYPARVLARRWGVPVAVSLS PNLV----- 135

ugt1a4 188 PNPSSYIPKLLTTNSDHMTFLQRVKNMMLYPLALS YICHTFSAPYASLASELFQREVSVVDLVS YAS-VWLF RGFVMDYP 266
2IYF_A 136 -----AWKGYEEVVAE PMWREPRQTERGRAYARFEAWLKENGI TE-HPDTFASH PPRS LVLIPKALQPHA 200

ugt1a4 267 RPIMPNMVFIGGINCANGKPLSQEF EAYINASGEHGIVV FSLGSMVSEIPEKKAMA IADALGKI PQTVLWRYTGTRP--S 344
2IYF_A 201 DRVDEDVYTFVGA-CQEGGWQR-----PAGA EKVV LVS LGS AFTQ--PAFYRECVRAFGN L PGWHLVLQIGT PAELG 269
          ^ ^                ^ ^                * *

ugt1a4 345 NLANN TILVKWLPQNDLLGH PMTRAFIT HAGSHGVYESI CNGVPMVMMLPFGDQMDNAKRMETKGAGVTLNVLEMTSEDL 424
2IYF_A 270 ELPDNVEVHDWVPLA ILRQA--DLFVTHAGAGGSQ EGLATATPMI AVPQAVDQFGNADMLQGLGVARKLATEEATADLL 347

ugt1a4 425 ENALKAVINDKSYKENIMRLSSLHKDRPVE PLDLAVFWVE 464
2IYF_A 348 RETALALVDDPEVARRLRRIQAEMAQEG--GTRRAADLIE 385

```

Figure 43 : Alignement de séquence primaire de l'UGT1A4 et de la chaîne A de l'oléandomycine glycosyltransférase de *Streptomyces antibioticus* (code pdb 2IYF).

Concernant la structure 2IYF_A, dans la zone signalée par ^^ ils manquent les résidus de 216 à 219 (GDRA), dans la zone marquée par ___il manque le résidu 244 (K) et dans la région ** ils manquent les résidus 270 à 272 (RKV). Il faut aussi noter que dans l'alignement ci-dessus il y a 24 résidus (178 au 201) d'UGT1A4 qui ne sont pas alignés, cette zone est donc très difficile à modéliser, voir impossible de façon fiable.

Un autre modèle proposé est celui généré à partir de l'UDP-glucose flavonoïde 3-*O*-glycosyltransférase de la *vigne* (chaîne A du code pdb 2C1X) avec l'alignement présenté dans la figure 44.

```

UGT1A4 28 SGKVLVVPDGS-PWLSMREALRELHARGHQAVVLTPEVNMHIKEEKFFTLTAYAVPWTQKEFDRVTLGYTQGFETEHL 106
2C1X_A 7 NPHVAVLAFPFSTHAAPLLAVVRRLLLLAAAPHAVFSFSTSQSNASIFQCNIKSYDISD-----GVPEGYVFAG-- 74
      ^ ^
UGT1A4 107 LKRYSRSMAIMNNSLALHRCCVELLHNEALIRHLNATSFVVLTDPVNLGAVLAKYLSIPAVFFWRYIPCDLDFKG-- 184
2C1X_A 75 -RPQEDIELFTRAAPESFRQGMVMAVAETG-----RPVSLVADAFIWFADMAAEMGVAWLPFWTAGPNLSLTHVYI 146

UGT1A4 185 -----TQCPNPSYIPKLLTTNSDHMTFLQRVKNMLYPLALSYICHTFSAPYASLASELFQREVSVDLVSYASVW 255
2C1X_A 147 DEIREKIGVSGIQGREDELLNFI PGMSK-VRFRDLQEGIVF-----GNLNSLFSRMLHR---MGQVLPKATAV 210

UGT1A4 256 LFRGDFVMD----YPRPIMPNMVFI GGINCANGKPLSQEFAY INASGEHGI VVFSLGSMVSEIPEKKAMAIADALGKI 330
2C1X_A 211 FINSFEELDDSLTNDLKSCLKTYLNI GPFNLI TG-----CLQWLKERKPTSVVYISFGTVTT-PPPAEVALSEALEAS 283
      \ \
UGT1A4 331 PQTVLWRYTGTRPSNLA-----NNTILVKWLPQNDLLGHPMTRAFITHAGSHGVYESICNGVPMVMMP LFGDQMDNA 402
2C1X_A 284 RVPFIWSLRDKARVHLEPGFLEKTRGYGMVVPWAPQAEVLAHEAVGAFVTHCGWNSLWESVAGGVPLICRPFPGDQRLNG 363

UGT1A4 403 KRMETK-GAGVTLNVLEMTSEDLLENALKAVIND---KSYKENIMRSLSLHKDRPVE---PLDLAVFVVEFVMRHKGA 472
2C1X_A 364 RMVEDVLEIGVRIEGGVFTKSGLMSCFDQILSQEKGKKLRENLRALRETADRAVGPKGSSTENFITLVDLVSKPKDV 440

```

Figure 44 : Alignement de séquence primaire de l'UGT1A4 et de la chaîne A de l'UDP-glucose flavonoïde 3-*O*-glycosyltransférase de la *vigne* (code pdb 2C1X).

La 2C1X_A, lui manque les résidus 54 à 60 (^; HDSMHTM) et 251 à 259 (___; PPPVVPNTT).

Les résidus en amont et en aval des régions manquantes au niveau de toutes les structures proposées par LOOPP, se trouvent à une distance entre 10 Å et 20 Å des substrats accepteur et donneur. Ceci implique que ces régions manquantes pourraient être proches de chacun des ligands et même établir des interactions non covalentes avec eux. La modélisation de ces régions serait longue et la validité du résultat n'est pas garantie.

B. Expression des UGTs dans les chondrocytes

V.15. Identification des UGTs exprimées dans les chondrocytes par RT-PCR

Nous avons dans un premier temps recherché l'expression des différentes isoformes d'UGTs dans les chondrocytes de cartilage articulaire humain par RT-PCR semi-quantitative. Utilisant cette approche, nous avons mis en évidence l'expression de 10 isoformes d'UGTs (UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A10, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B17 et UGT2B28) dans les chondrocytes. (Fig. 45). L'analyse de l'expression de différentes isoformes montre que leur expression varie de façon plus ou moins importante suivant l'isoforme étudiée. Ainsi l'UGT1A7, l'UGT1A10 et l'UGT2B11 sont plus exprimées que l'UGT1A3, l'UGT1A4, l'UGT1A6, l'UGT2B7, l'UGT2B10, l'UGT2B17 et l'UGT2B28, alors que 5 UGTs (UGT1A1, 1A8, 1A9, 2B4 et 2B15) ne sont pas exprimées (Fig. 45).

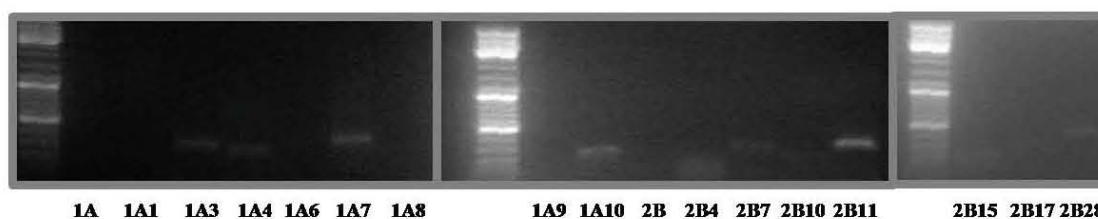


Figure 45 : Analyse de l'expression des UGTs chondrocytaires. Le produit d'amplification est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

V.16. Effet de Bap et TCDD sur l'expression des UGTs chondrocytaires

Les UGTs sont inductibles par des xénobiotiques en particulier au niveau du foie. Nous avons testé l'effet du Bap et du TCDD sur l'expression des UGTs chondrocytaires. Ces deux molécules contenues dans la fumée de cigarette peuvent induire des UGTs et par conséquent accélérer le métabolisme des estrogènes qui sont des protecteurs du cartilage.

Nous avons traité les chondrocytes issus du cartilage articulaire (femme, 65 ans) par le Bap (1 μ M) ou le TCDD (0,1 μ M) ou le DMSO (contrôle) pendant 6 h. L'analyse de l'expression des UGTs exprimées dans le chondrocyte montre que le Bap et le TCDD sont capables d'induire l'expression de 5 isoformes d'UGT1A (UGT1A3, 1A4, 1A6, 1A7 et 1A10) et 4 isoformes d'UGT2B (UGT2B10, 2B11, 2B17 et 2B28).

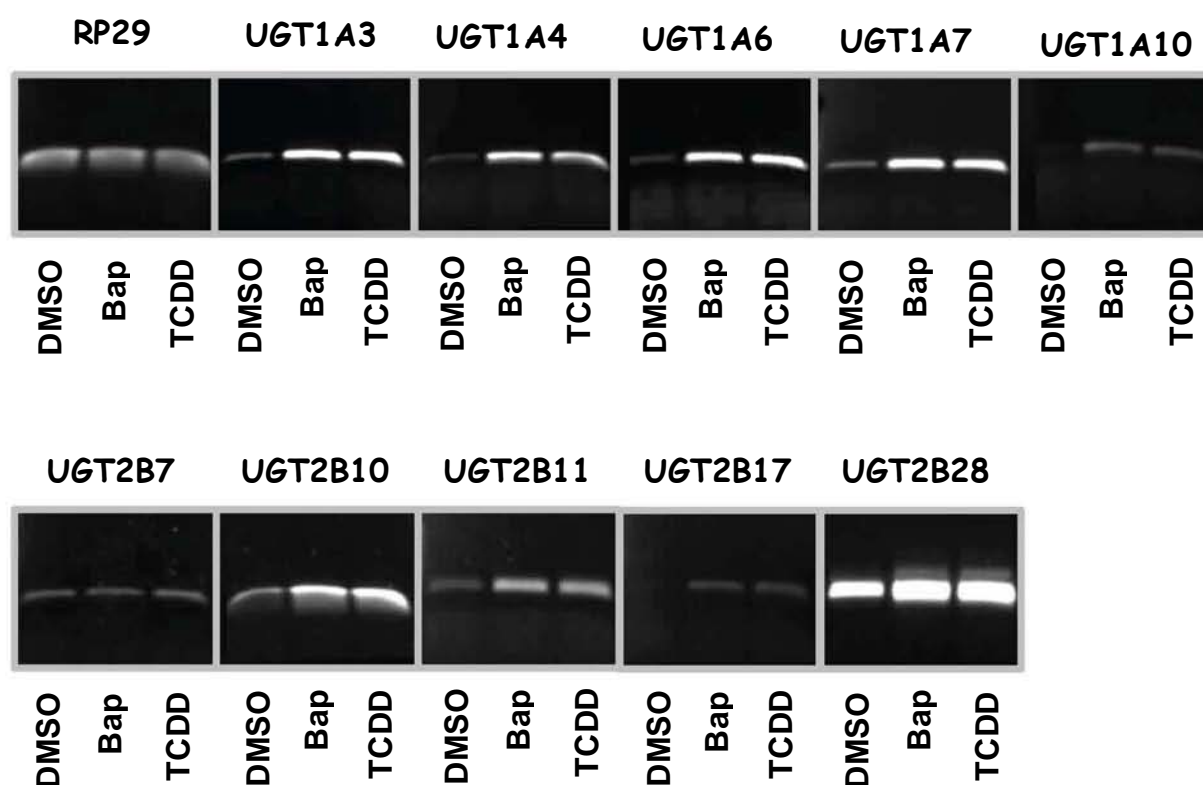


Figure 46 : Analyse de l'expression des ARNm des UGTs par RT-PCR dans les chondrocytes humains traités par le DMSO (D), le Bap (B) et le TCDD (T) pendant 6h. Le produit d'amplification est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

Il a été montré que parmi les UGTs exprimées dans le chondrocyte, les UGT1A3, 1A10 et 2B7 peuvent conjuguer les estrogènes. Nous nous sommes donc principalement intéressés à l'expression de ces isoformes.

V.17. Analyse de l'expression des UGTs chondrocytaires par Western blot et l'activité de glucuroconjugaison par CCM

Nous avons analysé l'expression des UGTs par immunoblot, cependant nous n'avons pas obtenu la confirmation de l'expression de ces UGTs au niveau protéique. De même, nous n'avons pas pu détecter d'activité de glucuroconjugaison dans le chondrocyte dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude. Il est donc important pour la suite d'utiliser d'autres méthodes de détection (nouvel anticorps...) et d'analyse de l'activité enzymatique par une méthode HPLC plus sensible.

Chapitre VI.

Discussion

L'amélioration de l'efficacité d'un médicament nécessite une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire de l'enzyme en charge de son métabolisme. Les UGTs jouent un rôle-clé dans la biotransformation des médicaments chez l'homme. Ces protéines catalysent aussi la glucuroconjugaison des xénobiotiques, dont certains sont connus pour être cancérigènes, ainsi que des composés endogènes, tels que les hormones et d'autres ligands des récepteurs nucléaires (acides gras, rétinoïdes). Ces enzymes constituent une barrière efficace contre l'entrée de substances potentiellement toxiques et jouent un rôle important dans la physiologie des cellules par la modulation de la concentration des composés endogènes. Par conséquent, le mécanisme de la réaction de glucuroconjugaison ainsi que la base moléculaire de la spécificité de substrat des UGTs doivent être mieux compris. Notre travail a pour but de fournir de plus amples informations sur ces deux points.

Après avoir exprimé l'enzyme dans la cellule hôte *P. pastoris*, en absence de structures 3D de l'UGT1A6 recombinante, nous avons utilisé essentiellement 4 approches complémentaires : la modification chimique, la mutagenèse dirigée, l'alignement des séquences et la modélisation moléculaire.

VI.1. Système d'expression : *Pichia pastoris*

L'étude structurale et fonctionnelle de l'UGT1A6 passe de façon obligatoire par l'obtention d'une forme membranaire recombinante active, après expression de l'ADNc correspondant dans des systèmes hétérologues. Notre laboratoire a testé plusieurs types de cellules hôtes en privilégiant chaque fois l'expression stable, ce qui permet de disposer d'une quantité quasi illimitée de la protéine d'intérêt. Ainsi l'UGT1A6 a été exprimée dans des cellules procaryotes et eucaryotes avec plus ou moins de succès. L'utilisation de *E.coli* n'a pas permis l'obtention d'une enzyme active, malgré la forte expression de la protéine, due à

l'accumulation de la protéine sous forme de corps d'inclusion (Ouzzine *et al.*, 1994b). L'absence de glycosylation d'une part et l'agrégation irréversible de l'UGT1A6 sont sûrement responsables de cet échec. Des systèmes eucaryotiques ont été utilisés par contre avec plus de succès, plus particulièrement les cellules V79 (fibroblastes de poumon de hamster chinois) (Fournel-Gigleux *et al.*, 1991) et HEK293 (cellules humaines embryonnaires de reins) (Antonio *et al.*, 2003) qui assurent une production d'enzyme active au niveau de la fraction microsomale. Ces cellules ont permis en particulier de déterminer la spécificité de substrat de l'UGT1A6 et d'initier des études visant à identifier les acides aminés importants. Cependant il est vite apparu que ces systèmes étaient limités en termes de quantité d'enzyme recombinante, d'où le recours à des cellules de types levures susceptibles d'être cultivées en grandes quantités.

Nous avons alors utilisé la levure *P. pastoris* pour exprimer l'UGT1A6 humaine sauvage et les différents mutants. Cette levure constitue un système d'expression qui présente plusieurs avantages par rapport à ceux utilisés antérieurement. En effet, sa manipulation génétique ainsi que sa culture sont aisées, ce qui génère un moindre coût d'utilisation. De plus *P. pastoris* a une croissance rapide, comparable à celle des organismes procaryotiques. Elle possède une machinerie sub-cellulaire similaire à celle des cellules eucaryotes et a la capacité à réaliser des modifications post-traductionnelles proches de celles rencontrées dans ces cellules. De plus, *P. pastoris* est le seul système d'expression permettant d'obtenir une forme activable de l'UGT1A6 recombinante par des détergents, similaire à celle de l'isoforme native exprimée au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui suggère une localisation membranaire proche de la forme native humaine.

VI.2. La comparaison UGTs/GTs

Les glycosyltransférases (GTs) constituent un groupe d'enzymes qui transfèrent un sucre à partir d'un substrat donneur activé (généralement un nucléotide-sucré) sur des molécules acceptrices de structures diverses (xénobiotiques mais aussi sucres, lipides, protéines...). Les

sucres transférés sont le plus souvent des hexoses de conformation D- ou L- selon l'enzyme. La plupart de ces enzymes utilisent des substrats donneurs contenant un groupement diphosphate. Ainsi plus de 60% des GTs sont des NDP-glycosyltransférases. Les réactions catalysées conduisent à la formation de liaisons glycosidiques présentant, ou non, une inversion de configuration du sucre donneur ($\alpha \rightarrow \beta$, $\alpha \rightarrow \alpha$) (Fig. 47). Le premier type de réaction est catalysé par des « inverting NDP-sugar » transférases. C'est le cas rencontré pour l'UGT1A6. Le mécanisme impliqué est de type S_N2 avec un état de transition de type ion oxocarbenium. Un tel mécanisme fait appel à une base catalytique pour l'activation de l'accepteur nucléophile par déprotonation, attaque nucléophile du carbone 1 du substrat donneur et départ du nucléotide diphosphate facilité par un cation métallique (Charnock and Davies (1999)). Le deuxième type de réaction est catalysé par des « retaining NDP-sugar » transférases. Le mécanisme ferait appel à 2 ions oxocarbenium ainsi qu'à un intermédiaire covalent de type glycoside-enzyme (Zechel and Withers, 2000).

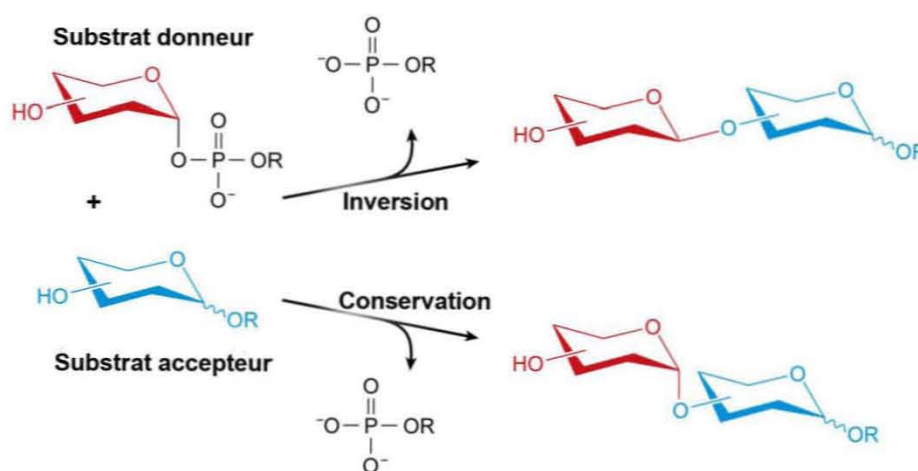


Figure 47 : Les 2 types de mécanismes rencontrés dans la famille des glycosyltransférases. Les glycosyltransférases catalysent le transfert du groupement glycosyle avec inversion ou conservation de la configuration du substrat donneur.

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la nature des résidus catalytiques ainsi que sur la structure de l'organisation de l'UGT1A6, nous avons tiré profit du grand nombre de données structurales et mécanistiques accumulées autour des grandes familles de

GTs qui sont présentes chez les mammifères, les bactéries, les champignons et les plantes. Plus de 7000 séquences ont été caractérisées à ce jour et sont classées en plus de 65 familles distinctes. Les séquences sont indexées dans la base de données CAZY (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>) (Coutinho *et al.*, 2003). De manière intéressante, 15 GTs, dont certaines membranaires, ont été cristallisées et leur structure en trois dimensions a été résolue. Étonnamment, bien que l'homologie de séquence soit très faible parmi ces GTs, elles s'organisent dans l'espace selon 2 types de structure seulement, ce qui a conduit à classer les GT selon deux superfamilles, GT-A et GT-B. Leurs caractéristiques structurales sont décrites dans la figure 48. Le motif de base pour les deux structures est la présence de deux sous-unités $\alpha/\beta/\alpha$ ou Rossmann folds, qui sont souvent présents dans les protéines interagissant avec des nucléotides. Dans les protéines GT-A, ces deux domaines interagissent avec les substrats donneurs (N-terminal) et les substrats accepteurs (C-terminal) et sont étroitement associés. Dans les protéines GT-B, ces deux domaines sont indépendants et correspondent au site de fixation du substrat accepteur (domaine N-terminal) et à celui du substrat donneur (domaine C-terminal). Une autre différence concerne l'activation des GTs par les ions métalliques. Les ions métalliques (Mg^{2+} , Mn^{2+}) sont strictement nécessaires pour les GT-A, alors qu'ils sont utiles mais pas indispensables, pour le fonctionnement des GT-B. Enfin, dans les deux structures de GTs, un résidu aspartique, glutamique ou histidine a été identifié comme la base catalytique.

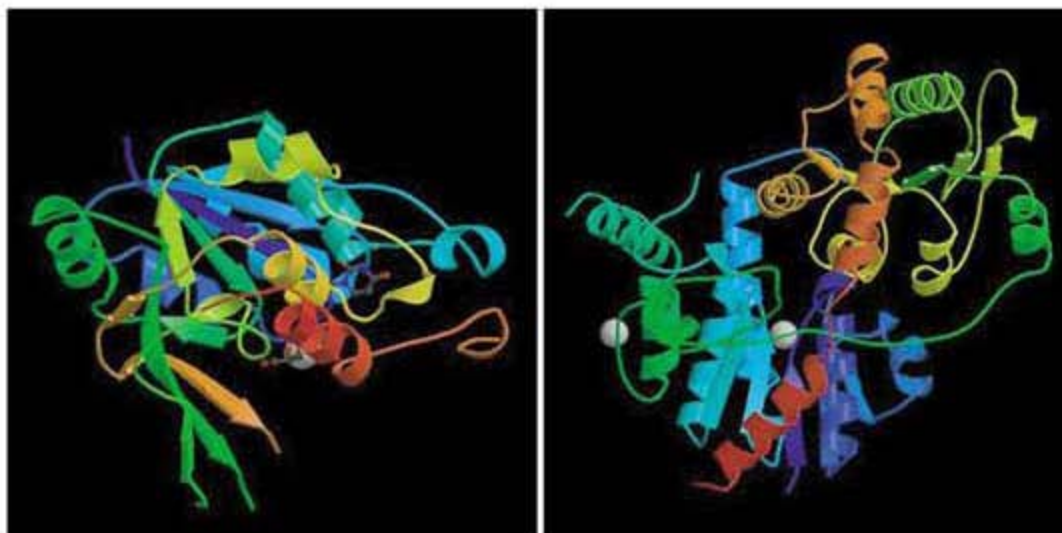
Une comparaison des propriétés fonctionnelles et de structure GT-A et GTB avec les UGTs révèle que les UGTs s'apparentent plus avec les GT-B qu'avec les GT-A :

(1)- Les UGTs sont connues pour présenter deux domaines N- et C-terminaux de tailles similaires et indépendants, interagissant avec le substrat accepteur (domaine N-terminal) et le substrat donneur (domaine C-terminal), respectivement.

(2)- L'activité UGT est certes optimale en présence de Mg^{2+} , mais l'enzyme fonctionne en son absence.

(3)- Les UGTs ont une organisation membranaire qui semble être similaire, dans certains aspects, à celle de la MurG bactérienne impliquée dans la synthèse de peptidoglycanes. Cette

GT associée à la membrane plasmique catalyse le transfert de N-acétylglucosamine, à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine, sur le substrat accepteur lipophile qui a traversé la membrane vers le site actif de MurG du côté cytoplasmique (Hu *et al.*, 2003).



GT-A

GT-B

	GT-A	GT-B
La famille GT typique	<ul style="list-style-type: none"> ●SpsA (<i>Bacillus substilis</i>) production de paroi des spores matures ●GlcAT-I (homme), synthèse des glycosaminoglycanes 	<ul style="list-style-type: none"> ●GtfB (bactérie), synthèse des antibiotiques ●MurG (bactérie), synthèse des peptidoglycanes
Repliement	2 domaines de type Rossmann $\alpha/\beta/\alpha$ étroitement associés (domaines N- et C-terminaux fixent le substrat donneur et le substrat accepteur respectivement)	2 domaines de type Rossmann $\alpha/\beta/\alpha$ moins étroitement associés (domaines N- et C terminaux indépendants fixent le substrat accepteur et le substrat donneur respectivement)
Activation métallique	Strict avec un motif DXD (Mn^{2+} , Mg^{2+})	Moins strict (Mn^{2+} , Mg^{2+})
Base catalytique	Asp ou Glu	Asp ou Glu
Code de PDB	SpsA, 1QG8	GtfB, 1IIR

Figure 48 : Comparaison structurale et fonctionnelle des glycosyltransférases cristallisées de type GT-A et GT-B.

L'alignement de séquences de MurG de *E. coli* et des homologues de sept autres souches bactériennes avec des isoformes d'UGTs a conduit à l'identification d'une région consensus « His/Arg-X7-Glu » (Ha *et al.*, 2000). De manière intéressante, le résidu histidine de cette séquence dans MurG, qui jouerait un rôle important dans la stabilisation de l'UDP au cours de la catalyse, correspond à l'His370 de l'UGT1A6. En fait cette histidine est bien impliquée dans la réaction enzymatique (Ouzzine *et al.*, 2000). De même, par analogie avec la fonction de l'acide glutamique dans MurG, Glu378 de l'UGT1A6 serait impliquée dans la reconnaissance du ribose de l'UDP-GlcA.

Les UGTs humaines appartiennent à la famille GT1 (Campbell *et al.*, 1997 ; Coutinho *et al.*, 2003) et adopteraient un repliement GT-B (Breton *et al.*, 2006). Les structures 3D de plusieurs membres de la famille GT1 ont été résolues ces dernières années, y compris la famille d'enzymes Gtf bactérienne qui est impliquée dans la synthèse de la vancomycine (Mulichak *et al.*, 2001 ; 2003 ; 2004) et deux flavonoïdes GTs de plantes (Shao *et al.*, 2005 ; Offen *et al.*, 2006) qui sont importantes pour la glycosylation de métabolites secondaires. Récemment, le domaine C-terminal de l'UGT2B7 a été cristallisé et sa structure 3-D résolue (Miley *et al.*, 2007). Ce domaine présente une structure globulaire avec un repliement de type Rossman (Fig. 49). Au cœur du polypeptide se situe un unique feuillet β parallèle composé de six brins et de sept hélices α . La superposition du domaine C-terminal de GtfA et de VvGT1 avec celui de l'UGT2B7 révèle un niveau élevé d'homologie structurale en dépit de leur faible identité de séquence (~ 19%). La comparaison du domaine C-terminal de l'UGT2B7 avec d'autres structures d'enzymes de la famille GT1 des bactéries et des plantes (GtfA et VvGT1) en complexe avec le substrat donneur suggère que l'UGT2B7 humaine lie l'UDP-GlcA dans un site analogue. Le site de fixation de l'UDP-GlcA de l'UGT2B7 est remarquablement semblable au site de liaison de l'UDP-glucose du VvGT1, avec seulement quelques différences en acides aminés. Les analyses par mutagenèse dirigée confirment l'implication des résidus Trp356, Gln359, His374, Asn378, Glu382, Asp398, Gln399 dans l'interaction avec le substrat donneur (UDP-GlcA).

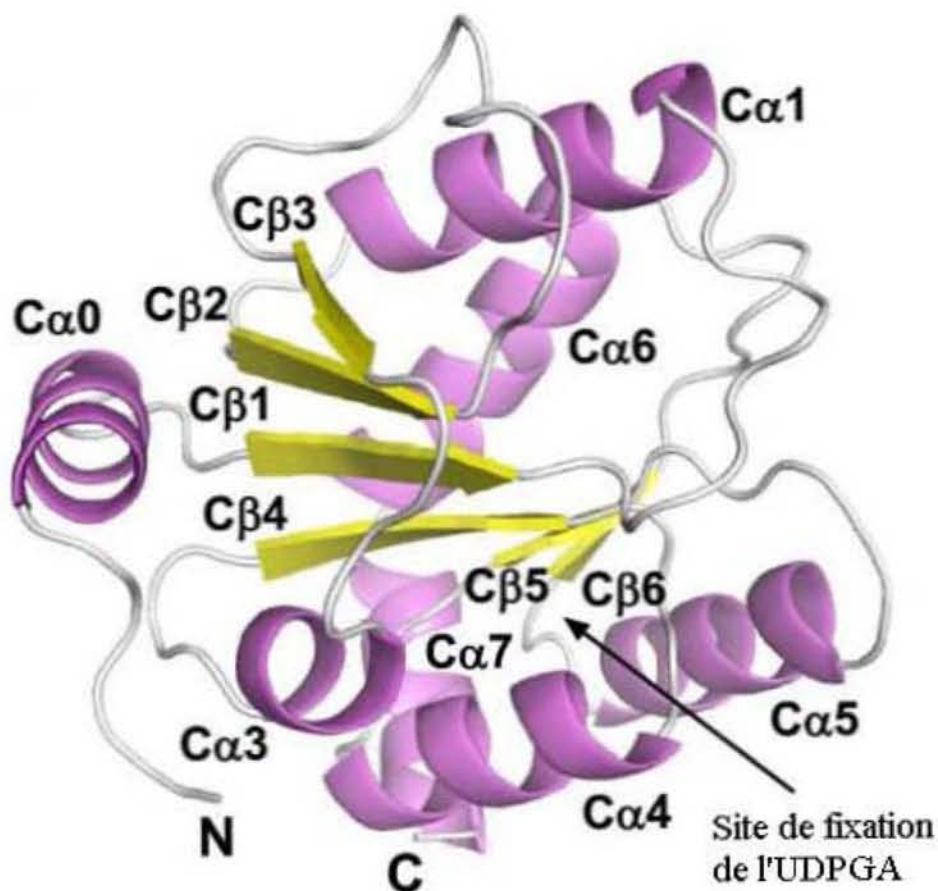


Figure 49 : Structure du domaine C-terminal de l'UGT2B7 (D'après Miley *et al.*, 2007).

VI.3. Mécanisme réactionnel catalysé par l'UGT1A6 recombinante humaine

L'identification des acides aminés essentiels pour la catalyse ou contribuant à l'activité enzymatique est un point important dans la compréhension de la structure et de la fonction des protéines. Dans ce travail de thèse, nous avons principalement utilisé l'UGT1A6 humaine comme protéine modèle afin de mieux comprendre les bases moléculaires de la glucuronoconjugaison des substances phénoliques. Le mécanisme réactionnel de l'UGT1A6 fait intervenir deux acides aminés de nature différente. Un résidu histidine a été identifié

comme résidu catalytique après inactivation de l'UGT1A6 par le DEPC (Battaglia *et al.*, 1994a). De plus, le traitement de l'UGT1A6 avec trois agents chimiques spécifiques des acides aminés carboxyliques résulte en une inactivation de l'activité enzymatique suggérant l'implication de résidus Glu/Asp (Battaglia *et al.*, 1994b). De façon complémentaire, l'expérience de titration de l'UGT1A6 a montré que les 2 résidus essentiels pour la catalyse se trouvent sous forme non protonnée au pH optimum (7,4) de la réaction.

VI.3.1. Analyse du rôle des résidus carboxyliques conservés

Dans ce travail, nous avons tenté d'identifier l'acide aminé carboxylique de l'UGT1A6 qui jouerait le rôle de base catalytique dans la glucuroconjugaison des phénols. En l'absence de données cristallographiques, ce travail a nécessité une approche méthodologique basée sur la comparaison de séquences afin de déceler les résidus conservés, partant du principe que de tels acides aminés jouent des rôles importants dans la structure et la fonction de la protéine. La contribution de ces acides aminés a été déterminée par mutation systématique de chacun de ces résidus et par une analyse cinétique des mutants générés. L'étude a été complétée par la mesure de la sensibilité des mutants au DCCI qui rend compte de la présence ou non d'un acide aminé carboxylique réagissant avec ce produit chimique.

L'identification d'un résidu acide aspartique ou glutamique crucial jouant potentiellement un rôle important dans l'activité catalytique, représente une 1^{ère} étape dans la compréhension des processus de glucuroconjugaison. Cette recherche de résidus conservés carboxylique a révélé la présence de 15 acides aspartiques/glutamiques sur l'ensemble des séquences. Ces positions sont hautement conservées entre les espèces de mammifères, y compris rat et souris. Pour identifier le résidu catalytique, une série de mutations a été effectuée, et les paramètres d'activité et de cinétique des mutants ont été étudiés après expression dans *P. pastoris*. Les résultats ont montré que sauf l'Asp150 et l'Asp488, la substitution des résidus carboxyliques par l'alanine produit des mutants actifs mais avec cependant une activité enzymatique plus faible et avec moins d'affinité pour les substrats accepteur et donneur, 4-MO et UDP-GlcA.

Cette observation suggère que ces résidus carboxyliques jouent un rôle plus ou moins important dans l'interaction avec le substrat accepteur ou donneur.

De manière intéressante, le remplacement de l'Asp394 ou l'Asp397 par l'alanine induit une augmentation de 24 et 21 fois du K_m apparent vis-à-vis de l'UDP-GlcA, sans changement marqué pour celui du 4-MO, ce qui suggère que ces mutations affectent spécifiquement l'interaction avec le substrat donneur. D'ailleurs, l'Asp394 et l'Asp397 sont situés dans un motif consensus trouvé dans les 110 membres de la superfamille des UGTs (Mackenzie *et al.*, 1997). Cette séquence signature correspond à une série d'acides aspartiques qui sont connus pour participer à la fixation du substrat donneur commun, UDP-GlcA. Nos résultats sont cohérents avec l'importance de l'Asp394 et de l'Asp397 dans l'interaction de l'UGT1A6 avec l'UDP-GlcA. Cela est aussi supporté par l'analyse structurale du domaine C-terminal de l'UGT2B7, qui prédit que l'Asp398 (Asp394 dans l'UGT1A6) interagit avec la partie GlcA du co-substrat (Miley *et al.*, 2007). Récemment, basé sur l'alignement de séquence de l'UGT1A10 avec le domaine C-terminal cristallisé de l'UGT2B7, une autre équipe a identifié le Glu393 (Asp394 en UGT1A6) comme critique pour la fixation de l'UDP-GlcA. Le résidu proximal Gln394 (Gln395 en UGT1A6) joue un faible rôle dans la spécificité de substrat donneur (Xiong *et al.*, 2008).

D'autre part, la substitution de l'Asp447 par l'alanine diminue fortement l'activité de l'enzyme. Toutefois, nos résultats ont montré que le remplacement par l'acide glutamique, un acide aminé avec une polarité similaire mais avec une chaîne latérale plus longue, restaure l'activité de l'enzyme, mais augmente fortement le K_m vis-à-vis du substrat donneur, ce qui suggère que ce résidu est susceptible de jouer un rôle important dans la fixation et la reconnaissance du substrat donneur. En outre, l'étude du rôle de l'Asp446 de l'UGT1A6 de rat (Asp447 dans l'UGT1A6 humaine) montre que cet acide aminé est indispensable pour une conformation correcte de cette enzyme mais ne serait pas impliqué dans la catalyse (Iwano *et al.*, 1997 ; 1999).

Dans le cas de Glu461, bien que le remplacement par l'alanine diminue de manière importante l'activité de l'UGT1A6, nos résultats indiquent que l'introduction d'une glutamine

(mutant E461Q) soutient une activité enzymatique, suggérant que le groupement carboxylique n'est pas obligatoire à cette position pour la catalyse.

En revanche, la mutation de l'Asp150 ou Asp488 par l'alanine supprime complètement l'activité enzymatique, ce qui indique que ces résidus sont indispensables à la fonction enzymatique. L'importance de ces résidus est supportée par le fait que leur remplacement par d'autres résidus carboxyliques ne réussit pas à rétablir une activité significative. Le résidu Asp488 appartient à un ensemble de 10 acides aminés chargés négativement près du segment trans-membranaire C-terminal indispensable à l'activité. Donc ce résidu a un rôle plutôt dans le positionnement et l'orientation de ce segment (von Heijne, 1994; Harley et Tipper, 1996). En conséquence, la mutation de l'Asp488 par l'acide glutamique (D488E) conduit à un mutant avec une activité enzymatique faible mais détectable. Ceci contraste avec le remplacement de ce résidu par un acide aminé non-chargé, l'alanine (D488A). Toutefois, le remplacement de l'Asp488 par l'acide glutamique augmente fortement le K_m vis-à-vis de l'UDP-GlcA, suggérant son implication dans les interactions entre l'enzyme et le substrat donneur. Ce résidu appartient à un domaine qui serait crucial pour l'activité de l'UGT2B13, ce qui suggère que cette partie de la protéine doit être structurellement rigide pour maintenir les UGTs dans une conformation active (Li *et al.*, 1997).

Par analogie avec les glycosyltransférases GT-B, dont la structure 3D a été résolue, il est possible de suggérer un rôle pour le résidu carboxylique conservé Glu378 de l'UGT1A6. Le résidu Glu378 appartient à un motif signature HX_7E ($^{370}HX_7E^{378}$ dans l'UGT1A6) de GT-B où cet acide glutamique s'est révélé important pour l'interaction avec le ribose de l'UDP-GlcA (Ha *et al.*, 2001). En accord avec nos résultats, le remplacement de ce résidu par l'alanine réduit fortement la V_{max} de la réaction et augmente fortement le K_m apparent (supérieur à 10 mM) de l'enzyme vis-à-vis du substrat donneur. Cette conclusion est aussi vérifiée par une autre équipe qui a montré que le résidu Glu378 est impliqué directement dans la fixation de l'UDP-GlcA (Patana *et al.*, 2007).

De même, il convient de noter que le résidu Asp-150 est conservé parmi les UGTs et les GT-B. La mutation de ce résidu conduit à l'inactivation de l'enzyme, sauf dans les cas où

l'acide aspartique est substitué par l'acide glutamique. Toutefois, la mutation affecte fortement la V_{\max} , sans changement marqué dans la valeur de K_m , ce qui suggère que l'Asp150 est important pour la catalyse mais pas pour la reconnaissance du substrat. En outre, l'alignement de la séquence de l'UGT1A6 avec la T4-BGT (Fig. 27) indique que l'Asp150 de l'UGT1A6 correspond à l'Asp100 proposé comme base catalytique de l'enzyme T4-BGT (Lariviere *et al.*, 2003). De plus, les mutations de l'Asp148, l'Asp152, et l'Asp151 dans d'autres isoformes d'UGTs (UGT1A9, UGT1A4 et UGT1A1), abolissent l'activité de l'enzyme, ce qui suggère que l'acide aspartique en position 150 dans l'UGT1A6 et les acides aspartiques correspondants dans d'autres UGTs sont susceptibles d'être des résidus catalytiques. L'analyse de la structure secondaire de la région contenant le résidu Asp150 dans les différentes isoformes d'UGTs indique que ce résidu aspartique est situé dans une boucle entre les deux hélices α , une position favorisant le rôle de base catalytique (Fig. 50).

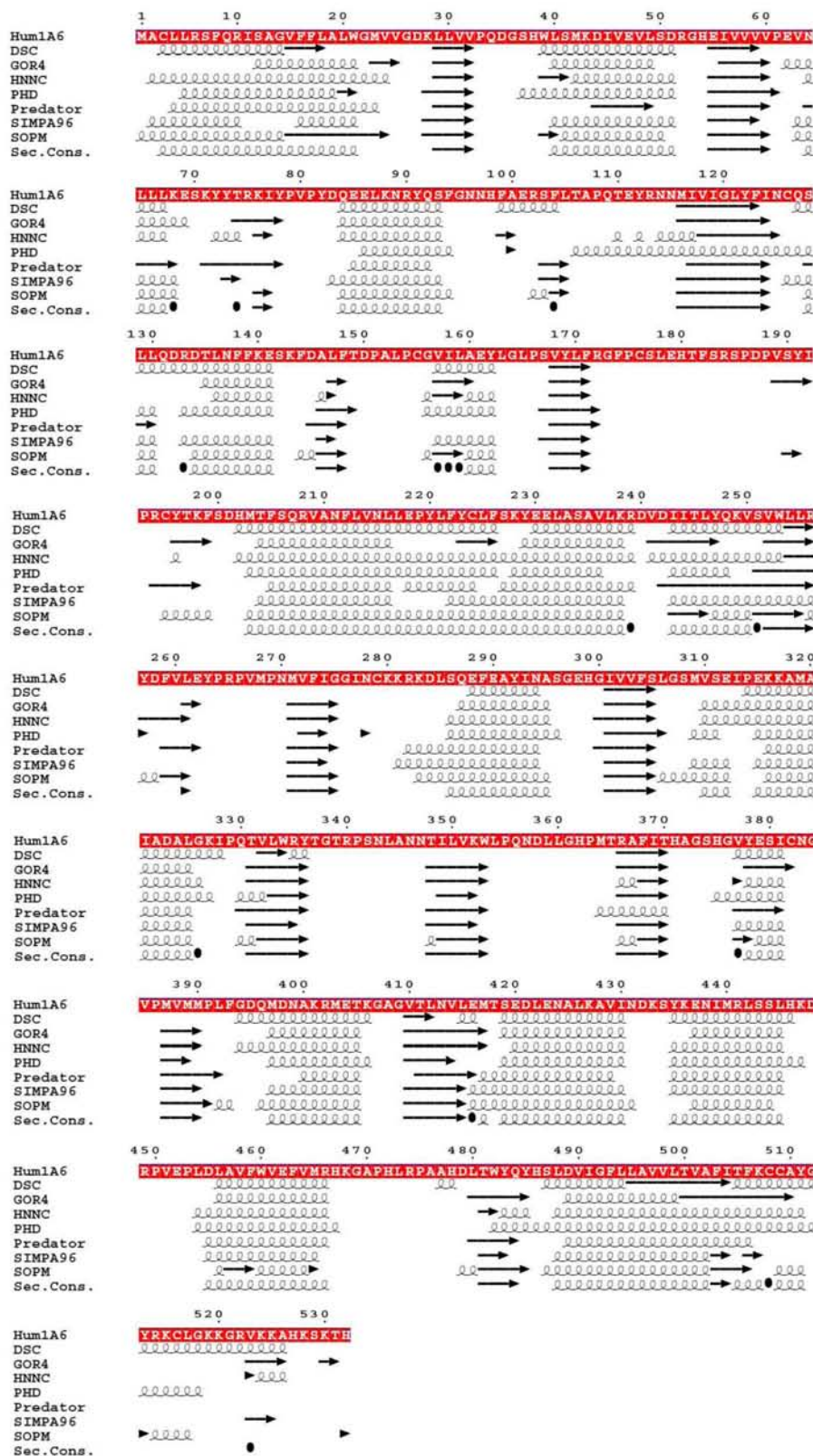


Figure 50 : Prédiction de la structure 2D de l'UGT1A6 humaine à partir de la séquence primaire en utilisant plusieurs méthodes de calculs. Si l'acide aminé His38 se trouve au début d'une hélice α , le résidu Asp150 est positionné dans un domaine situé entre 2 hélices α .
 →, feuillet bêta.

VI.3.2. Analyse du rôle de résidu histidine conservés (His38 en UGT1A6)

Selon l'analyse de la structure 3D des trois membres des glycosyltransférases GT-B, MurG, VvGT1 et UGT71G1, les résidus histidine H19, H20 et H22 respectivement, joueraient un rôle de base catalytique qui déprotonnerait le groupement hydroxyle du substrat accepteur (Offen *et al.*, 2006 ; Shao *et al.*, 2005). L'alignement de séquences de MurG, VvGT1, UGT71G1 et UGT1A6 indique que les résidus His19, His20 et His22 de la MurG, VvGT1, et UGT71G1, respectivement, correspondent au résidu His38 de l'UGT1A6 (Fig. 27). La mutation de His38 par la proline (H38P) abolit complètement l'activité de l'enzyme UGT1A6. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque His38 a été remplacée par l'alanine. Toutefois, la substitution par l'arginine et la lysine restaure dans une certaine mesure l'activité enzymatique et la spécificité de substrat, sauf pour la scopoletine qui n'est pas glucuronoconjuguée par le mutant. Ces résultats suggèrent que l'arginine ou la lysine peuvent établir des interactions avec des substrats phénoliques par le groupement amine, conduisant à la glucuronoconjugaison dans une certaine mesure de ces composés. De manière intéressante, l'alignement des séquences des différents membres des UGTs révèle que le résidu His38 de l'UGT1A6 est très conservé dans la famille UGT1A, sauf dans l'UGT1A4, où il est remplacé par une proline (Pro40) (Fig. 28). Comme ce résidu n'est pas conservé parmi les UGTs, il ne doit pas jouer le rôle d'une base catalytique. L'enzyme UGT1A4 catalyse la formation de *N*-glucuronide, et les seuls substrats acceptés sont des amines primaires, secondaires et tertiaires, dont des médicaments antipsychotiques importants (Green *et al.*, 1998). Toutefois, l'UGT1A3, qui est très homologue à l'UGT1A4 (93 % d'homologie), catalyse la glucuronoconjugaison d'une plus large série chimique de substrats (phénols, acides carboxyliques). La présence de la proline en position 40 (Pro-40) dans l'isoforme UGT1A4 est susceptible de jouer un rôle crucial dans la spécificité de substrat. En effet, la mutation de ce résidu en histidine (P40H) a élargi la spécificité de substrat de l'enzyme aux substances phénoliques et carboxyliques, entraînant une spécificité similaire à celle de l'UGT1A3. D'autre part, la mutation P40H conduit à une perte de la glucuronoconjugaison des amines

secondaires et tertiaires mais pas des amines primaires, ce qui suggère que le résidu histidine peut induire une barrière stérique qui pourrait modifier la capacité de fixation des substrats aminés volumineux. En revanche, ces changements favorisent la fixation de petites molécules telles que le α -naphthol et la 4-MO probablement par établissement d'interactions entre ces substrats et le résidu histidine. De manière intéressante, la mutation du résidu Pro40 en alanine (P40A) n'induit aucune modification de la spécificité de substrat de l'enzyme, ce qui suggère que le remplacement par l'alanine ne modifie pas l'organisation du site actif. Ces résultats indiquent que le résidu proline en position 40 est essentiel pour la conjugaison des amines tertiaire et pour la formation de glucuronides d'amines quaternaires par l'enzyme UGT1A4 humaine.

Inversement, lorsque le résidu His40 de l'UGT1A3 est remplacé par la proline (tel qu'on la trouve dans l'UGT1A4), la spécificité de substrat est déplacée vers celle de l'UGT1A4, entraînant la perte de glucuroconjugaison des phénols et acides carboxyliques, mais pas des amines. Le remplacement par l'alanine (H40A) ne restaure pas la glucuroconjugaison des composés phénoliques et des acides carboxyliques. Ces résultats mettent en évidence le rôle du résidu histidine en position 40 dans l'élargissement du profil de conjugaison de l'UGT1A4 vers les composés phénoliques et les acides carboxyliques, probablement par l'augmentation de leur réactivité *via* l'interaction avec le groupement imidazole. L'importance de ce résidu histidine à cette position dans la glucuroconjugaison des composés phénoliques a été confirmée par l'analyse des effets de sa mutation dans l'isoforme UGT1A1. En effet, le remplacement de His39 de l'UGT1A1 par le résidu proline ou alanine conduit à une enzyme qui ne conjugue plus les phénols, mais uniquement les estrogènes.

Le résidu en position 40 des UGT1A3 et UGT1A4 et le résidu correspondant dans l'UGT1A1 jouent un rôle crucial dans la conjugaison des composés phénoliques et des substrats carboxyliques. Ainsi, il est important de prendre en compte le rôle de ce résidu clé dans la poursuite du développement de modèles prédictifs de la spécificité de substrat des UGT1A4, 1A3 et 1A1. De même, Funhoff *et al.* (2005) ont montré qu'un résidu histidine joue un rôle important dans le positionnement du substrat de la phosphatase acide pourpre, et

Watts *et al.* (2006) ont identifié un seul résidu histidine de site actif régissant la spécificité de substrat de la famille de la lyase aromatique.

En l'absence de données sur la structure 3D de l'UGT entière, la structure de la glucosyltransférase des plantes flavonoïdes VvGT1 a été utilisée pour générer un modèle d'homologie pour l'UGT2B7 (Miley *et al.*, 2007). Ce modèle révèle que His35 et Asp151 de l'UGT2B7 sont analogues aux résidus catalytiques prédits His20 et Asp119 de l'enzyme VvGT1. Ainsi, les auteurs ont suggéré que His35 jouerait un rôle de base catalytique qui déprotonerait le substrat, et l'histidine protonée résultante serait stabilisée par l'Asp151 (Miley *et al.*, 2007). Toutefois, le résidu histidine à cette position n'est pas strictement conservé entre toutes les UGTs. En effet, deux isoformes d'UGT, UGT1A4 et UGT2B10, ont une proline et une leucine, respectivement, au lieu d'une histidine à cette position. Par conséquent, pour ces enzymes, le résidu qui pourra jouer la base catalytique pour déprotoner le substrat n'est pas clairement identifié. En outre, la mutation du résidu His35 de l'UGT2B7 conduit à un mutant avec une activité résiduelle pour l'androstérone (Miley *et al.*, 2007). De même, nous avons montré ici que la mutation de ce résidu histidine dans différentes isoformes d'UGTs n'inactive pas complètement les enzymes, sauf vis-à-vis des composés phénoliques et des substrats carboxyliques.

L'ensemble de ces résultats a permis de proposer un mécanisme hypothétique de la réaction de glucuroconjugaison catalysée par l'UGT1A6 humaine (Fig. 51). Pour les substrats phénoliques, la diade catalytique Histidine-Acide aspartique augmenterait le caractère basique de ce résidu, ce qui permettrait l'arrachage du proton du phénol et l'attaque nucléophile du phénolate sur le C-1 de l'acide glucuronique. Le même processus interviendrait pour les acides carboxyliques. Pour la glucuroconjugaison des amines aromatiques secondaires ou tertiaires (aminophényle, naphtylamine, diphenylamine, lamotrigine), catalysée par l'UGT1A4, leur caractère nucléophile particulièrement marqué, par rapport à celui d'un phénolate, ne nécessiterait pas l'existence d'un relais de charge entre l'histidine (remplacée par la proline dans l'UGT1A4) et l'acide aspartique pour effectuer la

réaction. La base catalytique (acide aspartique) seule suffirait pour la catalyse. De plus la présence d'une proline connue pour rompre la structure secondaire des protéines pourrait engendrer un remaniement local de la structure propice à la glucuroconjugaison des amines.

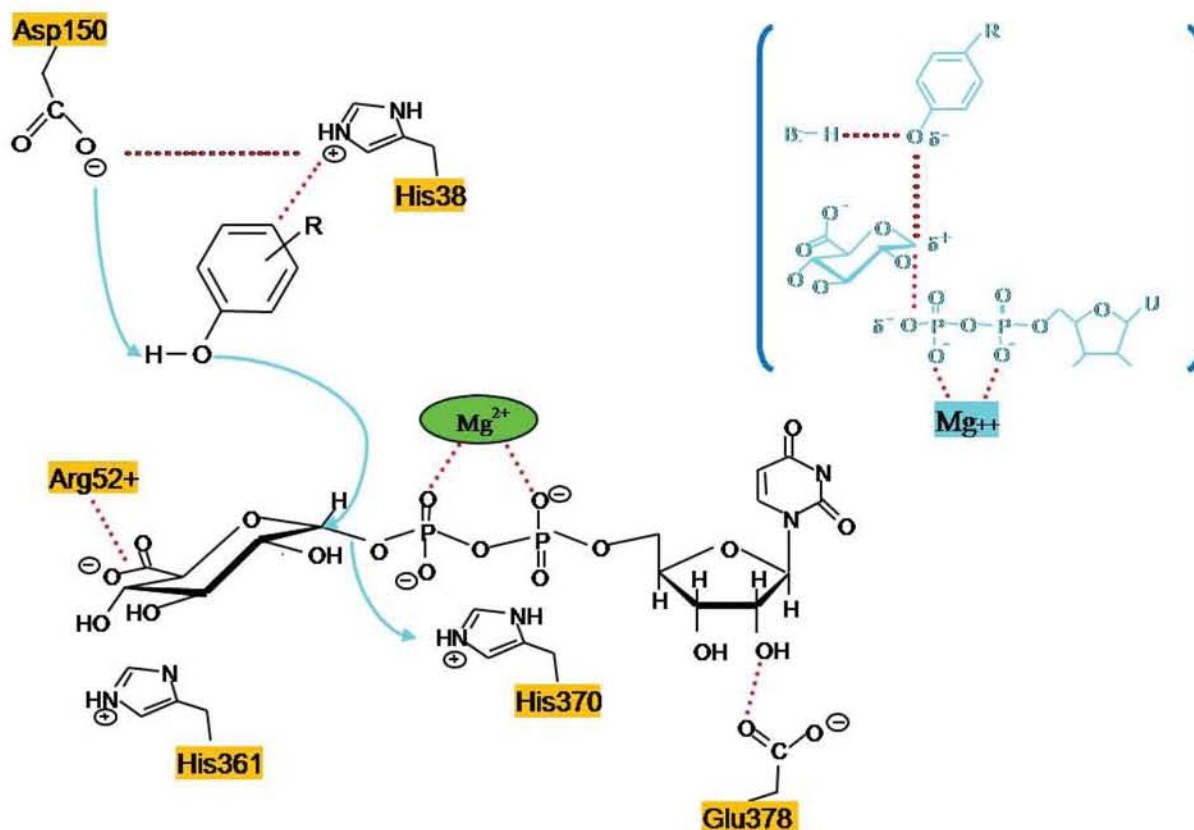


Figure 51 : Mécanisme réactionnel hypothétique de la glucuroconjugaison des phénols par l'UGT1A6. Rôle des acides aminés du site actif. En encart est représenté l'état de transition postulé.

VI.3.3. Autres résidus ou domaines importants pour l'activité des UGTs.

D'autres acides aminés sont connus pour jouer un rôle important dans la fonction de l'UGT1A6. L'utilisation de réactifs des groupements sulfhydryles des résidus cystéines, plus particulièrement des dérivés maléimides, conduit à l'inactivation de l'UGT1A6 (Senay *et al.*, 2002). De la même façon que précédemment, des alignements de séquences ont permis

d'isoler un résidu cystéine particulièrement conservé (Cys126) impliqué dans l'intégrité structurale de la protéine. Ce résidu ne joue pas un rôle catalytique et ne participe pas à la création d'un pont disulfure, ni dans la catalyse enzymatique de la protéine.

Enfin, par marquage de photoaffinité couplé à l'analyse LC-MS/MS, un motif F⁹⁰-M⁹¹-V⁹²-F⁹³ de l'UGT1A10 a été identifié comme étant important pour la fixation du substrat accepteur. Après la mutagenèse dirigée, deux phénylalanines 90 et 93 ont été trouvés être des acides aminés cruciaux pour le site de fixation des substrats phénoliques (4-nitrophénol et 4-MO) et l'estrogène (Xiong *et al.*, 2006 ; Starlard-Davenport *et al.*, 2007).

VI.4. UGTs et chondrocytes

Il existe des différences quant au niveau d'expression des UGTs dans le foie, l'intestin, et les autres organes. En outre, les UGTs sont distribués de manière tissu-spécifique dans tout le corps. Ainsi les UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 et tous les isoformes d'UGT2B sont exprimées dans le foie (Strassburg *et al.*, 2000 ; Turgeon *et al.*, 2001). Les UGT1A1, UGT1A6, UGT1A8, UGT1A10 et UGT2B7 sont exprimées dans l'intestin (Strassburg *et al.*, 2000 ; Tukey and strassburg, 2001 ; Czernik *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous avons montré que 10 isoformes d'UGTs (UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A10, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B17 et UGT2B28) sont exprimées dans les chondrocytes.

L'analyse de l'effet du Bap et du TCDD sur l'expression des UGTs chondrocytaires montre que ces deux molécules sont capables d'induire un nombre important d'UGTs. Parmi celles-ci, les UGTs 1A3, 1A10 et 2B7 sont capables de conjuguer les estrogènes qui sont des hormones exerçant un effet protecteur sur le cartilage.

Cependant, avec les méthodes analytiques et les anticorps dont nous disposons, nous n'avons pas pu mettre en évidence une activité enzymatique ou l'expression de la protéine. Ceci indique que le niveau d'activité est très faible. Ce résultat doit être relié à l'état de quiescence qui caractérise les chondrocytes matures.

Chapitre VII.

Conclusions et Perspectives

La plus grande partie de notre travail de thèse vise à mieux comprendre le mécanisme de glucuroconjugaison des xénobiotiques par l'UGT1A6 humaine en déterminant les acides aminés importants pour la catalyse et la reconnaissance des substrats. Pour ce faire, nous avons développé dans un premier temps une méthode de production efficace de l'enzyme recombinante sous forme active dans la levure *P. pastoris*.

Une approche pluridisciplinaire faisant appel essentiellement à des techniques de mutagenèse dirigée, de bioinformatique, de cinétique enzymatique et de modélisation moléculaire nous a conduits à proposer pour la première fois le résidu Asp150 comme base catalytique. De-même nos résultats ont permis de démontrer sans ambiguïté le rôle pivot de His38 dans l'interaction de l'enzyme avec les substrats. En l'absence de structure tridimensionnelle, nous avons échafaudé des hypothèses de mécanismes rendant compte des résultats obtenus, en tirant profit des structures établies de glycosyltransférases. Ces pistes demandent cependant à être explorées plus avant afin d'établir avec précision les événements moléculaires responsables de la glucuroconjugaison des xénobiotiques. Ces informations sont importantes pour pouvoir prédire le métabolisme et la toxicité de ces substances chez l'homme.

Dans une seconde partie de notre travail, nous avons commencé à explorer l'équipement enzymatique en UGTs des chondrocytes humains, en nous focalisant sur les isoformes responsables de la glucuroconjugaison de substances cibles du cartilage, telles les estrogènes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens carboxyliques. L'analyse par RT-PCR a démontré la présence de transcrits spécifiques de nombreuses isoformes, à un niveau cependant très inférieur à celui obtenu dans le foie. Cependant, ni la présence de l'enzyme par immunoblot ou son activité n'ont pu être mesurées. Il est donc indispensable d'arriver à mesurer ces paramètres avant d'apprécier la contribution des UGTs dans le métabolisme chondrocytaire.

Références bibliographiques :

- Albert C, Vallee M, Beaudry G, Belanger A and Hum D W
The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes.
Endocrinology, 1999. 140(7): p.3292-302.
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke T D, Greenwald R, Hochberg M and et al.
Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.
Arthritis Rheum, 1986. 29(8): p.1039-49.
- Antonio L, Xu J, Little J M, Burchell B, Magdalou J and Radominska-Pandya A
Glucuronidation of catechols by human hepatic, gastric, and intestinal microsomal UDP-glucuronosyltransferases (UGT) and recombinant UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7
Arch Biochem Biophys, 2003. 411(2): p.251-61.
- Araki Y, Fujiyama Y, Andoh A, Nakamura F, Shimada M, Takaya H and Bamba T
Hydrophilic and hydrophobic bile acids exhibit different cytotoxicities through cytolysis, interleukin-8 synthesis and apoptosis in the intestinal epithelial cell lines. IEC-6 and Caco-2 cells.
Scand J Gastroenterol, 2001. 36(5): p.533-9.
- Banhegyi G, Braun L, Marcolongo P, Csala M, Fulceri R, Mandl J and Benedetti A
Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles.
Biochem J, 1996. 315 (Pt 1): p.171-6.
- Bansal S K and Gessner T
A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-14C]glucuronic acid.
Anal Biochem, 1980. 109(2): p.321-9.
- Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green M D, Tephly T R, Hum D W and Belanger A
3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7).
Drug Metab Dispos, 2000a. 28(5): p.497-502.

Barbier O, Girard C, Breton R, Belanger A and Hum D W
N-glycosylation and residue 96 are involved in the functional properties of
UDP-glucuronosyltransferase enzymes.
Biochemistry, 2000b. 39(38): p.11540-52.

Barré L, Magdalou J, Netter P, Fournel-Gigleux S and Ouzzine M
The stop transfer sequence of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A determines
localization to the endoplasmic reticulum by both static retention and retrieval mechanisms.
Febs J, 2005. 272(4): p.1063-71.

Barré L, Venkatesan N, Magdalou J, Netter P, Fournel-Gigleux S and Ouzzine M
Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human
beta1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan
synthesis.
Faseb J, 2006. 20(10): p.1692-4.

Barré L, Fournel-Gigleux S, Finel M, Netter P, Magdalou J and Ouzzine M
Substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B4 and UGT2B7.
Identification of a critical aromatic amino acid residue at position 33.
Febs J, 2007. 274(5): p.1256-64.

Basu N K, Kubota S, Meselhy M R, Ciotti M, Chowdhury B, Hartori M and Owens I S
Gastrointestinally distributed UDP-glucuronosyltransferase 1A10, which metabolizes
estrogens and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, depends upon phosphorylation.
J Biol Chem, 2004. 279(27): p.28320-9.

Battaglia E, Pritchard M, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Radomska A, Siest G and
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, 1994a. 309(2): p.266-72.

Battaglia E, Senay C, Fournel-Gigleux S, Herber R, Siest G and Magdalou J
The chemical modification of human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 reveals the
involvement of a carboxyl group in catalysis.
FEBS Lett, 1994b. 346(2-3): p.146-50.

Battaglia E, Radomska-Pandya A
A functional role for histidyl residues of the UDP-glucuronic acid carrier in rat liver
endoplasmic reticulum membranes.
Biochemistry, 1998. 37(1):258-63.

Battaglia E, Terrier N, Mizeracka M, Senay C, Magdalou J, Fournel-Gigleux S and Radomska-Pandya A

Interaction of periodate-oxidized UDP-glucuronic acid with recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase 1A6.

Drug Metab Dispos, 1998. 26(8): p.812-7.

Beaulieu M, Levesque E, Hum D W and Belanger A

Isolation and characterization of a human orphan UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B11.

Biochem Biophys Res Commun, 1998. 248(1): p.44-50.

Belanger A, Hum D W, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, Belanger G, Turgeon D and Dubois S

Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues.

J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. 65(1-6): p.301-10.

Beutler E, Gelbart T and Demina A

Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism?

Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(14): p.8170-4.

Black M and Billing B H

Hepatic bilirubin udp-glucuronyl transferase activity in liver disease and gilbert's syndrome.

N Engl J Med, 1969. 280(23): p.1266-71.

Bock K W, Forster A, Gschaidmeier H, Bruck M, Munzel P, Schareck W, Fournel-Gigleux S and Burchell B

Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases.

Biochem Pharmacol, 1993. 45(9): p.1809-14.

Bradford M M

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal Biochem, 1976. 72: p.248-54

Brands A, Munzel P A and Bock K W

In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain.

Biochem Pharmacol, 2000. 59(11): p.1441-4.

Breton C, Snajdrova L, Jeanneau C, Koca J and Imberty A
Structures and mechanisms of glycosyltransferases.
Glycobiology, 2006. 16(2): p.29R-37R.

Brooks S C and Horn L
Hepatic sulfation of estrogen metabolites.
Biochim Biophys Acta, 1971. 231(1): p.233-41.

Brune K, Beck W S, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Peskar B M and Peskar B A
Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition.
Experientia, 1991. 47(3): p.257-61.

Burchell B and Coughtrie M W
UDP-glucuronosyltransferases.
Pharmacol Ther, 1989. 43(2): p.261-89

Burchell B, Brierley C H and Rance D
Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation.
Life Sci, 1995. 57(20): p.1819-31.

Campbell J A, Davies G J, Bulone V and Henrissat B
A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid
sequence similarities.
Biochem J, 1997. 326 (Pt 3): p.929-39.

Carlini L E, Meropol N J, Bever J, Andria M L, Hill T, Gold P, Rogatko A, Wang H and
Blanchard R L
UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer
patients treated with capecitabine/irinotecan.
Clin Cancer Res, 2005. 11(3): p.1226-36.

Carrier J S, Turgeon D, Journault K, Hum D W and Belanger A
Isolation and characterization of the human UGT2B7 gene.
Biochem Biophys Res Commun, 2000. 272(2): p.616-21.

Cecil R L and Archer B H
Arthritis of the menopause.
JAMA, 1925. 84: p.75-9.

Charnock S J and Davies G J

Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms

Biochemistry, 1999. 38(20): p.6380-5

Chen G and Radomska-Pandya A

Direct photoaffinity labeling of cellular retinoic acid-binding protein I (CRABP-I) with all-trans-retinoic acid: identification of amino acids in the ligand binding site.

Biochemistry, 2000. 39(41): p.12568-74.

Cheng Z, Rios G R, King C D, Coffman B L, Green M D, Mojarrabi B, Mackenzie P I and Tephly T R

Glucuronidation of catechol estrogens by expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A1, 1A3, and 2B7.

Toxicol Sci, 1998. 45(1): p.52-7.

Cheng Z, Radomska-Pandya A and Tephly T R

Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP- glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10.

Drug Metab Dispos, 1999. 27(10): p.1165-70.

Ciotti M, Marrone A, Potter C and Owens I S

Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP- glucuronosyltransferase: pharmacological implications.

Pharmacogenetics, 1997. 7(6): p.485-95.

Coffman B L, Rios G R, King C D and Tephly T R

Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation.

Drug Metab Dispos, 1997. 25(1): p.1-4.

Coffman B L, King C D, Rios G R and Tephly T R

The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268).

Drug Metab Dispos, 1998. 26(1): p.73-7.

Court M H, Duan S X, von Moltke L L, Greenblatt D J, Patten C J, Miners J O and Mackenzie P I

Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms.

J Pharmacol Exp Ther, 2001. 299(3): p.998-1006.

Coutinho P M, Deleury E, Davies G J and Henrissat B
An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases.
J Mol Biol, 2003. 328(2): p.307-17.

Crigler J F, Jr. and Najjar V A
Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus.
Pediatrics, 1952. 10(2): p.169-80.

Czernik P J, Little J M, Barone G W, Raufman J P and Radomska-Pandya A
Glucuronidation of estrogens and retinoic acid and expression of
UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in human intestinal mucosa.
Drug Metab Dispos, 2000. 28(10): p.1210-6.

Daly A K
Molecular basis of polymorphic drug metabolism.
J Mol Med, 1995. 73(11): p.539-53.

Das K K, Basu M, Basu S, Chou D K and Jungalwala F B
Biosynthesis in vitro of GlcA beta 1-3nLcOse4Cer by a novel glucuronyltransferase
(GlcAT-1) from embryonic chicken brain.
J Biol Chem, 1991. 266(8): p.5238-43.

Debinski H S, Lee C S, Dhillon A P, Mackenzie P, Rhode J and Desmond P V
UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome.
Pathology, 1996. 28(3): p.238-41.

Drake R R and Elbein A D
Photoaffinity labelling of glycosyltransferases.
Glycobiology, 1992. 2(4): p.279-84.

Drake R R, Igari Y, Lester R, Elbein A D and Radomska A
Application of 5-azido-UDP-glucose and 5-azido-UDP-glucuronic acid photoaffinity probes
for the determination of the active site orientation of microsomal UDP-glycosyltransferases
and UDP-glucuronosyltransferases
J Biol Chem, 1992. 267(16): p.11360-5.

Dutton G J
Variations in glucuronide formation by perinatal liver.
Biochem Pharmacol, 1966. 15(7): p.947-51.

Ebner T and Burchell B

Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family.

Drug Metab Dispos, 1993. 21(1): p.50-5.

Emery P

Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition.

Scand J Rheumatol Suppl, 1996. 102: p.23-8.

Fabien N, Desbos A, Bienvenu J and Magdalou J

Autoantibodies directed against the UDP-glucuronosyltransferases in human autoimmune hepatitis.

Autoimmun Rev, 2004. 3(1): p.1-9.

Felson D T and Nevitt M C

The effects of estrogen on osteoarthritis.

Curr Opin Rheumatol, 1998. 10(3): p.269-72.

Felson D T and Zhang Y

An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention.

Arthritis Rheum, 1998. 41(8): p.1343-55.

Fisher M B, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel K E, Hall S D and Wrighton S A

Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank.

Pharmacogenetics, 2000. 10(8): p.727-39.

Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B and Siest G

Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferase cDNAs in V79 cell cultures.

Mol Pharmacol, 1991. 39(2): p.177-83.

Fournel-Gigleux S, Netter P, Magdalou J and Ouzzine M

Advances in the structural aspects of the UDP-glucuronosyltransferases.

In «Endoplasmic Reticulum : A Metabolic Compartement» (A. Bedetti, G. Banhegyi and A. Burchell, Eds), IOS Press, Nato Science Series, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC., 2005: p.143-149.

Funhoff E G, Wang Y, Andersson G and Averill B A

Substrate positioning by His92 is important in catalysis by purple acid phosphatase.

Febs J, 2005. 272(12): p.2968-77.

Gall W E, Zawada G, Mojarrabi B, Tephly T R, Green M D, Coffman B L, Mackenzie P I and Radomska-Pandya A

Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7.

J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. 70(1-3): p.101-8.

Gardner-Stephen D, Heydel J M, Goyal A, Lu Y, Xie W, Lindblom T, Mackenzie P and Radomska-Pandya A

Human PXR variants and their differential effects on the regulation of human UDP-glucuronosyltransferase gene expression.

Drug Metab Dispos, 2004. 32(3): p.340-7.

Gestl S A, Green M D, Shearer D A, Frauenhoffer E, Tephly T R and Weisz J

Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyestrone and all-trans retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and in situ breast cancers.

Am J Pathol, 2002. 160(4): p.1467-79.

Girard H, Court M H, Bernard O, Fortier L C, Villeneuve L, Hao Q, Greenblatt D J, von Moltke L L, Perusse L and Guillemette C

Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver.

Pharmacogenetics, 2004. 14(8): p.501-15.

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 and Popescu N C

Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus.

Pharmacogenetics, 2001. 11(4): p.357-68.

Green M D, King C D, Mojarrabi B, Mackenzie P I and Tephly T R

Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3.

Drug Metab Dispos, 1998. 26(6): p.507-12.

Gschaidmeier H and Bock K W

Radiation inactivation analysis of microsomal UDP-glucuronosyltransferases catalysing mono- and diglucuronide formation of 3,6-dihydroxybenzo(a)pyrene and 3,6-dihydroxychrysene.

Biochem Pharmacol, 1994. 48(8): p.1545-9.

Guldberg H C and Marsden C A

Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role.

Pharmacol Rev, 1975. 27(2): p.135-206.

Ha S, Walker D, Shi Y and Walker S

The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis.

Protein Sci, 2000. 9(6): p.1045-52.

Ha S, Gross B and Walker S

E. Coli MurG: a paradigm for a superfamily of glycosyltransferases.

Curr Drug Targets Infect Disord, 2001. 1(2): p.201-13.

Harding D, Fournel-Gigleux S, Jackson M R and Burchell B

Cloning and substrate specificity of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(22): p.8381-5.

Harley C A and Tipper D J

The role of charged residues in determining transmembrane protein insertion orientation in yeast.

J Biol Chem, 1996. 271(40): p.24625-33.

Haumont M, Magdalou J, Lafaurie C, Ziegler J M, Siest G and Colin J N

Phenobarbital inducible UDP-glucuronosyltransferase is responsible for glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine: characterization of the enzyme in human and rat liver microsomes.

Arch Biochem Biophys, 1990. 281(2): p.264-70.

Heydel J, Leclerc S, Bernard P, Pelczar H, Gradinaru D, Magdalou J, Minn A, Artur Y and Goudonnet H

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

Brain Res Mol Brain Res, 2001. 90(1): p.83-92.

Hu Y, Chen L, Ha S, Gross B, Falcone B, Walker D, Mokhtarzadeh M and Walker S

Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): p.845-9.

Ikushiro S, Emi Y and Iyanagi T

Protein-protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic microsomes.

Biochemistry, 1997. 36(23):p.7154-61.

Innocenti F, Grimsley C, Das S, Ramirez J, Cheng C, Kuttab-Boulos H, Ratain M J and Di Rienzo A

Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups.

Pharmacogenetics, 2002. 12(9): p.725-33.

Ishii Y, Takeda S, Yamada H and Oguri K

Functional protein-protein interaction of drug metabolizing enzymes.

Front Biosci, 2005. 10: p.887-95.

Iwano H, Yokota H, Ohgiya S, Yotumoto N and Yuasa A

A critical amino acid residue, asp446, in UDP-glucuronosyltransferase.

Biochem J, 1997. 325 (Pt 3): p.587-91.

Iwano H, Yokota H, Ohgiya S and Yuasa A

The significance of amino acid residue Asp446 for enzymatic stability of rat UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6.

Arch Biochem Biophys, 1999. 363(1): p.116-20.

Iyer L, King C D, Whittington P F, Green M D, Roy S K, Tephly T R, Coffman B L and Ratain M J

Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes.

J Clin Invest, 1998. 101(4): p.847-54.

Jackson M R, Nilsson T and Peterson P A

Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum.

Embo J, 1990. 9(10): p.3153-62.

Jedlitschky G, Cassidy A J, Sales M, Pratt N and Burchell B

Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase.

Biochem J, 1999. 340 (Pt 3): p.837-43.

Jin C, Miners J O, Lillywhite K J and Mackenzie P I
Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of a human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs.
J Pharmacol Exp Ther, 1993. 264(1): p.475-9.

Kaivosaaari S, Toivonen P, Hesse L M, Koskinen M, Court M H and Finel M
Nicotine glucuronidation and the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B10.
Mol Pharmacol, 2007. 72(3): p.761-8.

King C D, Green M D, Rios G R, Coffman B L, Owens I S, Bishop W P and Tephly T R
The glucuronidation of exogenous and endogenous compounds by stably expressed rat and human UDP-glucuronosyltransferase 1.1.
Arch Biochem Biophys, 1996. 332(1): p.92-100.

King C D, Rios G R, Assouline J A and Tephly T R
Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate.
Arch Biochem Biophys, 1999. 365(1): p.156-62.

Kitchin K T
An enzymatic approach to biotransformation.
Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1984. 6(6): p.303-10.

Köhle C, Badary O A, Nill K, Bock-Hennig B S and Bock K W
Serotonin glucuronidation by Ah receptor- and oxidative stress-inducible human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 in Caco-2 cells.
Biochem Pharmacol, 2005. 69(9): p.1397-402.

Koster A S, Frankhuijzen-Sierevogel A C and Noordhoek J
Distribution of glucuronidation capacity (1-naphthol and morphine) along the rat intestine.
Biochem Pharmacol, 1985. 34(19): p.3527-32.

Krishnaswamy S, Duan S X, Von Moltke L L, Greenblatt D J and Court M H
Validation of serotonin (5-hydroxytryptamine) as an in vitro substrate probe for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6.
Drug Metab Dispos, 2003. 31(1): p.133-9.

Laemmli, U. K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 1970. 227(5259): p.680-5

Lakhani N J, Sarkar M A, Venitz J and Figg W D
2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent
Pharmacotherapy, 2003. 23(2): p.165-72.

Lariviere L, Gueguen-Chaignon V and Morera S
Crystal structures of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism.
J Mol Biol, 2003. 330(5): p.1077-86.

Lazard D, Zupko K, Poria Y, Nef P, Lazarovits J, Horn S, Khen M and Lancet D
Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase.
Nature, 1991. 349(6312): p.790-3.

Lepine J, Bernard O, Plante M, Tetu B, Pelletier G, Labrie F, Belanger A and Guillemette C
Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium.
J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(10): p.5222-32.

Levesque E, Beaulieu M, Green M D, Tephly T R, Belanger A and Hum D W
Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene.
Pharmacogenetics, 1997. 7(4): p.317-25.

Levesque E, Beaulieu M, Hum D W and Belanger A
Characterization and substrate specificity of UGT2B4 (E458): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene.
Pharmacogenetics, 1999. 9(2): p.207-16.

Levesque E, Turgeon D, Carrier J S, Montminy V, Beaulieu M and Belanger A
Isolation and characterization of the UGT2B28 cDNA encoding a novel human steroid conjugating UDP-glucuronosyltransferase.
Biochemistry, 2001. 40(13): p.3869-81.

Lilienblum W, Walli A K and Bock K W
Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents
Biochem Pharmacol, 1982. 31(6): p907-13.

Li Q, Lou X, Peyronneau M A, Straub P O and Tukey R H
Expression and functional domains of rabbit liver UDP-glucuronosyltransferase 2B16 and 2B13.

J Biol Chem, 1997. 272(6): p.3272-9.

Lind J L, Heimann K, Miller E A, van Vliet C, Hoogenraad N J and Wetherbee R
Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans.

Planta, 1997. 203(2): p.213-21.

Little J M and Radomska A

Application of photoaffinity labeling with [11,12-3H]all-trans-retinoic acid to characterization of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) with activity toward retinoic acid.

Biochem Biophys Res Commun, 1997. 230(3): p.497-500.

Longcope C, Gorbach S, Goldin B, Woods M, Dwyer J and Warram J

The metabolism of estradiol; oral compared to intravenous administration.

J Steroid Biochem, 1985. 23(6A): p.1065-70.

Mackenzie P I

Rat liver UDP-glucuronosyltransferase. cDNA sequence and expression of a form glucuronidating 3-hydroxyandrogens.

J Biol Chem, 1986. 261(30): p.14112-7.

Mackenzie P I, Owens I S, Burchell B, Bock K W, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum D W, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury J R, Ritter J K, Schachter H, Tephly T R, Tipton K F and Nebert D W

The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence.

Pharmacogenetics, 1997. 7(4): p.255-69.

Mackenzie P I, Bock K W, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners J O, Owens I S and Nebert D W

Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily.

Pharmacogenet Genomics, 2005. 15(10): p.677-85.

Martinasevic M K, King C D, Rios G R and Tephly T R

Immunohistochemical localization of UDP-glucuronosyltransferases in rat brain during early development.

Drug Metab Dispos, 1998. 26(10): p.1039-41.

Marti-Renom M A, Stuart A C, Fiser A, Sanchez R, Melo F and Sali A
Comparative protein structure modeling of genes and genomes.
Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. 29: p.291-325.

McGurk K A, Brierley C H and Burchell B
Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases.
Biochem Pharmacol, 1998. 55(7): p.1005-12.

Meech R and Mackenzie P I
Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases.
Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997a. 24(12): p.907-15.

Meech R and Mackenzie P I
UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization.
J Biol Chem, 1997b. 272(43): p.26913-7.

Meech R and Mackenzie P I
Determinants of UDP glucuronosyltransferase membrane association and residency in the
endoplasmic reticulum.
Arch Biochem Biophys, 1998. 356(1): p.77-85.

Miley M J, Zielinska A K, Keenan J E, Bratton S M, Radomska-Pandya A and Redinbo M
R
Crystal structure of the cofactor-binding domain of the human phase II drug-metabolism
enzyme UDP-glucuronosyltransferase 2B7.
J Mol Biol, 2007. 369(2): p.498-511.

Miller E C and Miller J A
Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules.
Cancer, 1981. 47(10): p.2327-45.

Mojarrabi B, Butler R and Mackenzie P I
cDNA cloning and characterization of the human UDP glucuronosyltransferase, UGT1A3.
Biochem Biophys Res Commun, 1996. 225(3): p.785-90.

Mulichak A M, Losey H C, Walsh C T and Garavito R M
Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the
biosynthesis of vancomycin group antibiotics.
Structure, 2001. 9(7): p.547-57.

Mulichak A M, Losey H C, Lu W, Wawrzak Z, Walsh C T and Garavito R M
Structure of the TDP-epi-vancosaminyltransferase GtfA from the chloroeremomycin biosynthetic pathway.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(16): p.9238-43.

Mulichak A M, Lu W, Losey H C, Walsh C T and Garavito R M
Crystal structure of vancosaminyltransferase GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway: interactions with acceptor and nucleotide ligands.

Biochemistry, 2004. 43(18): p.5170-80.

Nasatzky E, Schwartz Z, Soskolne W A, Brooks B P, Dean D D, Boyan B D and Ornoy A
Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures.
Connect Tissue Res, 1994. 30(4): p.277-94.

Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, Kiat-Lim E, Davis B G, Tarling C A, Ford C M, Bowles D J and Davies G J
Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification.

Embo J, 2006. 25(6): p.1396-405.

Operana T N and Tukey R H
Oligomerization of the UDP-glucuronosyltransferase 1A proteins: homo- and heterodimerization analysis by fluorescence resonance energy transfer and co-immunoprecipitation.

J Biol Chem, 2007. 282(7): p.4821-9.

Orzechowski A, Schrenk D, Bock-Hennig B S and Bock K W
Glucuronidation of carcinogenic arylamines and their N-hydroxy derivatives by rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferase of the UGT1 gene complex.

Carcinogenesis, 1994. 15(8): p.1549-53.

Ouzzine M, Pillot T, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Burchell B and Siest G
Expression and role of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 analyzed by specific antibodies raised against a hybrid protein produced in Escherichia coli.

Arch Biochem Biophys, 1994a. 310(1): p.196-204.

Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Pillot T, Burchell B, Siest G and Magdalou J
Expression of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 in Escherichia coli. Influence of bacterial signal peptides on the production and localization of the recombinant protein.

FEBS Lett, 1994b. 339(1-2): p.195-9.

Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B and Fournel-Gigleux S
An internal signal sequence mediates the targeting and retention of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 to the endoplasmic reticulum.
J Biol Chem, 1999a. 274(44): p.31401-9.

Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B and Fournel-Gigleux S
Expression of a functionally active human hepatic UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A6) lacking the N-terminal signal sequence in the endoplasmic reticulum.
FEBS Lett, 1999b. 454(3): p.187-91.

Ouzzine M, Antonio L, Burchell B, Netter P, Fournel-Gigleux S and Magdalou J
Importance of histidine residues for the function of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6: evidence for the catalytic role of histidine 370.
Mol Pharmacol, 2000. 58(6): p.1609-15.

Pasagian-Macaulay A, Meilahn E N, Bradlow H L, Sepkovic D W, Buhari A M, Simkin-Silverman L, Wing R R and Kuller L H
Urinary markers of estrogen metabolism 2- and 16 alpha-hydroxylation in premenopausal women.
Steroids, 1996. 61(8): p.461-7.

Patana A S, Kurkela M, Goldman A and Finel M
The human UDP-glucuronosyltransferase: identification of key residues within the nucleotide-sugar binding site.
Mol Pharmacol, 2007. 72(3): p.604-11.

Pelletier G
Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues.
Histol Histopathol, 2000. 15(4): p.1261-70.

Peters W H, Jansen P L and Nauta H
The molecular weights of UDP-glucuronyltransferase determined with radiation-inactivation analysis. A molecular model of bilirubin UDP-glucuronyltransferase.
J Biol Chem, 1984. 259(19): p.11701-5.

Pillot T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Lafaurie C, Radomska A, Burchell B, Siest G and Magdalou J
Glucuronidation of hyodeoxycholic acid in human liver. Evidence for a selective role of UDP-glucuronosyltransferase 2B4.
J Biol Chem, 1993. 268(34): p.25636-42.

Prescott L

Paracetamol (paracetamol).

A critical bibliographic review. Taylor and Francis Publishers, London, 1996.

Radomska A and Drake R R

Synthesis and uses of azido-substituted nucleoside diphosphate sugar photoaffinity analogs.

Methods Enzymol, 1994. 230: p.330-9.

Radomska-Pandya A, Czernik P J, Little J M, Battaglia E and Mackenzie P I

Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases.

Drug Metab Rev, 1999. 31(4): p.817-99.

Radomska-Pandya A, Chen G, Czernik P J, Little J M, Samokyszyn V M, Carter C A and Nowak G

Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy.

J Biol Chem, 2000. 275(29): p.22324-30.

Radomska-Pandya A, Chen G, Samokyszyn V M, Little J M, Gall W E, Zawada G, Terrier N, Magdalou J and Czernik P

Application of photoaffinity labeling with [(3)H] all trans- and 9-cis-retinoic acids for characterization of cellular retinoic acid--binding proteins I and II.

Protein Sci, 2001. 10(1): p.200-11.

Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R and Weisz J

Estrogen metabolism by conjugation.

J Natl Cancer Inst Monogr, 2000(27): p.113-24.

Richmond R S, Carlson C S, Register T C, Shanker G and Loeser R F

Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2.

Arthritis Rheum, 2000. 43(9): p.2081-90.

Riedy M, Wang J Y, Miller A P, Buckler A, Hall J and Guida M

Genomic organization of the UGT2b gene cluster on human chromosome 4q13.

Pharmacogenetics, 2000. 10(3): p.251-60.

Ritter J K, Chen F, Sheen Y Y, Tran H M, Kimura S, Yeatman M T and Owens I S

A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini.

J Biol Chem, 1992. 267(5): p.3257-61.

- Sallustio B C, Harkin L A, Mann M C, Krivickas S J and Burcham P C
Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibrilic acid and gemfibrozil: a novel role for phase-II-mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones?
Toxicol Appl Pharmacol, 1997. 147(2): p.459-64.
- Sani B P, Barua A B, Hill D L, Shih T W and Olson J A
Retinoyl beta-glucuronide: lack of binding to receptor proteins of retinoic acid as related to biological activity.
Biochem Pharmacol, 1992. 43(4): p.919-22.
- Schrenk D, Orzechowski A, Schwarz L R, Snyder R, Burchell B, Ingelman-Sundberg M and Bock K W
Phase II metabolism of benzene.
Environ Health Perspect, 1996. 104 Suppl 6: p.1183-8.
- Senafi S B, Clarke D J and Burchell B
Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation.
Biochem J, 1994. 303 (Pt 1): p.233-40.
- Senay C, Ouzzine M, Battaglia E, Pless D, Cano V, Burchell B, Radominska A, Magdalou J and Fournel-Gigleux S
Arginine 52 and histidine 54 located in a conserved amino-terminal hydrophobic region (LX2-R52-G-H54-X3-V-L) are important amino acids for the functional and structural integrity of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6.
Mol Pharmacol, 1997. 51(3): p.406-13.
- Senay C, Jedlitschky G, Terrier N, Burchell B, Magdalou J and Fournel-Gigleux S
The importance of cysteine 126 in the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6.
Biochim Biophys Acta, 2002. 1597(1): p.90-6.
- Shao H, He X, Achnine L, Blount J W, Dixon R A and Wang X
Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*.
Plant Cell, 2005. 17(11): p.3141-54.
- Smith S A, Nagalla S R, Andrews D P and Olsen G D
Morphine regulation of a novel uridine diphosphate glucuronosyl-transferase in guinea pig pups following in utero exposure.
Mol Genet Metab, 1999. 68(1): p.68-77.

Soars M G, Ring B J and Wrighton S A

The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of udp-glucuronosyltransferases.
Drug Metab Dispos, 2003. 31(6): p.762-7.

Sowers M R, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur A G, Hochberg M and Jamadar D A

Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis.

Arthritis Rheum, 2006. 54(8): p.2481-7.

Spahn-Langguth H and Benet L Z

Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism?

Drug Metab Rev, 1992. 24(1): p.5-47.

Starlard-Davenport A, Xiong Y, Bratton S, Gallus-Zawada A, Finel M and Radominska-Pandya A

Phenylalanine(90) and phenylalanine(93) are crucial amino acids within the estrogen binding site of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A10.

Steroids, 2007. 72(1): p.85-94.

Strassburg C P, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey R H and Manns M P

Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine.

J Biol Chem, 2000. 275(46): p.36164-71.

Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K, Machida T, Takagi H, Mori M, Kakizaki S, Sueyoshi T, Negishi M and Miwa M

Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia.

Biochem Biophys Res Commun, 2002. 292(2): p.492-7.

Tanko L B, Sondergaard B C, Oestergaard S, Karsdal M A and Christiansen C

An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage.

Climacteric, 2008. 11(1): p.4-16.

Teodorescu O, Galor T, Pillardy J and Elber R

Enriching the sequence substitution matrix by structural information.

Proteins, 2004. 54(1): p.41-8.

Tephly T R

Isolation and purification of UDP-glucuronosyltransferases.

Chem Res Toxicol, 1990. 3(6): p.509-16.

Tephly T R and Burchell B

UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes

Trends Pharmacol Sci, 1990. 11(7): p.276-9

Terrier N, Benoit E, Senay C, Lopicque F, Radomska-Pandya A, Magdalou J and Fournel-Gigleux S

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

Mol Pharmacol, 1999. 56(1): p.226-34.

Tukey R H, Pendurthi U R, Nguyen N T, Green M D and Tephly T R

Cloning and characterization of rabbit liver UDP-glucuronosyltransferase cDNAs.

Developmental and inducible expression of 4-hydroxybiphenyl UGT2B13.

J Biol Chem, 1993. 268(20): p.15260-6.

Tukey R H and Strassburg C P

Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract.

Mol Pharmacol, 2001. 59(3): p.405-14.

Turgeon D, Carrier J S, Levesque E, Beatty B G, Belanger A and Hum D W

Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4.

J Mol Biol, 2000. 295(3): p.489-504.

Turgeon D, Carrier J S, Levesque E, Hum D W and Belanger A

Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members.

Endocrinology, 2001. 142(2): p.778-87.

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Ohkubo I and Hukuda S

Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis.

J Rheumatol, 1998. 25(1): p.134-7.

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I and Hukuda S

Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes.

Osteoarthritis Cartilage, 1999. 7(6): p.560-6.

van Saase J L, van Romunde L K, Cats A, Vandenbroucke J P and Valkenburg H A

Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations.

Ann Rheum Dis, 1989. 48(4): p.271-80.

Villeneuve L, Girard H, Fortier L C, Gagne J F and Guillemette C
Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs.
J Pharmacol Exp Ther, 2003. 307(1): p.117-28.

von Heijne G
Signals for protein targeting into and across membranes.
Subcell Biochem, 1994. 22: p.1-19.

Watts K T, Mijts B N, Lee P C, Manning A J and Schmidt-Dannert C
Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family.
Chem Biol, 2006. 13(12): p.1317-26.

Wells P G, Mackenzie P I, Chowdhury J R, Guillemette C, Gregory P A, Ishii Y, Hansen A J, Kessler F K, Kim P M, Chowdhury N R and Ritter J K
Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease.
Drug Metab Dispos, 2004. 32(3): p.281-90.

Williams J A, Ring B J, Cantrell V E, Campanale K, Jones D R, Hall S D and Wrighton S A
Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes.
Drug Metab Dispos, 2002. 30(11): p.1266-73.

Williams, R. T.
Detoxication Mechanisms, 2nd ed (1959). London: Chapman & Hall.

Xie W, Yeuh MF, Radomska-Pandya A, Saini SP, Negishi Y, Bottroff BS, Cabrera GY, Tukey RH, Evans RM
Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 1;100(7):4150-5

Xiong Y, Bernardi D, Bratton S, Ward M D, Battaglia E, Finel M, Drake R R and Radomska-Pandya A
Phenylalanine 90 and 93 are localized within the phenol binding site of human UDP-glucuronosyltransferase 1A10 as determined by photoaffinity labeling, mass spectrometry, and site-directed mutagenesis.
Biochemistry, 2006. 45(7): p.2322-32.

Xiong Y, Patana A S, Miley M J, Zielinska A K, Bratton S M, Miller G P, Goldman A, Finel M, Redinbo M R and Radomska-Pandya A

The first aspartic acid of the DQxD motif for human UDP-glucuronosyltransferase 1A10 interacts with UDP-glucuronic acid during catalysis.

Drug Metab Dispos, 2008. 36(3): p.517-22.

Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Hara Y, Tachibana O, Yamashita J, McLeod H L and Yokoi T

A novel polymorphism in the promoter region of human UGT1A9 gene (UGT1A9*22) and its effects on the transcriptional activity.

Pharmacogenetics, 2004. 14(5): p.329-32.

Zakim D, Hochman Y and Kenney W C

Evidence for an active site arginine in UDP-glucuronosyltransferase.

J Biol Chem, 1983. 258(10): p.6430-4.

Zakim D, Cantor M and Eibl H

Phospholipids and UDP-glucuronosyltransferase. Structure/function relationships.

J Biol Chem, 1988. 263(11): p.5164-9.

Zakim D and Dannenberg A J

How does the microsomal membrane regulate UDP-glucuronosyltransferases?

Biochem Pharmacol, 1992. 43(7): p.1385-93.

Zeche D L and Withers S G

Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst

Acc Chem Res, 2000. 33(1): p.11-8.

Publication et communication issues de ce travail

1- Publication internationale à comité de lecture

D. LI, S. FOURNEL-GIGLEUX, L. BARRE, G. MULLIERT, P. NETTER, J. MAGDALOU, M. OUZZINE

Identification of aspartic acid and histidine residues mediating the reaction mechanism and the substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferases 1A.

Journal of Biological Chemistry, 2007, 282, 36514-37524.

2- Conférence internationale sur invitation

LI D., FOURNEL-GIGLEUX S., BARRE L., NETTER P., MAGDALOU J., OUZZINE M.

Aspartic and histidine residues mediate the reaction mechanism and the substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferases 1A.

12th International Workshop "Glucuronidation and the UGT", Québec, Canada (Juillet 2008)

Identification of Aspartic Acid and Histidine Residues Mediating the Reaction Mechanism and the Substrate Specificity of the Human UDP-glucuronosyltransferases 1A*

Received for publication, April 12, 2007, and in revised form, October 11, 2007. Published, JBC Papers in Press, October 23, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703107200

Dong Li[‡], Sylvie Fournel-Gigleux[‡], Lydia Barré[‡], Guillermo Mulliert[§], Patrick Netter[‡], Jacques Magdalou[‡], and Mohamed Ouzzine^{‡1}

From [‡]UMR 7561, Faculté de Médecine and [§]UMR 7036, Faculté des Sciences, CNRS-Université Henri Poincaré Nancy 1, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

The human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 is the primary phenol-metabolizing UDP-glucuronosyltransferase isoform. It catalyzes the nucleophilic attack of phenolic xenobiotics on UDP-glucuronic acid, leading to the formation of water-soluble glucuronides. The catalytic mechanism proposed for this reaction is an acid-base mechanism that involves an aspartic/glutamic acid and/or histidine residue. Here, we investigated the role of 14 highly conserved aspartic/glutamic acid residues over the entire sequence of human UGT1A6 by site-directed mutagenesis. We showed that except for aspartic residues Asp-150 and Asp-488, the substitution of carboxylic residues by alanine led to active mutants but with decreased enzyme activity and lower affinity for acceptor and/or donor substrate. Further analysis including mutation of the corresponding residue in other UGT1A isoforms suggests that Asp-150 plays a major catalytic role. In this report we also identified a single active site residue important for glucuronidation of phenols and carboxylic acid substrates by UGT1A enzyme family. Replacing Pro-40 of UGT1A4 by histidine expanded the glucuronidation activity of the enzyme to phenolic and carboxylic compounds, therefore, leading to UGT1A3-type isoform in terms of substrate specificity. Conversely, when His-40 residue of UGT1A3 was replaced with proline, the substrate specificity shifted toward that of UGT1A4 with loss of glucuronidation of phenolic substrates. Furthermore, mutation of His-39 residue of UGT1A1 (His-40 in UGT1A4) to proline led to loss of glucuronidation of phenols but not of estrogens. This study provides a step forward to better understand the glucuronidation mechanism and substrate recognition, which is invaluable for a better prediction of drug metabolism and toxicity in human.

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs,² EC 2.4.1.17) constitute a superfamily of enzymes that are involved in the phase II

biotransformation pathway of many drugs and xenobiotics from natural or synthetic origin (1). UGTs are inverting glycosyltransferases belonging to the wide family 1 of NDP-sugar hexosyltransferases (2). They catalyze the transfer of glucuronic acid from the high energy donor substrate UDP- α -D-glucuronic acid on hydroxyl, carboxyl, or amine groups of structurally unrelated acceptor molecules, leading to the formation of β -D-glucuronides. The hydrophilic glucuronides are readily excreted from the body via urine and bile. Endogenous compounds, such as bilirubin and ligands of nuclear receptors (fatty acids, estrogens, retinoic acid) are also substrates of UGTs. Thus, these enzymes expressed in several tissues such as liver, lung, brain, kidney, and gastro-intestinal tract play a major role in both physiological and toxicological processes (3).

The UGT1A6 isoform is encoded by the *UGT1* gene locus, which is also responsible for the expression of eight other functional UGT1A proteins (UGT1A1, -1A3, -1A4, -1A5, -1A7, -1A8, -1A9, and -1A10). These isoforms present a distinct but overlapping substrate specificity. The preferred substrates are bilirubin for UGT1A1, carboxyl drugs for UGT1A3, anti-psychotic amines for UGT1A4, 1-hydroxy-[a]-benzopyrene for UGT1A5, planar phenols for UGT1A6, and phenolic and carboxyl substances for UGT1A7, -1A8, and -1A9 (4, 5). Each isoform results from the alternate splicing of different exons 1 encoding the variable N-terminal half of the protein with the four common 2–5 exons encoding the C-terminal half. The N-terminal sequence of different isoforms is, therefore, predicted to interact with the acceptor substrates and is responsible for the substrate specificity, whereas the invariant C-terminal sequence would interact with the common donor substrate, UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA).

UGT1A6 isoform is expressed in hepatic and extrahepatic tissues (6) and is recognized as one of the main enzymes involved in the glucuronidation of phenols (7). Indeed, inhibitory antibodies raised against the C-terminal end of UGT1A6 protein indicated that this isoform contributed up to 60% in the glucuronidation of phenolic substances in human liver (8). In addition, UGT1A6 is involved in glucuronidation of drugs, such as the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen, the analgesic drug paracetamol (9), the vasorelaxant naftazone (10), and carcinogens (hydroxyl polycyclic arylhydrocarbons) (11). Recently, serotonin (5-hydroxytryptamine) and its analogs such as 5-hydroxytryptophol have also been identified as substrates for human UGT1A6 (12, 13).

* This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche and the Ligue Régionale contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: UMR CNRS 7561-Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: 33-3-83-68-39-72; Fax: 33-3-83-68-39-59; E-mail: ouzzine@medecine.uhp-nancy.fr.

² The abbreviations used are: UGT, UDP-glucuronosyltransferase; 4-MU, 4-methylumbelliferone; GlcUA, glucuronic acid.

Despite the importance of UGTs in the bioavailability of drugs and endogenous compounds, the structural determinants that are critical for the reaction mechanism and the molecular basis of substrate recognition have not been elucidated yet. Recently, the structure of the cofactor binding domain of UGT2B7 has been solved, and several amino acids interacting with the co-substrate (UDP-GlcUA) have been identified (14). However, the lack of information on the three-dimensional structure of the substrate binding domain and of the full-length protein due to difficulties in crystallizing these membrane proteins has impaired a better understanding of the active site organization and of the glucuronidation process.

Among other glycosyltransferases, several members have been crystallized and their three-dimensional structure solved. Interestingly, despite their functional diversity, their structures fall into two different canonical folds only, termed GT-A and GT-B (15). By analogy, the bi-domain organization of the UGTs in which the N- and C-terminal halves appear to be responsible for interaction with the acceptor and donor substrate, respectively, suggests that they would adopt a three-dimensional structure similar to that found in GT-B enzymes.

It has been proposed that the reaction mechanism of GT-B involves a general base (histidine, aspartic, or glutamic acid) initiating catalysis by abstracting a proton from the reactive group of aglycone and allowing the direct nucleophilic attack at the donor sugar C1 carbon center (16). Structural analyses and site-directed mutagenesis studies of GT-B members, MurG (17), GtfA (18), VvGT1 (19), and T4-BGT (20) suggested that histidine and aspartic acid residues His-19, Asp-13, His-20, and Asp-100, respectively, act as a catalytic base (19). Furthermore, His-22 has also been found to be critical for catalysis by the plant UGT71G1, whereas Asp-122 was shown to be a key residue that may assist deprotonation of the acceptor substrate by forming an electron transfer chain with the catalytic base, His-22 (21).

An acid-base mechanism has also been proposed for the glucuronidation reaction catalyzed by human UGT1A6 based on irreversible inactivation of the recombinant UGT1A6 by the histidyl- and carboxyl-directed electrophilic probes, diethylpyrocarbonate and carbodiimides, respectively (22, 23). Using this approach along with site-directed mutagenesis, we showed that histidine residue His-370 plays an important role in the catalytic process (24). Indeed, sequence alignment of GT-B proteins with UGT1A6 revealed that His-370 corresponds to the histidine residue of a common HX₇E motif present in GT-B glycosyltransferases, known to play an important role in stabilizing the leaving UDP group of the donor substrate UDP-GlcUA during catalysis (18, 25).

In this paper we have investigated the role of conserved aspartic and glutamic acid residues of the human UGT1A6 in the glucuronidation mechanism. Each of these amino acids was individually mutated, and the mutant enzymes were analyzed in terms of enzyme activity and kinetic properties. Our results suggest that the aspartic residue Asp-150 plays a key role in the glucuronidation reaction and provide evidence that it participates to the catalytic mechanism. Furthermore, analysis of the role of histidine residue His-38 of UGT1A6, which corresponds to a predicted catalytic base His-22 of the plant UGT71G1, and

of its counterpart Pro-40 in UGT1A3 and His-40 in UGT1A4 demonstrated that it governs the substrate specificity of these UGT isoforms toward phenolic and carboxylic substrates.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Aglycone substrates for glucuronidation assays were of the highest purity available and were purchased from Sigma. UDP-[U-¹⁴C]glucuronic acid (418 mCi/mmol) was obtained from PerkinElmer Life Sciences. Restriction enzymes were provided by New England Biolabs (Hitchin, UK). The QuikChange site-directed mutagenesis kit was from Stratagene (La Jolla, CA), and Advantage[®] 2 polymerase mix was from Clontech (Palo Alto, CA). The yeast culture medium was from Difco. The *Pichia pastoris* expression system was from Invitrogen. Alkaline phosphatase-conjugated antibodies for Western blot detection were from Sigma. All other reagents were of the best quality and commercially available.

Plasmid Construction and Mutagenesis—cDNA sequences encoding human UGT1A6, UGT1A9, UGT1A4, UGT1A3, and UGT1A1 were cloned from human liver library (Clontech) and inserted into EcoRI-XhoI or PmlI-XhoI sites of the yeast expression vector pPICZB. The recombinant vectors pPICZ-UGT1A6, pPICZ-UGT1A9, pPICZ-UGT1A4, pPICZ-UGT1A3, and pPICZ-UGT1A1 were used for expression of recombinant UGTs in *P. pastoris* as previously described (24). Constructions of amino acid-substituted mutants were performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit according to the recommendations of the manufacturer. The sequence of sense mutation primers is indicated in Table 1. Full-length mutated cDNAs were systematically checked by DNA sequencing.

Heterologous Expression in the Yeast *P. pastoris*—Each recombinant pPICZ vector was individually transformed into *P. pastoris* SMD 1168 yeast strain (Invitrogen) using the *P. pastoris* EasyComp[™] kit (Invitrogen). Stable transformants were selected on YPD plates (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose) containing 100 μg/ml zeocin. Transformed cells were grown in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6.0), 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, and 1% (v/v) glycerol) for 24 h at 30 °C. Expression was induced by methanol in BMGM medium (BMGY with 1% (v/v) glycerol replaced by 2% (v/v) methanol) and carried out for 48 h at 30 °C in a rotary shaker at 215 rpm (26).

Subcellular Fractionation of Recombinant Yeast Cells—Yeast cells were harvested by centrifugation at 3000 × *g* for 10 min and further submitted to subcellular fractionation as previously described (24). Briefly, after harvesting, cells were washed once and suspended in cold breaking buffer (50 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 5% (v/v) glycerol). The cells were then broken with glass beads. The resulting homogenate was centrifuged at 5000 × *g* for 15 min, and the supernatant was further centrifuged at 12,000 × *g* for 20 min. Membranes were then pelleted from the supernatant by centrifugation for 1 h at 100,000 × *g* at 4 °C. The membrane fraction was resuspended by Dounce homogenization in 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES buffer (pH 7.4).

TABLE 1
Sequence of the sense primers used for site-directed mutagenesis
Mutant amino acid codons are underlined.

UGT1A6	
H38A	5'-CAGGACGGAAGCGCCTGGCTTAGTATGAAG-3'
H38D	5'-CAGGACGGAAGCGACTGGCTTAGTATGAAG-3'
H38N	5'-GACGGAAGCAACTGGCTTAGT-3'
H38P	5'-GACGGAAGCCCTTGGCTTAGT-3'
H38Q	5'-CCTCAGGACGGAAGCCAGTGGCTTAGTATGAAG-3'
H38R	5'-GACGGAAGCCCTGGCTTAGT-3'
H38Y	5'-GACGGAAGCTACTGGCTTAGT-3'
D145A	5'-AGCAAGTTTGCIGCTCTTTTC-3'
D150A	5'-CTTTTCACAGCCCCAGCCTTA-3'
D150C	5'-TTTGTATGCTCTTTTCACATGTCAGCCTTACCCTGT-3'
D150E	5'-CTTTTCACAGAGCCCTTA-3'
D150N	5'-TTTGTATGCTCTTTTCACAAAACCAGCCTTACCCTGT-3'
D150Q	5'-TTTGTATGCTCTTTTCACACAGCCAGCCTTACCCTGT-3'
D150S	5'-CTTTTCACATCCCCAGCCTTA-3'
D150T	5'-TTTGTATGCTCTTTTCACAACACCAGCCTTACCCTGT-3'
E287A	5'-TTGCTCAGGCATTTGAAGCC-3'
E289A	5'-CAGGAATTTGACGCTACATT-3'
E297A	5'-GCTTCTGGAGCACATGGAATT-3'
E314A	5'-GAAATCCAGCCAAGAAGCT-3'
D357A	5'-CCCCAAAACGCTCTGTTGGT-3'
E378A	5'-CATGGTGTATGACAGCATATGCAAT-3'
E378D	5'-CATGGTGTATGACAGCATATGCAAT-3'
E378S	5'-GGTGTATTATCAAGCATATGC-3'
D394A	5'-TTGTTTGGTCTCAGATGGAC-3'
D394E	5'-TTGTTTGGTGGACAGATGGAC-3'
D397A	5'-GTGATCAGATGCCAATGCAAAGCGCATG-3'
D397E	5'-GGTGTATCAGATGGAGAATGCAAAGCGCATG-3'
D420A	5'-ACTTCTGAAGCTTTAGAAAATGCT-3'
D447A	5'-AGCCTTCACAAGGCCGCCCGGTG-3'
D447E	5'-AGCCTTCACAAGGCCGCCCGGTGGA-3'
D454A	5'-GAGCCGCTGGCCCTGGCCGTG-3'
E461A	5'-GTGTTCTGGGTGGCCTTTGTGATG-3'
E461D	5'-GTGTTCTGGGTGGACTTTGTGATGAG-3'
E461S	5'-TTCGGGTGTCGTTTGTGATG-3'
E461Q	5'-GCCGTGTTCTGGGTGCACTTTGTGATGAGGCACA-3'
D488A	5'-TACCATTCTTGGCCGTGATTGGTTTCC-3'
D488E	5'-CATTCCCTGGAGGTGATTGGT-3'
D488S	5'-CATTCCCTGICCGTGATTGGT-3'
UGT1A4	
P40A	5'-GATGGCAGCGCCTGGCTCAGC-3'
P40H	5'-GATGGCAGCCACTGGCTCAGC-3'
D152A	5'-GTTTTAACAGCCCCCGTTAAC-3'
D152E	5'-GTTTTAACAGAGCCCCGTTAAC-3'
UGT1A9	
D148A	5'-GCAGTGTCTCGCTCCTTTTGATAAC-3'
D148E	5'-GCAGTGTCTCGAACCTTTTGATAAC-3'
UGT1A3	
H40A	5'-ATTGATGGCAGCGCCTGGCTCAGCATG-3'
H40P	5'-ATTGATGGCAGCCCTGGCTCAGCATG-3'
UGT1A1	
D151A	5'-ATGCTGACGGCCCTTTCCTT-3'
D151E	5'-ATGCTGACGGAGCCTTTCCTT-3'
H39P	5'-CCAGTGATGGCAGCCCTGGCTGAGCATGCTT-3'
H39A	5'-CCAGTGATGGCAGCGCTTGGCTGAGCATGCTT-3'

Immunoblot Analysis—Protein concentration was evaluated by the method of Bradford (27). 30 μg of membrane proteins were analyzed by SDS-PAGE (28) and immunoblotting using anti-C-terminal peptide anti-UGT1A6 antibodies and alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies, as described previously (24).

Enzyme Activity—Glucuronidation activity toward 4-MU was measured according to the method of Lilienblum *et al.* (29). Fluorescence measurement of the glucuronide at excitation and emission wavelengths of 320 and 380 nm, respectively, was carried out on a Hitachi F2000 spectrofluorimeter (ScienceTec, Les Ullis, France) with 4-MU-β-D-glucuronide (0–10 nmol) as a standard.

The activity of recombinant wild-type UGT1A6, UGT1A9, UGT1A4, and UGT1A3 and of corresponding mutants toward selected substrates was determined by thin layer chromatography as described (30). Briefly, incubation in Eppendorf tubes

(total volume 40 μl) consisted of 50 μg of microsomal proteins in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ containing 0.1 mM UDP-GlcUA and 0.1 μCi UDP-[U-¹⁴C]glucuronic acid. The reaction was started by the addition of substrate (0.5 mM, final concentration) dissolved in 2 μl of dimethyl sulfoxide. A control was performed in which the substrate was omitted and contained dimethyl sulfoxide. After incubation for 1 h at 37 °C, the proteins were precipitated by 40 μl ethanol on ice and removed by centrifugation at 4000 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was loaded onto thin layer chromatography plates (LK6DF silica gel, 250 μm, Whatman, Clifton, NJ). The plates were developed with *n*-butanol, acetone, acetic acid, aqueous ammonia (28%), water (70:50:18:1.5:60, v/v) and with *n*-butanol, acetone, water, and ammonium hydroxide (35:35:20:10, v/v) in the case of amine substrates. They were dried and sprayed with 1% (v/v) 2-(4-*t*-butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole in toluene. The radioactivity associated to the glucuronide was visualized by autoradiography with X-Omat Kodak film (Sigma) for 3 days or 6 days at –20 °C. The silica gel areas of the glucuronides were scraped off, and the associated radioactivity was quantified on a LKB spectrometer using Fluoran Safe Ultima Gold scintillant mixture (Packard Instrument Co.). The dpm value corresponding to the activity of a given sample was considered significant when it was at least 2-fold that of the control sample.

Determination of Kinetic Parameters—Apparent kinetic constants K_m and V_{max} toward 4-MU were determined by incubating yeast microsomes with increasing concentrations of 4-MU (0.01–2.0 mM) in the presence of a fixed concentration of UDP-GlcUA (5.0 mM). The apparent kinetic constants toward UDP-GlcUA were obtained using a constant amount of 4-MU (1 mM) in the presence of increasing concentrations of UDP-GlcUA (0.025 to 10 mM). K_m and V_{max} values were determined using nonlinear least squares analysis of the data fitted to Michaelis-Menten rate equation ($v = V_{max} \times [S]/K_m + [S]$) using the curve-fitter program Sigmaplot 9.0TM (31).

RESULTS

Expression and Kinetic Parameters of Wild-type UGT1A6 and Mutants—In an attempt to identify the carboxylic amino acid potentially involved in UGT catalysis, we have performed a sequence alignment of several mammalian UGT isoforms and identified 14 highly conserved aspartic/glutamic acid residues over the entire sequence of human UGT1A6, *i.e.* Asp-145, Asp-150, Glu-287, Glu-289, Glu-314, Asp-357, Glu-378, Asp-394, Asp-397, Asp-420, Asp-447, Asp-454, Glu-461, and Asp-488 (Fig. 1). To address the importance of these invariant amino acids in glucuronidation mechanism, each of them was mutated to alanine (non-conservative mutation) and to aspartic or glutamic acid (conservative mutation), and the recombinant proteins were produced in yeast *P. pastoris*. We first examined the role of aspartic acid residues by engineering the corresponding alanine mutants D145A, D150A, D357A, D394A, D397A, D420A, D447A, D454A, and D488A. Upon expression, Western blot analysis showed that recombinant wild-type UGT1A6 and mutants were expressed at similar or higher levels than the wild-type protein (Fig. 2A). The amount of mutant protein was evaluated by scanning densitometry, and all activities were nor-

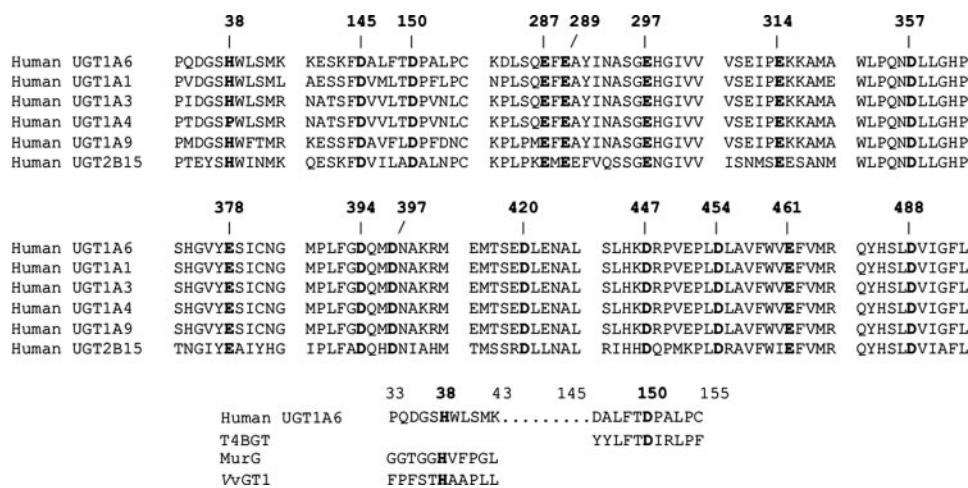


FIGURE 1. **Sequence alignment of UGTs and glycosyltransferases.** Alignment of human UGT1A6 (NP001063), UGT1A1 (NP000454), UGT1A3 (NP061966), UGT1A4 (NP009051), UGT1A9 (NP066307), UGT2B15 (NP001067), MurG (P17443), VvGT1 (2C9ZA), and T4-BGT (1J39A) was performed using ClustalW program (42). Conserved aspartic and glutamic acid residues as well as histidine 38 are in *bold*. Numbers of amino acid residues refer to the UGT1A6 sequence.

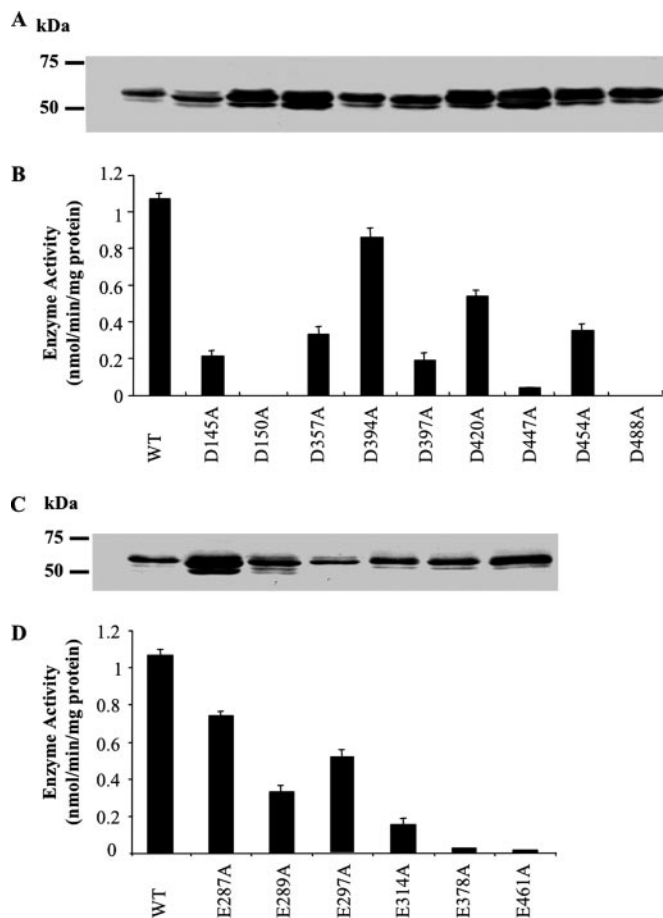


FIGURE 2. **Effect of substitution of conserved carboxylic acid residues with alanine on UGT1A6 activity.** Immunoblot and enzyme activity analyses of UGT1A6 aspartic acid mutants (A and B) and UGT1A6 glutamic acid mutants (C and D) are shown. 30 μ g of membrane proteins from recombinant yeast cells were loaded in each lane (A and C). Glucuronidation activity (B and D) of wild type (WT) and the mutants toward 4-MU substrate was carried out according to the method of Lilienblum *et al.* (29) with 50 μ g of protein incubated in the presence of 5 mM UDP-GlcUA acid and 1 mM 4-MU as indicated under "Experimental Procedures." Values are the mean \pm S.D. of three independent determinations.

malized relative to the wild-type UGT1A6. To evaluate the consequences of the mutations on the enzyme function, we analyzed the activity (Fig. 2B) and determined kinetic parameters of recombinant wild-type and mutant enzymes using 4-MU as reference acceptor substrate (Table 2). Interestingly, the results showed that except for D150A and D488A, all the alanine-substituted mutants exhibited enzyme activity, although compared with wild-type it was reduced by 5-, 3.2-, 5.6-, 2-, 29-, and 3-fold for D145A, D357A, D397A, D420A, D447A, and D454A, respectively (Fig. 2B). In the case of D394A mutant, only a slight decrease in activity was observed (about 20%). It

is noteworthy that mutation of Asp-447 by alanine (D447A) strongly reduced enzyme activity (29-fold). However, replacement of this residue with glutamic acid (D447E) restored the activity of the enzyme but dramatically increased the K_m value (>10 mM) for the donor substrate with no change in the K_m for the acceptor substrate (Table 2), suggesting the importance of Asp-447 residue in the interaction of the enzyme with UDP-GlcUA.

We investigated the role of conserved glutamic acid residues *i.e.* Glu-287, Glu-289, Glu-297, Glu-314, Glu-378, and Glu-461 in glucuronidation mechanism by engineering the corresponding alanine mutants E287A, E289A, E297A, E314A, E378A, and E461A. Upon expression in *P. pastoris*, immunoblot analysis showed that all the mutants were produced in similar or higher amounts compared with the wild-type enzyme (Fig. 2C). Analysis of the effect of the mutations of glutamic acid to alanine residues on the enzyme activity showed that, in contrast to aspartic acid to alanine substitutions, none of the alanine mutations abrogated the enzyme activity (Fig. 2D). Indeed, all the mutants exhibited enzyme activity, although compared with wild-type, it was reduced by 1.4-, 3.2-, 2-, and 7-fold for E287A, E289A, E297A, E314A, respectively, and by 150- and 350-fold for E378A and E461A mutants, respectively (Fig. 2D). Further analyses were conducted to determine the importance of Glu-378 and Glu-461 residues. For this purpose we constructed and expressed mutants with Glu-378 and Glu-461 individually replaced by a conservative amino acid, aspartic acid, or with serine or glutamine residues, *i.e.* E378D, E378S, E461D, E461S, and E461Q. Analysis of the enzyme activity showed that E378D and E378S mutants exhibited similar V_{max} values compared with the alanine-substituted mutant E378A (Table 2). Similarly, E461D and E461S presented V_{max} values close to that of E461A mutant. In contrast, replacement of Glu-461 with glutamine led to E461Q mutant with a V_{max} value 25-fold lower than that of the wild-type enzyme but 20-fold higher than that of E461D and E461S mutants (Table 2). These results showed that both Glu-378 and Glu-461 residues could be replaced to some extent by non-carboxylic amino acids, suggesting that carboxylic amino

TABLE 2**Michaelis-Menten parameters for glucuronidation of 4-MU by wild-type UGT1A6 and mutant enzymes**

Kinetic parameters toward donor and acceptor substrates were evaluated from initial velocity values of the reaction performed in triplicate using a constant amount of 4-MU (1 mM) in the presence of increasing concentrations of UDP-GlcA (0.025–10.0 mM) or increasing concentrations of 4-MU (0.01 to 2.0 mM) in the presence of a fixed concentration of UDP-GlcA (5.0 mM). ND, glucuronide formation was not detected (limits of detection 0.1 pmol/min/mg of protein).

Enzyme	UDP-GlcA		4-MU	
	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
	pmol/min/mg of protein	mM	pmol/min/mg of protein	mM
1A6	1047.3 ± 23.1	0.25 ± 0.01	1130.6 ± 19.7	0.12 ± 0.01
D145A	245.0 ± 4.5	1.05 ± 0.07	235.0 ± 8.1	0.23 ± 0.04
D150A	ND	ND	ND	ND
D150E	3.6 ± 0.2	0.24 ± 0.04	3.3 ± 0.3	0.35 ± 0.10
E287A	637.3 ± 13.0	0.28 ± 0.02	622.6 ± 21.3	0.16 ± 0.02
E289A	610.1 ± 28.2	1.00 ± 0.16	516.7 ± 24.4	0.21 ± 0.03
E297A	776.2 ± 10.5	0.83 ± 0.06	773.9 ± 24.6	0.17 ± 0.02
E314A	133.1 ± 8.2	0.63 ± 0.15	166.0 ± 4.4	0.34 ± 0.03
D357A	421.3 ± 16.4	0.44 ± 0.08	462.6 ± 9.0	0.14 ± 0.01
E378A	30.1 ± 2.0	>10	21.4 ± 1.8	0.51 ± 0.11
E378D	49.8 ± 6.5	>10	48.1 ± 4.6	0.32 ± 0.10
E378S	20.6 ± 3.7	>10	23.9 ± 0.6	0.58 ± 0.09
D394A	2239.5 ± 241.2	6.11 ± 1.89	2096.0 ± 61.8	0.17 ± 0.02
D397A	638.6 ± 34.5	5.28 ± 1.01	549.3 ± 20.3	0.23 ± 0.03
D420A	1151.2 ± 20.5	1.03 ± 0.06	1077.0 ± 23.4	0.20 ± 0.01
D447A	57.0 ± 1.7	0.17 ± 0.02	46.7 ± 1.3	0.16 ± 0.01
D447E	1027.0 ± 71.5	>10	838.6 ± 29.8	0.11 ± 0.02
D454A	522.5 ± 25.9	0.82 ± 0.15	608.1 ± 44.1	0.48 ± 0.09
E461A	2.7 ± 0.2	0.58 ± 0.14	1.8 ± 0.1	0.16 ± 0.04
E461D	2.4 ± 0.15	0.22 ± 0.06	1.5 ± 0.08	0.09 ± 0.02
E461Q	42.7 ± 1.0	0.11 ± 0.01	36.9 ± 1.4	0.22 ± 0.03
D488A	ND	ND	ND	ND
D488E	129.9 ± 6.9	>10	133.6 ± 7.6	0.14 ± 0.03

acids at these positions are important but not mandatory for the enzyme function. Altogether, these results indicated that except for Asp-150 and Asp-488, mutation of conserved aspartic and glutamic acid residues of UGT1A6 by alanine produced active mutants, suggesting that, although some of these residues have critical effect on enzyme function, none of them acts as catalytic base. This assumption was further supported by the kinetic analysis of the mutants (Table 2). The apparent Michaelis-Menten constants showed that mutations generally increased the K_m value for the donor substrate by about 4-fold and for the acceptor substrate by about 2–4-fold except for the mutants D394A and D397A, which exhibited an increase in K_m of 25- and 22-fold, respectively, toward the donor substrate. The V_{max} values were decreased or not changed (Table 2).

To further address the role of Asp-488 residue, we examined the effects of replacement of this residue with non-conservative amino acids alanine, phenylalanine, serine, and threonine and a conservative residue glutamic acid on the enzyme activity and kinetic parameters. All the mutants were expressed at similar or higher levels compared with the wild-type enzyme (Fig. 3A). Analysis of the enzyme activity showed that the mutants D488A, D488F, D488S, and D488T lack detectable enzyme activity, whereas D488E mutant exhibited enzyme activity (Fig. 3B). Determination of the kinetic parameters revealed that the V_{max} value of D488E mutant was 8-fold decreased, and its K_m value toward the donor substrate, UDP-GlcUA, was dramatically increased (above 10 mM) (Table 2). These results suggested that aspartic acid at position 488 influences the interaction of the enzyme with UDP-GlcUA rather than playing the role of a catalytic base. The topology of UGT1A6 within the

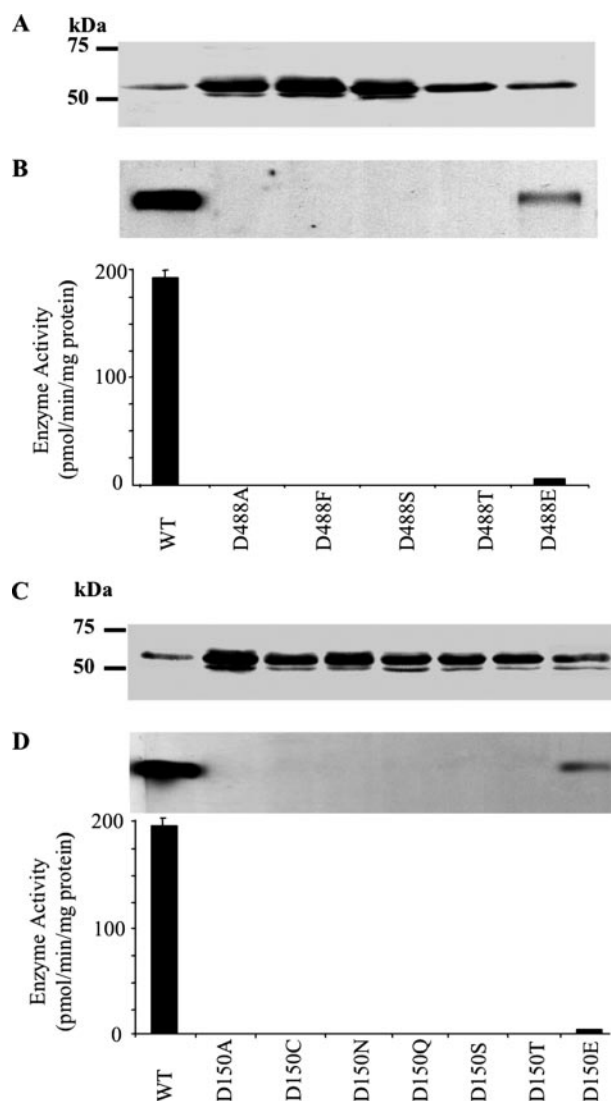


FIGURE 3. Replacement of Asp-488 and Asp-150 by different types of amino acids; effect on UGT1A6 activity. Immunoblot and enzyme activity analyses of UGT1A6 Asp-488 mutants (A and B) and Asp-150 mutants (C and D) are shown. 30 μ g of membrane proteins from recombinant yeast cells were loaded in each lane (A and C). Glucuronidation activity (B and D) of wild type (WT) and the mutants toward 4-MU substrate was carried out with 50 μ g of protein incubated in the presence of 0.1 mM UDP-GlcUA acid containing 0.1 μ Ci UDP-[14 C]glucuronic acid and 1 mM substrate as indicated under "Experimental Procedures." The glucuronides were separated by thin layer chromatography, visualized by autoradiography (B and D, inset) (film was exposed for 3 days), and quantitated by liquid scintillation counting. The rate values are the mean of three experiments.

endoplasmic reticulum membrane indicates that the Asp-488 residue is the terminal residue of the transmembrane helix and is located at the membrane-luminal side interface. This position is more likely responsible for the positioning of the transmembrane domain of the protein in the endoplasmic reticulum membrane, which is critical for the UGTs function (32).

To investigate the role of aspartic acid Asp-150 in UGT1A6 glucuronidation mechanism, this residue was converted to different non-conservative amino acids including alanine, cysteine, asparagine, glutamine, serine, and threonine and to a conservative residue glutamic acid. Upon expression, immunoblot analysis revealed that the mutants were efficiently produced and presented similar or higher levels of expression com-

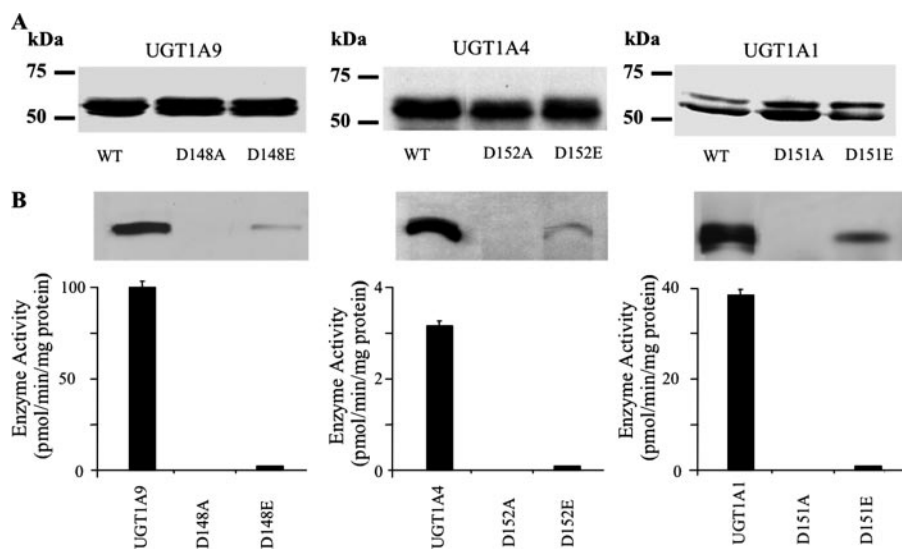


FIGURE 4. Effect of mutation of Asp-148, Asp-152, and Asp-151 in UGT1A9, UGT1A4, and UGT1A1, respectively. A, immunoblot analysis of wild type (WT) and mutants. 30 μ g of membrane proteins were loaded per lane. B, glucuronidation activity of wild type (WT) and mutants was carried out as described in Fig. 3. The substrates used were 4-MU for UGT1A9, 4-aminobiphenyl for UGT1A4, and octylgallate for UGT1A1. The glucuronides were separated by thin layer chromatography, visualized by autoradiography (shown in the inset) (films were exposed for 6 days except for UGT1A9, which was exposed for 3 days), and quantitated by liquid scintillation counting. The rate values are the mean of three experiments.

pared with the wild-type recombinant enzyme (Fig. 3C). Analysis of enzyme activity and determination of the kinetic parameters (Table 2) indicated that non-conservative mutations resulted in total loss of enzyme activity, whereas replacement with glutamic acid led to D150E mutant with detectable enzyme activity (Fig. 3D). Interestingly, kinetic studies revealed that the D150E mutant presented a very low V_{max} value compared with that of the wild type, with no change in K_m values (Table 2).

To further determine the importance of the UGT1A6 Asp-150 residue in the glucuronidation reaction, we mutated the corresponding aspartic residue in other UGT1A isoforms UGT1A9, UGT1A4, and UGT1A1, *i.e.* Asp-148, Asp-152, and Asp-151, respectively, into alanine and glutamic acid and measured the enzyme activity toward reference substrates of each isoform (Fig. 4). Immunoblot analysis showed that all the mutants were expressed at similar levels to that of corresponding wild-type protein (Fig. 4A). Interestingly, enzyme activity analysis showed that for all isoforms, the mutation to alanine resulted in a complete loss of enzyme activity (Fig. 4B). On the other hand, substitution of the aspartic acid residues by glutamic acid produced mutants with low but detectable activity (Fig. 4B). UGT1A9 mutant D148E presented an activity of 3.3 pmol/min/mg of protein toward 4-MU, UGT1A4 mutant D152E exhibited an activity of 0.21 pmol/min/mg of protein toward 4-aminobiphenyl, and UGT1A1 presented an activity of 1 pmol/min/mg of protein toward octylgallate (Fig. 4B). Altogether, these results highlight the importance of aspartic acid residue at position 150 in UGT1A6 as well as its counterpart in other UGT1A isoforms in catalysis.

Histidine 38 Governs the Substrate Specificity of UGT1A—According to the three-dimensional structure analysis of two GT-B glycosyltransferase members MurG (17) and VvGT1 (19), histidine residues His-19 and His-20, respectively, were

predicted to act as an alternate general base to deprotonate the hydroxyl group of the acceptor substrate instead of carboxylic amino acids, leading us to investigate the role of this residue in the UGT1A family. Sequence alignment indicated that these residues correspond to His-38 in UGT1A6, His-39 in UGT1A1, and His-40 in UGT1A3, whereas in UGT1A4 this position corresponds to proline residue (Pro-40) (Fig. 1). The observation that this residue is not invariant among the members of the UGT family does not favor the hypothesis that it plays the role of a catalytic base.

To clarify the role of His-38 residue of UGT1A6, it was mutated to alanine, aspartic acid, proline, arginine, and tyrosine to generate H38A, H38D, H38P, H38R, and H38Y mutants, respectively. Immunoblot analysis showed that the mutants were expressed at similar or higher levels than that of the wild-type protein (Fig. 5A).

Analysis of the activity and substrate specificity indicated that, except for H38R, these mutants were inactive (data not shown). Nonetheless, the mutant H38R exhibited low enzyme activity (Fig. 5B). Interestingly, H38R mutant presented different substrate specificity compared with wild-type enzyme. Indeed, the mutant was not able to glucuronidate scopoletin (Fig. 5, compare B and C), indicating that arginine can, to some extent, replace His-38 residue in terms of substrate specificity. These results suggest that His-38 residue is involved in determining the substrate specificity of UGT1A6 enzyme rather than playing a role of catalyst.

UGT1A4 sequence is 93% identical to that of UGT1A3; however, the two isoforms exhibit major differences in substrate specificity. UGT1A4 forms *N*-glucuronides from primary, secondary, and tertiary amines and plays a major role in the metabolism of anti-psychotic drugs. In addition to amine substrates, UGT1A3 catalyzes the glucuronidation of phenolic compounds and carboxylic acids that are not glucuronidated by UGT1A4. As indicated above, UGT1A4 contains a proline residue (Pro-40) at the position corresponding to His-38 in UGT1A6 (Fig. 1). Therefore, we investigated the role of this residue by engineering the UGT1A4 mutant P40H, in which proline was replaced by a histidine residue, as found in UGT1A6 and in its homologous UGT1A3 as well as in other UGT isoforms, and by alanine to generate P40A mutant (Fig. 6). Upon expression, UGT1A4 mutants were expressed at similar or higher level than that of the wild-type enzyme (Fig. 6A). Remarkably, analysis of enzyme activity toward a range of compounds revealed that P40H mutant exhibited expanded substrate specificity toward phenolic and carboxylic substrates (Fig. 6C). Indeed, the mutant was able to glucuronidate phenols (4-MU, 1-naphthol, 4-nitrophenol, quercetin, scopoletin) and

Critical Determinants for Catalysis and Specificity of UGT1A

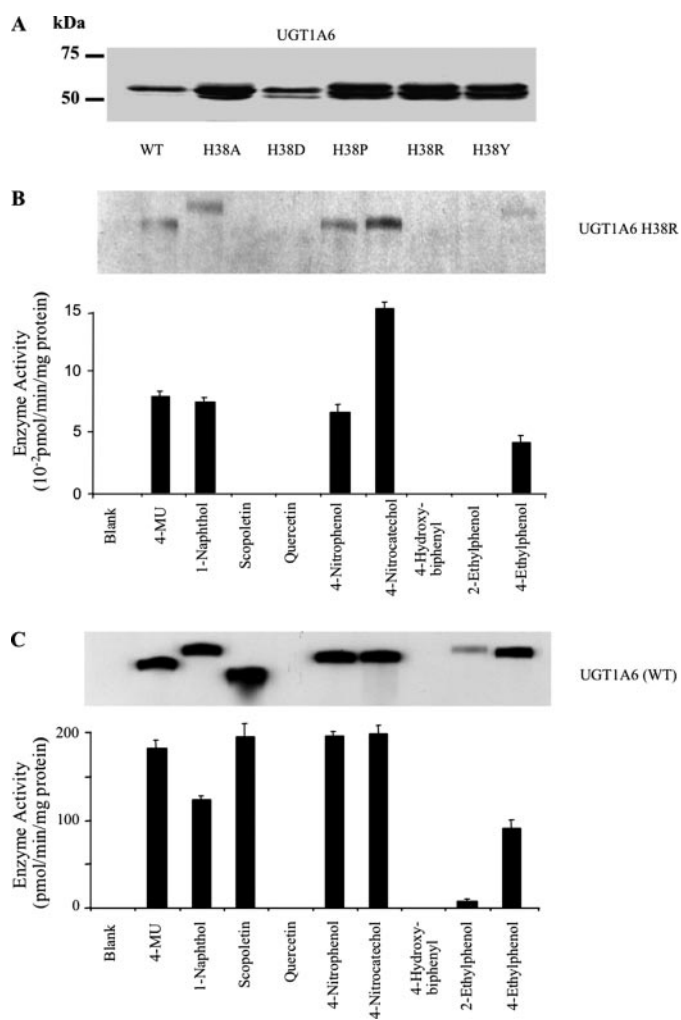


FIGURE 5. Mutation of His-38 residue of UGT1A6. A, Western blot analysis of wild type (WT) and mutant. 30 μ g of membrane proteins were loaded per lane. Glucuronidation activity of H38R mutant (B) and wild-type UGT1A6 (C) was carried out as described in Fig. 3 using different phenol compounds as substrates. The glucuronides were separated by thin layer chromatography, visualized by autoradiography (shown in the inset) (films were exposed for 3 days in the case of wild-type UGT1A6 and 6 days for the mutant H38R), and quantitated by liquid scintillation counting. The rate values are the mean of three experiments.

carboxylic acids (ibuprofen, ketoprofen). Analysis of the substrate specificity of the mutant toward amine substrates showed that the catalytic activity was restricted to primary amines such as 4-aminobiphenyl and 2-naphthylamine. No activity was detected either for secondary amines such as diphenylamine and *N*-desmethyloclozapine or for ternary amines such as cyproheptadine or doxepin (Fig. 6, compare B and C). These results suggested that histidine mutation alters the organization of the active site cavity to favor the binding of small molecules and to prevent the binding of bulky amines. Interestingly, mutation of Pro-40 residue to alanine did not induce changes in substrate specificity of the enzyme (data not shown).

To confirm the importance of Asp-152 residue in glucuronidation mechanism, we generated a UGT1A4 double mutant P40H-D152A and measured the enzyme activity toward the substrates described above. The results obtained showed that, in contrast to a single mutant P40H, which was able to glucuronidate phenolic, carboxylic, and amine sub-

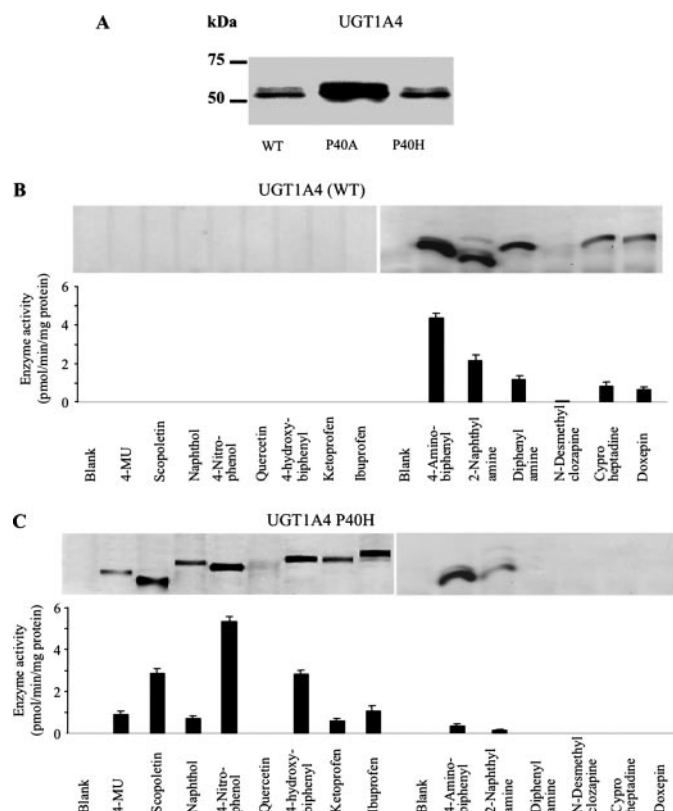


FIGURE 6. Effect of proline residue at position 40 on substrate specificity of UGT1A4. A, Western blot analysis of wild type (WT) and UGT1A4 mutants. 30 μ g of membrane proteins were loaded per lane. Glucuronidation activity of wild-type UGT1A4 (B) and P40H mutant (C) toward phenolic, carboxylic acid, and amine substrates was carried out as described in Fig. 3. The glucuronides were separated by thin layer chromatography, visualized by autoradiography (shown in inset) (film exposure was for 6 days), and quantitated by liquid scintillation counting. The rate values are the mean of three experiments.

strates, the P40H-D152A double mutant was totally inactive, thus confirming the essential catalytic role of the Asp-152 residue (data not shown).

As shown above, exchanging Pro-40 residue of UGT1A4 by histidine, as found in UGT1A3, led to a UGT1A4 mutant P40H with substrate specificity similar to that of UGT1A3. We further investigated the role of histidine residue His-40 of UGT1A3 in substrate specificity of the enzyme. For this purpose, we generated and expressed UGT1A3 mutant H40P, in which His-40 residue was exchanged by a proline, as found in UGT1A4, and H40A mutant in which His-40 was replaced with alanine residue (Fig. 7). Upon expression, UGT1A3 mutants were expressed at a similar level as that of the wild-type protein (Fig. 7A). Interestingly, substrate specificity analysis of UGT1A3 mutant H40P revealed that it was shifted toward that of UGT1A4. Indeed, the mutant was active toward amine substrates 4-aminobiphenyl and 2-naphthylamine but was not able to glucuronidate phenolic and carboxylic acid compounds (4-MU, scopoletin, 1-naphthol, 4-nitrophenol, ketoprofen, and ibuprofen) (Fig. 7, compare B and C). Similar results were obtained when His-40 residue was converted to alanine (H40A) (data not shown).

To further investigate the importance of this residue in the glucuronidation of phenols, we analyzed the effects of the

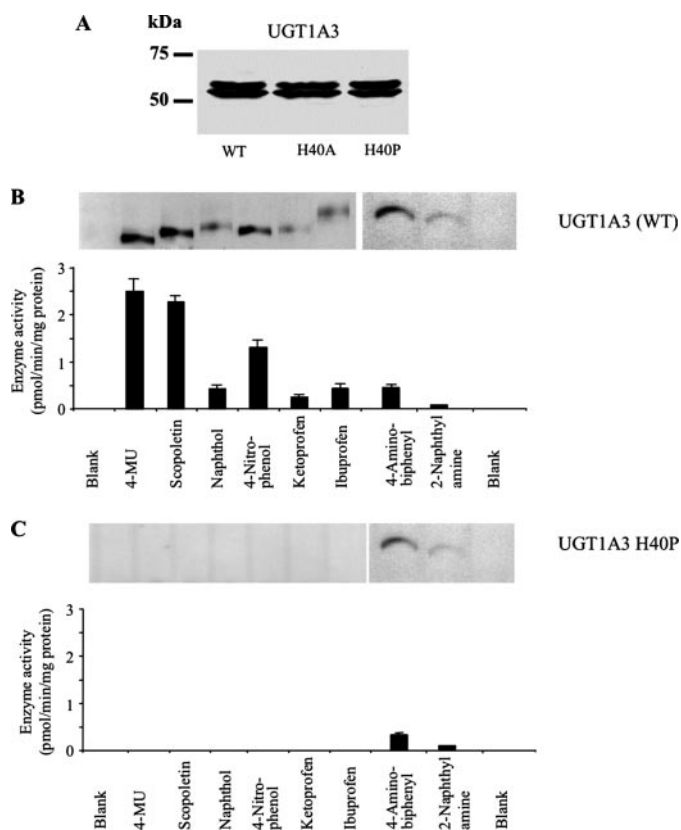


FIGURE 7. Effect of histidine residue at position 40 on substrate specificity of UGT1A3. A, Western blot analysis of wild type (WT) and UGT1A3 mutants. 30 μ g of membrane proteins were loaded per lane. Glucuronidation activity of wild-type UGT1A3 (B) and of H40P mutant (C) toward phenolic, carboxylic acid, and amine substrates was carried out as described in Fig. 3. The glucuronides were separated by thin layer chromatography, visualized by autoradiography (shown in the inset) (film exposure was for 6 days), and quantitated by liquid scintillation counting. The rate values are the mean of three experiments.

mutation of His-39 residue in UGT1A1 into proline and alanine. Upon expression, UGT1A1 mutants were expressed at similar or higher levels than that of the wild-type enzyme (Fig. 8A). As expected, analysis of the glucuronidation activity indicated that UGT1A1 catalyzes the glucuronidation of estrogens (β -estradiol, 2-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestrone) and phenolic compounds (4-MU, scopoletin, 1-naphthol, eugenol, octylgallate, 4-nitrophenol) (Fig. 8B). Interestingly, replacement of His-39 residue of UGT1A1 by proline led to loss of glucuronidation of phenolic compounds but not of estrogens (Fig. 8, compare B and C). Similar results were obtained when His-39 was replaced by alanine residue (data not shown). Taken together, these data indicate that the amino acid at position 40 in UGT1A3 and UGT1A4 and its counterpart in UGT1A1 (His-39) is an important determinant for the glucuronidation of phenolic and carboxylic acid compounds.

DISCUSSION

The improvement of drug efficacy requires a better understanding of the molecular mechanism of the enzyme activity in charge of their metabolism. In that context, UGTs play a key role in the biotransformation of drugs in human. These proteins also catalyze the glucuronidation of structurally unrelated xenobiotics, some of which are known to be carcinogens, as well

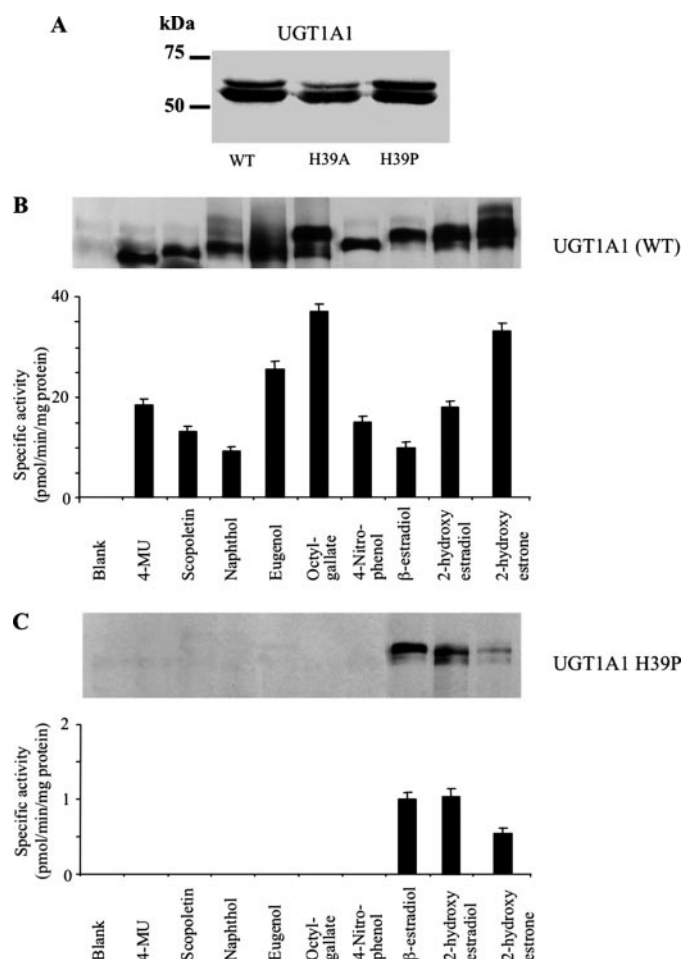


FIGURE 8. Importance of histidine residue at position 39 on substrate specificity. A, Western blot analysis of wild type (WT) and UGT1A1 mutants. 30 μ g of membrane proteins were loaded per lane. Glucuronidation activity of wild-type UGT1A1 (B) and of H39P mutant (C) toward phenolic and estrogen substrates was carried out as described in Fig. 3. The glucuronides were separated by thin layer chromatography, visualized by autoradiography (shown in inset) (film exposure was for 6 days), and quantitated by liquid scintillation counting. The rate values are the mean of three experiments.

as endogenous compounds, such as hormones and other ligands of nuclear receptors. Thus, these enzymes constitute an effective barrier against the entry of potentially toxic substances and play an important role in the physiology of the cells by modulating the concentration of endogenous compounds. Therefore, the mechanism of the glucuronidation reaction as well as the molecular basis of their substrate specificity should be better understood. This work aims at providing more information on these two points.

Identification of amino acids that are essential for catalysis or governing the substrate specificity is a major issue in the understanding of the structure and function of UGTs. Based on kinetic and chemical modification studies as well as glycosylation mechanism supported by inverting glycosyltransferases, it was proposed that the reaction mechanism accounting for glucuronidation would involve a nucleophilic attack of the acceptor substrate on the C₁ atom of α -D-glucuronic acid, leading to the β -D-glucuronide formation and the release of UDP (15, 23). Such reaction is believed to proceed according to a S_N2 reaction mechanism with an oxocarbenium ion-like as the transition

Critical Determinants for Catalysis and Specificity of UGT1A

state. This type of mechanism would require a general base (histidine and/or aspartate/glutamate) for activation of the nucleophilic hydroxyl group of the acceptor substrate by deprotonation required for its transfer to glucuronic acid together with the departure of UDP.

In previous studies we suggested a carboxylic acid and a histidine residue to play crucial roles in the function of UGT1A6 from its susceptibility to be inactivated by dicyclohexylcarbodiimides and diethylpyrocarbonate, respectively (22, 23). Multiple sequence alignment of several human UGT isoforms with GT-B glycosyltransferases showed that His-370 belongs to the HX₇E (³⁷⁰HX₇E³⁷⁸ in UGT1A6) signature motif of this family of enzymes (25, 33). By analogy with the reaction mechanism that has been described for crystallized glycosyltransferases, we postulated that His-370 would stabilize the leaving UDP group during catalysis by neutralizing the negative charge of the pyrophosphate moiety (34). This assumption was recently supported by structure analysis of the C-terminal domain of UGT2B7 (residues 285–451) predicting that His-374 residue (His-370 in UGT1A6) interacts with the β -phosphate of the donor substrate UDP-GlcUA (14).

The identification of a putative crucial aspartic or glutamic acid residue acting as a catalytic amino acid will represent a step forward in understanding the glucuronidation process. In this study search for conserved carboxylic residues revealed the presence of 14 aspartic/glutamic acids present over the entire sequence. These positions are highly conserved among mammalian species, including rats and mice. To identify the catalytic residue, serial point mutations were undertaken, and the activity and kinetic parameters of the mutants were investigated upon expression in *P. pastoris*. Except for Asp-150 and Asp-488, the substitution of carboxylic residues by alanine led to active mutants but with decreased enzyme activity and lower affinity for both acceptor and donor substrates, 4-MU and UDP-GlcUA. This observation suggests that these carboxylic acid residues may modify the conformation of the enzyme or may be important in substrates binding. Interestingly, replacement of Asp-394 or Asp-397 by alanine induced a 25- and 22-fold increase in apparent K_m toward UDP-GlcUA, with no marked change in that of 4-MU, thus suggesting that these mutations specifically affected the binding of the donor substrate. Consistently, Asp-394 and Asp-397 are located in a consensus sequence found in all 110 members of the UGT superfamily (35). This signature sequence is believed to correspond to a series of aspartic acid residues that are known to participate in the binding of the common donor substrate, UDP-GlcUA. Our findings are consistent with Asp-394 and Asp-397 being important for the interaction of UGT1A6 with UDP-GlcUA. This is supported by structural analysis of the C-terminal domain of UGT2B7 that predicted that Asp-398 (Asp-394 in UGT1A6) interacts with GlcUA moiety of the co-substrate (14).

On the other hand, substitution of Asp-447 by alanine severely impaired the enzyme activity. However, our results showed that replacement with glutamic acid, an amino acid with similar polarity but with longer side chain, restored the activity of the enzyme but dramatically increased the K_m value toward the donor substrate, suggesting that this residue is likely

to be important in donor substrate binding and recognition. Furthermore, investigation of the role of Asp-446 of rat UGT1A6 (the counterpart of Asp-447 in human UGT1A6) showed that it was important in the enzyme function but not directly involved in catalysis and can be replaced by threonine or asparagine residues (36). In the case of Glu-461, although alanine replacement produced a severe decrease in UGT1A6 activity, our results indicated that introduction of a glutamine residue (Gln-461) sustained, to some extent, the enzyme activity, suggesting that the carboxyl group was not mandatory at this position.

In contrast, mutation of Asp-150 or Asp-488 by alanine completely abolished the enzyme activity, indicating that they were crucial for the enzyme function. The importance of these residues was further supported by the fact that their substitution by the alternate carboxyl amino acid failed to restore a significant activity. The Asp-488 residue belongs to a strictly conserved, negatively charged stretch of 10 amino acids located in the vicinity of the C-terminal side of the transmembrane segment of UGTs, which is expected to be an important signal in positioning and orientating the transmembrane domain (37, 38). Accordingly, mutation of Asp-488 with negatively charged residue glutamic acid (D488E) led to a mutant with detectable enzyme activity. This is in contrast with deleterious consequences of the mutation of this residue to a noncharged amino acid, alanine (D488A). However, replacement of Asp-488 by glutamic acid strongly increased the K_m value toward UDP-GlcUA, suggesting its implication in determining the interactions between the enzyme and the donor substrate. Consistent with our results, this residue belongs to a domain that has been shown to be critical for UGT2B13 activity, leading to the suggestion that this part of the protein exhibits rigid structural requirements to maintain UGTs in an active conformation (39).

By analogy with GT-B glycosyltransferases, whose three-dimensional structure has been solved, it was possible to suggest a role for the conserved carboxyl residues Glu-378 and Asp-150 of UGT1A6. Glu-378 belongs to the HX₇E signature motif (³⁷⁰HX₇E³⁷⁸ in UGT1A6) of GT-B glycosyltransferases where glutamic acid was shown to be important for the interaction with the ribose of UDP-GlcUA (25). In agreement, our results showed that exchanging this residue by alanine strongly decreased the V_{max} of the reaction and also highly increased the apparent K_m value (above 10 mM) of the enzyme for the donor substrate. Similarly, it is noteworthy that Asp-150 residue is conserved among UGTs and GT-B members. Mutation of this residue led to inactive UGT, except when glutamic acid was substituted to aspartic acid. However, the mutation strongly affected the V_{max} , with no marked change in the K_m values, thus suggesting that Asp-150 is important for catalysis and not for substrate recognition. Additionally, sequence alignment of UGT1A6 with T4-BGT (Fig. 1) indicated that Asp-150 of UGT1A6 corresponds to Asp-100 proposed as a catalytic base of T4-BGT enzyme (20). Consistently, mutations of Asp-148, Asp-152, and Asp-151 in other UGT isoforms UGT1A9, UGT1A4, and UGT1A1, respectively, similarly abrogated enzyme activity, suggesting that aspartic acid at position 150 in UGT1A6 and its counterpart in other UGTs is likely to be a catalytic residue. Analysis of the secondary structure of the

region encompassing residue Asp-150 in different UGT isoforms indicated that this aspartic residue is located in a loop between two α -helices, a position favoring the catalytic role of this residue.

According to the three-dimensional structure analysis of two GT-B glycosyltransferase members, MurG and VvGT1, histidine residues His-19 and His-20, respectively, were predicted to act as a general base to deprotonate the hydroxyl group of the acceptor (19). Sequence alignment of MurG, VvGT1, and UGT1A6 indicated that His-19 and His-20 of MurG and VvGT1, respectively, correspond to residue His-38 of UGT1A6. Mutation of His-38 by proline completely abolished UGT1A6 enzyme activity. Similar results were obtained when His-38 was replaced by alanine. However, substitution by arginine restored to some extent the enzyme activity and substrate specificity except for scopoletin that is not glucuronidated by the mutant. These results suggest that arginine may establish interactions with phenol substrates via the amine group leading to glucuronidation to some extent of these compounds. Interestingly, sequence alignment of different members of UGTs (Fig. 1) reveals that His-38 residue is highly conserved among UGT1A family, except for UGT1A4, where it is replaced by proline (Pro-40). UGT1A4 enzyme catalyzes the formation of *N*-glucuronides, and the only substrates accepted are primary, secondary, and tertiary amines among those are important antipsychotic drugs (4). However, UGT1A3, that is highly homologous to UGT1A4, glucuronidates a larger range of substrates. The presence of proline at position 40 (Pro-40) in UGT1A4 isoform was likely to play a pivotal role in the substrate specificity. Indeed, mutation of this residue to histidine (P40H) expanded the glucuronidation activity of the enzyme to phenol and carboxylic compounds, therefore leading to UGT1A3-type isoform in terms of substrate specificity. On the other hand, P40H mutation led to a loss of glucuronidation of secondary and tertiary amines but not of primary amines, suggesting that histidine residue may induce steric hindrance that alters the capacity of the binding site cavity to accommodate bulky amine substrates. In contrast, these changes favor the binding of small molecules such as 1-naphthol and 4-MU probably by establishing interactions between these substrates and histidine residues. Interestingly, mutation of Pro-40 residue to alanine (P40A) did not induce any changes in the substrate specificity of the enzyme, suggesting that alanine replacement did not alter the active site organization. These results indicated that the proline residue at position 40 is critical for glucuronidation of ternary amines and for the formation of quaternary amine glucuronides by human UGT1A4 enzyme.

Conversely, when the His-40 residue of UGT1A3 was replaced with proline (as found in UGT1A4), the substrate specificity shifted toward that of UGT1A4 as the enzyme was active only toward amine substrates but no longer glucuronidated carboxylic acids and phenols. Replacement by alanine (H40A) did not restore the glucuronidation activity of the enzyme toward phenolic and carboxylic acid compounds. These results reveal the key effect of histidine 40 residue in expanding the glucuronidation activity of UGT1A4 toward phenolic and carboxylic acid compounds possibly by increasing their reactivity via interaction with the imidazole group. The

importance of histidine residue at this position in glucuronidation of phenolic compounds was further confirmed by analyzing the effects of its mutation in UGT1A1 isoform. Indeed, replacement of His-39 of UGT1A1 by proline or alanine residues led to UGT1A1 mutant lacking glucuronidation activity toward phenols but still exhibiting detectable activity toward estrogens.

The binding site of UGTs is intrinsically promiscuous in nature, the residue at position 40 in UGT1A3 and UGT1A4 and its counterpart in UGT1A1 obviously play a crucial role in glucuronidation of phenolic and carboxylic substrates. Thus, it will be important to take into account the role of this key residue in further development of predictive models of the specificity of UGT1A4, UGT1A3, and UGT1A1. Similarly, Funhoff *et al.* (40) showed recently that a histidine residue plays an important role in positioning the substrate of the purple acid phosphatase, and Watts *et al.* (41) identified a single active site histidine residue governing substrate selection of aromatic lyase family.

In the absence of structure data of the full-length UGT and of the C-terminal domain that binds the acceptor substrate, the structure of the plant flavonoid glycosyltransferase VvGT1 has been used to generate a homology model of UGT2B7 (14). This model revealed that His-35 and Asp-151 of UGT2B7 were analogous to the predicted catalytic residues His-20 and Asp-119 of VvGT1 enzyme. Thus, the authors suggested that His-35 plays a role of the catalytic base to deprotonate the substrate, and the resulting protonated histidine is stabilized by Asp-151 (14). However, a histidine residue at this position is not strictly conserved among all UGT members. Indeed, two UGT isoforms, UGT1A4 and UGT2B10, have proline and leucine, respectively, instead of histidine at this position. Therefore, for these enzymes it is not clear which residue may act as a catalytic base to deprotonate the substrate. In addition, mutation of His-35 residue of UGT2B7 led to a mutant enzyme with residual activity for androsterone (14). Likewise, we showed here that mutation of this histidine residue in different UGT isoforms did not completely inactivate the enzymes, except for phenolic and carboxylic substrates.

Our study indeed suggests that this residue is more likely to confer glucuronidation activity toward phenolic and carboxylic compounds; it cannot be ruled out that it could also act to deprotonate these substrates. The resolution of the three-dimensional structure of the whole protein will surely bring a definitive answer to that question. Our study provides a step forward to better understanding of the glucuronidation mechanism. Such information is invaluable for a rational prediction of drug metabolism and toxicity in human.

REFERENCES

- Clarke, D. J., and Burchell, B. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 112, pp. 3–43, Springer, Berlin
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997) *Biochem. J.* **326**, 929–939
- Tukey, R. H., and Strassburg, C. P. (2000) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 581–616
- Green, M. D., King, C. D., Mojarrabi, B., Mackenzie, P. I., and Tephly, T. R. (1998) *Drug Metab. Dispos.* **6**, 507–512
- Kiang, T. K., Ensom, M. H., and Chang, T. K. (2005) *Pharmacol. Ther.* **106**, 97–132
- Radominska-Pandya, A., Czernik, P. J., Little, J. M., Battaglia, E., and

- Mackenzie, P. I. (1999) *Drug Metab. Rev.* **31**, 817–899
7. Tephly, T. R., and Burchell, B. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 276–279
 8. Ouzzine, M., Pillot, T., Fournel-Gigleux, S., Burchell, B., Siest, G., and Magdalou, J. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 196–204
 9. Bock, K. W., Forster, A., Gschaidmeier, H., Brück, M., Münzel, P., Schareck, W., Fournel-Gigleux, S., and Burchell, B. (1993) *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1809–1814
 10. Herber, R., Hercelin, B., Van Cantfort, J., De Graeve, J., Fournel-Gigleux, S., Taguchi, T., and Magdalou, J. (1995) *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1305–1314
 11. Bock, K. W. (1991) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 129–150
 12. King, C. D., Rios, G. R., Assouline, J. A., and Tephly, T. R. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 156–162
 13. Krishnaswamy, S., Hao, Q., Von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., and Court, M. H. (2004) *Drug Metab. Dispos.* **32**, 862–869
 14. Miley, M. J., Zielinska, A. K., Keenan, J. E., Bratton, S. M., Anna Radomska-Pandya, A., and Redinbo M. R. (2007) *J. Mol. Biol.* **369**, 498–511
 15. Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koea, J., and Imberty, A. (2006) *Glycobiology* **16**, 29–37
 16. Unligil, U. M., and Rini, J. M. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 510–517
 17. Hu, Y., Chen, L., Ha, S., Gross, B., Falcone, B., Walker, D., Mokhtarzadeh, M., and Walker, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 845–849
 18. Mulichak, A. M., Losey, H. C., Lu, W., Wawrzak, Z., Walsh, C. T., and Garavito, R. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9238–9243
 19. Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Turling, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J., and Davies, G. J. (2006) *EMBO J.* **25**, 1396–1405
 20. Lariviere, L., Gueguen-Chaignon, V., and Morera, S. (2003) *J. Mol. Biol.* **330**, 1077–1086
 21. Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J. W., Dixon, R. A., and Wang, X. (2005) *Plant Cell* **17**, 3141–3154
 22. Battaglia, E., Pritchard, M., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., Radomska, A., Siest, G., and Magdalou, J. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 266–272
 23. Battaglia, E., Senay, C., Fournel-Gigleux, S., Herber, R., Siest, G., and Magdalou, J. (1994) *FEBS Lett.* **346**, 146–150
 24. Ouzzine, M., Antonio, L., Burchell, B., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., and Magdalou, J. (2000) *Mol. Pharmacol.* **58**, 1609–1615
 25. Ha, S., Gross, B., and Walker, S. (2001) *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **1**, 201–213
 26. Ouzzine, M., Magdalou, J., Burchell, B., and Fournel-Gigleux, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31401–31409
 27. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
 28. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
 29. Lilienblum, W., Walli, A. K., and Bock, K. W. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**, 907–913
 30. Bansal, S. K., and Gessner, T. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 321–329
 31. Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*, pp. 18–99, John Wiley & Sons, Inc., New York
 32. Ouzzine, M., Barre, L., Netter, P., Magdalou, J., and Fournel-Gigleux, S. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 1953–1958
 33. Kapitonov, D., and Yu, R. K. (1999) *Glycobiology* **10**, 961–978
 34. Mulichak, A. M., Losey, H. C., Walsh, C. T., and Garavito, R. M. (2001) *Structure* **9**, 547–557
 35. Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belleranger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Rotter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., Tukey, R. H., and Nebert, W. (1997) *Pharmacogenetics* **7**, 255–269
 36. Iwano, H., Yokota, H., Ohgiya, S., Yotumoto, N., and Yuasa, A. (1997) *Biochem. J.* **325**, 587–591
 37. von Heijne, G. (1994) *Subcell. Biochem.* **22**, 1–19
 38. Harley, C. A., and Tipper, D. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24625–24633
 39. Li, Q., Lou, X., Peyronneau, M. A., Obermayer-Straub, P., and Tukey, R. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3272–3279
 40. Funhoff, E. G., Wang, Y., Andersson, G., and Averill, B. A. (2005) *FEBS J.* **272**, 2968–2977
 41. Watts, K. T., Mijts, B. N., Lee, P. C., Manning, A. J., and Schmidt-Dannert, C. (2006) *Chem. Biol.* **13**, 1317–1326
 42. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680

Aspartic acid and histidine residues mediate the reaction mechanism and the substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferases 1A

Dong Li*, Sylvie Fournel-Gigleux, Lydia Barré, Patrick Netter, Jacques Magdalou, Mohamed Ouzzine

UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy 1, Faculté de Médecine, BP 184, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

The study aims at identifying the aminoacids involved in substrate specificity and catalysis of UGT1A family. These isoforms glucuronidate diverse compounds, including phenols, carboxylic acids and amines. The acid-base reaction mechanism is believed to be supported by aspartic/glutamic acid and/or histidine residues.

UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6 have been expressed in the yeast *Pichia pastoris*. The importance and role of aminoacids were determined from sequence alignments of UGT and other glycosyltransferases, site-directed mutagenesis and kinetic analysis of the mutants.

Fourteen highly conserved aspartic/glutamic acids residues of UGT1A6 were individually mutated. The data showed that except for the D150A and D448A mutants that were inactive, alanine substitution at the other positions led to active proteins, which however presented a lower activity and affinity toward 4-methylumbelliferone and UDP-glucuronic acid. The results suggest that these residues may interact to various extend with the acceptor and donor substrates. Further analysis of the D150 and D448 residues with regard to the membrane topology of UGT and by analogy with crystallized T4-BGT glycosyltransferase suggested that D150 was a good candidate as a base catalyst. On the other hand, H39 is highly conserved in UGT1A family and corresponds to MurG H19 residue predicted to act as a catalytic base. However, this residue is replaced by proline (P40) in UGT1A4 which glucuronidates only amines, mainly anti-psychotic drugs. We investigated the role of this residue in UGT1A isoforms. Interestingly, when P40 was substituted into H40, UGT1A4 was able to glucuronidate phenols and carboxylic acids, like UGT1A3. Conversely, when H40 of UGT1A3 was mutated into P40, the mutant was not able to glucuronidate phenols and carboxylic acids. Finally, the substitution of H39 by P39 in UGT1A1 led to a loss of phenol glucuronidation, whereas that of estrogens was conserved. This study indicates that the substrate specificity of UGT1A is governed by H39 residue.

12th International Workshop "Glucuronidation and the UGT", Québec, Canada (Juillet 2008)