



HAL
open science

Contribution d'inhibiteurs compétitifs, de sondes électrophiles et de marqueurs de photoaffinité à l'étude du site actif de l'UDP-glucuronosyltransférase recombinante humaine UGT1*6 (conjugaison des composés phénoliques plans)

Eric Battaglia

► **To cite this version:**

Eric Battaglia. Contribution d'inhibiteurs compétitifs, de sondes électrophiles et de marqueurs de photoaffinité à l'étude du site actif de l'UDP-glucuronosyltransférase recombinante humaine UGT1*6 (conjugaison des composés phénoliques plans). Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1993. Français. NNT: 1993NAN10434 . tel-01747158

HAL Id: tel-01747158

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747158v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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 DE NANCY I

1993

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement
le 3 novembre 1993
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY 1**Mention Sciences du Médicament**

par

Eric BATTAGLIA

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

Sujet :

*Contribution d'inhibiteurs compétitifs, de sondes électrophiles et de marqueurs de photoaffinité à l'étude du site actif de l'UDP-glucuronosyltransférase recombinante humaine UGT1*6 (conjugaison des composés phénoliques plans)*

MEMBRES DU JURY :

Président : G. SIEST, Professeur (Nancy)

Rapporteurs : J.H. VAN BOOM, Professeur (Leiden, Pays-Bas)
G. VERGOTEN, Professeur (Villeneuve d'Ascq, France)

Juges : G. BRANLANT, Professeur (Nancy)
S. FOURNEL-GIGLEUX, Chargée de Recherche INSERM (Nancy)
J. MAGDALOU, Directeur de Recherche CNRS (Nancy)



104 030199 2

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES DE NANCY I

Année Universitaire 1993/1994

Membres du personnel enseignant

DOYENC. VIGNERON

VICE DOYENG. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

| | | | |
|------|-----------------|----|-------------------|
| M. | BERNANOSE André | M. | MIRJOLET Marcel |
| Mlle | BESSON Suzanne | M. | PIERFITTE Maurice |
| Mlle | GIRARD Thérèse | M. | RICHARD Georges |
| M. | MEUNIER André | M. | SOLEIL Jean |

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

| | | |
|------|-------------------------|---|
| M. | ATKINSON Jeffrey | Pharmacodynamie |
| M. | BAGREL Alain | Biochimie fondamentale et clinique, biotechnologies |
| Mlle | BATT Anne Marie | Toxicologie |
| M. | BLOCK Jean Claude | Santé et Environnement |
| M. | BONALY Roger | Biochimie microbienne |
| Mme | FINANCE Chantal | Microbiologie moléculaire |
| Mlle | GALTEAU Marie Madeleine | Biochimie |
| M. | HAYON Jean Claude | Botanique |
| M. | HOFFMAN Maurice | Pharmacie galénique |
| M. | JACQUE Michel | Pharmacodynamie |
| M. | LABRUDE Pierre | Physiologie |
| M. | LALLOZ Lucien | Chimie Organique |
| M. | LECTARD Pierre | Biologie végétale et Cryptogamie |
| M. | LEMAY René | Droit et économie pharmaceutique |
| M. | LOPPINET Vincent | Chimie thérapeutique |
| M. | MAINCENT Philippe | Pharmacie galénique |
| M. | MARSURA Alain | Chimie thérapeutique |
| M. | MARTIN Jean Armand | Chimie minérale et Minéralogie |
| M. | MORTIER François | Pharmacognosie |
| M. | NICOLAS Alain | Chimie analytique et Bromatologie |
| Mme | SCHWARTZBROD Janine | Bactériologie - Parasitologie |
| M. | SCHWARTZBROD Louis | Virologie - Immunologie |
| M. | SIEST Gérard | Chimie biologique |
| M. | VIGNERON Claude | Hématologie |

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M. BODMEIER Roland
M. ICHINO Kazuhiko
M. LADURON Pierre
M. LEVY Jean Claude
Mme STREIBLOVA Eva

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|-----------------------------------|--|
| Mme ALBERT Monique | Bactériologie - Virologie |
| M. BAUDOT Philippe | Toxicologie |
| Mme BENOIT Emmanuelle | Chimie analytique |
| M. BONNEAUX François | Chimie thérapeutique |
| Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine | Pharmacodynamie |
| M. CATAU Gérald | Pharmacodynamie |
| M. CHEVIN Jean Claude | Chimie minérale |
| Mme COLLOMB Jocelyne | Parasitologie |
| M. COULON Joël | Biochimie |
| M. DECOLIN Dominique | Chimie analytique |
| Mle FRIANT Pascale | Biophysique et Mathématiques |
| Mme FUZELLIER Marie Claude | Pharmacognosie |
| M. GHERMANI Nour-Eddine | Biophysique - Biomathématiques |
| Mle HINZELIN Françoise | Biologie végétale et Pharmacognosie |
| Mme HOFFMAN Marie Antoinette | Pharmacie galénique |
| M. HUMBERT Thierry | Interactions moléculaires |
| Mle IMBS Marie Andrée | Bactériologie - Virologie et Parasitologie |
| Mme KEDZIEREWICZ Francine | Pharmacie galénique |
| Mle LARTAUD Isabelle | Pharmacologie |
| Mme LEININGER MULLER Brigitte | Biochimie |
| M. LEROY Pierre | Chimie analytique |
| Mme LETOT Michèle | Bactériologie - Virologie et Parasitologie |
| Mme LIVERTOUX Marie Hélène | Toxicologie |
| Mme MARCHAND-ARVIER Monique | Immunologie - Hématologie |
| M. MENU Patrick | Physiologie |
| M. MIGNOT Bernard | Physique |
| M. MONAL Jean Louis | Chimie thérapeutique |
| M. NOTTER Dominique | Biologie cellulaire |
| Mme PAULUS Francine | Informatique |
| Mme PERDIAKIS Christine | Chimie organique |
| Mme PICHON Virginie | Biophysique et Mathématiques |
| Mme POCHON Marie France | Chimie analytique |
| Mme ROVEL Anne | Immunologie - Hématologie |
| M. VISVIKIS Athanase | Toxicologie |
| Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika | Biochimie |

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES OU INVITES

M. BOIS Yves
Mme ARNAUD Françoise

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

| | |
|----------------------------|---------------------|
| Mme BERTHE Marie-Catherine | Biochimie |
| M. DANGIEN Bernard | Botanique |
| Mme MOREAU Blandine | Pharmacognosie |
| Mme MOUREY Michèle | Cryptogamie |
| Mme PAVIS Annie | Parasitologie |
| M. TROCKLE Gabriel | Pharmacodynamie |
| Mme ZINUTTI Colette | Pharmacie galénique |

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

| | |
|----------------------|--|
| Mle BOUHMAIDA Nouzha | Biophysique et mathématiques : Physique |
| Mle FAIVRE Béatrice | Hématologie et Biologie Cellulaire |
| M. FERRARI Luc | Biochimie |
| M. THERY Vincent | Mathématiques et informatique pharmaceutique |
| Mle UBRICH Nathalie | Biophysique et mathématiques : Informatique |
| M. VIARD Benoît | Biochimie |

MONITEURS D'INITIATION A L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

| | |
|--------------------------|---------------------------|
| Mle EVRARD Anne | Biochimie clinique |
| M. HELDER Rémi | Physiologie - Hématologie |
| Mle LEONARD Isabelle | Chimie analytique |
| Mle MAGDALINIUK Sandrine | Biologie cellulaire |

DOCTEURS HONORIS CAUSA

| | |
|------------------------|-----------------------|
| M. ANDERSON Norman G. | Illinois - USA |
| M. BETTOLO Marini | Rome - ITALIE |
| M. BLOCH Konrad E. | Massachusetts - USA |
| M. BOVET Daniel | Rome - ITALIE |
| M. DUTTON Geoffrey J. | Dundee - ECOSSE |
| M. GHUYSEN Jean Marie | Liège - BELGIQUE |
| M. HEIDELBERGER | New Jersey - USA |
| M. KOFOD Helmer | Copenhague - DANEMARK |
| M. PARRAS FARRAS Ramon | Barcelone - ESPAGNE |

| |
|------------------------|
| CHARGES D'ENSEIGNEMENT |
|------------------------|

| | | |
|-----|--------------|---|
| M. | AZRIA | Pharmacologie |
| M. | BARADEL | Conseils vétérinaires |
| Mme | BLOCH | Gynécologie |
| M. | CAMUZEUX | Hospitalisation à domicile |
| M. | CHARPIGNON | Gestion, commercialisation |
| M. | DANOUX | Comptabilité |
| M. | DEMANGE | Pharmacie clinique |
| M. | DOUCHE | Services de la Distribution pharmaceutique |
| Mme | EVARD | Services de la Distribution pharmaceutique |
| M. | FRANCAIS | Services de la Distribution pharmaceutique |
| M. | GABLE | Maintien à domicile |
| M. | GIESENFELD | Pharmacie clinique |
| M. | GILGENKRANTZ | Génétique |
| M. | HACHET | Services de la Distribution pharmaceutique |
| M. | JACQUOT | Assurance - qualité |
| M. | JOUAULT | Services de la Distribution pharmaceutique |
| Mme | LABAEYE | Audiologie |
| M. | LAMOTTE | Physique (acoustique) |
| M. | LE FLOCH | Gestion, Droit du travail, Droit commercial |
| M. | LEVIN | Services de la Distribution pharmaceutique |
| M. | LOUIS | Séméiologie |
| Mle | MANGIN | Pharmacie clinique |
| M. | MAUURY | Séméiologie |
| M. | MAY | Maladies infectieuses |
| M. | NICOLAY | Anatomie |
| M. | PARDON | Services de la Distribution pharmaceutique |
| Mle | PICAUT | Pharmacie clinique |
| M. | RENAUX | Secourisme |
| M. | RETOURNARD | Electronique |
| M. | ROLLET | Secourisme |
| M. | ROUYER | Législation, Podologie, Orthopédie |
| M. | SIMON | Audiologie |
| M. | TRECHOT | Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments |
| M. | TURKAWKA | Relations humaines, techniques de la communication |
| Mle | WOLF | Services de la Distribution pharmaceutique |

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires suivants :

Centre du Médicament (URA CNRS 597)
30 rue Lionnois
54000 NANCY
(Pr G. Siest et Pr A.M. Batt)

Gastroenterology Division
University of Arkansas for Medical Sciences
4301 West Markham
Little Rock, Arkansas (USA)
(Dr R. Lester)

UFR Chimie
Université des Sciences et Techniques
59650 Villeneuve d'Ascq
(Pr G. Vergoten)

AVANT PROPOS

Je tiens à remercier

M. le Professeur G. Siest de m'avoir accueilli au Centre du Médicament et fait confiance depuis mon DEA. Je lui exprime mon profond respect et le remercie de présider ce jury de thèse.

M. le Docteur J. Magdalou. Vous m'avez accueilli dans votre équipe et soutenu tout au long de ce travail. C'est grâce à l'intérêt que vous avez porté à mon travail que je peux présenter aujourd'hui cette thèse. Recevez toute ma gratitude et ma considération.

Mme le Docteur S. Fournel-Gigleux, pour son aide efficace, ses conseils et ses qualités humaines remarquables.

M. le Professeur G. Vergoten. Vous m'avez accueilli avec spontanéité dans votre laboratoire afin de m'initier à la manipulation du logiciel SYBYL en particulier. Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance pour l'accueil chaleureux, typiquement ch'ti, et pour votre contribution à ce travail. Veuillez trouver l'expression de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie particulièrement M. le Professeur J.H. van Boom qui m'a fait l'honneur d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Votre notoriété scientifique est internationalement reconnue. Je suis extrêmement sensible à l'honneur que vous me faites aujourd'hui en acceptant de juger ce travail.

M. le Professeur G. Branlant. Votre notoriété internationale dans le domaine de l'enzymologie nous a conduit à vous demander de faire partie de ce jury de thèse. Votre argumentation est particulièrement indispensable à la valorisation de ce travail.

M. le Docteur A. Ellass. Il s'est investi dans le travail de modélisation moléculaire effectué lors de mon séjour à Lille, malgré ses multiples occupations et les sollicitations de chacun. Amitiés.

A mes autres amis lillois du laboratoire, mangeurs de sandwiches beurrés au gouda et buveurs de bière.

M. le Docteur R. Lester. Vous m'avez accueilli avec bienveillance durant 4 mois dans votre laboratoire à Little Rock. L'intérêt que vous avez montré pour mon travail a été une source de motivation supplémentaire. Veuillez trouver toute l'expression de ma reconnaissance.

Mme le Docteur A. Radomska. Je ne peux oublier l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé à Little Rock. Mon séjour dans votre équipe demeure une satisfaction immense.
"OK, let's go "ome" and have some rolled cabbage"

A tous mes amis de Little Rock.

F. Sar, pour son amicale disponibilité et son aide efficace durant la rédaction de ce manuscrit.

M. Said, qui a participé à la réalisation d'une partie de ce travail. Cette collaboration fut des plus amicales.

C. Lafaurie, R. Herber, F. Hasser, qui ont contribué à la réalisation de ce travail et m'ont apporté leur bonne humeur et leur gentillesse durant mon séjour au Centre du Médicament.

A tous ceux qui ont contribué à ce travail ou à la réalisation de ce manuscrit.

A tous mes amis et à tous ceux qui me sont chers.

A mes parents, mes frères et soeur, à toute ma famille qui attend ce jour. Trouvez dans ce travail votre faible récompense.

A la mémoire de mes grands-parents.

sommaire



| | |
|--|----|
| ETAT DES CONNAISSANCES | 1 |
| I. Place des UDP-glucuronosyltransférases dans le métabolisme des médicaments | 1 |
| II. UDP-glucuronosyltransférases et glucuroconjugaison | 1 |
| II.1. Multiplicité des UGT | 1 |
| II.2. Nomenclature des UGT | 2 |
| II.3. Latence et phospholipodépendence | 3 |
| II.4. Structure des UGT..... | 4 |
| II.5. Mécanisme de la glucuroconjugaison..... | 6 |
| II.6. Mécanisme de fixation des substrats..... | 7 |
| II.7. Lignées cellulaires recombinantes et UGT1*6..... | 8 |
| III. Stratégie d'étude du site actif. Résidus essentiels | 9 |
| III.1. Présentation des approches utilisées | 9 |
| III.2. Inhibiteurs compétitifs..... | 10 |
| III.2.1. Inhibiteurs de l'état final | 10 |
| III.2.1.1. Principe et applications..... | 10 |
| III.2.1.2. Cas des UGT..... | 11 |
| III.2.2. Inhibiteurs de l'état de transition..... | 12 |
| III.2.2.1. L'état de transition enzymatique..... | 12 |
| III.2.2.2. Les analogues de l'état de transition | 13 |
| III.2.2.3. Analogues hypothétiques de l'état de transition des UGT..... | 14 |
| III.3. Modélisation moléculaire et étude du site actif : relation structure-activité..... | 16 |
| III.3.1. Principe | 16 |
| III.3.2. Relation quantitative structure-activité appliquée aux UGT..... | 18 |
| III.3.3. Méthode comparative d'analyse des champs moléculaires..... | 18 |
| III.4. Les sondes électrophiles..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| III.4.1. Introduction : rôle des acides aminés dans la structure et la fonction des protéines | 20 |
| III.4.2. Classification des inhibiteurs irréversibles..... | 21 |
| III.4.3. Modification des cystéines par les maléimides | 22 |
| III.4.4. Modification chimique des résidus histidine par le diéthyl pyrocarbonate | 24 |
| III.4.5. Modification des acides carboxyliques..... | 26 |
| III.4.6. Autres réactifs..... | 27 |
| III.4.7. Applications aux UGT | 29 |
| III.5. Sondes photoactivables..... | 30 |
| III.5.1. Principe du marquage de photoaffinité..... | 31 |
| III.5.2. Les groupements photoactivables..... | 32 |
| III.5.2.1. Carbènes et nitrènes..... | 33 |
| III.5.2.2. Variabilité des ligands et des fonctions photoactivables | 34 |
| III.5.3. Cas particulier : marquage de photoaffinité direct..... | 35 |
| III.5.4. Principales applications des sondes photoactivables | 36 |
| III.5.4.1. Identification d'un récepteur | 36 |
| III.5.4.2. Caractérisation structurale d'un récepteur | 36 |
| III.5.5. UGT et marqueurs de photoaffinité | 38 |
| III.5.5.1. Marquage de photoaffinité de l'UGT-morphine par le Flunitrazepam | 38 |
| III.5.5.2. L'acide azido-UDP-glucuronique | 38 |
| III.5.5.3. Quelques autres exemples de sondes photoactivables potentielles des UGT..... | 39 |
| OBJECTIFS DU TRAVAIL..... | 40 |
| MATERIELS ET METHODES..... | 41 |
| I. Microsomes de foie de rat..... | 41 |
| I.1. Induction au 3-méthylcholanthrène et au clofibrate | 41 |
| I.2. Fractions subcellulaires microsomales..... | 41 |
| I.3. Solubilisation des microsomes | 41 |

| | |
|---|----|
| II. Culture de la lignée recombinante V79-UGT1*6 | 42 |
| II.1. Milieu de culture et lignée cellulaire..... | 42 |
| II.2. Préparation des fractions membranaires..... | 42 |
| III. Electrophorèse et immunorévélation de l'UGT1*6 | 43 |
| III.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide..... | 43 |
| III.2. Immunorévélation..... | 43 |
| IV. Dosage des activités UGT | 45 |
| IV.1. Glucuroconjugaison de la 4-méthylumbelliféone..... | 45 |
| IV.2. Glucuroconjugaison du 1-naphtol..... | 45 |
| IV.3. Glucuroconjugaison de la bilirubine..... | 45 |
| IV.4. Evaluation générale d'activités de glucuroconjugaison..... | 47 |
| V. Inactivation des UGT par modification chimique | 49 |
| V.1. Préparation des inhibiteurs irréversibles..... | 49 |
| V.2. Inactivation par le DEPC..... | 49 |
| V.2.1. Cinétique d'inactivation..... | 49 |
| V.2.2. Réversibilité de l'inactivation par l'hydroxylamine..... | 50 |
| V.2.3. Photoincorporation de l'acide azido-UDP-glucuronique en présence de l'enzyme inactivée par le DEPC..... | 50 |
| V.2.4. Inactivation en présence de substrat..... | 51 |
| V.3. Inactivation par les dérivés maléimides..... | 51 |
| V.4. Etude de l'effet du dithiothréitol et du chlorure de cuivre..... | 52 |
| V.5. Effet du <i>N</i> -acétyl imidazole et du dicyclohexylcarbodiimide..... | 53 |
| V.6. Inactivation par le NBD-Cl de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO dans les fractions solubilisées de microsomes de foie de rat..... | 53 |
| VI. Inhibiteurs réversibles | 53 |
| VI.1. Détermination spectrophotométrique des concentrations..... | 54 |

| | |
|---|-----------|
| VI.2. Préincubation des fractions membranaires en présence de phénylméthylsulfonylfluorure | 54 |
| VI.3. Détermination des constantes d'inhibition..... | 55 |
| VI.4. Marquage de photoaffinité des fractions membranaires par l'acide [β - ³² P]5-azido UDP-glucuronique en présence de ligands des UGT..... | 55 |
| VI.5. Etude d'une préincubation de PP56B avec les fractions membranaires sur la photoincorporation de l'acide [β - ³² P]5-azido UDP-glucuronique et sur l'activité de l'UGT1*6..... | 56 |
| VII. Marquage de photoaffinité..... | 57 |
| VII.1. acide [β - ³² P]5-azido UDP-glucuronique | 57 |
| VII.1.1. Synthèse | 57 |
| VII.2. Purification de l'UGT1*6 marquée par électrophorèse préparative..... | 59 |
| VII.3. Glucuronide de 8-azido-2-naphtol | 60 |
| VII.3.1. Synthèse du 8-azido-2-naphtol..... | 60 |
| VII.3.2. Synthèse du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide..... | 61 |
| VII.3.3. Stabilité | 62 |
| VII.3.4. Photochimie | 62 |
| VII.3.5. Inactivation de l'enzyme recombinante par le 8-azido-2-naphtol- β -D glucuronide..... | 63 |
| VII.3.6. Stabilité du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide dans le milieu d'incubation..... | 63 |
| VII.3.7. Marquage covalent des fractions membranaires par le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- ¹⁴ C(U)] | 64 |
| VII.3.7.1. Identification de l'UGT1*6..... | 64 |
| VII.3.7.2. Influence du pH..... | 65 |
| VIII. Alignement de séquences protéiques et profil d'hydrophobie..... | 65 |
| IX. Modélisation moléculaire | 66 |
| IX.1. Matériels et construction des composés PP..... | 66 |

| | |
|---|-----|
| IX.2. Analyse conformationnelle..... | 66 |
| IX.3. Méthode d'analyse comparative de champs moléculaires | 67 |
| RESULTATS ET DISCUSSION | 69 |
| I. Préparation des fractions membranaires de la lignée cellulaire recombinante V79-UGT1*6 et optimisation du dosage de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO | 69 |
| I.1. Fractions membranaires | 69 |
| I.2. Optimisation de la mesure d'activité enzymatique..... | 69 |
| II. Inhibiteurs réversibles de l'UGT1*6 et état de transition .. | 74 |
| II.1. Structures | 74 |
| II.2. Stabilité en présence des fractions membranaires | 77 |
| II.3. Effet des composés sur la fixation covalente de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ | 77 |
| II.4. Influence des modifications structurales sur le pouvoir inhibiteur | 80 |
| II.4.1. Détermination des IC ₅₀ et K _i | 80 |
| II.4.2. Approche du mécanisme de fixation des substrats..... | 84 |
| II.4.3. Interactions au niveau du site UDPGA. Effet synergique | 86 |
| II.4.4. Processus de fixation de PP56B..... | 88 |
| II.4.5. L'état de transition de l'UGT1*6..... | 90 |
| II.4.5.1. Modélisation moléculaire des inhibiteurs..... | 91 |
| II.4.5.2. Alignement des inhibiteurs avec le composé TS..... | 93 |
| II.4.5.3. Rôle des divers groupements dans la fixation à l'état de transition enzymatique..... | 97 |
| II.4.5.4. Etat de transition de l'UGT1*6 et libération des produits | 99 |
| II.4.5.5. Conclusion..... | 100 |
| II.4.6. Modèles QSAR | 100 |
| II.4.6.1. Modèle CoMFA | 100 |

| | |
|--|------------|
| II.4.6.2. Modèle des angles τ | 101 |
| II.4.6.3. Modèle des angles τ associé au modèle CoMFA | 102 |
| II.4.6.4. Modèle tridimensionnel d'interaction stérique et électrostatique..... | 104 |
| III. Effet du pH sur les paramètres cinétiques de l'UGT1*6 ... | 108 |
| IV. Modification chimique de l'UGT1*6 | 112 |
| IV.1. Inactivation de l'UGT1*6 par le diéthyl pyrocarbonate | 112 |
| IV.1.1. Influence de la concentration en diéthyl pyrocarbonate | 112 |
| IV.1.2. Cinétique d'inactivation..... | 113 |
| IV.1.3. Réversibilité de l'inactivation en présence d'hydroxylamine | 116 |
| IV.1.4.Effet d'une inactivation partielle sur les constantes cinétiques | 119 |
| IV.1.5. Effets de la fixation des ligands de l'UGT1*6 sur l'inactivation..... | 121 |
| IV.1.6. Effet d'une inactivation partielle de l'UGT1*6 par le DEPC sur la fixation covalente de la sonde photoactivable [β - ³² P]5N ₃ -UDPGA | 128 |
| IV.1.7. Détermination du pKa du résidu modifié | 130 |
| IV.1.8 Effet du DEPC sur d'autres activités UGT | 131 |
| IV.1.9. Les résidus histidines conservés au sein des UGT | 132 |
| IV.1.10. Profil d'hydrophobie de l'UGT1*6..... | 137 |
| IV.1.11. Effet du DEPC sur le mutant histidine 54 alanine (H54A)..... | 139 |
| IV.2. Effet d'autres agents de modification chimique sur les UGT | 142 |
| IV.2.1. Rôle des cystéines | 142 |
| IV.2.2. Effet du NBD-Cl sur l'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol dans les fractions solubilisées de microsomes de foie de rat | 145 |
| IV.2.3. Inactivation par le dicyclohexylcarbodiimide..... | 148 |
| IV.3. Proposition d'un mécanisme catalytique | 150 |
| V. Marquage de photoaffinité des UGT | 155 |
| V.1. Sonde [β - ³² P]5N ₃ -UDPGA | 155 |

| | |
|---|-----|
| V.1.1. Identification des UGT..... | 155 |
| V.1.2. Purification de l'UGT1*6 par électrophorèse préparative | 156 |
| V.2. Glucuronide de 8-azido-2-naphtol | 158 |
| V.2.1. Glucuronoconjugaison des analogues photoactivables du naphtol par les UGT de foie de rat | 158 |
| V.2.2. Synthèse du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide (NAG)..... | 161 |
| V.2.3. Photochimie | 161 |
| V.2.4. Stabilité du glucuronide en présence des fractions membranaires | 165 |
| V.2.5. Effet d'une irradiation sur la glucuronoconjugaison par l'UGT1*6 en présence de NAG..... | 165 |
| V.2.6. Marquage de photoaffinité des fractions membranaires par le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- 14 C (U)] | 166 |
| V.2.6.1. Identification de l'UGT1*6 par immunoblot..... | 166 |
| V.2.6.2. Effet du pH sur la photoincorporation de la sonde..... | 168 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 171 |
| BIBLIOGRAPHIE | 173 |
| PUBLICATIONS | 187 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate
CHAPS : (3-[3-cholamidopropyl]diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CoMFA : comparative molecular field analysis
DCCI : dicyclohexylcarbodiimide
DEAE : diéthylamino éthyl
DEPC : diéthyl pyrocarbonate
DIDS : acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
DTT : dithiothréitol
EDTA : éthylène diamine tétraacétate dihydrate
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HSSP : homology-derived secondary structure of proteins
IC₅₀ : concentration inhibitrice 50
IgG : immunoglobuline G
3-MC : 3-méthylcholantène
4-MO : 4-méthylombelliférone
4-MOG : 4-méthylombelliférone- β -D-glucuronide
NAI : *N*-acétylimidazole
NAG : 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide
NBT : nitro blue tetrazolium
NBD-Cl : 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
NEM : *N*-éthylmaléimide
NPM : *N*-phénylmaléimide
Butyl-PBD : [2-biphényl-4-yl-5(4-tert-butylphényl)-1,3,4-oxadiazole]
PBS : phosphate buffer saline
PEI : polyéthylène imine
PLS : partial least square
PMSF : phénylméthylsulfonylfluorure
QSAR : quantitative structure-activity relationship
RMN : résonance magnétique nucléaire
TBST : tris buffer saline tween
TCA : acide trichloroacétique
TEMED : *N,N,N',N'*-tétraméthyl-éthylènediamine
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofuranne
UDP : uridine 5'-diphosphate
UDPG : uridine 5'-diphospho-glucose
UDPGA : acide uridine 5'-diphospho-glucuronique
UGT : uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase
SAB : sérum albumine bovine
SDS : sodium dodécyl sulfate
S_N1 : substitution nucléophile de premier ordre
S_N2 : substitution nucléophile de deuxième ordre

**état des
connaissances**



I. PLACE DES UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASES DANS LE METABOLISME DES MEDICAMENTS

L'élimination des xénobiotiques de l'organisme nécessite en général une transformation des composés en métabolites plus solubles pouvant être excrétés dans la bile ou l'urine. Le métabolisme enzymatique est sous la dépendance des enzymes de phase I (phase de fonctionnalisation) et de phase II (phase de conjugaison). Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) appartiennent à cette seconde catégorie. La variété des composés d'origine endogène et exogène conjugués à l'acide glucuronique (substrat donneur : acide- α -D-UDP-glucuronique, UDPGA) démontre la contribution essentielle des UGT dans le processus de détoxification de l'organisme. Tephly et Burchell (1990) ont souligné qu'un grand nombre de composés tels que les polluants possèdent des fonctions polaires et sont directement glucuronoconjugués sans être d'abord métabolisés par les enzymes de phase I. Bock (1991) a rappelé la contribution des UGT dans l'élimination de certains métabolites de composés carcinogènes tels que les composés aromatiques polycycliques.

Les UGT sont aussi largement impliquées dans l'élimination de composés endogènes. Matern *et al.* (1991) ont purifié et caractérisé une UGT impliquée dans la glucuronoconjugaison des acides biliaires chez l'homme. La glucuronoconjugaison des hormones stéroïdiennes contribue à limiter leur taux dans le corps humain en facilitant leur excrétion (Mackenzie *et al.*, 1992). Enfin, Ritter *et al.* (1991) ont cloné et exprimé deux ADNc d'UGT impliquées dans la glucuronoconjugaison hépatique de la bilirubine.

II. UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE ET GLUCURONOCONJUGAISON

II.1. Multiplicité des UGT

La glucuronoconjugaison s'effectue principalement dans le foie, mais la localisation des UGT est très ubiquitaire. Ainsi des activités de glucuronoconjugaison ont été mises en évidence dans la peau (Pham *et al.*, 1989), l'intestin (Koster et Noordhoek, 1983), le cerveau (Leininger *et al.*, 1991 ; Oka *et al.*, 1992) et l'épithélium nasal (Lazard *et al.*, 1991).

Le concept de la multiplicité des UGT a d'abord été formulé sur la base de l'induction différentielle des activités de glucuroconjugaison de divers substrats, la variabilité de la distribution tissulaire, la mise en évidence de déficiences de certaines activités de glucuroconjugaison ou encore l'évolution des activités de glucuroconjugaison durant l'ontogénèse (Mulder *et al.*, 1990). La mise au point de techniques de purification (Tephly, 1990) et l'expression hétérologue dans des lignées cellulaires eucaryotiques telles que les cellules COS (Harding *et al.*, 1988) ou V79 (Fournel-Gigleux *et al.*, 1990) ont permis de démontrer sans ambiguïté la multiplicité des isoformes. La variabilité des substrats pris en charge par une même isoforme et le chevauchement de la spécificité de substrat étendue à plusieurs isoformes ont été mis en évidence grâce à la purification ou à l'expression hétérologue des UGT. Ainsi, l'isoforme recombinante humaine HP4 exprimée dans la lignée V79 conjugue des substrats aussi différents que l'acide rétinoïque, le propranolol ou la 4-méthylumbelliférone (Ebner et Burchell, 1993). Ce dernier composé est en outre substrat de l'isoforme HP1 (UGT1*6) (Bock *et al.*, 1993). Par ailleurs, la spécificité de substrat peut être large ou étroite suivant les isoformes. Ainsi l'isoforme recombinante 2B1 prend en charge des substrats aussi variés que les acides gras, la morphine, la 4-méthylumbelliférone et la testostérone alors que l'isoforme recombinante 2B4 métabolise uniquement l'acide hyodéoxycholique (Fournel-Gigleux *et al.*, 1990).

II.2. Nomenclature des UGT

Une trentaine d'ADNc a été séquencée à ce jour. Une nomenclature, similaire à celle proposée pour les cytochromes P450, a été proposée pour les UGT sur la base de l'évolution divergente des gènes (Burchell *et al.*, 1991). Deux familles et trois sous-familles ont été définies sur la base de l'analyse des séquences en acides aminés déduites des ADNc, la classification se faisant selon une valeur limite de divergence entre les séquences de 50 %. Chaque gène est nommé par l'abréviation "UGT" suivi d'un chiffre caractérisant la famille génique, puis d'une lettre caractérisant la sous-famille et enfin d'un chiffre représentant le gène. La présence d'un phénomène d'épissage alternatif est repéré par un astérisque dans la nomenclature du gène ou de la protéine correspondante (cas de l'UGT1*6 par exemple).

II.3. Latence et phospholipidodépendance

Les UGT sont des enzymes exclusivement membranaires, principalement localisées dans le réticulum endoplasmique lisse et, dans une moindre mesure, dans la membrane périnucléaire (Mulder, 1992). L'activité enzymatique des UGT est sous dépendance stricte des phospholipides (Zakim *et al.*, 1988).

L'utilisation de détergents perturbant la membrane microsomale permet d'augmenter l'activité de glucuroconjugaison. La latence des activités enzymatiques des UGT a été expliquée par la localisation du site actif du côté luminal des microsomes. La vitesse de glucuroconjugaison dans les microsomes natifs pourrait être limitée par l'accessibilité des substrats au site actif : Boyer *et al.* (1980) ont montré que le transfert de l'oestrone jusqu'au site actif des UGT pouvait se faire par contact entre vésicules phospholipidiques sans passage dans le milieu aqueux. La contribution de la membrane phospholipidique sur l'activité de glucuroconjugaison de composés lipophiles dans les microsomes natifs s'expliquerait plus vraisemblablement par l'accessibilité limitée de l'UDPGA au site actif. La latence serait ainsi levée en présence de détergent qui faciliterait l'accessibilité au site de glucuroconjugaison du substrat donneur hydrophile (Tephly et Burchell, 1990). En fait, le mécanisme par lequel l'UDPGA accède au site actif des UGT est encore controversé. Zakim et Dannenberg (1992) ont rappelé les deux modèles hypothétiques tentant d'expliquer la latence des activités de glucuroconjugaison dans les microsomes natifs :

- l'hypothèse de la compartimentation envisage un transporteur membranaire d'UDPGA impliqué dans le passage de ce composé jusqu'au site actif (luminal) des UGT. En présence de détergent, la latence est levée car l'accessibilité de l'UDPGA au site actif des UGT n'est plus limitée.

- l'hypothèse de contrainte conformationnelle explique le phénomène de latence des UGT par l'existence de conformations distinctes des UGT dans les microsomes natifs et dans les microsomes traités aux détergents. L'interaction phospholipides-enzyme maintient, à l'état latent, la conformation dans un état correspondant à une faible activité. L'addition d'agents activateurs modifie cette interaction et conduit à des changements conformationnels se

traduisant par une augmentation de l'activité. Zakim et Dannenberg (1992) favorisent cette dernière hypothèse en soulignant que leurs travaux ont montré le rôle prépondérant de l'interaction phospholipides-UGT dans la modulation de l'activité, la spécificité catalytique, l'affinité et la nature de la cinétique de glucuroconjugaison.

Hauser *et al.* (1988) ont montré que le transport de l'UDPGA à l'intérieur des microsomes est saturable et peut être inhibé par des inhibiteurs du transport des anions (SITS, DIDS, probénécide). Milla *et al.* (1992) ont démontré que le phénomène de transport de l'UDPGA et d'autres sucres nucléotidiques dépend de la température et est sensible à des inhibiteurs compétitifs. En outre, un transporteur membranaire a été partiellement purifié au cours de ce même travail, ce qui tend à conforter l'hypothèse de la compartimentation impliquant un transport actif de l'UDPGA.

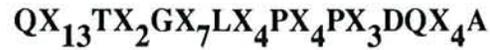
II.4. Structure des UGT

La détermination du profil d'hydrophobie par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) a suggéré qu'un seul fragment peptidique, localisé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, serait transmembranaire (Mackenzie, 1986^a ; Jackson et Burchell, 1986). L'utilisation combinée d'anticorps anti-UGT et de protéases sur des microsomes natifs et traités avec des détergents (Vanstapel et Blanckaert, 1988 ; Shepherd *et al.*, 1989 ; Yokota *et al.*, 1992) a permis de proposer un modèle topologique pour les UGT (figure 1).

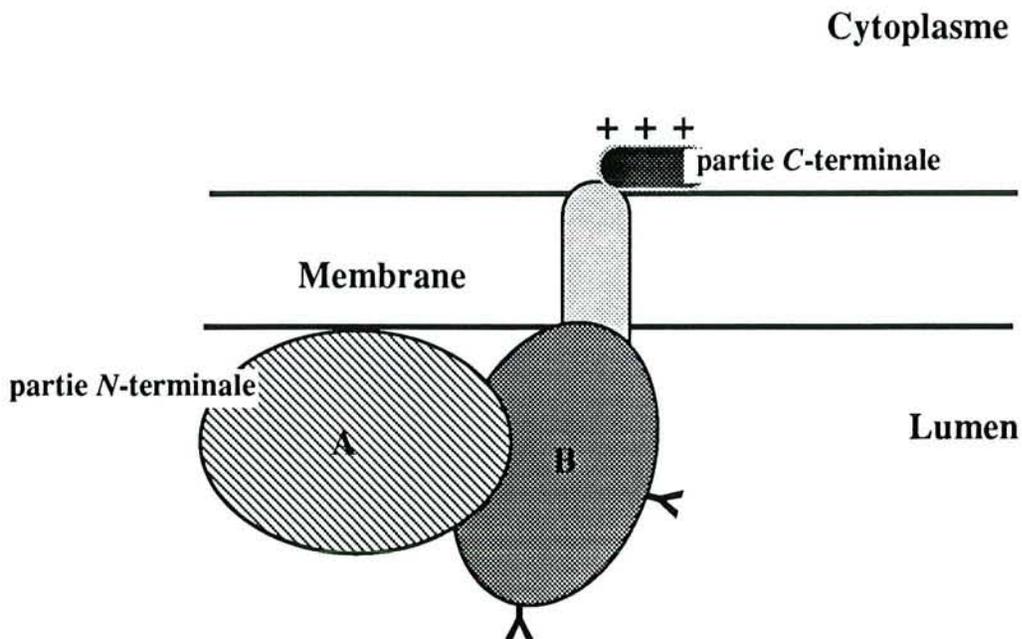
La plus grande partie de l'enzyme est orientée du côté luminal de la membrane du réticulum endoplasmique. La localisation luminale du site actif a été démontrée par l'utilisation de la sonde photoactivable [β -³²P]5N₃-UDPGA, analogue du substrat donneur, sur des microsomes natifs et traités aux détergents (Drake *et al.*, 1992).

L'extrémité carboxy-terminale est composée d'acides aminés chargés qui pourraient être responsables de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (Shepherd *et al.*, 1989 ; Kinoshita *et al.*, 1993). La présence d'un court fragment orienté vers le côté cytoplasmique a été confirmée par immunorévélation après action de la carboxypeptidase A avec les microsomes natifs (Yokota *et al.*, 1992). Par ailleurs, la partie carboxy-terminale des

UGT possède un fort pourcentage d'homologie, suggérant son implication dans une fonction commune à toutes les isoformes, la fixation de l'UDPGA (Tephly et Burchell, 1990 ; voir aussi la figure 52 en Résultats et Discussion). Hundle *et al.* (1992) ont recherché des homologies entre les séquences d'UDP-glucosyl- et glucuronosyltransférases et ont proposé la séquence consensus en acides aminés suivante comme appartenant au site de fixation de l'UDP dans la partie carboxy-terminale des UGT :



où X représente un résidu variable.



- A** : domaine de fixation du substrat
- B** : domaine de fixation de l'UDPGA
- ▲** : site potentiel de N-glycosylation

Figure 1. Représentation schématique de la topologie des UGT.

Mackenzie (1990) a montré, par construction de protéines chimériques, que la spécificité de substrats était déterminée par la partie amino-terminale des UGT (120 résidus), variable suivant les isoformes. Enfin, des séquences consensus de glycosylation Asn-X-Ser/Thr sont observées dans la partie amino-terminale de la plupart des séquences primaires déduites des ADNc. La glycosylation des UGT a été démontrée par la modification de la masse moléculaire apparente des polypeptides après traitement par des glycosidases (Shepherd *et al.*, 1989 ; Styczynski *et al.*, 1991) ou à l'aide d'inhibiteurs de la glycosylation (Harding *et al.*, 1988), mais le rôle éventuel de la glycosylation n'est pas éclairci. En particulier, la *N*-glycosylation des UGT ne contribue ni à l'activité enzymatique ni à la stabilité de la protéine (Mackenzie *et al.*, 1992).

II.5. Mécanisme de la glucuroconjugaison

La glucuroconjugaison consiste en un transfert du résidu acide glucuronique de l'acide UDP- α -D-glucuronique sur le groupement accepteur du substrat. Le carbone 1 de l'UDPGA formant une liaison α -glucosidique avec l'UDP subit lors de la réaction de glucuroconjugaison une inversion de configuration (Mulder *et al.*, 1990) (Figure 2).

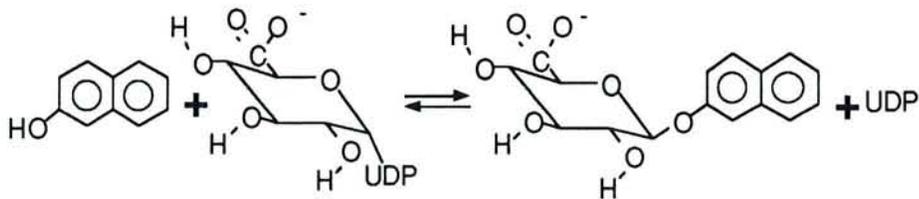


Figure 2. Mécanisme de glucuroconjugaison catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases.

L'aglycone est, dans cet exemple, le 2-naphtol.

Magdalou *et al.* (1982) ont montré que la glucuroconjugaison des phénols catalysée par l'isoforme GT_{2P} purifiée à partir de foie de porc est liée à l'acidité des aglycones ainsi qu'à l'environnement lipidique de l'enzyme. Les auteurs ont suggéré que ce mécanisme est de type S_n2 , mais ce transfert peut par ailleurs être de type S_n1 selon la nature des phospholipides utilisés pour la reconstitution de l'activité enzymatique. La fixation de l'UDPGA au site actif

pourrait déstabiliser la liaison α -glucosidique du substrat donneur et de ce fait faciliter la réaction de transfert. Hochman et Zakim (1984) ont démontré en utilisant la même enzyme purifiée une activité α -glycosidasique (hydrolyse de l'UDPGA en UDP et acide glucuronique) de l'ordre de 1 % comparée à l'activité de glucuronoconjugaison de phénols plans. Cette activité α -glycosidasique est augmentée en présence de composés qui se fixent dans le site de l'aglycone sans y être conjugués. Les auteurs ont proposé que la fixation du carboxylate du substrat donneur à un résidu arginine (Zakim *et al.*, 1983) pourrait provoquer une distorsion des angles de valence de l'atome de carbone 1 de l'UDPGA, ce qui favoriserait une attaque nucléophile des aglycones sur ce carbone lors de la glucuronoconjugaison. L'analyse de l'effet inhibiteur d'une série de composés de type "analogue de l'état de transition" conçus sur la base d'un mécanisme de transfert S_N2 a depuis suggéré de manière complémentaire un transfert direct des aglycones sur l'acide glucuronique (Noort *et al.*, 1990 ; voir aussi paragraphe II.2.2.4).

II.6. Mécanisme de fixation des substrats

Les premières études cinétiques du mécanisme de fixation des substrats ont été développées à partir de microsomes de foie de rat, ce qui a compliqué leur interprétation du fait de la multiplicité des isoformes prenant en charge un même substrat. Vessey et Zakim (1972) ont suggéré un mécanisme de fixation séquentiel au hasard et à équilibre rapide, sur la base de l'étude de la glucuronoconjugaison du *p*-nitrophénol. Falany *et al.* (1986) ont proposé un mécanisme identique pour la glucuronoconjugaison des stéroïdes. Rao *et al.* (1976) ont proposé un mécanisme séquentiel ordonné de type Theorell-Chance avec fixation de l'aglycone en premier pour la glucuronoconjugaison de l'oestrone dans le rein de porc. Enfin, Koester et Noordhoek (1983) ont mis en évidence un mécanisme séquentiel ordonné, avec fixation du 1-naphtol en premier en étudiant la glucuronoconjugaison de cette aglycone dans les microsomes d'intestin de rat. Cette large variabilité des propriétés cinétiques a été vérifiée par Hochman et Zakim (1983). Les auteurs ont purifié deux isoformes conjuguant le *p*-nitrophénol (GT_{1P} et GT_{2P}) à partir de microsomes de foie de porc et reconstitué un environnement phospholipidique identique pour chacune. Ils ont montré que ces deux

isoformes, bien que capables de glucuroconjuguer le même substrat, possèdent des propriétés catalytiques différentes (affinité des substrats, effet des cations divalents, type de phospholipides utilisé pour obtenir une activité optimale).

Il apparaît donc que le mécanisme de fixation des substrats est variable suivant la nature du substrat, la localisation tissulaire de l'isoforme ou plus probablement suivant l'isoforme impliquée.

II.7. Lignées cellulaires recombinantes et UGT1*6

L'expression des UGT a d'abord été développée dans la lignée cellulaire COS-7 (cellules de rein de singe). Mackenzie (1986^a, 1986^b, 1987) a exprimé de manière transitoire dans ces cellules trois ADNc codant pour les protéines UGT r-4, UGT r-3 et UGT r-2, puis déterminé leur spécificité de substrat. Depuis, l'expression des UGT dans cette lignée cellulaire a été largement développée (Jackson *et al.*, 1987 ; Tukey *et al.*, 1993).

Le clonage et l'expression dans les cellules COS-7 de l'ADNc issu d'une banque d'ADNc de foie humain et codant pour l'UGT1*6 (HP1) ont été développés par Harding *et al.* (1988). Les auteurs ont montré la présence dans les cellules transfectées d'un polypeptide de masse moléculaire apparente d'environ 55 kDa reconnu par des anticorps anti-UGT. Il a été montré au cours du même travail que l'UGT1*6 est glycosylée et que sa spécificité de substrat est dirigée vers les composés phénoliques plans telle que la 4-méthylumbelliférone, le *p*-nitrophénol et le 1-naphtol. L'UGT1*6 a par la suite été exprimée de manière stable au laboratoire dans la lignée V79 (fibroblastes de poumon de hamster chinois) par Fournel-Gigleux *et al.* (1990), ces cellules permettant de fournir une source d'enzyme exprimée à un niveau 10 à 20 fois supérieur au niveau d'expression observé en expression transitoire. La spécificité de substrat de cette isoforme a depuis été précisée par Ebner et Burchell (1993), qui ont évalué la glucuroconjugaison de plus d'une centaine de composés dans la lignée de cellules V79 recombinante. Les auteurs ont montré que la spécificité de substrat de cette isoforme était limitée aux composés phénoliques plans et ont suggéré sur cette base que cette enzyme pourrait être impliquée dans la protection contre l'effet toxique de xénobiotiques tels que les terpènes d'origine végétale. Récemment, Bock *et al.* (1993) ont montré en utilisant la

même lignée cellulaire recombinante que cette enzyme était impliquée dans la glucuroconjugaison d'un médicament, le paracétamol.

III. STRATEGIE D'ETUDE DU SITE ACTIF. RESIDUS ESSENTIELS

III.1. Présentation des approches utilisées

L'établissement des relations structure-fonction des enzymes peut être obtenu par différentes approches. Si la structure tridimensionnelle de l'enzyme a été établie, en général par cristallographie, la fonction envisagée pour tout résidu d'acide aminé peut être vérifiée par mutagenèse dirigée. Cependant, ce cas "idéal" est loin d'être applicable à l'ensemble des protéines. Ainsi la connaissance de la structure tridimensionnelle des protéines, bien qu'en croissance exponentielle, ne peut suivre le nombre des structures primaires des protéines dont l'ADNc a été séquencé et répertorié dans les banques de données protéiques et nucléotidiques (EMBL, Genbank). Par ailleurs, certaines enzymes ne peuvent être caractérisées exhaustivement du fait de leurs propriétés physico-chimiques (instabilité, localisation membranaire, faible prévalence etc).

Lorsque la structure tridimensionnelle de l'enzyme étudiée est inconnue, des approches cinétiques au moyen d'inhibiteurs de types variés permettent d'accéder à des connaissances aussi différentes que l'analyse d'un mécanisme réactionnel, la caractérisation d'acides aminés essentiels, l'identification de peptides du site actif ou encore la caractérisation topologique du site récepteur. Ces différents types d'inhibiteurs sont présentés ci-dessous et seront détaillés par la suite :

| inhibiteurs | mécanisme d'action | exemples |
|---------------------------|---|--|
| réversibles | $E + I \rightleftharpoons E \cdots I$ | analogues de substrats inhibiteurs compétitifs analogues de l'état de transition |
| irréversibles non dirigés | $E + I \rightleftharpoons E-I$ | agents de modification des cystéines |
| irréversibles et dirigés | $E + I \rightleftharpoons E \cdots I \rightarrow E-I$ | marqueurs de photoaffinité |

Tableau 1. Inhibiteurs utilisés pour l'étude de la relation structure-fonction des enzymes

III.2. Inhibiteurs compétitifs

III.2.1. Inhibiteurs de l'état final

III.2.1.1. Principe et applications

Les inhibiteurs compétitifs sont des composés interagissant de manière réversible avec le site de fixation d'un substrat du fait d'une analogie structurale. La mise en évidence de ce type d'inhibition se fait par l'étude cinétique du mode d'action du composé sur l'enzyme étudiée. L'une des représentations graphiques les plus utilisées est celle de Lineweaver-Burk (des exemples seront fournis au cours de ce travail). L'utilisation d'inhibiteurs compétitifs ou de substrats permet de caractériser les paramètres contribuant à l'interaction récepteur-ligand. A titre d'exemple, Hindsgaul *et al.* (1991) ont utilisé des substrats oligosaccharidiques qui ont permis de suggérer l'existence d'une liaison hydrogène critique entre les ligands à haute affinité et un site anionique des glycosyltransférases.

Le développement de la modélisation moléculaire contribue à l'amélioration de la connaissance de la structure des sites récepteurs permettant la caractérisation des paramètres responsables d'une fixation à haute sélectivité et affinité de ligand, comme nous le

détaillerons ultérieurement. La caractérisation de la complémentarité ligand-récepteur trouve des applications dans la conception et la synthèse de nouveaux agents thérapeutiques.

En effet, de nombreux médicaments doivent leur efficacité à leur action inhibitrice sur certaines enzymes. De multiples exemples peuvent être évoqués, parmi lesquels on compte les inhibiteurs de l'ACE (angiotensin-converting enzyme) tel que le Captopril^R (Ondetti *et al.*, 1977), les inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH tel que l'AZT (Zidovudine^R) ainsi que d'autres dérivés nucléosidiques (Tisdale *et al.*, 1993) ou encore la Lovastatine^R, inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (Wang *et al.*, 1991). Les programmes de développement de nouveaux médicaments sont établis à partir de l'étude des voies métaboliques, en cherchant à inhiber l'une des enzymes impliquées directement ou indirectement dans la réponse physiologique (Bush, 1983). La connaissance du mode d'action des inhibiteurs et des facteurs conditionnant l'inhibition contribue donc à la conception de nouveaux médicaments.

III.2.1.2. Cas des UGT

Les UGT conjuguant les stéroïdes peuvent être inhibées compétitivement par des analogues de stéroïdes qui ne sont pas substrats de ces isoformes (Falany *et al.*, 1986). Sanchez *et al.* (1978) ont montré que la glucuroconjugaison de la morphine est compétitivement inhibée dans les microsomes de foie de rat par différents analogues de substrats et narcotiques.

Le travail le plus significatif a été obtenu au laboratoire à l'aide d'inhibiteurs compétitifs de la glucuroconjugaison de la bilirubine. En première approche, Fournel *et al.* (1986) ont mis en évidence une série d'inhibiteurs compétitifs (dérivant de l'acide triphénylacétique) de cette activité enzymatique dans les microsomes de foie humain et de rat. Fournel-Gigleux *et al.* (1989) ont défini trois paramètres structuraux essentiels à l'inhibition de l'activité UGT-bilirubine dans les microsomes de foie de rat :

- la présence d'un groupement triphényle hydrophobe,
- l'existence d'une fonction carboxylique terminale,
- une longueur optimale de chaîne aliphatique séparant ces deux groupements correspondant à cinq atomes de carbone.

Depuis, nous nous sommes proposé de caractériser plus en détail les éléments structuraux déterminant l'effet inhibiteur : nous avons développé une nouvelle série d'inhibiteurs compétitifs plus puissants et plus spécifiques en introduisant en particulier des groupements glycole au sein de la chaîne, ainsi qu'une fonction alcool primaire au niveau de l'extrémité polaire (publication n°1). Enfin, nous avons établi très récemment une analogie structurale entre le substrat (bilirubine) et les inhibiteurs compétitifs à l'aide de la modélisation moléculaire. Nous avons postulé une liaison hydrogène critique à l'inhibition entre l'extrémité polaire non ionisée des ligands et un résidu aspartique ou glutamique du site actif (publication n° 4).

III.2.2. Inhibiteurs de l'état de transition

III.2.2.1. L'état de transition enzymatique

Le chemin réactionnel de la catalyse peut être représenté selon le schéma décrit sur la Figure 3.

Entre l'état initial et l'état final de la réaction se situent deux niveaux énergétiques caractéristiques :

- les intermédiaires de haute énergie occupent les puits du diagramme énergétique et correspondent à des entités isolables.
- les états de transition correspondent aux pics du diagramme énergétique. L'espèce réactive est non isolable car instable. Les liaisons chimiques sont en cours de formation et le substrat développe des interactions favorables avec le site actif qui n'existent ni dans son état initial, ni dans son état final.

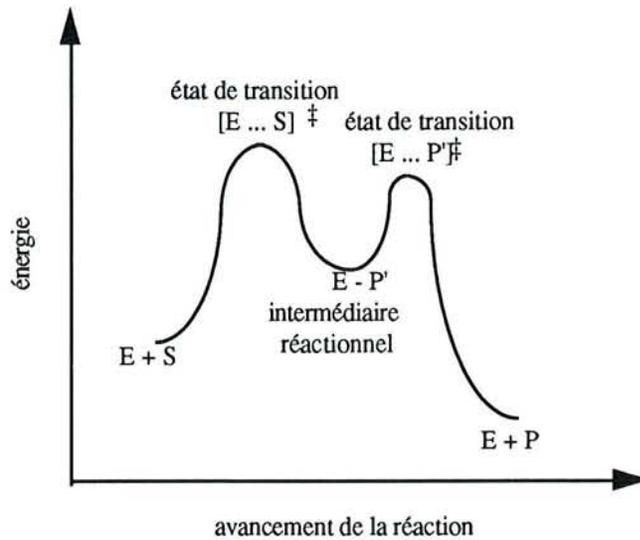


Figure 3. Diagramme énergétique d'une réaction enzymatique avec formation d'un intermédiaire réactionnel.

III.2.2.2. Les analogues de l'état de transition

Les analogues dits de l'état de transition sont des molécules incorporant des éléments structuraux clés de l'état de transition (hypothétique puisque non isolable) dans des structures stables issues en général de la synthèse chimique. Les enzymes ont la capacité de tirer avantage des propriétés électroniques des substrats (parmi lesquelles celles non directement impliquées dans la catalyse) qui ne peuvent être utilisées lors de la réaction non enzymatique (Collins et Stark, 1971). Ainsi, dans l'état de transition, les substrats se fixent fortement au site actif. Un analogue de l'état de transition doit donc posséder une affinité élevée pour l'enzyme-cible.

Puisque l'état de transition de la réaction enzymatique possède des liaisons covalentes en cours de formation et de rupture, un composé ne peut mimer cette structure non isolable qu'avec une similitude très relative. Cependant, cette stratégie est utilisée avec succès pour obtenir des inhibiteurs à hautes affinité et sélectivité mais leur classification en tant qu'inhibiteurs analogues de l'état de transition est rarement démontrée de manière non ambiguë. Le terme couramment employé doit être considéré comme le reflet d'un concept basé sur un schéma réactionnel catalytique hypothétique, la démonstration de la fixation lors

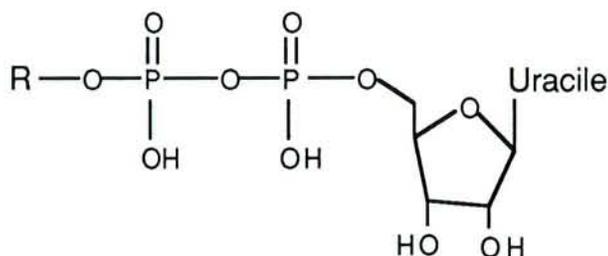
de l'état de transition étant dans la plupart des cas irréalisable. Ainsi Bertics *et al.* (1984) ont postulé une analogie structurale entre une forme limite de résonance d'un inhibiteur de réductase et l'état de transition présumé de la réaction enzymatique. Bartlett et Marlowe (1983) ont cependant réussi à démontrer que des dérivés peptidiques étaient de véritables analogues de l'état de transition en comparant les valeurs de K_i des inhibiteurs avec les paramètres cinétiques d'une série de substrats équivalents. Malheureusement, cet exemple ne constitue qu'un cas particulier et l'analyse du mécanisme catalytique par l'utilisation d'inhibiteurs analogues de l'état de transition reste encore à ce jour principalement basée sur des critères d'affinité élevée (Janssen et Nes, 1992). Pour les enzymes à deux substrats, la synthèse de composés possédant les caractéristiques structurales des deux ligands (analogues de bisubstrat) est généralement le point de départ pour concevoir des analogues de l'état de transition pour les enzymes dont le mécanisme catalytique procède par transfert (Broom, 1989).

Par ailleurs, leurs hautes affinité et spécificité permettent de concevoir des composés à pouvoir thérapeutique (Sandler, 1980).

III.2.2.3. Analogues hypothétiques de l'état de transition des UGT

Noort *et al.* (1990) ont conçu et testé des inhibiteurs des UGT microsomales de foie de rat sur la base de l'état de transition présumé de la réaction de glucuronoconjugaison. Ces structures décrites sur la Figure 4 possèdent un groupement analogue d'aglycones plans, greffé à l'UDP en position β du phosphate, ce qui leur confère une analogie avec les deux substrats des UGT.

Certains des inhibiteurs sont compétitifs vis-à-vis des sites de fixation des substrats donneur et accepteur simultanément, avec des valeurs de K_i pour l'UDPGA et l'aglycone identiques, ce qui pourrait suggérer que ces structures sont des analogues de l'état de transition. Les auteurs mettent en évidence une spécificité d'inhibition vis-à-vis des différentes isoformes suggérant que celles-ci présentent des topologies différentes au niveau de leur site actif.



R= analogues d'aglycones plans (*p*-nitrophénol, 1-naphtol, etc)

Figure 4. Structures générales des analogues de l'état de transition présumé des UGT.

Said *et al.* (1992) ont utilisé au laboratoire une stratégie de synthèse voisine pour concevoir des dérivés ω,ω,ω -triphénylalkyl-UDP. Rappelons que les dérivés triphénylalcooliques ont été synthétisés et caractérisés au laboratoire, fournissant une nouvelle série d'inhibiteurs compétitifs puissants de l'UGT-bilirubine dans les microsomes de foie de rat (se référer à la publication n°1). Said *et al.* ont ainsi conçu des composés possédant des caractéristiques communes à l'UDPGA et aux ligands interagissant avec le site de fixation de la bilirubine (Figure 5).

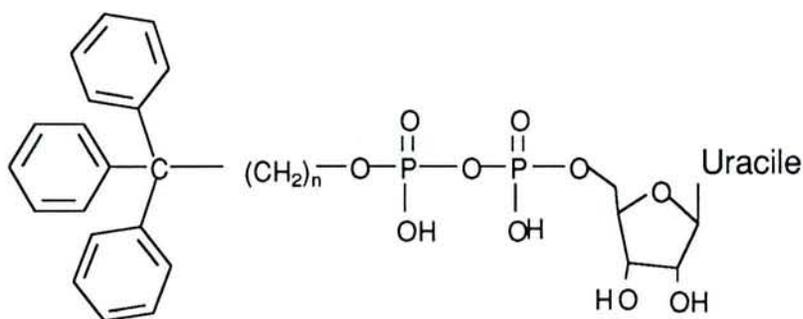


Figure 5. Structure générale des dérivés ω,ω,ω -triphénylalkyl-UDP.

La condensation des groupements UDP et triphényl alcools a effectivement permis d'accroître le pouvoir inhibiteur de la série des composés triphényliques vis-à-vis des isoformes conjuguant le 1-naphtol et la testostérone, alors qu'un effet inverse est observé pour la glucuroconjugaison de la bilirubine. Les auteurs mettent ainsi en évidence la spécificité structurale des isoformes étudiées. Said (1993) propose, pour expliquer la disparition de

l'effet inhibiteur par greffage du groupement UDP aux dérivés triphényl alcools, une interaction répulsive entre une charge anionique du site actif (publication n° 4) et les groupements phosphate des inhibiteurs chargés négativement au pH optimal de glucuroconjugaison.

Noort *et al.* (1991) ont montré que le 2,2,2-triphényléthyl-UDP est un inhibiteur de la glucuroconjugaison sur les hépatocytes intacts de rat *in vitro*.

III.3. Modélisation moléculaire et étude du site actif : relation structure-activité

III.3.1. Principe

Deux stratégies majeures sont utilisées pour l'étude de la relation entre la structure des ligands et leur activité biologique (Cohen *et al.*, 1990). Si la structure tridimensionnelle du récepteur est connue, la conception de nouveaux ligands est dirigée par les connaissances du site accepteur : c'est la conception directe. Dans la plupart des cas, la structure tridimensionnelle du récepteur est inconnue et la conception de nouvelles molécules pharmacologiquement actives est menée à partir de l'analyse comparative entre différentes molécules, actives et inactives. Ceci permet de déduire *a posteriori* les paramètres de la fixation à un récepteur de structure inconnue : c'est la conception indirecte.

Les systèmes de modélisation moléculaire sont employés dans ce but et permettent une visualisation et une manipulation de modèles tridimensionnels des ligands. Les conformations, les propriétés électroniques, la surface moléculaire et les différentes propriétés physico-chimiques des ligands deviennent ainsi accessibles. Notons que la manipulation s'effectue en temps réel.

La réussite de l'établissement d'une relation structure-activité en trois dimensions repose sur le choix de la conformation des ligands. Pour cela, l'énergie totale de chaque molécule est évaluée à l'aide de méthodes de détermination des champs de force tels que MAXIMIN 2 sur le logiciel SYBYL.

En l'absence de connaissance structurale du récepteur, le choix de la conformation des ligands repose sur l'étape de recherche conformationnelle. Le conformère le plus stable est celui de plus basse énergie. La minimisation énergétique est un processus itératif qui consiste à évaluer les énergies totales de chaque ligand, pour chacune de ses conformations. Pour cela, les paramètres de la géométrie des ligands sont modifiés par incrément jusqu'à l'obtention d'un minimum local énergétique. La minimisation énergétique cesse dès le premier minimum local rencontré.

Afin de pouvoir explorer l'espace conformationnel complet de la molécule et ainsi tenter de déterminer le minimum énergétique global de la molécule, l'incrémentation s'effectue en faisant varier tous les angles de torsion d'une valeur minimale et en calculant l'énergie correspondant à chacune de ces conformations (recherche conformationnelle systématique). Notons cependant que la conformation correspondant au minimum global ne correspond pas forcément à la conformation de la molécule fixée au récepteur et il convient parfois de considérer des conformations d'énergie légèrement supérieure au minimum énergétique global lors de l'étude de la relation structure-activité.

La conception indirecte de molécules repose sur la reconnaissance des caractéristiques tridimensionnelles communes à une série de molécules actives (le pharmacophore). Le concept de pharmacophore repose sur le postulat d'un modèle géométrique unique d'atomes dans un site de fixation permettant des interactions favorables ligand-récepteur. On considère que tous les ligands de la série analysée se fixent de la même manière au même site. L'alignement du pharmacophore est obtenu par superposition des structures actives. Les molécules inactives permettent de définir les régions défavorables (Cohen *et al.*, 1990).

Tout pharmacophore ou modèle de récepteur doit être considéré avec prudence car sa détermination repose sur différentes approximations telles que la fixation des ligands à un même site ou la rigidité du site récepteur (Hibert *et al.*, 1988). C'est un modèle hypothétique qui se doit d'être vérifié par l'expérience. De nouveaux ligands supposés complémentaires au récepteur sur la base de la relation structure-activité sont conçus et synthétisés afin de raffiner le modèle selon un processus itératif (Lewis, 1991). Dans la plupart des cas, on possède une série de ligands d'un récepteur ; la structure tridimensionnelle du site de fixation n'est élucidée que plus tard. Les propriétés des ligands sont utilisées pour déduire celles du site récepteur.

La mutagénèse dirigée, lorsqu'on est en possession du gène ou de l'ADNc correspondant, est un outil efficace pour préciser ou valider un modèle de cartographie de récepteur, en particulier pour les récepteurs membranaires difficiles à étudier par les méthodes classiques (purification et cristallographie).

III.3.2. Relation quantitative structure-activité appliquée aux UGT

L'étude de la relation structure-activité au moyen de divers aglycones structurellement apparentées a été développée afin de tenter de prédire la glucuroconjugaison des médicaments. Thomassin *et al.* (1987) ont établi au laboratoire une relation prédictive entre les paramètres cinétiques et physico-chimiques d'aglycones monohydroxylés substrats des UGT dans les microsomes de foie de rat. Plus récemment, Kim (1991) a montré que la glucuroconjugaison de divers aglycones peut être corrélée à la lipophilie de ces composés.

III.3.3. Méthode comparative d'analyse des champs moléculaires

La modélisation moléculaire est désormais un outil courant d'exploitation de données expérimentales pour caractériser la structure du site de fixation de ligands sur un récepteur en l'absence d'information sur le site de fixation (conception indirecte). De nombreux logiciels permettant d'établir une relation quantitative structure-activité ont été mis au point à cette fin. La méthode comparative d'analyse des champs moléculaires (CoMFA), développée par Cramer *et al.* (1988), est utilisée pour l'étude de la relation quantitative structure-activité. CoMFA permet d'accéder aux champs stérique et électrostatique entourant une série de ligands interagissant avec un même site de fixation. Elle repose sur le principe bien établi selon lequel la réponse biologique est due en règle générale à des interactions non covalentes au sein du site de fixation du ligand avec le récepteur (Thomas *et al.*, 1991). Plus précisément, l'expérience a montré que cette interaction non covalente peut être décrite par des termes stériques et électrostatiques (Klebe et Abraham, 1993). Une estimation correcte des champs stérique et électrostatique autour d'une série de ligands correctement alignés peut permettre de caractériser les paramètres responsables de leurs propriétés biologiques (Cramer

et al., 1988). Par ailleurs, on suppose que les interactions des ligands avec le récepteur produisant la réponse biologique s'effectuent dans le même site de fixation et avec une orientation identique. Dans ce cas, les résultats de l'étude CoMFA peuvent permettre de définir quelques-unes des propriétés géométriques et électrostatiques du récepteur par le biais de la complémentarité récepteur-ligand.

L'évaluation des champs stérique et électrostatique autour des molécules est obtenue en calculant les interactions stériques et électrostatiques entre chaque ligand et une sonde parcourant l'espace entourant ces composés. En général, cette sonde est un atome de carbone sp^3 possédant une charge +1 mais d'autres sondes sont envisageables selon le problème à traiter. Ainsi, Kim et Martin (1991) ont utilisé une sonde H^+ afin de prédire des valeurs de pK_a de dérivés d'acide benzoïque. Une relation structure-activité est alors établie à partir de la table QSAR après analyse statistique à l'aide de la méthode PLS (partial least square). Le modèle subit une étape de validation croisée qui permet d'estimer la validité de la prédiction obtenue par la méthode CoMFA, en excluant éventuellement certains des composés n'entrant pas dans le modèle prédictif. Cette étape est répétée tant que la valeur de r^2 (traduisant la corrélation de l'équation de prédiction avec les paramètres de la réponse biologique) augmente. Cette table représente la réponse biologique (expérimentale) ainsi qu'une multitude de paramètres stériques et électrostatiques pour chaque molécule. Le choix des pharmacophores à aligner est de première importance car les énergies d'interactions sont fonction du positionnement des molécules. Celui-ci est en fait livré aux convictions et jugement du modélisateur. Les ligands sont alors modélisés et alignés pour tenter de satisfaire le choix subjectif défini par l'expérimentateur. En l'absence de connaissance de la structure du site de fixation, les conformations des ligands alignés sont celles qui sont les plus stables énergétiquement, même si ces conformères ne sont peut-être pas biologiquement actifs. L'analyse par la méthode CoMFA peut donc se résumer de la manière suivante:

- 1) construction et établissement de la conformation de chaque composé
- 2) superposition (alignement) des molécules
- 3) détermination des énergies d'interactions stérique et électrostatique autour des molécules
- 4) analyse statistique de la relation entre les énergies d'interaction et la réponse biologique (inhibition enzymatique)

L'équation de prédiction est traduite en trois dimensions et les zones d'interactions stérique et électrostatique sont visualisées graphiquement autour des ligands alignés. En particulier, une représentation sous forme de polygones de différentes couleurs met en évidence les régions d'interaction autour des ligands. La carte des contours ainsi générée indique une relation structure-activité en trois dimensions. Cette carte peut donner des indications sur la nature des interactions ligand-récepteur. Par ailleurs, le modèle prédisant la réponse biologique (relation entre réponse biologique prédite et réponse biologique expérimentale) aide à la synthèse de nouveaux composés.

De ce fait, ce type de représentation peut être utilisé pour envisager la synthèse de nouveaux ligands et permettre de prédire l'activité d'une nouvelle molécule (prédiction quantitative) et/ou de raffiner le modèle CoMFA pour une série de composés.

III.4 . Les sondes électrophiles

III.4.1. Introduction : rôle des acides aminés dans la structure et la fonction des protéines

Les enzymes sont des protéines aux propriétés physico-chimiques remarquables, tant du point de vue de leur spécificité d'action vis-à-vis de leur substrat que de leur efficacité comme catalyseur d'une réaction chimique. L'un des buts de la biochimie est de cerner leur mécanisme d'action. L'étude du mécanisme de la catalyse peut être appréhendé de diverses manières. Ainsi, l'étude cinétique de la réaction enzymatique permet de caractériser l'ordre de fixation et de relargage des ligands ainsi que la vitesse à laquelle s'effectue cette catalyse. Cependant, ni le mécanisme moléculaire lui-même, ni les acides aminés impliqués dans l'étape catalytique ne peuvent être caractérisés par ce biais. L'absence de données cristallographiques rend la caractérisation de la structure d'une enzyme difficile. Cependant, un certain nombre de techniques permettent d'identifier les acides aminés essentiels intervenant dans la catalyse, la fixation du substrat, ou encore jouant un rôle au niveau de la structure de la protéine (pont disulfure par exemple).

Les acides aminés peuvent être classés suivant la nature du substituant R présent dans l'enchaînement polypeptidique :

- groupement R apolaire (alanine, leucine, tryptophane etc...).

Les acides aminés sont de nature hydrophobe et leur rôle dans l'enzyme est neutre ou d'ordre structural (interactions hydrophobes à l'intérieur de la protéine, fragments transmembranaires...).

- groupement R polaire (sérine, cystéine, asparagine etc) ou prototropique (acide aspartique, acide glutamique, lysine, arginine, histidine).

La réactivité chimique de ces groupements confère à ces acides aminés des propriétés essentielles dans le mécanisme de la catalyse ou de l'interaction enzyme-substrat.

En l'absence de données structurales de la protéine d'intérêt, la modification chimique des enzymes par des inhibiteurs irréversibles (sondes électrophiles) est couramment utilisée pour cibler le rôle de ce type de résidus, souvent en combinaison avec la mutagenèse dirigée sur des protéines recombinantes.

III.4.2. Classification des inhibiteurs irréversibles

Les sondes électrophiles sont des composés possédant des groupements réactifs susceptibles de réagir avec les protéines de manière covalente, selon une réaction de type "attaque nucléophile" et seuls les acides aminés polaires peuvent normalement subir une modification chimique. La condition *sine qua non* de leur utilisation est bien entendu leur réactivité dans des conditions non drastiques (pH, température, etc...) afin de caractériser les protéines d'intérêt dans une conformation active. L'utilisation des inhibiteurs irréversibles a contribué à identifier les groupements réactifs de certains résidus d'acides aminés impliqués dans le mécanisme d'action des enzymes. Ainsi, la suppression ou l'altération de la fonction des enzymes par modification chimique des résidus d'acides aminés polaires a démontré leur implication dans le processus catalytique de nombreuses enzymes (Riordan *et al.*, 1965).

La présente introduction ne constitue pas une revue exhaustive des différents inhibiteurs irréversibles. Quelques-uns des réactifs les plus couramment utilisés, ou ceux dont l'utilisation a été développée lors de ce travail, sont présentés selon leur réactivité avec différentes classes d'acides aminés.

III.4.3. Modification des cystéines par les maléimides

Les groupements sulfhydryle possèdent des propriétés nucléophiles exacerbées (en particulier les thiolates). Le corollaire de ce caractère est leur grande réactivité avec une panoplie très large d'agents de modification chimique (Eyzaguirre, 1987).

Les cystéines sont sensibles à l'oxydation qui provoque la formation de ponts disulfure essentiels au maintien d'une conformation active des protéines, ou au contraire bloquant la structure protéique dans une conformation non active.

Les dérivés halo-acétates et -acétamides (tels que l'iodoacétate et l'iodoacétamide) sont des réactifs de modification des cystéines à spécificité élevée. Leur mode d'action suit un mécanisme de type S_N2 conduisant à la formation d'un dérivé carboxy-méthylcystéine ou carboxamido-méthylcystéine:

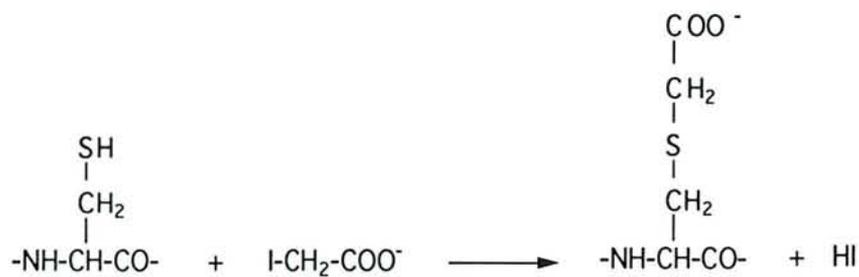


Figure 6. Modification d'un résidu cystéine par l'iodo-acétate

Les dérivés maléimides tel que le *N*-éthylmaléimide présentent une spécificité élevée vis-à-vis des cystéines :

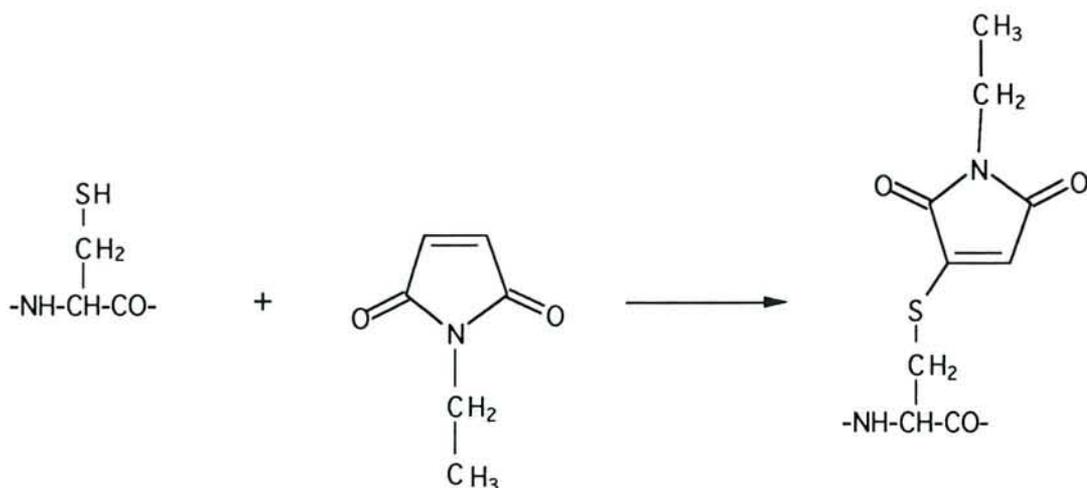


Figure 7. Réaction du *N*-éthylmaléimide avec un résidu cystéine

Sokol *et al.* (1986) ont mis en évidence le rôle de groupements disulfure et sulfhydryle dans un transporteur de cations en utilisant le *N*-éthylmaléimide. Cette réaction est réversible en présence d'agents réducteurs tel que le dithiotréitol, ce qui constitue un moyen complémentaire de vérifier la spécificité de la modification. Blicq *et al.* (1988) ont utilisé des dérivés maléimides *n*-substitués pour mettre en évidence un résidu cystéine du site actif situé dans un environnement apolaire. Différents métaux de transition, parmi lesquels l'ion cuivrique (Cu^{2+}), peuvent être utilisés en complément comme agent d'oxydation des sulfhydryles (Landgraf *et al.*, 1991).

L'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) est aussi utilisé pour la modification et la détermination des groupements sulfhydryle. Le produit de réaction est l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque caractérisé par un absorbance typique à 410 nm, permettant de déterminer sa stoechiométrie de fixation avec une protéine :

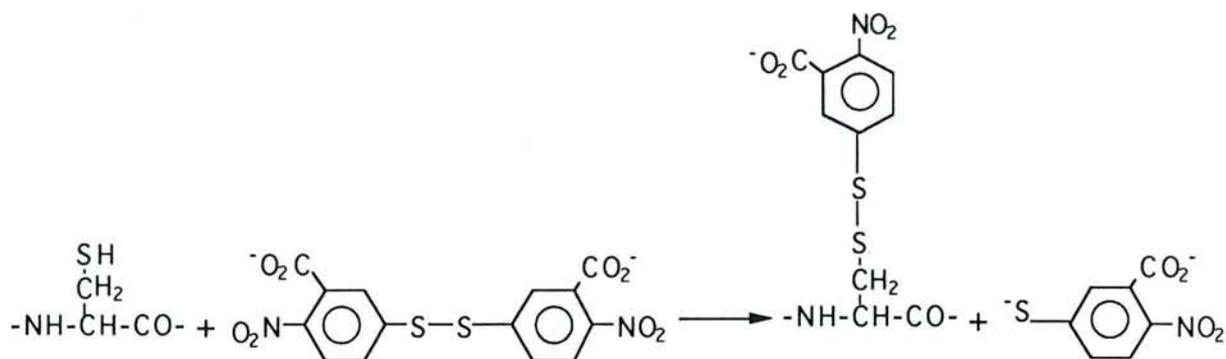


Figure 8. Modification d'un résidu cystéine par l'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)

L'utilisation de ces différents inhibiteurs radiomarqués spécifiques des cystéines aboutit souvent à l'identification du résidu essentiel du fait de la stabilité de l'adduit formé subissant les conditions de séquençage peptidique (Smyth et Colman, 1991; Pot et Dixon, 1992).

III.4.4. Modification chimique des résidus histidine par le diéthyl pyrocarbonate

L'anhydride éthoxyformique, plus couramment nommé diéthyl pyrocarbonate (DEPC) est le réactif le plus souvent employé lorsqu'on tente d'appréhender la fonction des résidus histidine d'un récepteur. De part sa structure possédant simultanément une fonction ester et une fonction anhydrique, il est susceptible de subir une attaque nucléophile selon le schéma suivant (Miles, 1977):

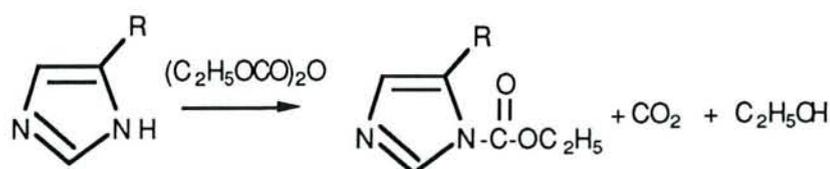


Figure 9. Réactivité du diéthyl pyrocarbonate avec un résidu histidine

Le produit de la réaction est un *N*-carbéthoxyhistidine, possédant des caractéristiques spectroscopiques spécifiques (λ_{max} : 247 nm). Par ailleurs, le DEPC est facilement hydrolysable selon la réaction suivante :



Figure 10. Hydrolyse du diéthyl pyrocarbonate

Ceci lui confère une grande instabilité dans les conditions de marquage irréversible des protéines, nécessitant parfois un ajustement de sa concentration en fonction de son temps de présence en milieu aqueux (Gomi et Fujioka, 1983 ; Topham et Dalziel, 1986).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, aucune sonde électrophile n'est absolument spécifique d'une classe d'acides aminés. Cependant, dans le cas du DEPC, la spécificité vis-à-vis des histidines peut être grandement améliorée en réalisant l'inactivation du récepteur à pH acide (pH 6,0), car la réaction de carbéthoxylation par le DEPC s'effectue sur les histidines non protonées (Holbrook and Ingram, 1973).

Du point de vue expérimental, la modification effective des résidus histidine peut être vérifiée de diverses manières:

- d'une part, la formation d'un dérivé *N*-carbéthoxyhistidine est en général réversible en présence d'hydroxylamine :

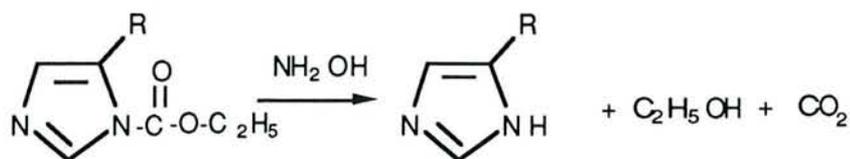


Figure 11. Réversibilité de la carbéthoxylation des résidus histidine en présence d'hydroxylamine

L'utilisation de l'argument de la réversibilité en présence d'hydroxylamine comme évidence de la modification de résidus histidine est cependant sujette à caution. Ainsi, l'utilisation d'une

concentration élevée en DEPC lors de la phase d'inactivation du récepteur peut conduire à une seconde modification des histidines, non réversible en présence d'hydroxylamine :

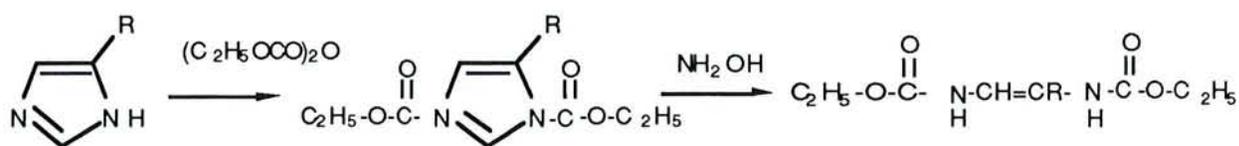


Figure 12. Effet de l'hydroxylamine sur un résidu histidine traité par un large excès de DEPC.

La carbéthoxylation d'autres résidus est réversible en présence d'hydroxylamine. La réversibilité en présence d'hydroxylamine étant discutée ultérieurement sur la base de nos propres résultats, il convient de s'y reporter pour plus de détails.

- d'autre part, l'analyse de la cinétique d'inactivation en fonction du pH permet de déterminer le pKa du résidu essentiel modifié, et, de ce fait, conduit à son identification probable.

L'identification du résidu modifié est aisée si l'on travaille sur une enzyme purifiée, ceci grâce à l'analyse du spectre UV de la protéine carbéthoxylée (λ_{max} : 247nm pour les dérivés *N*-carbéthoxyhistidyle, comme indiqué précédemment ; λ_{max} : 278 nm pour les dérivés *O*-carbéthoxytyrosyle, Miles, 1977). Il est par ailleurs possible de corréler le nombre de résidus modifiés à la diminution de l'activité enzymatique, permettant une quantification des résidus carbéthoxylés en fonction du temps d'inactivation (Bhattacharyya *et al.*, 1992).

L'identification du résidu essentiel modifié a pu être obtenue par séquençage (Ko *et al.*, 1991), en dépit de l'instabilité de la modification chimique.

III.4.5. Modification des acides carboxyliques

Les carbodiimides sont des réactifs couramment utilisés par les chimistes pour les réactions de couplage peptidique. Leur utilisation en temps que réactif de modification des acides

aspartique et glutamique est basée sur le même schéma réactionnel que celui du couplage peptidique (première étape de la figure 13).

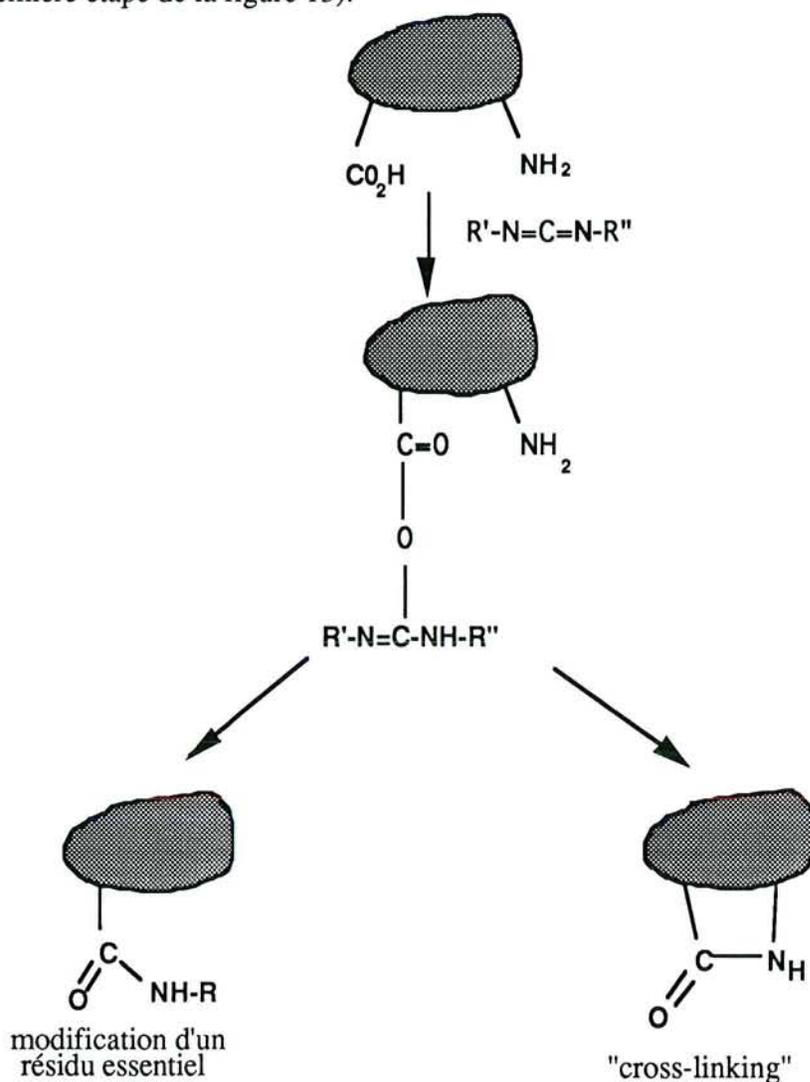


Figure 13. Modification des groupements carboxyliques d'une enzyme par un carbodiimide (d'après Pedemonte et Kaplan, 1986).

Le plus courant des réactifs de couplage est le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) mais d'autres composés plus solubles en milieu aqueux sont aujourd'hui disponibles. La difficulté d'utilisation de ces réactifs pourtant largement utilisés (Suchi *et al.*, 1991, Verburg *et al.*, 1992) provient de la nature de la modification générée. Ainsi, la modification chimique d'une enzyme peut conduire à des interprétations erronées si le réactif, après avoir spécifiquement modifié un résidu carboxylique, facilite la formation d'un pont intramoléculaire au sein de la protéine entre le résidu activé par le carbodiimide et un nucléophile endogène (Figure 13, étape 2). Pedemonte et Kaplan (1986) ont ainsi montré que l'inhibition de l'enzyme Na,K-ATPase par un carbodiimide soluble n'était pas due à la modification *per se* d'un résidu mais à

une réaction intramoléculaire évoquée ci-dessus entre un résidu carboxylate et un résidu aminé vicinal modifiant la structure de la protéine. Notons aussi que l'utilisation de réactifs de modification de taille importante peut conduire à des interprétations erronées pour des raisons similaires, la fixation du réactif pouvant, dans ce cas plus que dans d'autres, perturber la structure de la protéine et de ce fait affecter son activité.

Les sels d'isoxasolium présentent un intérêt particulier dans le cas des UGT : un dérivé de la bilirubine de type réactif de Woodward (Bilirubin-Woodward's reagent K, modifiant spécifiquement les acides carboxyliques) a été utilisé notamment pour sonder le site de fixation de la bilirubine aux glutathion-S-transférases (Boyer, 1986). Son utilisation peut être envisagée pour la caractérisation éventuelle des UGT métabolisant la bilirubine (aucune étude de ce type n'a été développée à ce jour).

III.4.6. Autres réactifs

Le 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) est un réactif développé pour la modification des amines et thiols (Craik *et al.*, 1986), ainsi que des tyrosines (Andrews *et al.*, 1984). Ce composé, bien que peu spécifique du point de vue de sa réactivité chimique, est cependant couramment utilisé car il présente la particularité de posséder une analogie structurale avec l'adénine. Ainsi, son utilisation a permis de caractériser des résidus du site actif de protéines ATP-dépendantes, tel que l'actine (Houk *et al.*, 1983) ou diverses ATPases (Ho et Wang, 1983 ; Sutton et Ferguson, 1984). Del Boccio *et al.* (1991) ont utilisé ce même réactif présentant une haute affinité envers une glutathion-transférase pour mettre en évidence des résidus cystéine essentiels. Son principal intérêt est donc de se comporter comme un marqueur d'affinité pour de nombreuses protéines.

Enfin, le *N*-acétylimidazole est utilisé comme réactif de modification chimique des tyrosines (Lundblad, 1984). Riordan *et al.* (1965) ont utilisé ce composé hydrophile pour distinguer les résidus tyrosine accessibles de ceux qui sont enfouis. Cependant cette spécificité apparente vis-à-vis des résidus "accessibles" s'est par la suite révélée n'être pas absolue (Lundblad, 1984).

La modification des résidus arginine - bien que ce ne soit pas l'objet de ce travail - mérite sans doute notre attention car le travail le plus significatif sur les UGT a été obtenu de cette manière par Zakim *et al.* (1983) et sera détaillé au chapitre suivant.

La 2,3-butanedione, la cyclohexanedione et le phénylglyoxal sont les réactifs les plus utilisés pour la modification du groupement guanidine des arginines. Riordan *et al.* (1977) ont postulé, sur la base de la modification d'un large éventail d'enzymes par la 2,3-butanedione, un rôle pour ces résidus dans la fixation des substrats et cofacteurs anioniques (notamment ceux possédant des groupements phosphate). Takahashi (1968) a le premier développé l'utilisation du phénylglyoxal pour la modification des résidus arginine dans les protéines, et souligne la relative facilité de synthèse de ce réactif, marqué au ^{14}C afin de permettre l'identification de résidus modifiés dans la structure primaire de la protéine étudiée.

Chacun pourra se reporter à l'ouvrage de Lundblad (1984) pour complément d'information sur la modification chimique des protéines.

III.4.7. Applications aux UGT

Les acides aminés essentiels sont encore peu caractérisés, quelles que soient les isoformes. Quelques études préliminaires ont cependant été développées sur des microsomes de foie de rat. Arion *et al.* (1984) se sont essentiellement consacrés à l'étude d'une enzyme microsomale, la glucose-6-phosphatase, mais ils ont en outre mis en évidence une sensibilité élevée de l'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol au DEPC, sans pour autant pousser plus loin leur investigation.

Winsnes (1971) a souligné que l'activité des UGT de foie de rat et de souris n'est pas dépendante de groupements sulfhydryle en utilisant des réactifs de modification chimique (*N*-éthyl maléimide, *p*-mercuribenzoate, iodoacétamide). En revanche, Rao *et al.* (1976) évoquent la sensibilité de l'activité de glucuroconjugaison de l'oestrone aux maléimides ainsi qu'au chlorure de cuivre dans les microsomes de rein de porc, suggérant un rôle possible de résidus cystéine sous forme oxydée ou réduite. Ces résultats contradictoires sont probablement le reflet d'une hétérogénéité structurale des UGT. Toutes ces études n'apportent cependant pas de contribution importante à la détermination de la relation entre la structure et

la fonction des UGT, les auteurs ayant vraisemblablement été limités dans leurs investigations par la variabilité des isoformes présentes dans les microsomes de foie.

La contribution la plus significative à la détermination des acides aminés essentiels du site actif a été celle de Zakim *et al.* (1983) qui ont mis en évidence un résidu arginine essentiel dans le site actif d'une isoforme purifiée à partir de foie de porc (GT_{2P}) et conjuguant le *p*-nitrophénol. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé la 2,3-butanedione comme agent d'inactivation chimique et vérifié la spécificité de la modification par analyse du contenu en acides aminés avant et après la modification chimique. La cinétique d'inactivation, de type pseudo-premier ordre, est limitée en présence d'acide glucuronique et d'UDPGA, alors que l'UDP seul est sans effet. Les auteurs suggèrent que ce résidu arginine interagit probablement avec le groupement carboxylate en position 6 de l'UDPGA.

III.5. Sondes photoactivables

Toute réponse physiologique est la conséquence d'une interaction entre un ligand (L) et un récepteur protéique (R).



Ce phénomène repose d'une part sur la spécificité de cette fixation, d'autre part sur la nature de l'interaction elle-même permettant la réponse biologique. Les marquages d'affinité et de photoaffinité dépendent de la spécificité même de l'interaction entre l'effecteur et son récepteur (reconnaissance moléculaire). Ainsi, la fixation covalente d'une molécule radioactive à son site de fixation spécifique contribue à la caractérisation de nouvelles protéines. D'une manière générale, ce marquage consiste à utiliser un analogue du ligand d'intérêt portant un groupement chimique susceptible de se fixer de manière covalente au site récepteur. Dans le cas du marquage d'affinité, cette fonction est capable de subir une attaque nucléophile de la part de résidus nucléophiles du site de fixation. Ces fonctions électrophiles sont du même type que celles décrites au chapitre II.3 pour les inhibiteurs irréversibles. Le marquage d'affinité est développé avec succès si la sonde est suffisamment spécifique vis-à-

vis du site de fixation. D'autre part, la localisation de la fonction réactive par rapport au(x) résidu(s) nucléophile(s) du site actif contribue à l'efficacité du marquage. Cette technique est développée avec succès sur les enzymes qui possèdent, outre une grande spécificité de reconnaissance vis-à-vis de leurs substrats, un caractère nucléophile exacerbé pour certains résidus impliqués dans la fonction de l'enzyme au sein du site actif. L'exemple décrit par Holbrook et Ingram (1973) est, à ce titre, très évocateur : le DEPC, agent de modification chimique des résidus histidine, réagit 10 fois plus rapidement avec la lactate déhydrogénase de coeur de porc que lorsqu'il est en présence d'un résidu imidazole libre (tampon imidazole). Rappelons que le DEPC n'est pas un marqueur d'affinité, c'est-à-dire qu'il est susceptible de réagir avec tous les résidus histidine qui lui sont accessibles. C'est donc un indicateur de la nucléophilie des résidus modifiés (Lundblad *et al.*, 1984). Wells et Marnett (1992) ont souligné que la prostaglandine synthétase est spécifiquement acétylée par l'aspirine au niveau d'une seule sérine du site actif car ce résidu est vraisemblablement le plus nucléophile de la protéine. En règle générale, l'utilisation d'un marqueur d'affinité (cette dénomination inclut les marqueurs de photoaffinité) augmente la spécificité de la modification des résidus par rapport aux inhibiteurs irréversibles classiques, puisqu'ils favorisent la formation d'adduits par un effet de proximité stérique des deux groupements réactifs et limitent la taille de l'environnement stérique accessible à la fonction réactive.

Les marqueurs de photoaffinité reposent sur le même principe, mais la nature de la fonction activable est différente. Comme nous venons de le souligner, l'efficacité de l'incorporation du marqueur d'affinité est en partie liée à la présence d'un résidu réactif dans le site de fixation. L'utilisation d'un groupement photoactivable permet de pallier ce problème.

III.5.1. Principe du marquage de photoaffinité

Le marqueur de photoaffinité est, contrairement à un marqueur d'affinité, inerte chimiquement, mais le greffage d'une fonction hautement réactive sous irradiation lui confère ses propriétés de sonde covalente (Figure 14).

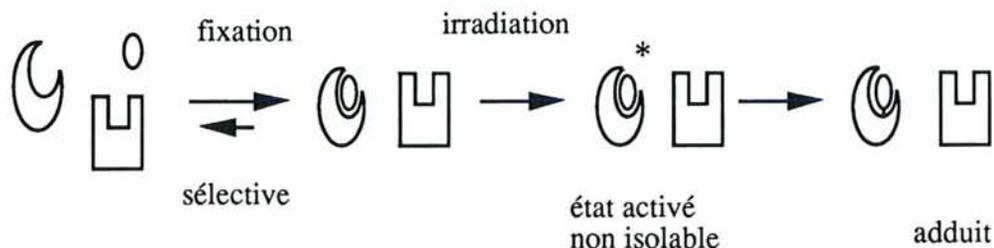


Figure 14. Principe du marquage de photoaffinité

L'irradiation du groupement photoactivable est déclenchée lorsque le ligand est fixé au récepteur.

Grâce à cette fonction non réactive en absence d'irradiation, la fixation covalente de la sonde au récepteur peut être déclenchée à un moment précis, ce qui permet de limiter les fixations non spécifiques. De plus, la présence d'un groupement fonctionnel particulier dans le site actif n'est plus indispensable car les espèces générées par photoactivation sont capables de réagir avec tout groupement vicinal, y compris des groupements alkyle (Baylet et Knowles, 1977).

D'une manière générale, le groupement irradié devient hautement réactif. Par ailleurs, son temps de demi-vie extrêmement faible lui permet de réagir théoriquement avec tous les acides aminés vicinaux, quelle que soit leur nature, ce qui permet une utilisation large de cette technique pour cibler les récepteurs.

III.5.2. Les groupements photoactivables

L'irradiation de fonctions photoactivables peut conduire à la formation de deux types de groupements réactifs par coupure homolytique (Guillory et Jeng, 1983) :

- la coupure d'une double liaison au niveau d'un carbone ou d'un atome d'azote conduit à la formation d'un carbène ou d'un nitrène,
- la coupure au niveau d'une seule liaison covalente conduit à la formation de deux radicaux libres ou d'un diradical.

III.5.2.1. Carbènes et nitrènes

La plupart des fonctions photoactivables utilisées jusqu'à ce jour forment des entités très réactives sous irradiation, les carbènes et les nitrènes (Figure 15).

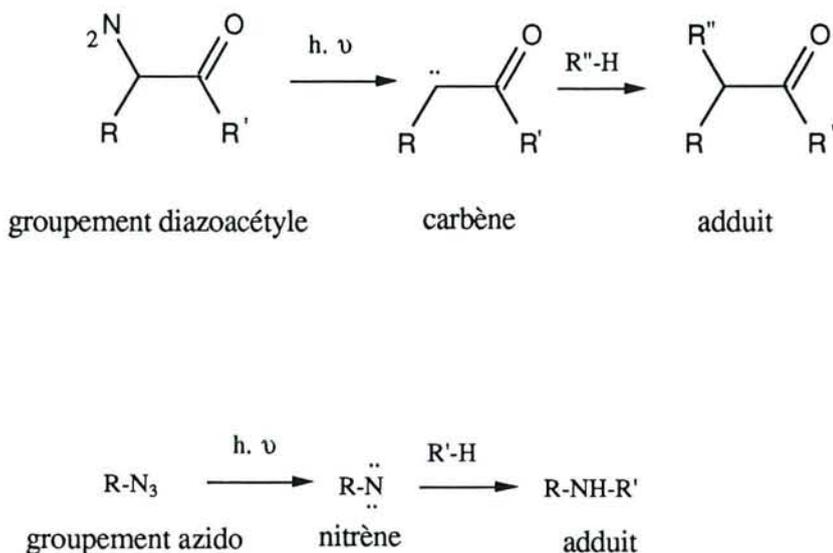


Figure 15. Réactivité des groupements diazoacétyle et azido sous irradiation lumineuse (Baylet, 1983).

Ces précurseurs sont susceptibles de réagir avec toutes les molécules (protéines ou solvants). Les groupements générateurs de carbènes sont cependant moins utilisés actuellement car instables chimiquement (en l'absence d'irradiation) et susceptibles de suivre un mécanisme de réarrangement interne qui leur fait perdre leur capacité à former un adduit intermoléculaire. En revanche, les nitrènes sont utilisés avec beaucoup plus de succès (se référer aux exemples évoqués dans les prochains paragraphes où les auteurs choisissent le groupement photoactivable azido). En particulier, les arylazides, chimiquement stables et peu susceptibles aux réactions de réarrangement sont assez facilement synthétisables par diazotation de l'aniline et traitement à l'azide de sodium.

III.5.2.2. Variabilité des ligands et des fonctions photoactivables

Cette liste n'est pas exhaustive. Le tableau suivant illustre, à titre d'exemple, le grand nombre et la complexité des structures de sondes photoactivables analogues de l'ATP :

| Analogues photoactivables de l'ATP | Références |
|--|-------------------------------|
| 8-azido-ATP | Mimura <i>et al.</i> , 1990 |
| 2-azido-ATP | Melese <i>et al.</i> , 1988 |
| 8-azido-2'-O-dansyl-ATP | Chuan <i>et al.</i> , 1989 |
| 3'(2')-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP | Cole et Yount, 1990 |
| 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophényl)-8-azido-ATP | McIntosh <i>et al.</i> , 1992 |

Citons également les cétones insaturées qui pourraient trouver plusieurs applications dans le cadre du marquage de photoaffinité des UGT du fait de la nature des ligands concernés (substrats éventuels ou inhibiteurs compétitifs). Ainsi, de nombreux exemples de marquage de photoaffinité par des stéroïdes sont mentionnés dans la littérature (Taylor *et al.*, 1980 ; Grenot *et al.*, 1992). La photoréactivité de ces composés est due à la présence d'une cétone capable d'atteindre, sous irradiation, un état excité (Figure 16) conduisant à la formation de radicaux réactifs (Baylet, 1983).

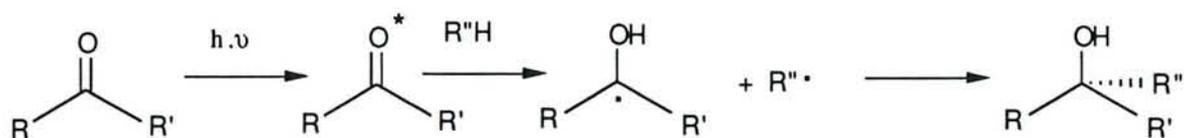


Figure 16. Photoactivation des cétones

III.5.3. Cas particulier : marquage de photoaffinité direct

Le marquage de photoaffinité direct consiste à irradier le complexe récepteur-ligand, le ligand ne possédant aucune des fonctions photoactivables précédemment décrites. L'utilisation de cette technique est, à notre connaissance, restreinte aux ligands nucléotidiques. L'incorporation de la sonde est covalente, mais la formation de l'adduit serait due vraisemblablement à l'apparition d'un radical libre sur un acide aminé aromatique de la protéine, le nucléotide possédant des propriétés intrinsèques susceptibles de faciliter la formation de cet adduit (Haley, 1991). Ainsi Antonoff *et al.* (1984) signalent que la photoincorporation de l'AMP cyclique est optimale à 280 nm, suggérant ainsi que le groupement photactivable est issu d'un acide aminé aromatique du site de fixation, et non du nucléotide lui-même. L'usage du marquage de photoaffinité direct est donc très restreint en raison d'une part de la fonction de la protéine (fixation d'un substrat nucléotidique), d'autre part des propriétés intrinsèques de la protéine au niveau du site de fixation du substrat (présence d'un acide aminé aromatique pouvant éventuellement réagir avec le substrat). Par ailleurs, l'incorporation covalente nécessite des temps de photolyse élevés, à des longueurs d'onde situées dans les UV lointains, dont les effets conduisent à la destruction simultanée de l'intégrité de la protéine par des processus telle que la photooxydation des noyaux aromatiques. Cependant, cette technique a pu aboutir à quelques résultats d'importance. Ainsi, Stroop *et al.* (1989) sont parvenus à mettre en évidence, par cette technique, deux sites de fixation du GMP cyclique dans une phosphodiesterase. Garabedian et Yount (1990) ont

identifié, par marquage de photoaffinité direct de la myosine en présence d'UDP tritié, un résidu glutamique du site de fixation des bases puriques. Delmer *et al.* (1991) ont isolé la sous-unité catalytique d'une callose synthétase par marquage de photoaffinité direct en présence de [³²P]UDP-glucose. Notons que ces deux derniers travaux permettent d'envisager une stratégie similaire sur les UGT, l'UDPGA radiomarqué étant disponible auprès des fournisseurs de produits chimiques.

III.5.4. Principales applications des sondes photoactivables

III.5.4.1. Identification d'un récepteur

La localisation, la caractérisation et l'isolement d'un composant inconnu de la fonction cellulaire peuvent être effectués par marquage de photoaffinité. Ainsi, l'utilisation d'un ligand photoactivable permet d'identifier dans un milieu complexe la ou les protéines présentant une certaine affinité avec le composé. Möhler *et al.* (1980) ont identifié par cette technique un récepteur aux benzodiazépines dans le cerveau à l'aide du flunitrazepam tritié. Haley (1983) rappelle l'utilisation de nucléotides photoactivables de type 8-azidopurine pour la localisation cellulaire des sites de fixation des nucléotides. Ito *et al.* (1992) ont identifié dans les membranes de mastocytes de souris le récepteur de la prostaglandine I, inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et vasodilatateur puissant, par marquage de photoaffinité avec un ligand photoactivable. La purification et l'identification d'un récepteur ou d'une enzyme peuvent être effectuées par marquage de photoaffinité d'un homogénat cellulaire, en corrélant la photoincorporation de la radioactivité à l'activité enzymatique (Drake et Elbein, 1992).

III.5.4.2. Caractérisation structurale d'un récepteur

Comme nous l'avons précédemment signalé par quelques exemples, le marquage de photoaffinité peut fournir des informations sur la localisation de peptides appartenant au site

de fixation. Par ailleurs, la conformation de ce site peut être caractérisée par l'utilisation combinée d'un ligand successivement substitué en divers endroits par des groupements photoactivables. L'identification de multiples fragments peptidiques permet une caractérisation topologique du site récepteur (Figure 17).

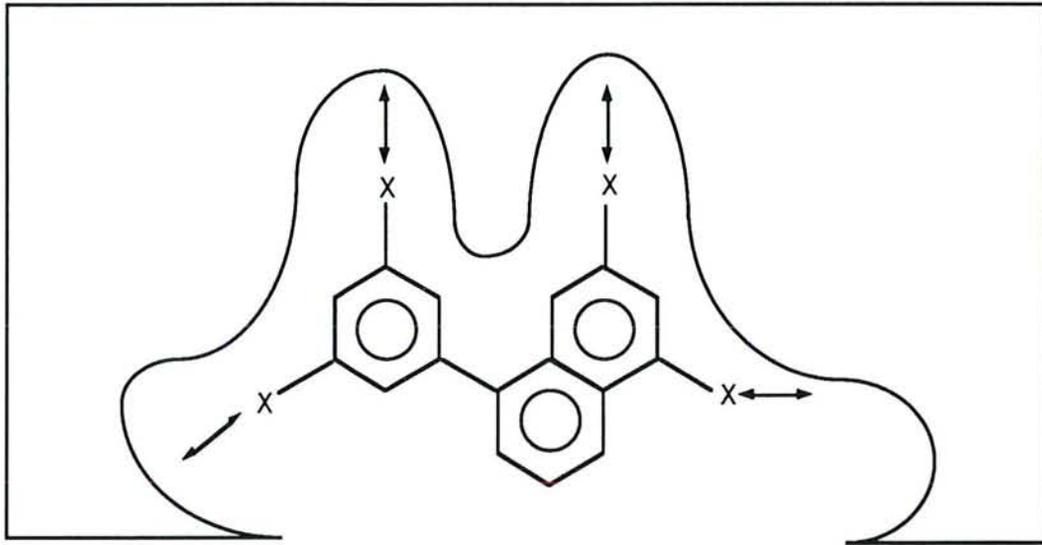


Figure 17. Représentation schématique de plusieurs ligands photoactivables dans un site récepteur

X représente la localisation du groupement photoactivable sur un ligand. Dans la plupart des cas, un marqueur de photoaffinité possède un seul groupement photoactivable.

Ainsi, Powers *et al.* (1991) ont utilisé une série homogène de ligands photoactivables de longueur croissante pour définir la distance entre deux sites de fixation de sous-unités d'un récepteur pancréatique. Chatrenet *et al.* (1990) ont défini l'environnement du site récepteur à l'acétylcholine à l'aide de toxines photoactivables. Galzi *et al.* (1991) ont caractérisé la transition allostérique provoquée par un effecteur à l'aide d'un antagoniste photoactivable du récepteur de l'acétylcholine.

III.5.5. UGT et marqueurs de photoaffinité

III.5.5.1. Marquage de photoaffinité de l'UGT-morphine par le flunitrazepam

Le flunitrazepam, inhibiteur compétitif de la glucuroconjugaison de la morphine dans les microsomes de foie de rat, a été utilisé par Thomassin et Tephly (1990) comme marqueur de photoaffinité de cette isoforme. Les auteurs ont montré une incorporation, sous irradiation UV, de la sonde tritiée à l'isoforme impliquée. Ainsi, les entités radiomarquées sont co-éluées avec l'UGT-morphine lors de la purification. Par ailleurs, l'analyse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS met en évidence un polypeptide tritié dont la masse moléculaire apparente est comparable à celle d'un monomère de l'UGT-morphine (56 KDa). L'identification d'un peptide radiomarqué n'a cependant jamais encore été publiée.

III.5.5.2. L'acide azido UDP-glucuronique

Drake *et al.* (1989) ont mis au point la synthèse d'un dérivé nucléotidique photoactivable, le [β -³²P]5-azido-UDP-glucose, pour le marquage de photoaffinité des enzymes à UDP-glucose (Lin *et al.*, 1989, Frost *et al.*, 1990). L'acide 5-azido-UDP-glucuronique (Figure 18) a été obtenu enzymatiquement à partir de l'azido-UDP-glucose en ajoutant une étape d'oxydation par l'UDP-glucose déhydrogénase (Drake *et al.*, 1991). La synthèse (détaillée en Matériels et Méthodes) est obtenue par une voie chimique et une voie enzymatique.

Cette dernière sonde a trouvé de nombreuses applications dont certaines, grâce à une collaboration, sont le sujet même de ce travail. Citons par ailleurs le travail de Drake *et al.* (1992) qui a mis en évidence l'orientation luminale des UGT dans les microsomes de foie de rat en combinant marquage de photoaffinité par l'azido-UDPGA avec trypsinolyse avant et après traitement par des détergents. Van de Rijn et Drake (1992) ont utilisé cette même sonde pour identifier une hyaluronate synthétase impliquée dans la synthèse polysaccharidique. Enfin, Radomska *et al.* (1993) ont mis en évidence une glycosyltransférase impliquée dans le métabolisme des acides biliaires chez l'homme en combinant marquage de photoaffinité avec les deux sondes précédentes et caractérisation du produit de la réaction de glycosylation.

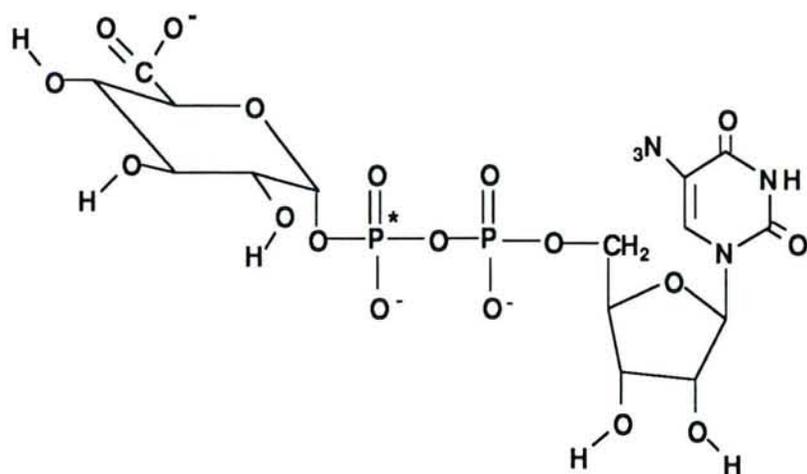


Figure 18. Structure de la sonde photoactivable acide 5-azido-UDP-glucuronique (Drake et al., 1991).

La localisation de la radioactivité est indiquée par un astérisque.

III.5.5.3. Quelques autres exemples de sondes photoactivables potentielles des UGT

Nous donnons dans ce paragraphe quelques exemples de ligands ayant été utilisés pour le marquage de photoaffinité de diverses protéines. Nous présentons ceux qui sont substrats et inhibiteurs compétitifs des UGT et peuvent donc être appliqués aux UGT.

Hutchinson et Mutopo (1979) ont mis en évidence une incorporation covalente de la bilirubine tritiée à la sérum albumine bovine et suggèrent l'intervention du groupement vinyle dans la formation de l'adduit.

Martyr et Benisek (1973) ont utilisé des stéroïdes substrats d'une stéroïde isomérase comme marqueurs de photoaffinité.

**objectifs
du travail**

Nous nous proposons d'étudier à la fois la structure et la fonction d'une isoforme d'UDP-glucuronosyltransférase hépatique humaine, l'UGT1*6, impliquée dans le métabolisme des substances phénoliques, après expression de façon stable dans les cellules V79.

Le but de notre travail est le suivant :

- 1- définir un mécanisme catalytique pour la glucuroconjugaison de ces substrats
- 2- apporter des informations sur l'organisation du site actif

Pour ce faire, nous utiliserons des inhibiteurs compétitifs analogues de l'état de transition, des agents chimiques modifiant irréversiblement des acides aminés et des sondes photoactivables dérivées de l'acide UDP-glucuronique et du glucuronide de 2-naphtol qui interagissent avec les sites de fixation de l'aglycone et du co-substrat. L'apport de la modélisation moléculaire nous permettra d'accéder à l'organisation spatiale de ces deux sites.

Les points suivants seront plus particulièrement développés :

- 1) synthèse de marqueurs de photoaffinité et évaluation du pouvoir inhibiteur de composés analogues de substrats sur l'UGT1*6.
- 2) purification de l'enzyme recombinante après marquage de photoaffinité
- 3) utilisation d'inhibiteurs analogues de l'état de transition pour l'étude de la topologie du site actif et du mécanisme catalytique
- 4) identification des résidus d'acides aminés du site actif impliqués dans le processus catalytique

**matériels
et
méthodes**

I. PREPARATION DES MICROSOMES DE FOIE DE RAT

I.1. Induction au 3-méthylcholanthrène et au clofibrate

Le 3-MC (Sigma, St. Louis, USA) est dispersé dans une huile végétale et administré par voie intrapéritonéale à un premier lot de rats à raison d'une administration de 80 mg.kg^{-1} , 5 jours avant le sacrifice.

Un second lot de rats reçoit pendant 7 jours du Clofibrate (I.C.I. Pharma, Enghiens, France) après dissolution dans l'acétone, intégration à la nourriture puis évaporation du solvant, à raison de 3.3 g.kg^{-1} de nourriture, soit approximativement $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Les rats sont mis à jeûn la veille du sacrifice.

I.2. Fractions subcellulaires microsomales

Les microsomes sont préparés par ultracentrifugation différentielle selon la technique de Hogeboom (1955). Les foies sont prélevés, broyés au Potter-Elvehjem, puis centrifugés à 10000 g pendant 20 minutes en présence d'une solution de 1 mM Tris-HCl (pH 7,4), $0,25 \text{ M}$ saccharose. Le surnageant est centrifugé 1 heure à 100000 g . Le culot de microsomes est repris dans le tampon et conservé à -80°C . La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant une courbe étalon de SAB.

I.3. Solubilisation des microsomes

tampon de solubilisation:

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
10 % (v/v) Glycérol
5 mM $\text{MgCl}_2 (6 \text{ H}_2\text{O})$

330 mg de protéines microsomales de foie de rat induit au 3-MC sont dilués dans le tampon de solubilisation à la concentration finale de 4 mg.ml^{-1} . Le détergent (CHAPS) est ajouté pour atteindre une concentration finale de 8 mM puis les microsomes sont réhomogénéisés à l'aide d'un Dounce. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 4°C et centrifugé une heure à 100000 g. La fraction solubilisée est répartie en aliquotes puis congelée à -20°C .

II. CULTURE DE LA LIGNEE RECOMBINANTE V79-UGT1*6

L'établissement de la lignée cellulaire recombinante utilisée dans ce travail et exprimant de manière stable l'UGT1*6 a été réalisé au laboratoire (Fournel-Gigleux *et al.*, 1990).

II.1 Milieu de culture et lignée cellulaire

Les cellules V79 recombinantes sont cultivées en milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) supplémenté par 10% (v/v) de Nu-serum^R (TEBU, le Perray-en-Yvelines, France), $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ de streptomycine et $100 \text{ unités.ml}^{-1}$ de pénicilline.

La culture des cellules s'effectue dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre incubées à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2 . Les cellules sont repiquées à une densité de 2.10^6 par boîte dans 10 ml de milieu de culture supplémenté. La confluence est atteinte en général après 48 heures. Les cellules sont récoltées 72 heures après repiquage après un traitement de 24 heures au butyrate de sodium (2 mM, Sigma). Elles sont lavées à l'aide d'une solution de PBS (phosphate-buffer saline, Gibco), grattées et centrifugées à 500 g pendant 10 minutes à 4°C . Les culots cellulaires sont alors conservés à -80°C jusqu'à utilisation pour préparation des fractions membranaires.

II.2. Préparation des fractions membranaires

Les fractions membranaires de la lignée cellulaire recombinante sont obtenues par ultracentrifugation différentielle. Pour cela, environ 110 mg de protéines d'homogénat cellulaire sont resuspendues dans environ 60 ml d'un tampon HEPES, 5 mM (pH 7,4)

contenant 0,25 M de saccharose. L'homogénat est alors soumis à trois sonications successives de 10 secondes (Vibracell, Bioblock). Puis l'homogénat est centrifugé à 6500 g pendant 10 minutes et le surnageant est centrifugé à 100000 g pendant 60 minutes. Le culot obtenu est homogénéisé dans environ 10 ml de tampon HEPES, 5 mM (pH 7,4), saccharose, 0,25 M puis congelé à -80°C après avoir été aliquoté en fractions de 200 µl.

III. ELECTROPHORESE ET IMMUNOREVELATION DE L'UGT1*6

III.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est réalisée d'après la méthode de Laemmli (1970).

Gel de concentration :

30 % - 0,8 % (p/v) acrylamide-bisacrylamide, 2,5 ml
0,5 M Tris-HCl(pH 6,8), 1,88 ml
50% (v/v) glycérol, 0,75 ml
H₂O, 10,3 ml
20% (p/v) SDS, 0,15 ml
10% (p/v) persulfate d'ammonium, 0,15 ml
TEMED, 10 µl.

Gel de séparation (12.5%) :

30%-0.8% (p/v) acrylamide-bisacrylamide, 6,25 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 3,76 ml
50% (v/v),glycérol, 1,5 ml
H₂O, 4,59 ml
SDS, 20% (p/v), 0,15 ml
persulfate d'ammonium, 10% (p/v), 75 µl
TEMED, 5 µl.

Tampon de migration :

glycine, 14,4 g
Tris, 3 g
SDS, 1 g
H₂O, qsp 1 l.

Tampon de dénaturation :

8 M Urée (H₂O), 9 ml
Tris, 0,05 g
DTT, 0,5 g
20 % (p/v) SDS, 5 ml
bleu de bromophénol
H₂O, pH 8,0, qsp 20 ml

Standards de masse moléculaire (Biorad, Ivry-sur-Seine) : phosphorylase B : 97,4 kDa ;
sérum albumine bovine : 66,2 kDa ; ovalbumine : 45,0 kDa ; anhydrase carbonique : 31,0
kDa ; inhibiteur de la trypsine : 21,5 kDa.

Le gel est coloré après migration par une solution de bleu de Coomassie à 0,2% (p/v) pendant
1/2 heure à 1 heure, puis décoloré dans une solution aqueuse à 10% (v/v) d'acide acétique et
8% (v/v) d'éthanol.

III.2. Immunorévélation

Les protéines sont transférées du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose ou
d'Immobilon P^R (Millipore). Le transfert est obtenu à 0,8 mA.cm⁻² de gel après 90 minutes
sur un appareil de transfert (Novablot, 2117-250, LKB). La nitrocellulose est colorée dans
une solution de rouge Ponceau (200 mg de Ponceau S pour de 100 ml de TCA à 3% (v/v)).

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 3 heures en présence du tampon TBST
(0,15 M Tris-HCl (pH 8.5) ; 10 mM NaCl ; 0.5% (v/v) Tween 20 ; 0,02% (p/v) azide de
sodium) contenant 3% (p/v) de SAB. L'immunorévélation est réalisée à l'aide d'anticorps
polyclonaux obtenus au laboratoire. Ces anticorps développés chez le mouton ont été dirigés
contre un fragment peptidique correspondant à 120 acides aminés de la partie N-terminale de
l'UGT 1*6 (Ouzzine *et al.*, manuscrit soumis).

Les anticorps sont incubés en présence de la membrane de nitrocellulose pendant une nuit à
température ambiante. Le lendemain, la membrane est lavée pendant 6 fois 30 minutes dans le

tampon TBST. Le second anticorps couplé à la phosphatase alcaline est dirigé contre les IgG de mouton (Sigma). La solution de second anticorps est diluée au 1/5000^{ème} dans le tampon TBST puis incubée pendant 30 minutes avec la membrane de nitrocellulose. Cette membrane est ensuite lavée pendant 4 fois 30 minutes dans le tampon TBST. L'immunorévélation s'effectue de la manière suivante :

Tampon de révélation :

Tris-HCl, 6 mM (pH 9,5)
NaCl, 100 mM
MgCl₂, 5 mM

Solution de révélation :

NBT (nitrobleu tetrazolium), 33 mg pour 660 µl d'une solution à 70% (v/v) de diméthylformamide
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate), 16,5 mg pour 330 µl de DMF.

Le NBT puis le BCIP sont ajoutés à 100 ml du tampon de révélation de la phosphatase alcaline. Le blot est incubé dans cette solution jusqu'à révélation des bandes avec un bruit de fond minimum. La nitrocellulose est lavée à l'eau distillée.

IV. DOSAGE DES ACTIVITES UGT

IV.1. Glucuroconjugaison de la 4-méthylumbelliférone

La glucuroconjugaison de la 4-MO est déterminée d'après la technique décrite par Lilienblum *et al.* (1982) basée sur la fluorescence du glucuronide formé.

La réaction de glucuroconjugaison est initiée par l'addition d'UDPGA. Le mélange réactionnel (fraction membranaire, 3 µg de protéines ; 0,125 M Tris-HCl (pH 7,4) ; 20 mM

MgCl₂ ; 1 mM 4-MO (DMSO) ; 5 mM UDPGA (H₂O)) est maintenu à 37°C sous agitation pendant 30-40 minutes. La réaction de glucuroconjugaison est arrêtée par addition de 800 µl d'eau glacée. L'extraction de la 4-MO non conjuguée est effectuée par addition de 4 ml d'acétate d'éthyle et centrifugation à 500 g pendant 10 minutes. La quantité de glucuronide est déterminée à l'aide d'un fluorimètre Hitachi F-2000 (ScienceTech, les Ullis, France) par l'ajout de 200 µl de la phase aqueuse du mélange réactionnel à 1,8 ml d'un tampon glycine-NaOH (pH 10,3). Une droite étalon, obtenue à l'aide du β-D-glucuronide de 4-MO (Sigma), permet de quantifier le glucuronide formé.

IV.2. Glucuroconjugaison du 1-naphtol

La glucuroconjugaison du 1-naphtol par les fractions membranaires de cellules recombinantes est déterminée par la méthode de Bock et White (1974).

Après 15 minutes d'incubation à 37°C (fractions membranaires : 10 µg de protéines; 0,1 M Tris-maléate-NaOH (pH 7,4) ; 20 mM MgCl₂ ; 6,6 nmoles d'α-naphtol,1-¹⁴C (104000 dpm, 7,1 mCi.mmole⁻¹) ; 0,5mM (DMSO/H₂O 97/3 V/V) d'α-naphtol ; 5 mM d'UDPGA (H₂O)), la réaction est arrêtée par addition de 200 µl de glycine-acide trichloroacétique (TCA), 0,6 M (pH 2,2) puis le substrat non conjugué est extrait par addition de 4 ml de chloroforme et centrifugation pendant 10 minutes à 2000 g. La production de glucuronide est quantifiée sur un compteur à scintillation Beckman LS-01 en mélangeant 100 µl de la phase aqueuse avec 5 ml de cocktail Aquasafe 500 (Berthold, Elancourt, France).

IV.3. Glucuroconjugaison de la bilirubine

Cette activité a été déterminée sur des microsomes de foie de rat induits au clofibrate. La latence de l'enzyme est levée par activation en présence d'un détergent, la digitonine (Merck Darmstadt, Allemagne). L'activation maximale est obtenue dans un rapport pondéral détergent/protéine égal à 2. Après 30 minutes de traitement, l'activité enzymatique est déterminée selon la technique de Heirwegh *et al.* (1972) modifiée comme suit :

Réactifs :

- bilirubine : 5 mg (8,6 μ moles) dans 0,5 ml de soude 0,05 N.
Ajouter 9,5 ml de SAB (20 mg.ml⁻¹, H₂O)
- réactif de diazotation : mélanger 100 μ l d'éthylanthranilate (Fluka) à 10 ml d'HCl 0,15 N. Ajouter 300 μ l d'une solution à 0,5 % (p/v) de nitrite de sodium

La réaction est initiée par l'ajout d'UDPGA et arrêtée après 30 minutes d'incubation à 37°C (150 μ l d'un tampon 0,4 M Tris-HCl (pH 7,7) ; 60 mM MgCl₂ ; 200 μ g de microsomes activés ; 50 μ l d'une solution à 0,85 mM de bilirubine ; 50 μ l d'une solution à 20 mM (H₂O) d'UDPGA) par l'addition de 500 μ l de 2 M glycine-HCl (pH 2,7). Le réactif de diazotation (500 μ l) est ajouté. La diazotation est arrêtée après 30 minutes dans l'obscurité par addition de 250 μ l d'une solution à 10% (p/v) d'acide ascorbique. Les glucuronides de bilirubine diazotés sont extraits par 1 ml de méthylpropylcétone (Merck) et l'absorbtion du glucuronide diazoté est mesurée à 530 nm contre la méthylpropylcétone, après centrifugation des tubes à 500 g pendant 10 minutes.

IV.4. Evaluation générale d'activités de glucuronoconjugaison

Bansal et Gessner (1980) ont décrit une méthode permettant de mettre en évidence la glucuronoconjugaison de composés par séparation par chromatographie sur couche mince (silice) des substrats conjugués à l'UDPGA, [glucuronyl-¹⁴C(U)] et révélation par autoradiographie.

La réaction (50 μ l tampon 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) ; 10 mM MgCl₂ ; 5 μ l de substrat à 10 mM (méthanol) ; 60 μ g de protéines de microsomes activés au Triton X-100 (voir paragraphe IV.2) ; 10 μ l de 1mM (H₂O) UDPGA ; 0,7 nmole d'UDPGA, [glucuronyl-¹⁴C(U)] (289,1 mCi.mmole⁻¹, NEN, Dupont de nemours, les Ulis, France) est arrêtée après 20 minutes d'incubation à 37°C par l'addition de 200 μ l d'éthanol absolu. Les échantillons sont placés

dans la glace puis centrifugés à 2000 g. 200 µl de surnageant sont évaporés à sec, repris dans 10 µl d'éthanol et 5 µl d'eau, puis déposés sur plaque de silice (Silicagel 0,25 mm, Merck).

Phase mobile :

n-butanol, 70 ml
acétone, 50 ml
acide acétique glacial, 18 ml
ammoniaque 30 %, 1,5 ml
H₂O, 60 ml

Les plaques sont séchées après migration, puis vaporisées avec une solution de Butyl-PBD (1 %, p/v (toluène), Merck). Les autoradiographies sont développées après 2 à 5 jours d'exposition. Les glucuronides localisés sur la silice (Rf environ 0,8) sont grattés et la silice est dispersée dans 5 ml du cocktail Aquasafe 500 puis placée dans le compteur à scintillation (LS1801, Beckman) pour quantification de la radioactivité.

Nous avons aussi utilisé une variante de cette méthode, mise au point par Radomska *et al.* (1993), pour évaluer l'éventuelle activité de glycosylation (substrat donneur : UDP-glucose) de l'UGT1*6 recombinante.

La réaction enzymatique (30 µl de tampon 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ ; 10 µl d' α -naphthol 10 mM (DMSO) ; 12,7 nmoles d' α -naphthol, 1-¹⁴C (200 000 dpm, 7,1 mCi.mmole⁻¹) ; 10 µl de 20 mM (H₂O) UDPGA ; 50 µg de protéines de fractions membranaires) est arrêtée par addition de 20 µl d'éthanol absolu à 4°C après 20 minutes d'incubation, puis les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 5 000 g. 60 µl du surnageant sont déposés sur plaque de silice ((¹⁹C)-Silica gel, Baker, Phillipsburg, USA).

Phase mobile :

chloroforme, 65 ml
méthanol, 25 ml
acide acétique, 2 ml
eau, 4 ml

V. INACTIVATION DES UGT PAR MODIFICATION CHIMIQUE

V.1. Préparation des inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles sont dilués dans une solution de DMSO.

Le diéthylpyrocarbonate (DEPC) est quant à lui préparé comme suit : la solution-mère de DEPC est diluée dans de l'éthanol absolu à 4°C puis une aliquote de 10 µl de cette solution est ajoutée à 3 ml d'une solution d'imidazole 10 mM (pH 7.5). La concentration effective du réactif est déterminée par lecture spectrophotométrique à 242 nm en utilisant un coefficient d'absorption molaire de $3200.M^{-1}.cm^{-1}$ pour la détection des dérivés carbéthoxyhistidine formés (Ovadi *et al.*, 1967). D'une manière générale, les solutions de DEPC, très sensibles à l'eau, sont préparées extemporanément dans de l'éthanol absolu à 4°C et sont maintenues sous atmosphère d'azote jusqu'à utilisation.

V.2. Inactivation par le DEPC

V.2.1. Cinétique d'inactivation

Les fractions membranaires sont diluées à $1.3 mg.ml^{-1}$ en protéines dans un tampon 50 mM Na_2PO_4/KH_2PO_4 (pH 6,0), 5 mM $MgCl_2$. L'inactivation de l'UGT 1*6 est initiée par l'ajout de solutions de concentration variable en DEPC (0,1 mM - 0,5 mM). La concentration en solvant (éthanol absolu) est limitée à 2% (v/v) et dans ces conditions n'affecte pas l'activité enzymatique. 10 µl du milieu d'inactivation sont prélevés régulièrement et dilués 60 fois dans le tampon d'activité enzymatique de glucuronoconjugaison de la 4-MO dans lequel ont été ajoutés 5 mM d'imidazole. L'activité enzymatique de glucuronoconjugaison de la 4-MO est alors déterminée comme indiqué précédemment. Parallèlement, les fractions membranaires sont traitées de façon identique par 2% (v/v) d'éthanol absolu et l'activité ainsi déterminée en fonction du temps représente 100% d'activité résiduelle.

Par ailleurs, l'efficacité de la dilution pour arrêter l'inactivation de l'enzyme est vérifiée en ajoutant 0,5 mM de DEPC aux fractions membranaires préalablement diluées selon le protocole décrit ci-dessus.

La stabilité du DEPC en absence de fractions membranaires est évaluée en incubant le réactif dans le tampon de dilution des fractions membranaires pendant deux minutes. Un échantillon est prélevé en fonction du temps et la concentration effective en DEPC est déterminée selon le protocole décrit au paragraphe V.1.

V.2.2. Réversibilité de l'inactivation par l'hydroxylamine

L'effet du traitement par l'hydroxylamine de fractions membranaires préalablement inactivées par le DEPC est déterminé en évaluant l'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol en fonction de la concentration et du temps de présence de l'agent de réversibilité. Les concentrations finales en hydroxylamine varient de 50 à 200 mM et l'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol est déterminée comme indiqué précédemment.

Parallèlement, les fractions membranaires non inactivées par le DEPC sont traitées de la même façon par l'hydroxylamine afin d'évaluer l'effet de ce composé sur l'activité UGT 1*6.

V.2.3. Photoincorporation de l'acide azido-UDP-glucuronique en présence de l'enzyme inactivée au DEPC

Les fractions membranaires sont inactivées à pH 6 par des concentrations variables en DEPC et l'activité résiduelle de glucuroconjugaison de la 4-MO est déterminée pour chacun des échantillons. Simultanément, 50 µg de protéines non inactivées ou inactivées par des concentrations croissantes en DEPC sont incubés pendant 20 secondes avec 40 µM de la sonde radiomarquée [β -³²P]5-azido UDPGA puis irradiés pendant 90 secondes avec une lampe UV (UVS-11, 254 nm, Ultraviolet Products Inc.). Les protéines sont alors traitées par

200 μ l de TCA, 10% (p/v) puis soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS comme décrit précédemment. Le gel est séché puis soumis à autoradiographie. Les films sont développés après 2 à 4 jours d'exposition à -80°C et quantifiés à l'aide d'un vidéodensitomètre (Zeneid, Biomed Instruments).

V.2.4. Inactivation en présence de substrat

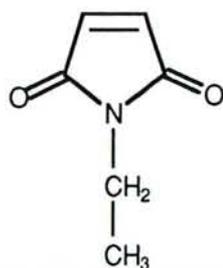
Dans un premier temps, l'absence de réactivité du DEPC avec la 4-MO et l'UDPGA doit être vérifiée. Pour cela, les substrats sont incubés en présence de DEPC (0,5 mM) pendant 2 minutes puis les substrats sont dilués dans le tampon d'activité enzymatique contenant 5 mM d'imidazole. L'activité enzymatique est alors déterminée en présence de ces substrats préalablement traités au DEPC, et comparée à celle obtenue en présence de substrats non traités.

L'effet de divers ligands de l'UGT 1*6 sur l'inactivation par le DEPC est évalué comme suit : l'inactivation par le DEPC est réalisée comme indiqué précédemment en présence de 4-MO et/ou d'UDPGA à des concentrations correspondant à 10 fois le K_m et 10 fois le K_i pour les expériences réalisées en présence d'inhibiteur de l'UGT1*6. Lorsque l'inactivation est réalisée en présence de 4-MO, la réaction de glucuroconjugaison est initiée par l'ajout d'UDPGA. Si le ligand mis en présence de l'enzyme lors de l'inactivation est l'UDPGA, la réaction de glucuroconjugaison est dans ce cas initiée par l'ajout de 4-MO.

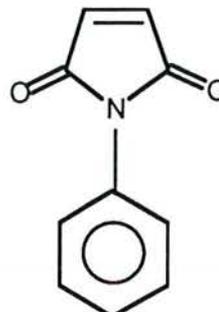
V.3. Inactivation par les dérivés maléimides

maléimides :

N-éthyl maléimide



N-phényl maléimide



Les solutions sont préparées extemporanément dans du DMSO. L'inactivation est réalisée comme indiqué au paragraphe V.2 pour le DEPC, avec les modifications suivantes :

Tampon d'inactivation :

50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,0)
5 mM MgCl_2

Tampon d'activité enzymatique :

0,125 M Tris-HCl (pH 7,4)
20 mM MgCl_2
1 mM dithiothréitol (Sigma)

L'inactivation est réalisée pendant 30 minutes. La quantité de solvant (DMSO) ajoutée est de 2% (v/v) et n'affecte pas l'activité enzymatique. L'inactivation est arrêtée par dilution (60 fois) dans le tampon d'activité enzymatique et l'activité de glucuronocouplage de la 4-MO est déterminée.

V.4. Etude de l'effet du dithiothréitol et du chlorure de cuivre

L'effet de ces agents de réduction et d'oxydation des cystéines a été évalué en suivant le protocole décrit au paragraphe V.2 pour l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC, dans les conditions suivantes :

- pour l'étude de l'effet du DTT, l'agent est incubé à des concentrations variant entre 0 et 10 mM et l'activité enzymatique est déterminée dans les différents échantillons.
- l'effet de CuCl_2 sur l'activité UGT1*6-4MO est évalué à la concentration de 10 mM.

Des aliquotes sont prélevées en fonction du temps de présence de CuCl_2 et du DTT avec les fractions membranaires diluées 60 fois dans le tampon d'activité enzymatique, puis l'activité de glucuroconjugaison de la 4MO est déterminée.

V.5. Effet du *N*-acétyl imidazole et du dicyclohexylcarbodiimide

Le *N*-acétyl imidazole (NAI, Sigma), agent de modification chimique des résidus tyrosine, est conservé à l'abri de l'humidité jusqu'à utilisation. Les fractions membranaires sont incubées en présence de NAI (0-15 mM) pendant 30 minutes, puis les fractions membranaires sont diluées 60 fois et l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO est déterminée.

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) est utilisé pour inactiver l'UGT1*6 dans une gamme de concentrations de 0 à 1mM selon un protocole similaire.

V.6. Inactivation par le NBD-Cl de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO dans les fractions solubilisées de microsomes de foie de rat

Les fractions de microsomes solubilisés (paragraphe I.3) sont incubées à la concentration de $5,6 \text{ mg.ml}^{-1}$ en protéines (pH 8,0) avec des quantités croissantes en NBD-Cl (0-2 mM). 10 μl de protéines sont prélevés à différents temps et dilués 200 fois dans le tampon de détermination de l'activité enzymatique. Les valeurs d'activité résiduelle sont exprimées par rapport à un essai en présence du solvant (DMSO).

VI. INHIBITEURS REVERSIBLES

La synthèse des inhibiteurs de la série PP présentés dans ce travail a été décrite par Paul *et al.*, 1993. Ils se caractérisent par une chaîne aliphatique *N*-acyl phénylaminoalcool et un groupement uridine séparés par une chaîne de nature variée. Certaines des structures possèdent un groupement isopropylidèneuridine (PP37P, PP50A, PP50B). Ces composés ont 1 à 2 carbones asymétriques. PP55A, PP55B, PP56B possèdent une stéréochimie connue. Les autres inhibiteurs correspondent au mélange des différents stéréoisomères (PP37 et PP37P).

La nomenclature chimique de ces composés est donnée ci-dessous et les structures sont représentées dans le Tableau 2 (paragraphe II.1., "Résultats et discussion").

| nom usuel | nomenclature |
|-----------|--|
| PP36 | 5'-[[N-(2-décanoylamino-3-hydroxy-3-phényl-propyloxy-carbonyl)glycyl]amino]-5'-déoxyuridine |
| PP37P | 5'-O-[[[(2-décanoylamino-3-hydroxy-3-phényl-propyloxy-carbonyl)amino]sulfonyl]-2',3'-O-isopropylidèneuridine |
| PP37 | 5'-O-[[[(2-décanoylamino-3-hydroxy-3-phényl-propyloxy-carbonyl)amino]sulfonyl]uridine |
| PP50 | 5'-O-[[[(2-décanoylamino-3-phényl-propyloxy-carbonyl)amino]sulfonyl]-2',3'-O-isopropylidèneuridine |
| PP55 | 5'-O-[[[(2-décanoylamino-3-phényl-propyloxy-carbonyl)amino]sulfonyl]uridine |
| PP56B | 5'-O-[[[(2-décanoyl-3-phényl-propyloxy-carbonyl)méthylsulfonyl]uridine |

VI.1. Détermination spectrophotométrique des concentrations

Les concentrations en inhibiteur sont déterminées sur la base des paramètres spectroscopiques des groupements uridine et isopropylidèneuridine :

$$\epsilon = 10000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\lambda = 260 \text{ nm}$$

VI.2. Préincubation des fractions membranaires en présence de phénylméthylsulfonylfluorure

Certains inhibiteurs sont de par leur structure des substrats potentiels des estérases et des protéases, celles-ci pouvant de ce fait modifier la concentration effective des composés *in vitro*.

Afin de tester cette éventualité, les effets inhibiteurs des composés sur l'activité UGT1*6-4-MO ont également été évalués en présence de PMSF (5 mM, éthanol) durant 30 minutes à

température ambiante. La quantité de solvant ajouté est de 2 % (v/v) et n'affecte pas l'activité enzymatique. Un échantillon de fractions membranaires non traitées au PMSF est mis en présence du solvant dans des conditions identiques. L'effet inhibiteur des structures est évalué sur les deux lots pour une concentration en inhibiteur de la série PP.

VI.3. Détermination des constantes d'inhibition

La détermination du K_m apparent pour l'UDPGA est obtenue en faisant varier la concentration du substrat donneur (0,05-5 mM) pour une concentration fixe en 4-MO de 1 mM. L'activité enzymatique est déterminée comme indiqué en paragraphe IV.1.

Le K_m apparent pour la 4-MO est obtenu en faisant varier la concentration du substrat accepteur (0,05-1 mM) pour une concentration fixe en UDPGA de 5 mM.

Les K_i apparents pour les différents inhibiteurs testés sont déterminés d'après la représentation secondaire de la pente (inhibiteurs compétitifs) ou l'intersection sur l'axe des ordonnées (inhibiteurs non compétitifs) de la représentation de Lineweaver-Burk en fonction de la concentration en inhibiteur.

Les concentrations inhibitrices 50 (IC_{50}) exprimant la concentration en inhibiteur pour laquelle on observe 50 % d'inhibition de l'activité enzymatique sont déterminées graphiquement sur une représentation semi-logarithmique de la concentration en inhibiteur en fonction de l'activité résiduelle.

Les inhibiteurs sont solubilisés dans du DMSO (sauf indication contraire). La quantité de DMSO n'excède jamais 7 % (v/v final) et, dans ces conditions, n'affecte pas l'activité enzymatique.

VI.4. Marquage de photoaffinité des fractions membranaires par l'acide [β - 32 P]5-azido UDP-glucuronique en présence de ligands des UGT

L'UGT1*6 est identifiée dans les fractions membranaires par marquage de photoaffinité au moyen de l'acide [β - 32 P]5-azido UDP-glucuronique selon la méthode décrite par Drake *et al.* (1992).

50 μg de protéines sont mis en présence de ligands (composés PP, UDPGA), aux concentrations indiquées sur les figures, dans un tampon 100 mM HEPES-NaOH (pH 7,0), 6 mM MgCl_2 . 40 μM d'acide [β - ^{32}P]5-azido UDP-glucuronique sont incubés avec le mélange pendant une minute à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors irradié à l'aide d'une lampe UV (UVP-11, 254 nm, Ultraviolet Products Inc.) pendant 90 secondes. Les protéines sont précipitées par l'acide trichloroacétique (150 μl , 10 % v/v), puis centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est dissout dans la solution de dénaturation utilisée pour l'électrophorèse. Les échantillons sont alors soniqués et soumis à ébullition pendant une minute, avant d'être déposés sur gel d'électrophorèse.

VI.5. Etude d'une préincubation de PP56B avec les fractions membranaires sur la photoincorporation de l'acide [β - ^{32}P]5-azido UDP-glucuronique et sur l'activité de l'UGT1*6

L'incorporation de la sonde acide [β - ^{32}P]5-azido UDP-glucuronique est étudiée en fonction du temps d'incubation de PP56B avec les fractions membranaires.

L'inhibiteur (0,3 mM) est incubé à température ambiante avec les fractions membranaires lors de durées variant de 0 à 40 minutes, puis l'étape de marquage de photoaffinité avec l'acide [β - ^{32}P]5-azido UDP-glucuronique est réalisée comme indiqué précédemment.

Par ailleurs, la réversibilité de l'inhibition est étudiée en incubant le composé PP56B (0,1 mM) avec les fractions membranaires pour des temps variant de 0 à 40 minutes. Des aliquotes sont prélevées régulièrement, diluées 60 fois dans le tampon d'activité enzymatique, puis cette activité est déterminée. L'activité résiduelle en fonction du temps est estimée par rapport à un échantillon sans inhibiteur, traité de manière identique.

VII. MARQUAGE DE PHOTOAFFINITE

VII.1. Acide [β - 32 P]5-azido UDP-glucuronique

Cette synthèse chimique et enzymatique a été mise au point par Drake *et al.* (1991) sur la base de la synthèse de la sonde photoactivable [β - 32 P]5-azido UDP-glucose (Drake *et al.*, 1989).

VII.1.1. Synthèse

Réactifs :

saccharose phosphorylase (Sigma)
 NH_4HCO_3 (Sigma)
Benzyl-DEAE-Cellulose (DE-52, Sigma)
 $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ (ICN)
Sucrose (Sigma)
NAD (Sigma)
UDP-glucose pyrophosphorylase de levure (Sigma)
UDP-glucose déhydrogénase (Sigma)
phosphatase alcaline (Sigma)
pyrophosphatase inorganique (Sigma)

Le schéma global de synthèse est résumé sur la Figure 19.

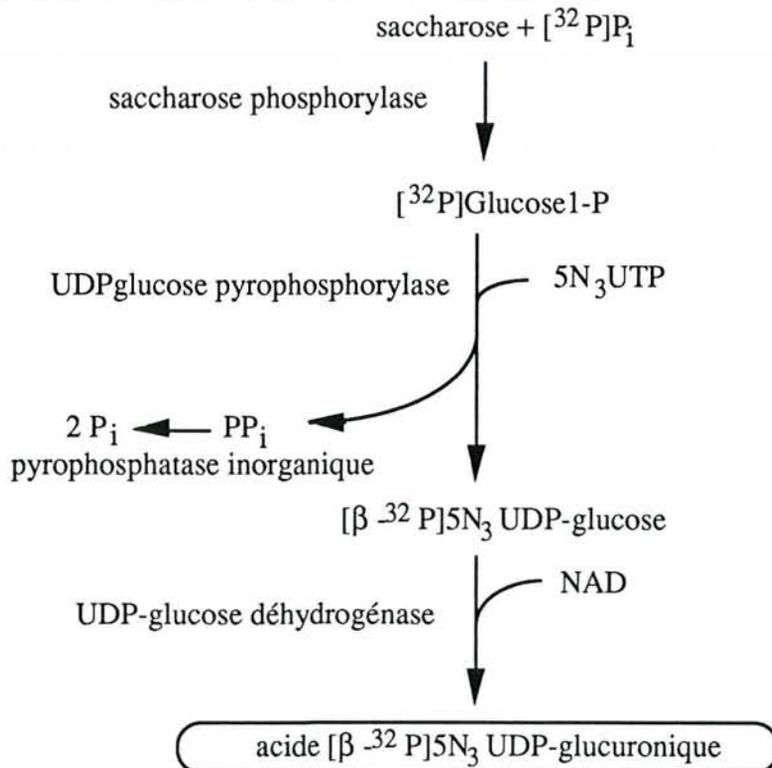


Figure 19. Schéma de synthèse du marqueur de photoaffinité acide [β - 32 P]5-azido UDP-glucuronique

L'étape de synthèse chimique consiste à élaborer le 5-azido-UTP, substrat de l'UDP-glucose pyrophosphorylase. Ce produit a été synthétisé au laboratoire de B.E. Haley (Lexington, Kentucky) selon le protocole décrit par Radomska et Drake (1993).

Synthèse enzymatique :

milieu réactionnel (tube Eppendorf) :

10 μ l de 0,5 M Tris-HCl (pH 8,5)

2 μ l de 0,1 M NaH_2PO_4

4 μ l de 0,1 M Na_2HPO_4

100 μ l de 30 mM saccharose

10 μ l de 100 mM MgCl_2

Ajouter 10 mCi de [32 P]Pi puis la saccharose phosphorylase. Maintenir à température ambiante pendant 1 heure.

Conditionnement de la DEAE (purification des sondes) :

Laisser gonfler le gel DE-52 dans 1 M NH_4CO_3 . Le rincer à l'eau bidistillée puis à nouveau dans la solution 1 M NH_4CO_3 . Placer le gel dans une colonne de purification (10 ml environ) puis laver le gel avec environ 100 ml d'eau.

Mélange réactionnel (suite)

0,6 μ mole de 5- N_3 -UTP

UDP-glucose pyrophosphorylase (100 U) et pyrophosphatase inorganique (100 U) dans 100 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 % (v/v) glycérol

UDP-glucose déhydrogénase (2,5 U) dans 100 μ l de tampon 0,25 M glycine-NaOH (pH 8,7)

50 μ l de 40 mM NAD

Ajouter au premier mélange réactionnel. Maintenir à température ambiante pendant 30 minutes. Ajouter 2,5 µg de phosphatase alcaline une minute avant de déposer sur la colonne DEAE. Eluer goutte-à-goutte par un gradient de NH_4HCO_3 (0-400 mM, durée 30 minutes environ). Les tubes contenant la radioactivité sont sélectionnés avec l'aide d'un compteur Geiger pour analyse spectrophotométrique : les dérivés 5-azido-uridine possèdent une absorption caractéristique à 288 nm ($\epsilon = 7600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les tubes contenant les sondes acide $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]5\text{-azido UDP-glucuronique}$ et $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]5\text{-azido UDP-glucose}$ sont alors évaporées à sec à l'évaporateur rotatif puis le résidu est solubilisé dans une solution de méthanol et conservé à -20°C .

VII.2 PURIFICATION DE L'UGT1*6 MARQUEE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE

Un appareil d'électrophorèse préparative (Prep Cell 491) a été récemment mis sur le marché par Biorad. Il permet une bonne séparation, dans des conditions dénaturantes, de protéines de masses moléculaires apparentes voisines.

Préparation du gel :

Le gel de séparation (12%) est préparé comme indiqué au paragraphe III. La solution est déposée dans un support circulaire (3 cm x 6 cm) et la polymérisation est obtenue après une nuit, sous un circuit d'eau glacée. Le lendemain, le gel de séparation est préparé et déposé dans le support circulaire (3 cm x 2 cm).

Tampon de migration :

Glycine, 28,8 g
Tris, 6 g
SDS, 2 g
 H_2O , qsp 2l

Préparation des échantillons :

A 3 mg de protéines des fractions membranaires sont ajoutés 100 μ l d'un tampon HEPES-NaOH, 100 mM, $MgCl_2$, 6 mM. La sonde [β - ^{32}P]5-azido UDP-glucuronique (40 μ M) est alors ajoutée au milieu puis l'irradiation et la préparation des échantillons sont réalisées comme indiqué en paragraphe V.2.3. Par ailleurs, 7 mg de protéines de fractions membranaires sont précipités au TCA et préparés pour une électrophorèse selon le protocole habituel. Les deux échantillons de protéines sont alors rassemblés et 2 marqueurs colorés de masse moléculaire sont ajoutés à l'ensemble:

- la triose phosphate isomérase (Sigma) : 35,2 kDa
- la pyruvate kinase (Sigma) : 75,2 kDa

L'échantillon est déposé sur le gel et l'électrophorèse préparative est développée à un débit du tampon de migration de 0,8 $ml \cdot min^{-1}$. Les échantillons sont collectés par fraction de 1 ml entre l'élution du premier marqueur de masse moléculaire (35,2 kDa) et celle du deuxième marqueur (75,2 kDa).

Les échantillons sont déposés sur des cellules de concentration (Amicon) et des aliquotes des fractions d'élution sont prélevées et déposées sur un fragment de nitrocellulose. Le Dot Blot est révélé avec les anticorps anti-UGT1*6 selon le protocole décrit au paragraphe III.2. Les fractions protéiques (correspondant à vingt tubes environ) révélées par cette technique sont soumises à une électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide. Le gel est séché et soumis à une autoradiographie (15 jours environ).

VII.3. Glucuronide de 8-azido-2-naphtol

VII.3.1. Synthèse du 8-azido-2-naphtol

La synthèse a été mise au point au laboratoire par M. Said de la manière suivante (Figure 59) : 2,5 g (0,01 mole) de 8-amino-2 naphtol sont dissouts dans 10 ml d'eau et 5 ml de THF. 5 ml d'HCl 12 N sont ajoutés à 0°C, puis 1,1 équivalent de $NaNO_2$ en solution à 25 % (p/v). 1,5

équivalent de NaN_3 (solution à 20 % p/v) est ajouté. Le précipité est lavé à l'eau puis placé au dessiccateur à l'abri de la lumière. Le rendement de la réaction est de 57 %. La structure a été vérifiée par analyse des spectres infra-rouges et RMN du proton.

VII.3.2. Synthèse du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide

La synthèse enzymatique de glucuronide a été obtenue à l'aide de microsomes immobilisés sur la base d'une technique originale mise au point au laboratoire par Haumont *et al.* (1991).

2 ml de microsomes de rat induits au 3-MC (18 mg.ml^{-1}) sont dilués au demi dans un tampon Tris-HCl, 0,1 M (pH 7,4), MgCl_2 , 10 mM (tampon 1). 25 ml d'une solution de chlorure de barium (2 %, v/v) sont préparés dans un bécher. 160 mg de polyéthylèneimide (PEI, Fluka) sont dilués dans 4 ml de tampon 1. 60 mg d'alginate de sodium (de *Macrocystis pyrifera*, Sigma) sont dilués dans 2 ml d'eau. Les microsomes sont mélangés à l'alginate, puis placés dans le corps d'une seringue. De fines gouttes de la suspension entrent en contact avec la solution de chlorure de barium pendant 15 minutes (étape de polymérisation) à 4°C. Les billes ainsi formées sont filtrées puis lavées à l'eau bidistillée, puis dans le tampon 1. Les billes sont alors consolidées par contact pendant une nuit sous agitation dans la solution de PEI à 4°C. Les billes sont alors filtrées, lavées dans le tampon 1 et conservées à 4°C en présence d'azide de sodium (0,1 % p/v) jusqu'à utilisation.

8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide (NAG)

L'incubation est réalisée à l'obscurité dans un tube de 5 ml en polypropylène.

mélange réactionnel :

640 mg de billes (36 mg de protéines microsomales)
250 μl de 60 mM 8-azido-2-naphtol (DMSO) (3 mM finale)
500 μl de 40 mM UDPGA (H_2O) (4 mM finale)
25 μmoles d'acide D-saccharique-1.4-lactone (5 mM finale)
3,25 ml de tampon 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl_2

L'incubation dure 90 minutes à 37°C. Le milieu aqueux est récupéré par décantation, puis acidifié par 400 µl de tampon 0,1 M Glycine-TCA (pH 2,8). L'extraction du 8-azido-2-naphtol non conjugué est effectuée avec 2 ml de chloroforme. La phase aqueuse est prélevée soigneusement avec une pipette Pasteur, puis filtrée sur une cartouche Sep-Pak (Millipore, MA) préalablement conditionnée avec du méthanol puis le tampon d'acidification. Le glucuronide est désorbé par du méthanol (5ml) après un lavage dans le même tampon (20 ml), puis à l'eau (10 ml). Le méthanol est évaporé à l'évaporateur rotatif. La pureté du produit est évaluée par chromatographie sur couche mince (phase mobile : butanol/acide acétique/eau, 35/3/10, V/V/V) et par CLHP (paragraphe VII.3.6).

8-azido-2-naphtol-β-D-glucuronide, [glucuronyl-¹⁴C (U)]

La synthèse est réalisée comme précédemment, mais en présence de 10 mg de billes, de 70 nmoles d'acide UDP-glucuronique, [glucuronyl-¹⁴C (U)] à 289,1 mCi.mmole⁻¹ (NEN, Dupont de Nemours, les Ulis, France) et de 400 nmoles de 8-azido-2-naphtol. L'UDPGA radiomarké est évaporé sous azote avant utilisation. Le 8-azido-2-naphtol en excès est séparé du glucuronide radiomarké comme indiqué précédemment.

VII.3.3. Stabilité

Placé à la lumière, le glucuronide est partiellement dégradé en quelques heures (noircissement). Lorsqu'il est conservé dans des tubes en polypropylène, sa stabilité, vérifiée par l'étude du spectre UV, est supérieure à une heure, ce qui permet d'éviter de travailler à l'abri de la lumière en prenant ces précautions. Par ailleurs, le glucuronide, conservé à -20°C est stable chimiquement pendant au moins 6 mois en solution aqueuse.

VII.3.4. Photochimie

Le NAG est irradié à la concentration de 10⁻⁵ M dans de l'eau bidistillée à l'aide d'une lampe UV (254 nm, VI215G, Bioblock) derrière un écran de verre pyrex filtrant les UV lointains.

Une aliquote est prélevée à différents temps d'irradiation et le spectre UV est déterminé (210-400 nm) sur un spectrophotomètre UVIKON 860.

VII.3.5. Inactivation de l'enzyme recombinante par le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide

Les fractions membranaires sont diluées à $1,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines dans un tampon 50 mM $\text{NaHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 5,1), 5 mM acide D-saccharique-1.4-lactone (inhibiteur de la β -glucuronidase).

Différents essais sont alors immédiatement réalisés :

- irradiation des protéines seules
- protéines seules non irradiées
- protéines et NAG 1mM, milieu non irradié
- protéines et NAG 1mM, milieu irradié

Les échantillons sont préincubés 2 minutes en présence de 1mM NAG (H_2O , 2% v/v) ou d'eau avant irradiation. L'irradiation se fait derrière un écran de verre pyrex à l'aide d'une lampe VL215G ($\lambda = 254 \text{ nm}$, Bioblock). Des prélèvements sont effectués à différents temps sur chacun des tubes, puis dilués 23 fois dans un tampon 180 mM Tris-HCl (pH 7,4) , 30 mM MgCl_2 et l'activité de glucuronocouplage est déterminée.

VII.3.6. Stabilité du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide dans le milieu d'incubation

La stabilité du glucuronide dans le milieu d'incubation (paragraphe VII.3.5) est vérifiée par CLHP.

matériel :

colonne LiChrosphere RP-18 (Hibar R.T., 250-4, 7 μm , Merck)
phase mobile : acétonitrile/ H_2O , 32/68 (V/V), TFA, 0,004 % (v/v)

Le NAG est incubé en présence des fractions membranaires dans les conditions décrites au paragraphe VII.3.5., en absence d'irradiation et à l'abri de la lumière. A $t = 20$ minutes d'incubation, les protéines sont précipitées à l'acétonitrile puis les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 1000 g. 100 μl sont alors injectés sur la colonne CLHP. L'élution est effectuée à un débit de $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ et le profil d'élution est suivi à une longueur d'onde de 230 nm. Les temps de rétention du glucuronide (NAG) et du 8-azido-2-naphtol sont déterminés en injectant les deux composés individuellement sur la colonne CLHP.

VII.3.7. Marquage covalent des fractions membranaires par le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- ^{14}C (U)]

VII.3.7.1. Identification de l'UGT1*6

Marquage de photoaffinité en présence de NAG, [glucuronyl- ^{14}C (U)] :

Tampon :

acétate de sodium/acide acétique, 200 mM (pH 4,0)
0,150 ml de 1M $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})$
0,667 ml de 150 mM acide D-saccharique-1,4-lactone (H_2O)
 H_2O , qsp 5ml

Milieu réactionnel :

NAG, 50 μM finale
NAG, [glucuronyl- ^{14}C (U)], 0,37 nmole (238.000 dpm,
289,1 mCi.mmole $^{-1}$)
fractions membranaires : 50 μg

Le mélange est incubé 2 minutes à température ambiante, puis irradié comme précisé au paragraphe VII.3.5 pendant 2 minutes. Les échantillons sont alors mis en présence du tampon de dénaturation (électrophorèse), soniqués et soumis à ébullition pendant 1 minute, puis déposés sur un gel de polyacrylamide à 12 % en présence de SDS. Les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon P^R (Millipore) et soumises à une immunorévélation avec des anticorps anti-UGT1*6 (paragraphe III).

VII.3.7.2. Influence du pH

L'effet du pH sur la photoincorporation de la sonde radiomarquée est évalué selon le protocole décrit au paragraphe VII.3.7.1, à des pH compris entre 3,6 et 7.

Pour les pH compris entre 3,6 et 5,6, le tampon utilisé est constitué de 200 mM d'acétate de sodium/acide acétique, 30 mM de MgCl₂ et 5 mM d'acide D-saccharique-1,4-lactone. Pour les pH compris entre 6,0 et 7,0, le tampon acétate est remplacé par un tampon 200 mM Na₂HPO₄/K₂HPO₄.

VIII. ALIGNEMENT DE SEQUENCES PROTEIQUES ET PROFIL D'HYDROPHOBIE

Les séquences en acides aminés déduites des ADNc de treize UGT ont été obtenues et alignées à l'aide du programme d'alignement de séquence HSSP (Sanders et Schneider, 1991) accessible à tout utilisateur de la banque de données nucléotidiques et protéiques European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg (EMBL, Allemagne).

L'indice d'hydrophobie des résidus d'acides aminés de l'UGT1*6 a été évalué en utilisant le programme FORTRAN AMPHI.UUE (Jähnig, 1990), avec une fenêtre de 19 acides aminés. Ce programme applique la méthode de Kyte et Doolittle (1982) permettant de déterminer les

fragments hydrophobes de la protéine, situés au coeur de la protéine ou localisés dans la membrane.

IX. MODELISATION MOLECULAIRE

IX.1. Matériels et construction des composés PP

La visualisation des molécules est développée sur une console graphique PS350 (Evans & Sutherland). Les calculs sont effectués à l'aide d'un ordinateur VAX 6320 (Digital Equipment). Les différentes structures étudiées (Tableau 2, p75-76) sont construites et modélisées à l'aide du logiciel de modélisation moléculaire SYBYL, version 5.3 à 5.5 (Tripos Associates, Saint Louis, Missouri). Les structures de départ sont construites à l'aide d'une base de données contenant différents motifs (phényle, alkyle, hydroxyle etc...) accessible par BUILD dans le menu d'utilisation. Les liaisons amide des structures sont construites sous leur forme *trans* à l'aide de l'option MODIFY TORSION. Les atomes d'hydrogène sont ajoutés aux fonctions polaires en présumant de leur état de protonation le plus probable au pH optimum dans les conditions expérimentales de détermination de la réponse biologique (IC_{50} dans ce cas). Les composés dont la stéréochimie n'est pas déterminée (composés non purifiés après synthèse non stéréosélective) sont considérés comme étant un mélange de stéréoisomères et traités comme tels dans l'étude QSAR (la valeur de $IC_{50} = 188 \mu\text{M}$ est ainsi attribuée à chacun des stéréoisomères **3**, **6**, **9**, **10** du Tableau 2).

IX.2. Analyse conformationnelle

La charge atomique pour tous les composés est calculée à l'aide de la méthode MOPAC, puis ceux-ci subissent une étape de minimisation énergétique par MAXIMIN 2 à l'aide du champ de force Tripos associé à SYBYL. Cette minimisation est réalisée par un processus itératif qui cesse lorsque la différence d'énergie entre deux itérations successives est minimale (0,05

kcal.mole⁻¹). On a alors minimisé le conformère construit. Bien entendu, cette minimisation est loin d'être complète car les structures étudiées possèdent un grand nombre de liaisons simples qui confèrent à chaque structure un nombre théorique infini de conformations. Il convient donc de faire une recherche conformationnelle en tenant compte de la flexibilité des molécules. Pour cela, les angles de torsion sont définis (Figure 31, Résultats et Discussion) puis on fixe un angle d'incrémentation afin de parcourir l'espace conformationnel pour chaque molécule. Après chaque incrémentation autour d'une liaison simple, l'énergie du conformère est déterminée à l'aide du champ de force Tripos. Lorsque cette recherche conformationnelle systématique est terminée, le conformère de plus basse énergie de chaque structure est sélectionné et subit une minimisation énergétique comme précédemment.

IX.3. Méthode d'analyse comparative de champs moléculaires

Le choix d'alignement des composés PP avec un analogue de l'état de transition hypothétique des UGT est décrit en "Résultats et Discussion". Les molécules sont ainsi orientées de manière identique selon notre jugement et peuvent alors subir une QSAR par la méthode CoMFA. Le volume englobant toutes les structures étudiées est parcouru par un atome "sonde" (carbone sp^3 , charge +1) qui se déplace d'une distance de deux angströms entre chaque échantillonnage (soit 3094 points dans notre cas). On effectue ainsi une estimation de l'énergie d'interaction stérique (van der Waals) et électrostatique (Coulomb) entre cette sonde et chacune des structures étudiées. Les valeurs d'énergie correspondant à l'échantillonnage final sont alors considérées pour l'analyse QSAR, afin de chercher une corrélation avec la réponse biologique.

La réponse biologique considérée dans cette étude est estimée expérimentalement sur la base d'un pouvoir inhibiteur de composés compétitifs. Le pouvoir inhibiteur est évalué en terme de IC_{50} .

Les caractéristiques de nature stérique et électrostatique des composés jouant un rôle dans le pouvoir inhibiteur sont visualisées sur écran autour des structures modélisées. Les polygones de couleur rouge indiquent les zones d'interactions à forte contribution sur l'effet inhibiteur (plus de 90 %), ceux de couleur jaune les zones d'interactions contribuant à plus de 75 % et

moins de 90 %. Les contours verts définissent les zones d'interactions à plus faible contribution (10 à 75 %), ceux de couleur bleue les zones à très faible contribution (entre 0 et 10 %). Les contributions des champs moléculaires (en %) associées aux couleurs sont indiquées sur les figures.

**résultats
et
discussion**

I. PREPARATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE LA LIGNEE CELLULAIRE RECOMBINANTE V79-UGT1*6 ET OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE DE GLUCURONOCONJUGAISON DE LA 4-MO

I.1. Fractions membranaires

Afin de nous affranchir du problème de perméabilité des composés au travers de la membrane cellulaire et d'obtenir une fraction subcellulaire contenant l'UGT1*6, nous avons choisi de travailler sur des fractions membranaires de réticulum endoplasmique de la lignée recombinante. Les fractions membranaires sont préparées par ultracentrifugation différentielle. Typiquement, l'enrichissement calculé sur la base des activités spécifiques est de 1,3. Le rendement en activité est de 60%. Soulignons par ailleurs que le traitement des cellules au butyrate de sodium a induit l'activité de glucuronoconjugaison de la 4-MO de 2,5 fois. La culture sur une centaine de boîtes de Pétri conduit à l'obtention d'environ 110 mg en protéines de fractions membranaires de la lignée recombinante V79-UGT1*6.

L'optimisation des activités enzymatiques est réalisée sur ces fractions membranaires.

I.2. Optimisation de la mesure d'activité enzymatique

Cette optimisation consiste d'une part à déterminer les concentrations optimales des différents effecteurs de la réaction enzymatique, soit la quantité de magnésium, la quantité de 4-MO et celle d'UDPGA, d'autre part à établir les conditions de vitesse initiale maximale.

Pour cela, la production de glucuronide a été évaluée en fonction de la quantité de protéines de fractions membranaires pour des concentrations fixes en substrat (figure 20).

La relation entre la quantité de glucuronide formé et la quantité de protéines est linéaire jusqu'à au moins 15 µg de protéines de fractions membranaires.

La figure 21, quant à elle, décrit la relation existant entre la quantité de glucuronide formé pour une concentration fixe en protéines (3 µg), en fonction du temps d'incubation. Elle est linéaire dans l'intervalle de temps 0 - 30 minutes d'incubation.

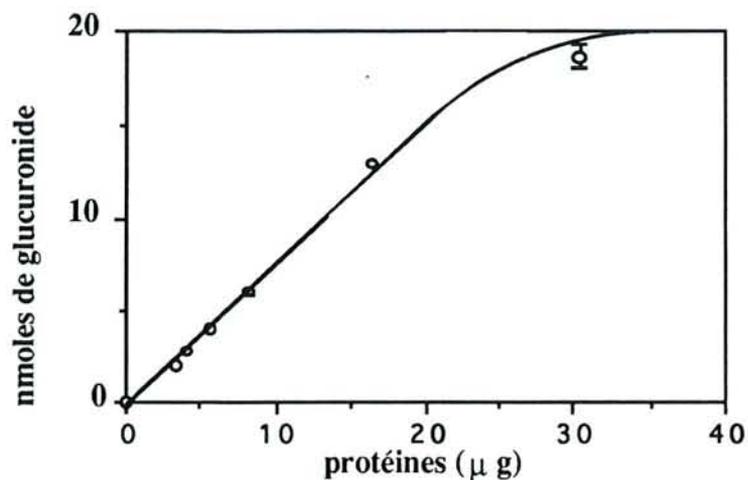


Figure 20. Formation de glucuronide de 4-MO par l'UGT1*6 en fonction de la quantité de protéines de fractions membranaires.

Conditions de détermination de l'activité enzymatique : UDPGA, 5 mM ; 4-MO, 1 mM ; 15 minutes d'incubation (37°C).

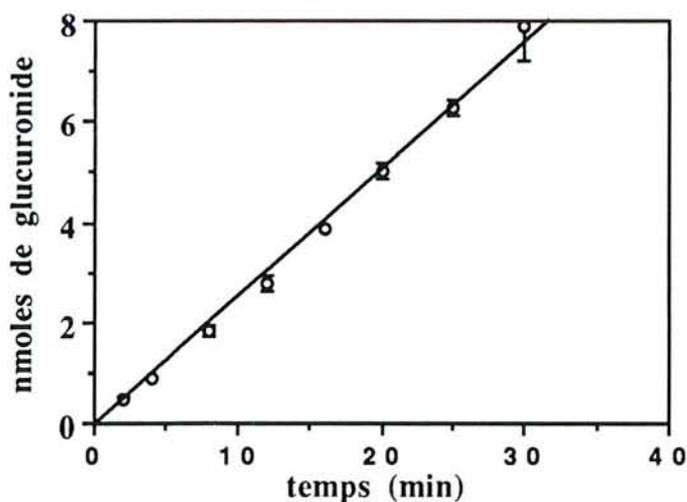


Figure 21. Formation de glucuronide de 4-MO par l'UGT1*6 dans les fractions membranaires en fonction du temps d'incubation.

Conditions de détermination de l'activité enzymatique : UDPGA, 5 mM ; 4-MO, 1 mM ; protéines de fractions membranaires, 3 μg

L'activité spécifique de l'UGT1*6 dans les fractions membranaires suit donc une cinétique d'ordre zéro (conditions de vitesse initiale) jusqu'à des concentrations en protéines de 15 μg et des temps d'incubation de 30 minutes à 37°C pour des concentrations en UDPGA et 4-MO de 5 mM et 1 mM respectivement.

L'effet du magnésium sur l'activité enzymatique a également été évalué (figure 22).

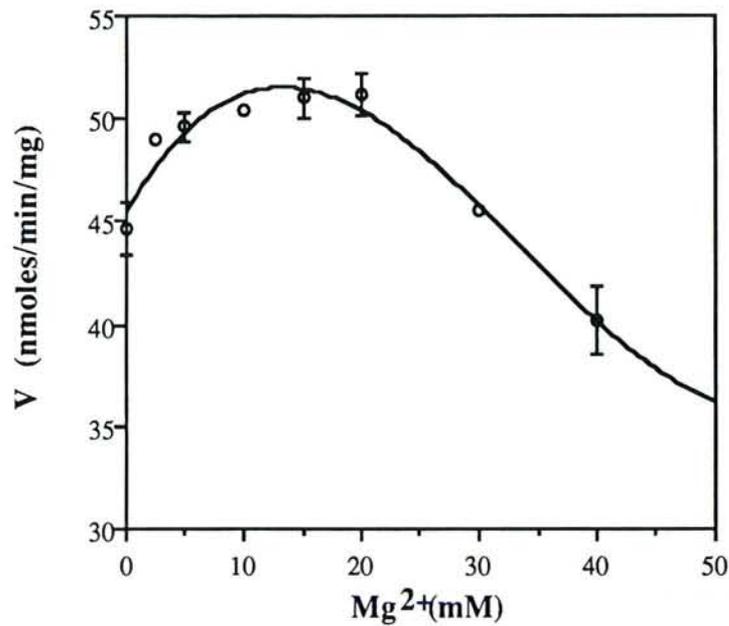


Figure 22. Effet de l'ion Mg^{2+} sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO.

L'activité spécifique en absence de magnésium est déterminée en présence de 6 mM d'EDTA

L'enzyme ne présente pas de dépendance stricte vis-à-vis du magnésium (le point zéro correspond à une activité en présence d'EDTA, 6mM). L'activité enzymatique est optimale à des concentrations voisines de 20 mM en magnésium. L'activité de glucuroconjugaison est augmentée de 10 % à cette concentration par rapport à l'activité enzymatique déterminée en absence de magnésium. Une inhibition de l'activité est observée aux fortes concentrations (supérieures à 20 mM). L'absence de dépendance stricte de l'activité vis-à-vis du magnésium a été observée par plusieurs auteurs sur les UGT microsomaux (Zakim *et al.*, 1973 ; Rao *et al.*, 1976). Bien que le magnésium ne soit pas essentiel à l'activité, c'est un effecteur de l'enzyme. L'hypothèse la plus largement admise présente le magnésium comme agent chélatant du substrat donneur, l'UDPGA, de manière identique à celle observée pour les protéine-kinases ATP- Mg^{2+} dépendantes (Burchell, 1978). Depuis, Abe *et al.* (1988) ont montré, en utilisant une UGT purifiée conjugant la 5-hydroxytryptamine dans les microsomes de foie de rat, que l'UDPGA présente une plus grande affinité pour l'enzyme lorsqu'il est en présence de magnésium.

L'effet d'une concentration variable en 4-MO et en UDPGA a par ailleurs été évalué sur l'activité enzymatique afin de se placer dans des conditions dites saturantes en substrat. La vitesse initiale en fonction de la concentration en UDPGA est représentée sur la figure 23.A. La cinétique de l'UGT 1*6 dans les fractions membranaires est de type Michaelien, en accord avec Bock *et al.* (1993). Miners *et al.* (1988) ont eux aussi souligné que la glucuronoconjugaison de la 4-MO est de type Michaelien dans les microsomes de foie humain. La représentation de Lineweaver-Burk (double inverse) permet d'obtenir un K_m apparent pour l'UDPGA de $411 \pm 39 \mu\text{M}$ (Figure 27 du paragraphe II.4.1).

La cinétique de l'UGT 1*6 est Michaelienne jusqu'à une concentration de 1 mM en 4-MO. Au-delà de cette concentration, une légère inhibition de l'activité enzymatique est observée (figure 23.B).

La représentation de Lineweaver-Burk (figure 27 du paragraphe II.4.1) permet de définir un K_m apparent de $120 \pm 5 \mu\text{M}$ pour la 4-MO.

La V_{max} apparente déterminée d'après l'une ou l'autre des représentations de Lineweaver-Burk (visant à déterminer les K_m apparents pour le substrat donneur et pour le substrat accepteur) est de $64 \pm 9 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (figures 26 et 27, paragraphe II.4.1).

Un effet de concentrations élevées en aglycone sur l'activité des UGT microsomaux a été observé par Vessey et Zakim (1972). Les auteurs soulignent les problèmes posés pour la détermination de l'activité enzymatique des UGT, d'une part parce que les aglycones peu polaires sont difficilement solubles à concentrations élevées dans le milieu aqueux, d'autre part parce que la nature même de ces composés peut leur conférer des effets non spécifiques sur les microsomes et donc de manière indirecte sur l'activité enzymatique.

Il apparaît, d'après nos résultats, que les concentrations dites saturantes en substrat (minimum $10 \times K_m$) ne peuvent et ne doivent être atteintes pour la 4-MO.

L'activité enzymatique sera donc déterminée dans les conditions optimales correspondant à 5 mM d'UDPGA (environ $10 \times K_m$ apparent) et à 1 mM de 4-MO (environ $8 \times K_m$ apparent).

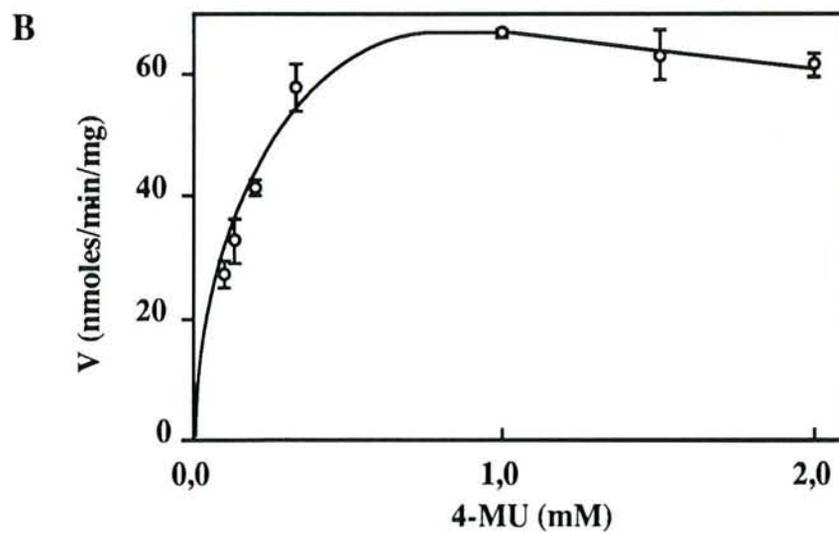
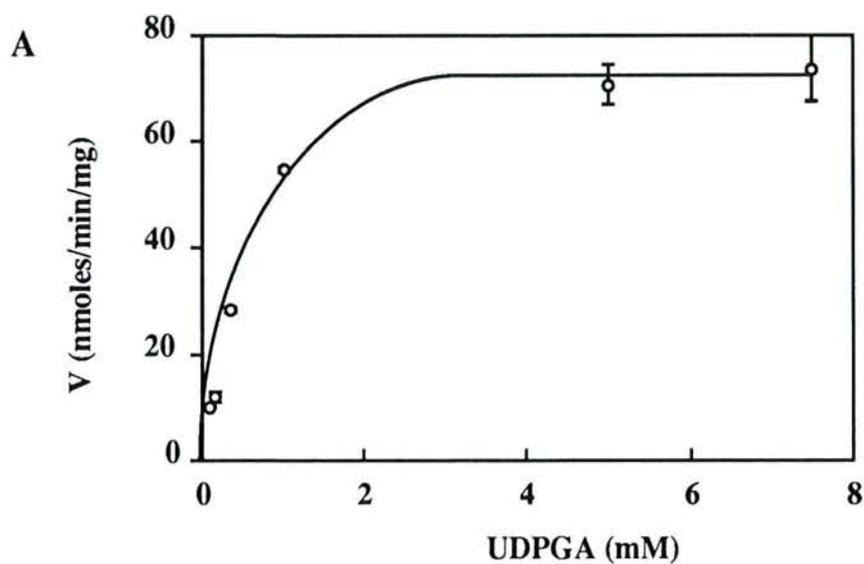


Figure 23. Vitesse de formation du glucuronide de 4-MO par l'UGT1*6 dans les fractions membranaires de la lignée cellulaire recombinante V79-UGT1*6, en fonction de la concentration en UDPGA (A) et 4-MO (B).

Protéines de fractions membranaires, 3 μ g ; A : UDPGA, 0,1 mM à 7,5 mM ; 4-MO fixe, 1 mM ; B : UDPGA fixe, 5 mM ; 4-MO, 0,05 à 2 mM

II. INHIBITEURS REVERSIBLES DE L'UGT1*6 ET ETAT DE TRANSITION

II.1. Structures

Les composés de la série PP sont présentés dans le Tableau 2 et sur la Figure 1 de la publication n° 2. L'effet inhibiteur de ces composés a été précédemment testé sur une glucosylphosphoryldolicholsynthase (Paul *et al.*, 1993). Notre intérêt s'est porté sur les composés de cette série en raison des analogies qu'ils présentent avec les substrats donneur et accepteur de l'UGT1*6.

Les structures testées dans ce travail présentent les groupements caractéristiques suivants :

- un groupement uridine ou isopropylidène-uridine. L'isopropyle masque les fonctions hydroxyle en 2' et 3' du ribofuranose, ce qui permettra d'évaluer le rôle de ces deux groupements dans la fixation des inhibiteurs de cette série à l'UGT1*6. Nous pourrions aussi évaluer l'effet de l'encombrement stérique et d'un accroissement de l'hydrophobie au niveau du site de fixation de l'uridine.

- une chaîne aliphatique à 9 atomes de carbone, susceptible de conférer aux structures une capacité de perméation de la membrane.

- un groupement phényle, séparé de l'uridine par le groupement isostérique du diphosphate. Nous étudierons la possibilité de sa fixation au niveau du site récepteur des substrats accepteurs (aromatiques plans) de l'UGT1*6.

La liaison de l'uridine au reste de la structure est établie par un groupement $-OCONHSO_2O-$ et non par un groupement diphosphate comme dans la structure de l'UDPGA. Camarasa *et al.* (1985) ont précédemment synthétisé une série d'analogues de l'UDP-glucose, possédant des activités antivirales, en introduisant ce groupement à la place du diphosphate, ceci présentant plusieurs avantages : d'une part, la synthèse des structures est plus simple ; d'autre part, ce groupement est vraisemblablement plus stable *in vitro* et *in vivo*, ce qui est essentiel pour

envisager une application pharmacologique à ces composés. Notons enfin que ce groupement est un isostère de la liaison diphosphate.

| numéro | structure et isomérisation |
|--------|---|
| 1 | <p>PP55B</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 2 | <p>PP37P</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 3 | <p>PP37</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 4 | <p>PP55A</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 5 | <p>PP37P</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 6 | <p>PP37</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |

| numéro | structure et isomérisation |
|--------|--|
| 7 | <p>PP56B</p> <p>$X = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 8 | <p>PP37P</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 9 | <p>PP37</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 10 | <p>PP37</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |
| 11 | <p>PP50A</p> <p>$x = \text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{O}-$</p> |

Tableau 2. Structure des inhibiteurs de la série PP.

Les numéros indiqués dans le tableau ont été utilisés lors de l'analyse des relations structure-activité des inhibiteurs (paragraphe II.4.6) pour distinguer les différents stéréoisomères des composés possédant un ou deux carbones asymétriques

II.2. Stabilité en présence des fractions membranaires

Le groupement isostérique du diphosphate présent dans les structures PP est constitué de liaisons ester et amide susceptibles d'être hydrolysées par des estérases et/ou des protéases durant les essais enzymatiques visant à caractériser les effets de ces composés sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6. Pour éviter toute dégradation éventuelle, l'effet inhibiteur des structures sur l'UGT1*6 a été évalué sur des fractions membranaires préalablement traitées au phényl méthyl sulfonyl fluorure (PMSF), inhibiteur irréversible des estérases et protéases à sérine (Moss et Fahrney, 1978). Par ailleurs, nous avons vérifié l'absence d'effet *per se* du PMSF sur l'activité UGT1*6. L'effet des composés PP sur des fractions membranaires traitées ou non traitées au PMSF est représenté sur la Figure 24. Les concentrations en inhibiteurs PP sont choisies de manière à observer un effet significatif sur l'activité UGT1*6 (de 40 à 80 % d'activité résiduelle suivant les structures). L'inactivation des enzymes à sérine par le PMSF n'affecte pas l'effet inhibiteur des molécules de la série PP, ce qui suggère que ces structures sont fonctionnelles dans les conditions opératoires. Les fonctions ester et amide sont vraisemblablement protégées par un encombrement stérique relatif autour des sites d'hydrolyse potentiels. Nous avons vérifié que des structures moins encombrées pouvaient être hydrolysées enzymatiquement dans des microsomes de foie de rat (publication n° 4). Dans le cas présent, l'addition de PMSF lors de l'utilisation de ces fractions membranaires n'est donc pas justifiée.

II.3. Effet des composés sur la fixation covalente de la sonde [β -³²P]5N₃-UDPGA

Les inhibiteurs ont été incubés en présence de fractions membranaires, avant marquage de photoaffinité de l'UGT1*6 avec la sonde [β -³²P]5N₃-UDPGA. L'effet des inhibiteurs est évalué sur l'incorporation de la sonde à deux concentrations, 150 et 300 μ M. Les figures 3.A et 3.B (publication n° 2) illustrent les effets variables des structures sur l'incorporation de la sonde radiomarquée à l'UGT1*6. Les pourcentages de photoincorporation de la sonde en présence des différents inhibiteurs sont présentés Tableau 3.

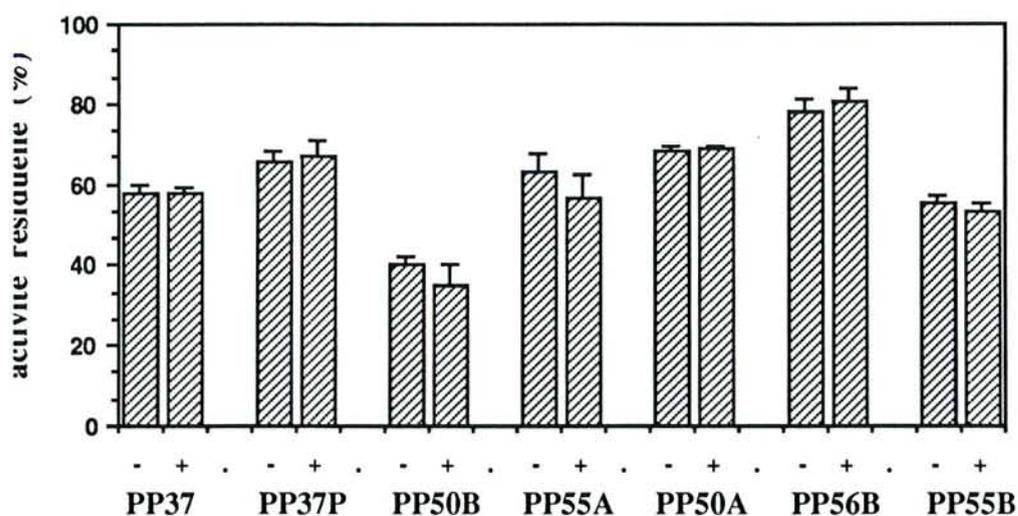


Figure 24. Effet de la préincubation des fractions membranaires avec du PMSF sur le pouvoir inhibiteur des composés PP.

+, 5 mM PMSF ; -, sans PMSF

Drake *et al.* (1991) ont montré que la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ se fixe au niveau du site de l'UDPGA des UGT microsomaux. Nous avons vérifié la spécificité de cette sonde vis-à-vis de ce site de l'UGT1*6 recombinante par des expériences de protection par le substrat donneur (publication n°2).

L'effet éventuel des composés sur la photoincorporation de la sonde peut être interprété de deux manières :

- soit l'inhibiteur interagit avec le site de fixation de l'UDPGA, ce qui provoque une diminution de l'incorporation de la sonde radioactive par effet de compétition.
- soit l'inhibiteur interagit avec un autre site de l'enzyme et cette interaction a pour conséquence de modifier l'affinité de la sonde pour le site UDPGA.

L'analogie structurale des composés avec la partie UDP du substrat donneur suggère une interaction de ceux-ci avec le site de fixation de l'UDPGA. Nous avons également caractérisé ce type d'interaction par l'étude de l'effet inhibiteur des composés sur l'activité de glucurononconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6 (paragraphe V.4).

| | | inhibiteur | | | |
|---------------------------|-------------|------------|-------|-------|-------|
| | | PP36 | PP37 | PP37P | PP50A |
| photoincorporation (%) | 150 μ M | 99 | 16 | 77 | 34 |
| | 300 μ M | 97 | 13 | 31 | 17 |
| | | PP50B | PP55A | PP55B | PP56B |
| photoincorporation (%) | 150 μ M | 25 | 35 | 40 | 82 |
| | 300 μ M | 17 | 29 | 18 | 84 |

Tableau 3. *Effet des inhibiteurs sur la photoincorporation de la sonde [β - 32 P]5N $_3$ -UDPGA à l'UGT1*6.*

Les inhibiteurs sont ajoutés aux fractions membranaires aux concentrations de 150 et 300 μ M avant l'étape de marquage de photoaffinité de l'UGT1*6 par la sonde [β - 32 P]5N $_3$ -UDPGA (40 μ M). La photoincorporation de la sonde à l'UGT1*6 est évaluée par mesure densitométrique de l'autoradiogramme du gel d'électrophorèse.

Seuls les composés PP36 et PP56B ne présentent pas ou que peu d'effet sur la photoincorporation de la sonde (Tableau 3). De façon inattendue, l'effet des composés sur la photoincorporation de la sonde ne semble pas être lié aux modifications de la région susceptible d'interagir spécifiquement avec le site de fixation de l'UDPGA. Ainsi, la présence d'un groupement isopropylidène masquant les groupements hydroxyle en 2' et 3' du ribose (composés PP37P, P50A, PP50B) conduit à des diminutions conséquentes de l'incorporation de la radioactivité. De plus, la comparaison de l'effet sur l'incorporation de la sonde radiomarquée des composés à groupement isopropylidène-uridine avec celui de leur équivalent à groupement uridine non protégé (PP37P et PP37, PP50A et PP55A, PP50B et PP55B) montre que celui-ci n'est pas affecté par cette modification structurale. Seul PP37P présente un effet inhibiteur modéré en comparaison de PP37 pour une concentration de 150 μ M (77 % de photoincorporation contre 16 %), mais cette différence disparaît à 300 μ M. Ces résultats suggèrent que les atomes d'hydrogène des fonctions hydroxyle en 2' et 3' de l'uridine ne sont vraisemblablement pas impliqués dans des liaisons hydrogène essentielles avec le site actif. Une étude d'inhibition enzymatique permettra ultérieurement de confirmer et de mieux

caractériser les paramètres structuraux essentiels pour la fixation des inhibiteurs au niveau du site actif et l'extrapolation à la fixation du co-substrat.

II.4. Influence des modifications structurales sur le pouvoir inhibiteur

II.4.1. Détermination des IC_{50} et K_i

L'effet inhibiteur de cette série de composés sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO a été évalué par la détermination des valeurs de IC_{50} . Bush (1983) souligne l'intérêt de la détermination des IC_{50} pour comparer les effets d'une série de composés sur une activité enzymatique. Cependant, seule la détermination des valeurs de K_i permet une caractérisation de la nature de l'inhibition. Ces constantes ont donc été déterminées pour quelques-unes des structures présentant un intérêt particulier lors de la caractérisation de leur fixation à l'UGT1*6. La Figure 25 représente un exemple de détermination graphique de la valeur IC_{50} pour l'inhibiteur PP56B.

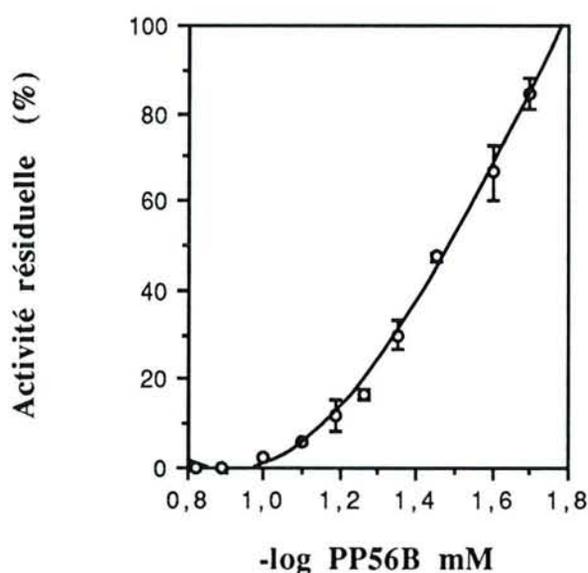


Figure 25. Inhibition de la glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6 en fonction de la concentration en composé PP56B

La détermination de la concentration en inhibiteur pour laquelle on observe 50 % d'activité résiduelle (IC_{50}) est effectuée graphiquement.

La figure 26.A représente la relation en double inverse (Lineweaver-Burk) entre la vitesse et la concentration en substrat donneur pour des concentrations variables en inhibiteur PP50B.

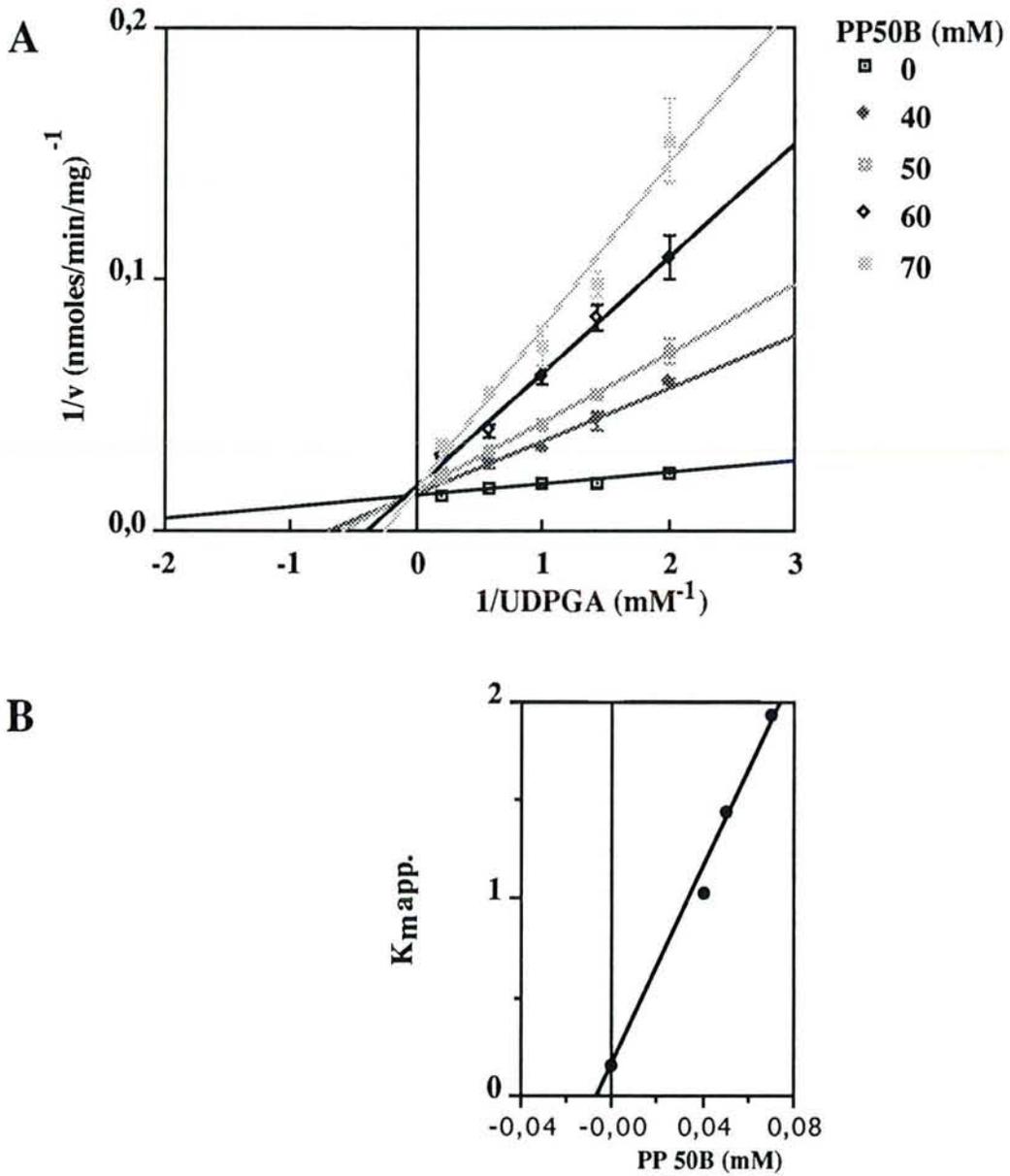


Figure 26. Représentation de Lineweaver-Burk (A) de l'inhibition de la glucuroconjugaison de la 4-MO pour des concentrations variables en UDPGA en fonction de la concentration en composé PP50B. (B) Représentation secondaire des pentes des droites d'inhibition en fonction de la concentration en composé PP50B.

UDPGA, 0,1 - 5 mM ; 4-MO, 1 mM ; protéines de fractions membranaires, 3 μ g

L'inhibition observée est de type compétitif et la valeur de la constante K_i est déterminée grâce à la représentation secondaire :

$$K_{m\ app} = \frac{K_m}{K_i} \cdot I + K_m$$

La linéarité de la relation met en évidence une inhibition compétitive pure de PP50B vis-à-vis de la fixation de l'UDPGA (Figure 26.B). La valeur du K_i correspondant à l'intersection de la droite sur l'axe des abscisses est de 10 μM . Les valeurs de K_m apparent pour l'UDPGA et la 4-MO sont respectivement de $411 \pm 39 \mu\text{M}$ et de $120 \pm 5 \mu\text{M}$, pour une valeur de V_{\max} apparente de $64 \pm 9 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

PP50B présente une inhibition non compétitive par rapport à la 4-MO (Figure 27A) et l'expression de la relation :

$$\frac{1}{V_{\max\ int}} = \frac{1}{V_{\max} \cdot K_i} \cdot I + \frac{1}{V_{\max}}$$

met en évidence une inhibition de type non compétitive pure (Figure 27.B). La valeur de K_i vis-à-vis de la 4-MO pour PP50B est de 11 μM .

Ces différents paramètres (IC_{50} , K_i (4-MO), K_i (UDPGA)) présentés dans le Tableau 1 de la publication n° 2 sont rappelés dans le Tableau 4.

D'une manière générale, les composés à groupement isopropylidène-uridine (PP37P, PP50B, PP50A) sont de meilleurs inhibiteurs que leurs équivalents non protégés (PP37, PP55B, PP55A) en terme de IC_{50} . Aucun effet stéréosélectif au niveau du groupement dérivant de la phénylalanine n'apparaît clairement au vu des valeurs de IC_{50} pour les composés PP50.

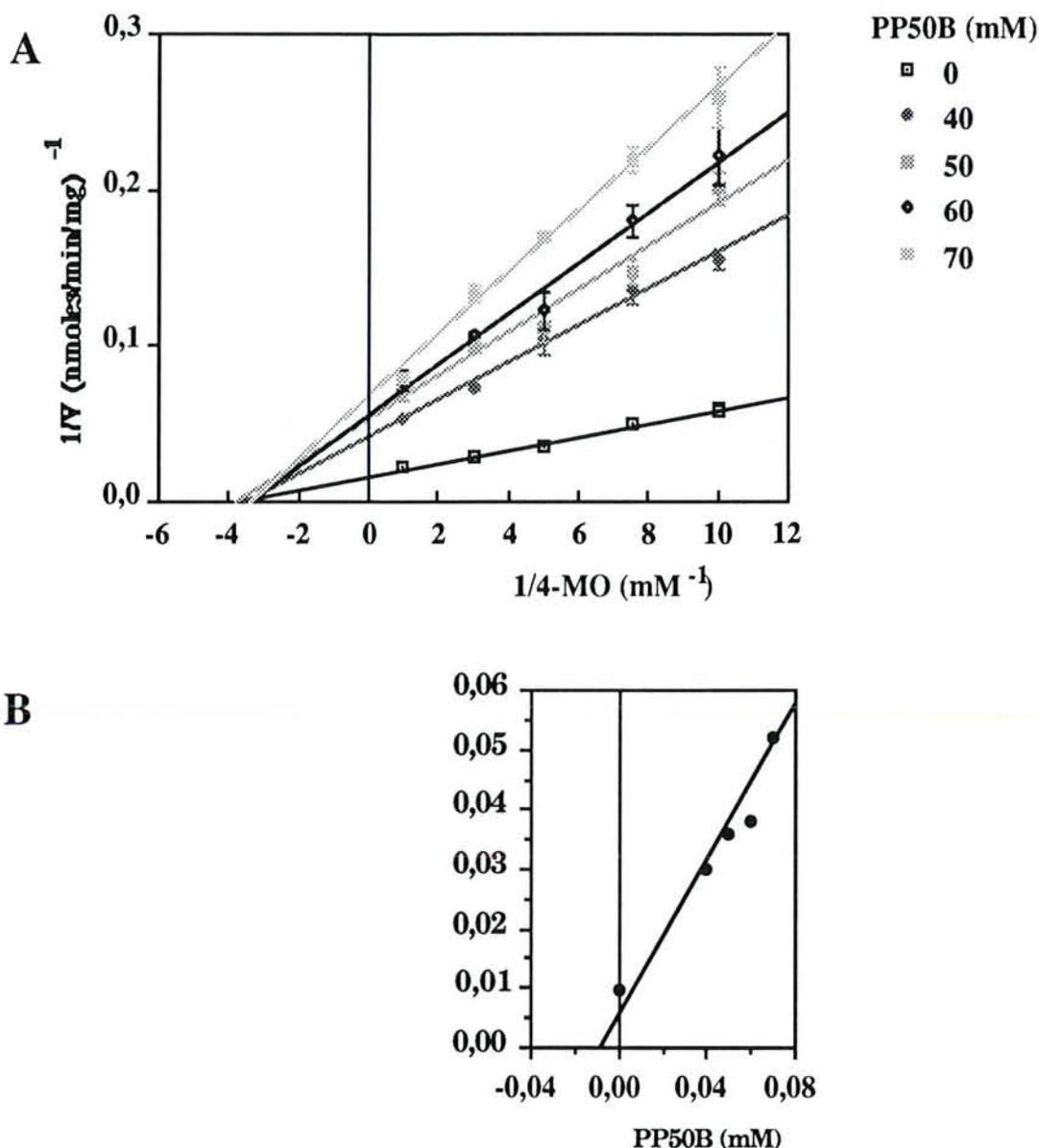


Figure 27. Représentation de Lineweaver-Burk (A) de l'inhibition de la glucuroconjugaison de la 4-MO pour des concentrations variables en 4-MO en fonction de la concentration en composé PP50B. (B) Représentation secondaire des pentes des droites d'inhibition en fonction de la concentration en composé PP50B.

4-MO, 0,05 - 1 mM ; UDPGA, 5 mM ; protéines de fractions membranaires, 3 μ g

En revanche, une inhibition stéréosélective en faveur du composé d'isomérisation *R* (PP55B) apparaît pour les composés PP55. La détermination du type d'inhibition permettra une caractérisation plus complète de l'interaction ligand-UGT1*6 et du mécanisme de fixation des substrats de l'UGT1*6.

| inhibiteurs | IC ₅₀ (μ M) | K _i app (UDPGA) (μ M) | K _i app (4-MO) (μ M) |
|-------------|--------------------------------|---|--|
| PP37 | 188 \pm 4.9 | 23 (C) | 99 (C) |
| PP37P | 136 \pm 20 | 25 (C) | 31 (C) |
| PP50A | 80 \pm 10 | - | - |
| PP50B | 67 \pm 9.9 | 10 (C) | 11 (NC) |
| PP55A | 358 \pm 25 | - | - |
| PP55B | 182 \pm 3.5 | - | - |
| PP56B | 39.5 \pm 6.4 | 17 (C) | 21 (C) |

Tableau 4. IC₅₀ et caractérisation de l'inhibition de la glucuroconjugaison de la 4-MO catalysée par l'UGT1*6.

Les inhibitions compétitives sont indiquées par (C) et les inhibitions de type non-compétitif sont représentées par (NC). -, valeur non déterminée ; K_m app (4-MO), 120 \pm 5 μ M ; K_m app (UDPGA), 411 \pm 39 μ M ; V_m app, 64 \pm 9 nmoles.min⁻¹.mg⁻¹

II.4.2. Approche du mécanisme de fixation des substrats

Les composés présentant des groupements communs aux deux substrats peuvent être utilisés pour éclaircir le mécanisme de la fixation des substrats au niveau du site actif (Danenberg et Danenberg, 1977). L'étude de la fixation de quelques inhibiteurs, choisis sur la base de critères structuraux ou d'un pouvoir inhibiteur élevé, est obtenue par la détermination des valeurs de K_i vis-à-vis des deux substrats et de leur mode d'interaction (Tableau 4). De cette étude, nous déduisons les points essentiels suivants :

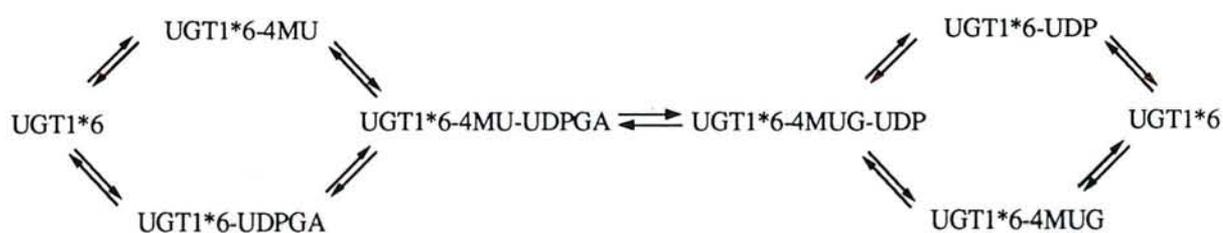
1) PP37, PP37P, PP56B sont des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du site de fixation du substrat donneur et du substrat accepteur, ce qui signifie qu'ils peuvent se fixer sur les deux sites de l'enzyme. Ces résultats expérimentaux sont la preuve d'une fixation des substrats selon un mécanisme séquentiel au hasard (Tableau 5), en accord avec les résultats obtenus par Vessey et Zakim (1972) dans leur étude de l'inhibition de l'activité enzymatique dans la voie normale (conjugaison) et réverse (déconjugaison) par les produits de la réaction.

| inhibiteurs | type d'inhibition | |
|--|-------------------|----------------|
| | S ₁ | S ₂ |
| analogue de S ₁ et S ₂ | C | C |
| analogue de S ₁ | C | NC |
| analogue de S ₂ | NC | C |

Tableau 5. Inhibition d'une enzyme à deux substrats, à mécanisme de fixation au hasard (d'après Manning et Wilson, 1984).

C représente une inhibition compétitive, NC une inhibition non compétitive. S₁ : substrat se fixant en premier ; S₂ : substrat se fixant en second.

Le mécanisme de la réaction enzymatique peut donc être schématisé selon le modèle suivant (Vessey et Zakim, 1972) :



Ainsi, en accord avec ce mécanisme, PP37, PP37P, PP56B interagissent au niveau du site de fixation du substrat accepteur lorsque le site de fixation du substrat donneur est occupé par l'UDPGA et réciproquement.

2) PP50B présente une inhibition compétitive vis-à-vis de l'UDPGA (Figure 26) et non compétitive vis-à-vis de la 4-MO (Figure 27). Ceci suggère que l'inhibiteur se fixe au complexe UGT1*6-4MO, mais non au complexe UGT1*6-UDPGA ou UGT1*6-UDPGA-4MO. En d'autres termes, PP50B serait uniquement un analogue de l'UDPGA (Tableau 5). Cependant, des valeurs de K_i similaires vis-à-vis de la 4-MO et de l'UDPGA, ainsi que la faible variation structurale comparée aux inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de l'UDPGA permettent d'envisager une alternative : la fixation du noyau phényle de PP50B au niveau du site 4-MO pourrait recouvrir partiellement le site de fixation de l'aglycone, de manière à ne

pas empêcher la fixation du substrat accepteur. Notons également que le groupement isopropylidène-uridine pourrait contribuer à un changement conformationnel de l'enzyme se traduisant par une augmentation de l'affinité au niveau du site de fixation de l'aglycone (voir paragraphe II.4.3). Ce changement conformationnel peut modifier les positions relatives des deux sites de fixation des substrats et empêcher de cette manière une fixation optimale du noyau phényle de PP50B dans le site accepteur. Le comportement de PP50B ne remet donc pas en cause le mécanisme de fixation des substrats décrit dans le schéma précédent.

II.4.3. Interactions au niveau du site UDPGA. Effet synergique

La comparaison des constantes d'inhibition de PP37 et PP37P, dont la différence structurale consiste en la présence du groupement isopropylidène-uridine sur PP37P, met en évidence des caractéristiques essentielles de l'interaction UGT1*6-UDPGA. D'une part, la modification de l'uridine en isopropylidène-uridine n'affecte pas la fixation des inhibiteurs au niveau du site de fixation de l'UDPGA, alors que l'homologie structurale avec le substrat donneur est en apparence plus faible comparée à celle de PP37. L'augmentation de l'encombrement stérique au niveau du ribofuranose par greffage d'un groupement isopropyle ne semble pas imposer de contrainte à la fixation des inhibiteurs évaluée en terme de K_i (Tableau 4). En revanche, cette modification favorise la fixation au niveau du site accepteur. Ainsi l'effet de la modification de l'uridine peut être interprétée en terme d'effet synergique de fixation, les modifications autour du groupement uridine favorisant la fixation au niveau du site de l'aglycone. Soulignons que l'effet synergique de fixation au niveau du site accepteur ne doit pas forcément être associé à un mécanisme enzymatique séquentiel ordonné, avec fixation de l'UDPGA qui induit la fixation de l'aglycone, mais plutôt à un changement conformationnel au niveau du site enzymatique qui a pour conséquence d'accroître l'affinité pour le substrat accepteur. Si le mécanisme de fixation des substrats était de type séquentiel ordonné, avec fixation de l'UDPGA en premier, les inhibitions observées ne pourraient être compétitives vis-à-vis de l'UDPGA et de la 4-MO pour un même composé, mais compétitives vis-à-vis du deuxième ligand (dans l'ordre de fixation séquentiel) et incompétitive vis-à-vis du premier ligand. Cleland (1977) souligne que la nature incompétitive d'une inhibition vis-à-vis d'un

cofacteur démontre que l'effet inhibiteur disparaît lorsque la quantité de cofacteur diminue, suggérant un mécanisme séquentiel avec fixation du cofacteur en premier comme observé pour plusieurs enzymes à cofacteur nucléotidique (Bertics *et al.*, 1984; Kubiseski *et al.*, 1992).

Par ailleurs, ces résultats suggèrent, en accord avec les expériences précédentes de marquage de photoaffinité de l'UGT1*6 par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ en présence d'inhibiteurs, que les atomes d'hydrogène des fonctions hydroxyle en 2' et 3' ne forment pas de liaisons hydrogène essentielles avec le site de fixation de l'UDPGA. Ces remarques sont en accord avec le modèle de l'UDP-glucose décrit par Kochetkov et Sibaev (1973) qui proposent entre autre une liaison hydrogène intramolécule O-2'...H-O-2' au niveau de l'uridine (Figure 28) qui pourrait aussi être présente dans l'UDPGA.

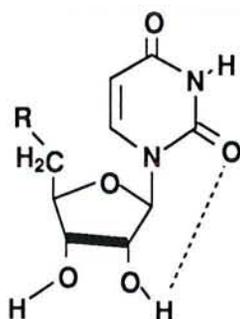


Figure 28. Possible liaison hydrogène intramolécule O-2'...H-O-2' de l'UDPGA.

Des liaisons hydrogène entre le site actif et les atomes d'oxygène du ribofuranose, telles que celles décrites par Fersht *et al.* (1985) entre le tyrosyl adénylate et la tyrosyl-ARN synthétase sont toutefois possibles avec les groupements isopropylidène-uridine.

Le caractère des inhibitions observées (inhibitions site-spécifiques) permettent d'extrapoler les caractéristiques de la fixation des composés PP au niveau du site actif à l'interaction UDPGA-UGT1*6. Ainsi, l'uridine est vraisemblablement impliquée dans un effet synergique avec la fixation du substrat donneur. Hochman et Zakim (1983) ont étudié les propriétés cinétiques de deux isoformes purifiées à partir de microsomes de foie de porc et conjugant le *p*-nitrophénol. Les auteurs ont mis en évidence des propriétés cinétiques différentes quant à la

conjugaison de l'aglycone et la fixation des substrats donneur et accepteur. Pour l'isoforme GT_{1P}, la fixation d'un des substrats (qu'il soit donneur ou accepteur) favorise la fixation du deuxième substrat. Par ailleurs, les auteurs suggèrent que c'est la partie UDP du substrat donneur qui est responsable de l'accroissement de l'affinité pour le *p*-nitrophénol lorsque l'UGT est saturée en UDPGA avant d'ajouter l'aglycone, car la fixation de l'UDP est identique à celle de l'UDPGA en terme d'affinité. En accord avec ces observations, nous avons montré un effet synergique de même type sur l'UGT1*6 recombinante par l'utilisation d'inhibiteurs modifiés au niveau de l'uridine. De plus, nos résultats permettent de préciser la nature du groupement plus spécifiquement impliqué. Ainsi l'effet d'un accroissement du caractère hydrophobe de l'uridine par la fonction isopropyle induit l'effet synergique observé. Les interactions contribuant à cet effet sont donc vraisemblablement de nature hydrophobe. Les fonctions hydroxyle en 2' et 3' du ribofuranose ne seraient pas impliquées dans l'effet synergique observé. Il est probable, du fait de la nature des interactions impliquées et de leur localisation sur la structure des inhibiteurs, que cet effet soit induit par la base pyrimidique de l'UDPGA dans le processus catalytique.

II.4.4. Processus de fixation de PP56B

L'effet inhibiteur de PP56B, important tant en terme de IC₅₀ que de K_i, est apparemment en contradiction avec l'absence d'effet significatif sur l'incorporation de la sonde azido-UDPGA. Afin d'exclure tout phénomène cinétique complexe de fixation de PP56B pouvant justifier cette apparente contradiction, le processus de fixation de PP56B a été étudié plus en détail. D'une part, il apparaît que l'incubation des inhibiteurs avec les fractions membranaires s'effectue pendant des temps plus longs et à température plus élevée lors de la détermination de l'activité enzymatique que lors du marquage de photoaffinité. Afin d'évaluer un éventuel processus de fixation lente récepteur - ligand (Rich et Sun, 1980 ; Todd et Hausinger, 1989) pouvant justifier le comportement de PP56B, l'inhibiteur a été incubé pendant différentes durées à 37°C avec les fractions membranaires avant marquage de photoaffinité avec la sonde [β -³²P]5N₃-UDPGA. En effet, la localisation luminale du site actif de l'UGT dans la membrane du réticulum (Drake *et al.*, 1992) pourrait conduire à ralentir l'accessibilité de

l'inhibiteur. De même, un changement conformationnel lent de l'enzyme conduisant à une complexation de l'inhibiteur au niveau du site actif pourrait aussi expliquer l'écart apparent entre la fixation du composé lors des expériences de photoaffinité et celle lors des déterminations des K_i . Nous avons vérifié que la photoincorporation de la sonde n'est pas modifiée en fonction du temps de préincubation des fractions membranaires en absence de PP56B. L'incorporation de la radioactivité à l'UGT1*6, évaluée par mesure densitométrique des autoradiogrammes et comparée à celle obtenue sur les fractions membranaires sans inhibiteur, n'est pas modifiée dans ces conditions (Figure 29), ce qui exclut un processus de fixation lente.

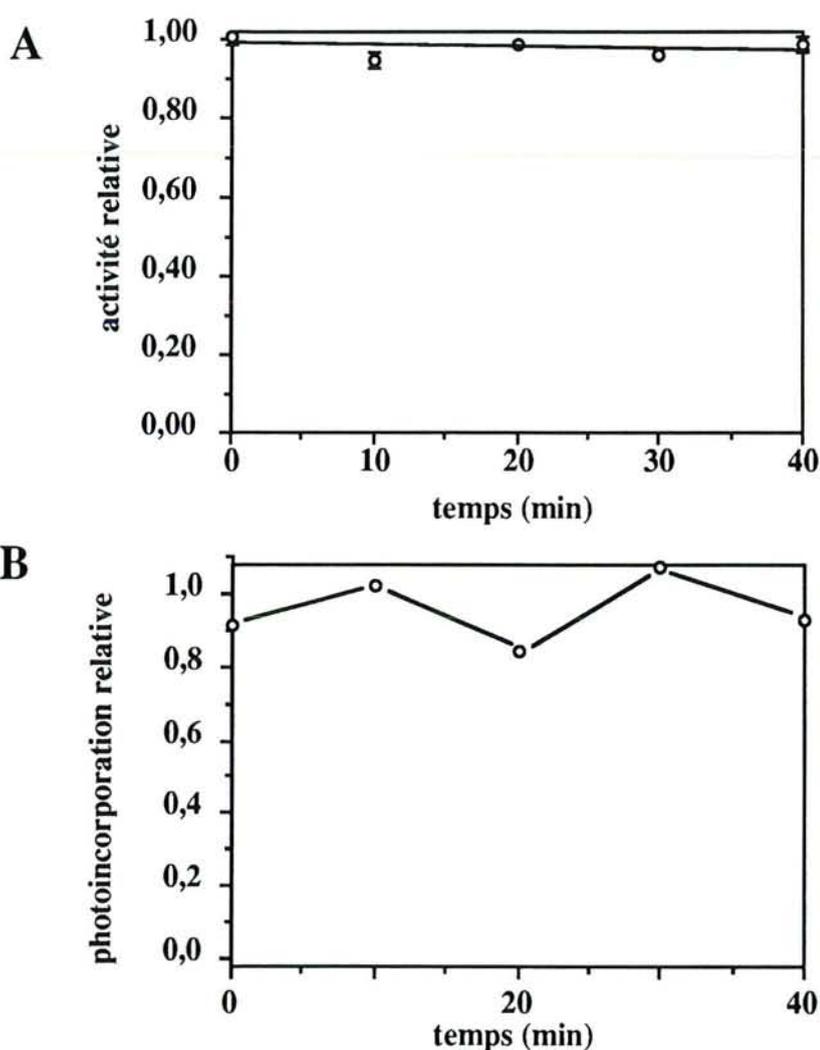


Figure 29. Effet d'une préincubation de PP56B avec les fractions membranaires sur la réversibilité de l'inhibition (A) de ce composé et sur la photoincorporation (B) de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]5\text{N}_3\text{-UDPGA}$.

A : PP56B, 0,1 mM ; B : PP56B, 0,3 mM ; $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]5\text{N}_3\text{-UDPGA}$, 40 μM

Une fixation de nature covalente à l'enzyme pourrait conduire à une inhibition de l'activité enzymatique sans affecter la photoincorporation de l'azido-UDPGA au niveau du site actif, bien que cette structure ne semble pas posséder de groupements fonctionnels réactifs. D'autre part, l'inhibiteur pourrait aussi se fixer lentement et très fortement à l'enzyme de telle sorte qu'un effet d'inhibition en fonction du temps puisse être observé après dilution des fractions membranaires. L'inhibiteur PP56B est incubé à une concentration de 100 μM aux fractions membranaires puis celles-ci sont diluées 60 fois de telle sorte qu'à cette concentration, aucune inhibition ne soit observée si la fixation est réversible. L'activité de glucuronoconjugaison de UGT1*6 est déterminée en fonction du temps d'incubation et comparée à l'activité contrôle (sans inhibiteur). Aucun effet dépendant du temps n'est observé (Figure 29.A) lors de la pré-incubation de PP56B et l'inhibition est levée par la dilution des fractions membranaires, excluant une inhibition de nature irréversible ou réversible à fixation forte.

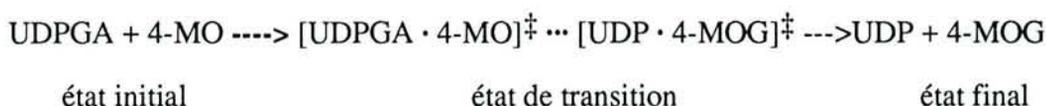
Ces expériences suggèrent donc que cet inhibiteur interagit avec le site actif selon un processus simple et réversible. Afin de tenter d'expliquer cet écart apparent entre les résultats du marquage de photoaffinité suggérant que PP56B ne se fixe pas compétitivement au niveau du site UDPGA de l'enzyme et les expériences d'inhibition enzymatique montrant que sa fixation est compétitive, plusieurs faits doivent être pris en considération :

- la stoechiométrie de fixation de la sonde est inconnue et l'inhibiteur peut interagir au niveau du site actif sans affecter la fixation de la sonde si cette stoechiométrie est faible (des valeurs de 0,01 à 0,95 mole par mole de site de fixation ont été reportées dans la littérature suivant la sonde et le récepteur étudié, Haley, 1991).
- dans l'hypothèse probable d'un changement conformationnel (voir paragraphe II.4.3), il est possible que PP56B se lie à l'un des sites de fixation des substrats donneur ou accepteur lorsque l'un des substrats est présent, mais pas à l'enzyme libre.

II.4.5. L'état de transition de l'UGT1*6

La détermination des K_i de PP56B vis-à-vis de l'UDPGA et de la 4-MO conduit à des valeurs proches (17 et 21 μM respectivement), alors que les K_m des substrats donneur et accepteur

sont différents (tableau 4). La fixation de PP56B se fait donc sur un site unique recouvrant les deux sites de fixation des substrats. Ce site correspondrait selon la Figure 3 (Introduction) soit au site de fixation d'un intermédiaire réactionnel de haute énergie, soit à l'état de transition. Cependant, la glucuroconjugaison relève vraisemblablement d'un mécanisme de transfert direct de l'aglycone sur l'UDPGA (Magdalou *et al.*, 1982, Noort *et al.*, 1990) incompatible avec l'existence d'un intermédiaire réactionnel. Le chemin réactionnel catalytique peut être décrit selon le schéma suivant :



dans lequel figure un état de transition mais aucun intermédiaire réactionnel. De ce fait il est probable que les inhibiteurs aux K_i similaires tels que PP56B soient des analogues de l'état de transition, ce que nous allons tenter de vérifier par modélisation moléculaire.

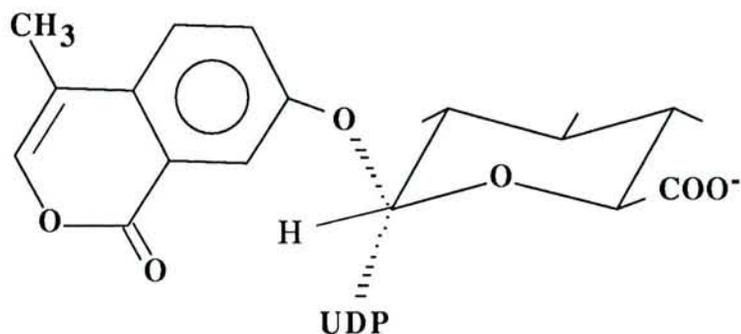
Sur la base de nos résultats et ceux de Vessey et Zakim (1972), il est vraisemblable que l'existence d'un complexe ternaire UGT1*6-UDPGA-4MO fasse partie intégrante du processus catalytique. Dans ce cas, l'état de transition présumé peut être assimilé aux substrats liés l'un à l'autre (Lienhard, 1980). L'état de transition serait vraisemblablement celui décrit sur la Figure 30.A, avec des liaisons partiellement formées autour du carbone 1 de l'UDPGA (Magdalou *et al.*, 1982).

Afin d'évaluer l'analogie probable entre PP56B et l'état de transition présumé de la réaction de glucuroconjugaison par l'UGT1*6, nous avons modélisé et superposé cette structure avec un analogue hypothétique de l'état de transition (Figure 30, composé TS).

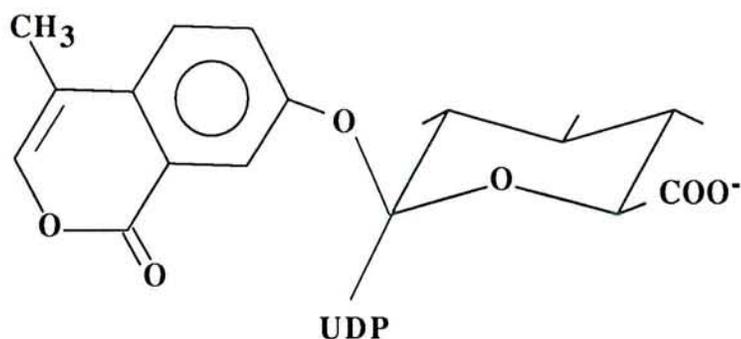
II.4.5.1. Modélisation moléculaire des inhibiteurs

Chaque composé de la série PP, ainsi que le composé de référence (TS) ont subi une analyse conformationnelle suivant le protocole détaillé dans le chapitre Matériels et Méthodes.

La structure TS, servant de matrice et les composés PP sont construits sur SYBYL, puis modélisés. Ces composés possèdent un nombre élevé de liaisons simples qui leur confèrent un nombre élevé de conformères et allongent considérablement la durée de la recherche conformationnelle. Les angles de torsion définis pour cette recherche conformationnelle sont indiqués sur la Figure 31 pour l'inhibiteur PP56B .



A. Etat de transition présumé de la réaction de glucuroconjugaison de la 4-MO



B. Analogue de l' état de transition présumé (composé TS) modélisé sur SYBYL

Figure 30. Etat de transition présumé de la réaction de glucuroconjugaison de la 4-méthylumbelliférone par l'UDP-glucuronosyltransférase UGT1*6 (A), et analogue de l' état de transition présumé modélisé sur SYBYL (B).

Les angles de torsion de la chaîne alkyle n'ont pas été considérés dans cette étape et cette chaîne aliphatique en C₉ a été maintenue dans sa conformation la plus stable (*all trans*) afin de diminuer le temps de calcul. L'incrément d'angle pour les 13 autres angles de torsion

définis sur la Figure 31 est de 30°. Cette valeur peut sembler élevée comparée à celle choisie par d'autres auteurs (1° pour Thomas *et al.*, 1991; 10 et 20° pour Olson *et al.*, 1990) mais le nombre élevé d'angles de torsion considérés ne nous laisse pas d'autre alternative si l'on veut limiter le temps de calcul à une durée raisonnable (notons que cette recherche conformationnelle a fourni dans ces conditions plus de 5.10^5 conformères pour PP56B). Les conformères de plus basse énergie après étape de minimisation supplémentaire sont alors sélectionnés pour la superposition ou l'étude QSAR (paragraphe II.4.5.2 et III.4.6).

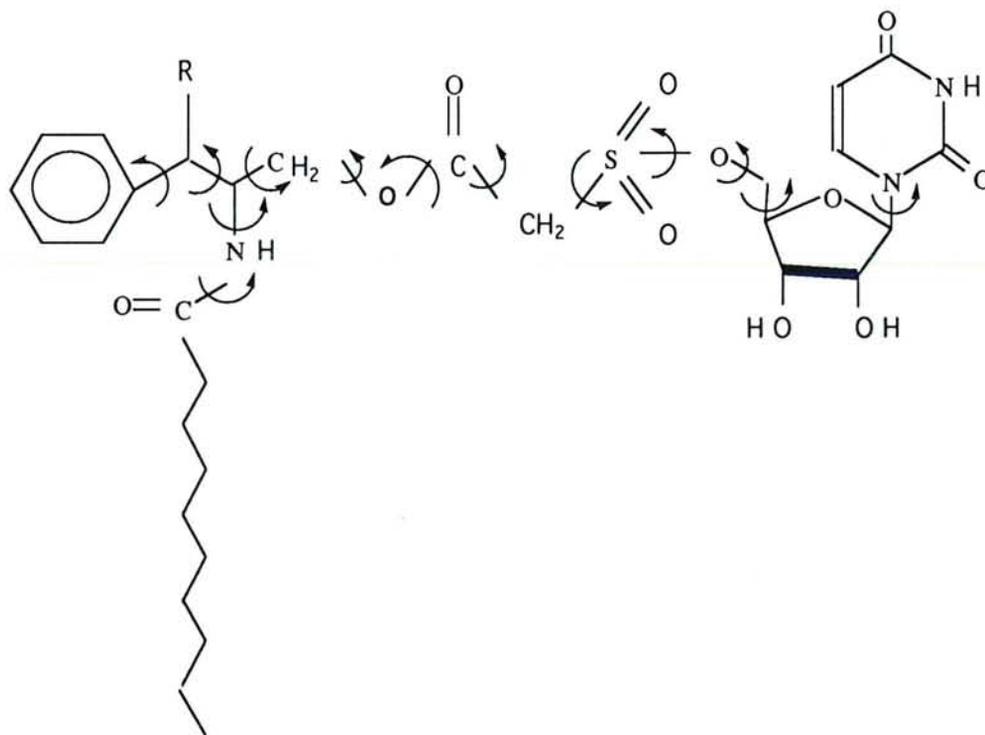


Figure 31. Définition des angles de torsion pour l'analyse conformationnelle (cas du composé 7, PP56B)

II.4.5.2. Alignement des inhibiteurs avec le composé TS

Le choix des motifs à aligner conditionne évidemment la réussite de l'alignement. Ce choix est livré au jugement de l'utilisateur. Dans notre cas, nous avons choisi les motifs à aligner sur la base de faits expérimentaux. Ainsi, la spécificité de l'UGT1*6 est dirigée vers les

aglycones plans tels que la 4-méthylumbellifénone. Par ailleurs, certains des inhibiteurs de la série étudiée sont simultanément compétitifs vis-à-vis de deux sites de fixation de l'enzyme :

- le site de fixation de l'aglycone, qui interagit avec des composés plans de type phénol.
- le site de fixation du cosubstrat (UDPGA).

Nous avons construit un analogue de l'état de transition présumé de la réaction enzymatique. Cet analogue, représenté Figure 30.B, nous sert de matrice pour superposer les inhibiteurs.

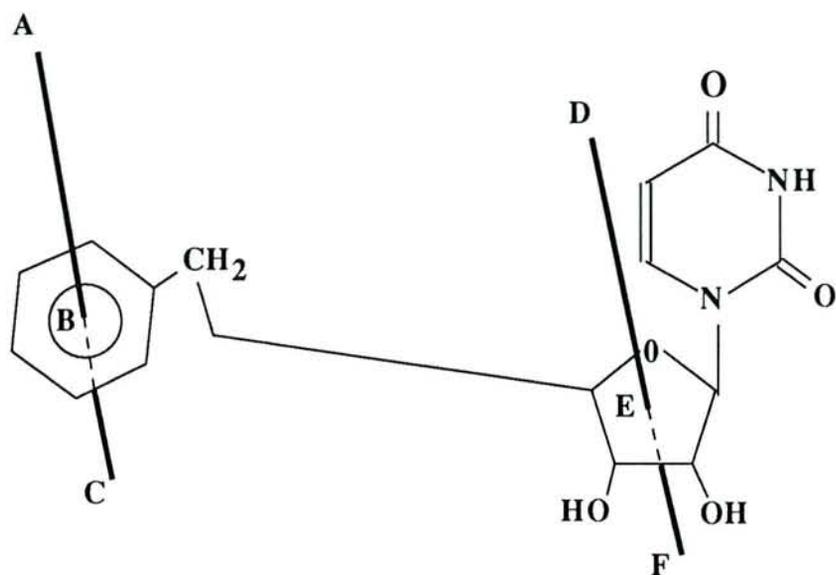
Deux motifs nous semblaient raisonnablement superposables :

- le motif uridine des inhibiteurs avec le motif uridine de l'analogue de l'état de transition.
- le groupement phényle des inhibiteurs qui semble être le seul motif pouvant interagir avec le site de fixation de l'aglycone (liant les substrats plans de type phénol).

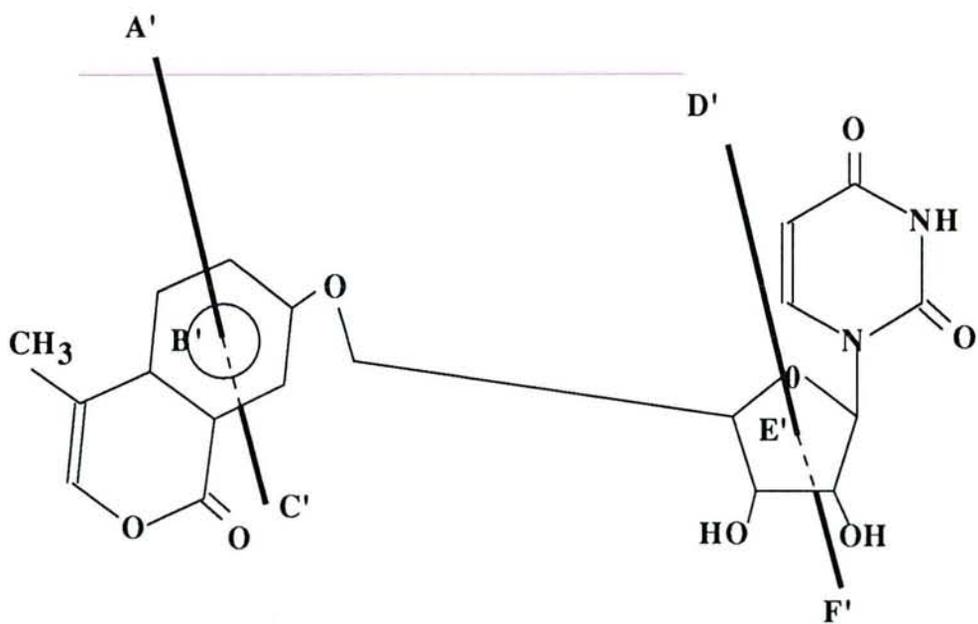
Nous avons donc choisi d'aligner les inhibiteurs testés avec l'analogue de l'état de transition TS en superposant les noyaux phényle et les groupements ribofuranose communs à toutes ces structures. Pour cela, les centroïdes des noyaux phényle, ainsi que les plans et les normales aux plans passant par les centroïdes ont été définis pour chaque structure étudiée (Figure 32). L'alignement se fait sur la base des différents points définis dans cette figure (A avec A', B avec B' etc.).

La Figure 33 représente la superposition de PP56B (A) et PP55A (B), qui sont respectivement le meilleur et le plus mauvais inhibiteur de l'UGT1*6 en terme de IC_{50} . Il apparaît que la superposition de PP56B avec TS permet de placer le groupement uridine et le groupement phényle communs dans un positionnement voisin, alors que l'alignement de PP55A avec TS est nettement moins favorable. Ceci suggère que PP56B peut vraisemblablement mimer l'état de transition de l'UGT1*6, en accord avec l'analyse de l'inhibition enzymatique par ce composé.

Pour tenter d'expliquer les effets inhibiteurs variables entre des structures très voisines au niveau des 2 sites susceptibles d'interagir avec les sites de fixation du substrat donneur et du substrat accepteur, nous avons considéré la chaîne séparant les deux groupements se fixant vraisemblablement à l'UGT1*6. Pour les inhibiteurs autres que PP56B, des formes limites de résonance au sein de cette chaîne peuvent être représentées selon le schéma de la Figure 34.



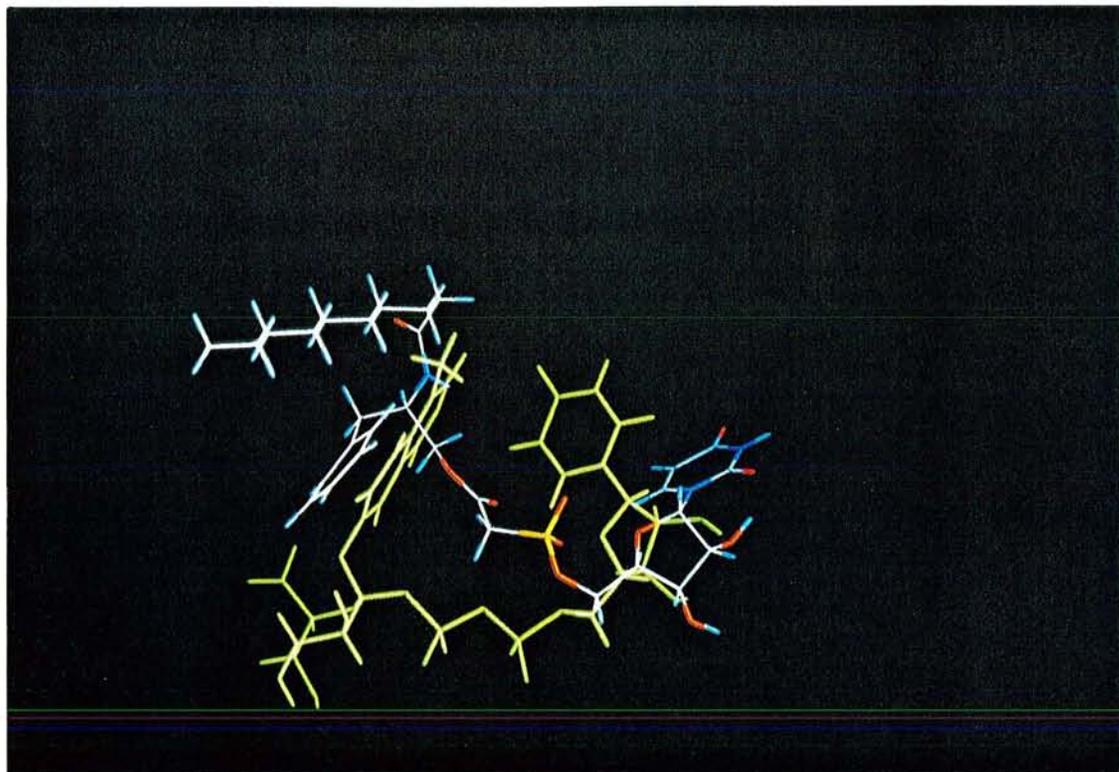
inhibiteurs (tableau 2)



composé TS

Figure 32. Définition des centroïdes et normales choisis pour l'alignement des inhibiteurs testés avec l'analogie de l'état de transition présumé (composé TS).

A



B

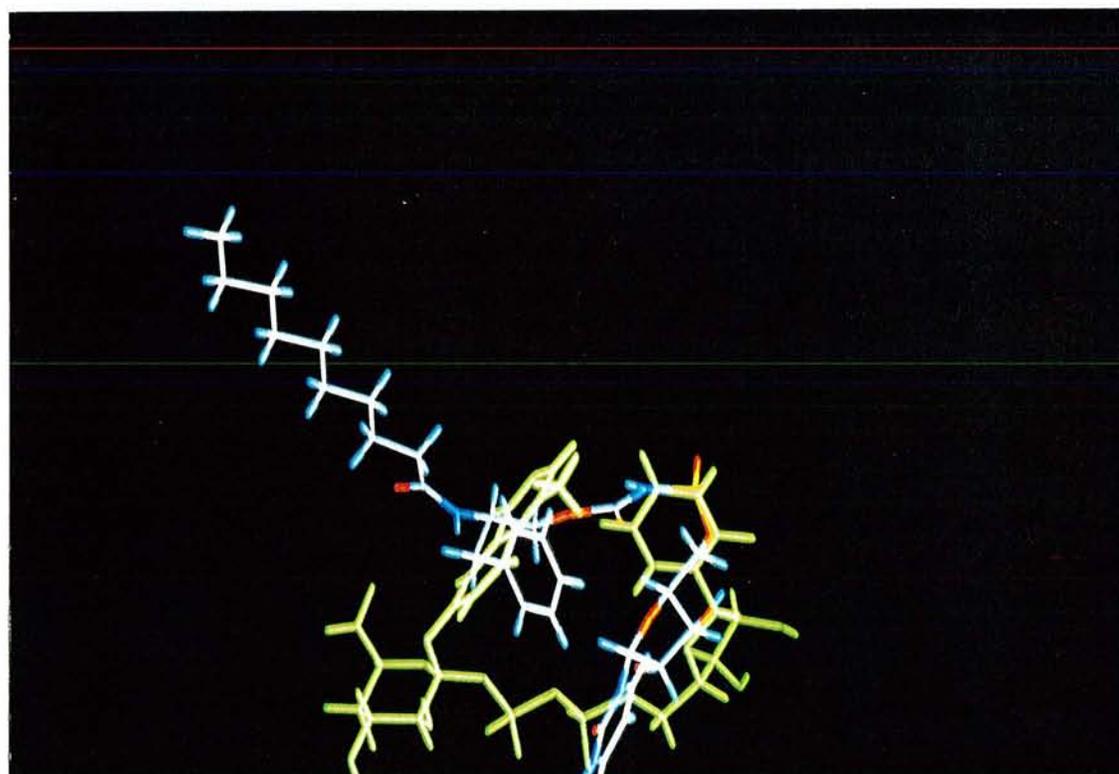


Figure 33. Résultat de la superposition de PP56B (A) et de PP55A (B) avec l'analogie de l'état de transition TS.

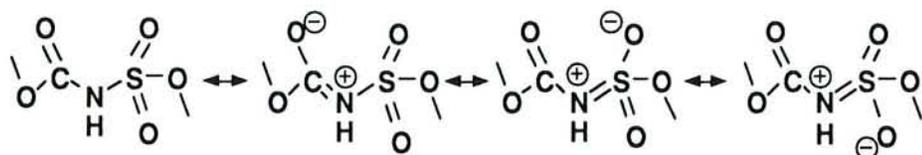


Figure 34. *Formes limites de résonance de la chaîne [(méthyloxy-carbonyl)amino]sulfonyl.*

Cette résonance confère à la chaîne une certaine rigidité et répartition de charges. En revanche, la chaîne de PP56B possède un plus grand degré de liberté conformationnelle car l'atome d'azote est remplacé par un atome de carbone qui empêche la résonance. L'analyse de deux angles de torsion τ_1 et τ_2 caractérisant ce groupement montre qu'il conditionne le positionnement du phényle et de l'uridine des inhibiteurs (publication n° 2 et paragraphe II.4.6).

II.4.5.3. Rôle des divers groupements dans la fixation à l'état de transition

Si l'on compare la structure de cet état de transition avec celle de l'inhibiteur PP56B, il semble qu'un grand nombre de caractéristiques structurales sont absentes dans cet inhibiteur pour permettre une inhibition de l'état de transition. En particulier, l'acide glucuronique est absent de la structure inhibitrice (le même groupement est absent des structures décrites par Noort *et al.* (1990), vraisemblablement parce que la synthèse chimique d'un tel composé est ardue). Cependant, il apparaît, tant à la vue de nos résultats qu'à ceux de Noort *et al.* (1990), que ceci n'empêche pas une fixation à l'enzyme lors de l'état de transition. Deux types de groupements sont susceptibles d'être impliqués dans la fixation de la partie acide glucuronique de l'UDPGA :

- les fonctions hydroxyle du glucopyranose.
- la fonction carboxylate en position C₅ du glucopyranose.

Les liaisons hydrogène sont des éléments ubiquitaires de la reconnaissance moléculaire (Fersht, 1987). Ainsi Quioco et Vyas (1984) décrivent le réseau complexe de liaisons hydrogène chargées et non chargées contribuant à la fixation du L-arabinose à l' "arabinose-binding protein". Des interactions similaires de la partie glucopyranose de l'UDPGA avec le site actif des UGT peuvent être impliquées dans la fixation du ligand. Toutefois, Fersht *et al.* (1985) ont montré que les liaisons hydrogène, plus particulièrement les liaisons chargées, contribuent davantage à la spécificité de la reconnaissance moléculaire qu'à l'énergie de fixation. Ainsi, les valeurs des constantes K_i des inhibiteurs PP et des rapports K_m/K_i (Tableau 6) suggèrent que l'absence du groupement glucopyranose dans cette série de composés n'exclut pas une fixation efficace des inhibiteurs.

La contribution majeure d'association récepteur-ligand est en général de nature hydrophobe (Street *et al.*, 1986). Ainsi, il semble que d'une manière générale le caractère hydrophobe contribue à l'inhibition de l'UGT1*6 par la série de composés PP évaluée en terme de IC_{50} (sans pour autant exclure un effet indirect sur l'accessibilité des inhibiteurs du fait de la localisation membranaire des UGT) : nous avons précédemment noté que l'introduction d'un groupement isopropylidène-uridine accroît l'effet inhibiteur. Le rôle peu favorable du groupement hydroxyle du *spacer* dans l'effet inhibiteur peut être interprété en terme d'hydrophobie moindre (publication n°2).

| | | Inhibiteurs | | | |
|-------------------------------------|-------|-------------|-------|-------|-------|
| | | PP37 | PP37P | PP50B | PP56B |
| $K_m \text{ app} / K_i \text{ app}$ | 4-MO | 1,2 | 3,9 | 10,9 | 5,7 |
| | UDPGA | 17,9 | 16,4 | 41,1 | 24,2 |

Tableau 6. Valeurs des rapports $K_m \text{ app} / K_i \text{ app}$ de quelques inhibiteurs de la série PP pour l'activité de glucuroconjugaison de la 4-méthylombelliférone par l'UGT1*6.

En revanche, le groupement carboxylate de l'acide glucuronique est vraisemblablement important dans la fixation des substrats dans l'état de transition. En effet, Zakim *et al.* (1983) mettent en évidence une interaction essentielle entre ce groupement et le site actif d'une UGT. La contribution d'une liaison ionique de ce type (énergie de dissociation de 8 kcal.mole^{-1}) est

vraisemblablement non négligeable dans la liaison avec le site actif de l'UGT. Ainsi, l'absence de certaines analogies structurales avec l'état de transition présumé de la réaction de glucuroconjugaison contribue sans doute à diminuer le pouvoir inhibiteur observé pour l'analogie de l'état de transition PP56B, si l'on compare les K_i observés à ceux déterminés pour des analogues de l'état de transition sur d'autres enzymes (Collins et Stark, 1971, Janssen et Nes, 1992). Broom (1989) a souligné le rôle des interactions ioniques fortes dans la fixation de nombreux substrats aux enzymes. L'absence de la liaison carboxylate-arginine (intervenant dans la fixation de l'UDPGA) entre les composés PP et le site actif peut de cette manière expliquer les valeurs de K_i relativement élevées.

II.4.5.4. Etat de transition de l'UGT1*6 et libération des produits

Il est possible que le caractère hydrophobe du site actif dans l'état de transition contribue à libérer le glucuronide et l'UDP aux propriétés hydrophiles. Par ailleurs une contribution plus probable au relargage des produits pourrait être issue d'un changement conformationnel résultant du transfert de l'aglycone sur l'UDPGA. En effet, l'état d'hybridation du carbone C_1 de l'UDPGA change durant l'état de transition représenté sur la Figure 30.A. Une colinéarité entre la liaison partiellement formée et la liaison partiellement rompue imposerait aux atomes C_1 -O- C_2 -H de l'UDPGA une position dans un même plan (Figure 35), comparable à l'état de transition trigonal bipyramidal des phosphokinasés (Cook *et al.*, 1981; Fersht, 1985) ou de l'indole *N*-méthyltransférase (Benghiat et Crooks, 1983).

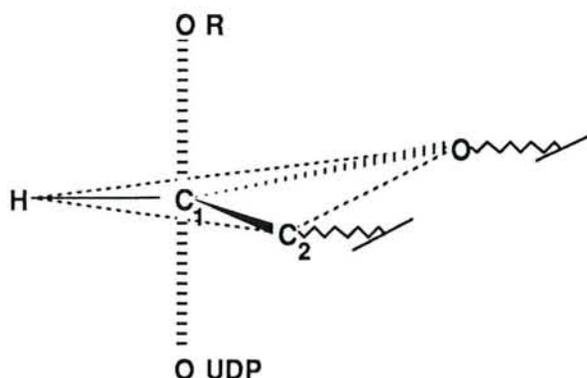


Figure 35. Géométrie des liaisons autour du carbone 1 de l'UDPGA lors de l'état de transition présumé de la glucuroconjugaison.

L'attaque nucléophile sur le carbone C₁ saturé doit ainsi vraisemblablement induire un changement conformationnel important pouvant résulter en la libération de l'UDP et du glucuronide.

II.4.5.5. Conclusion

Il est clair que dans un processus catalytique, seul l'état intermédiaire peut être synthétisé et certains inhibiteurs puissants sont des analogues de l'état intermédiaire et non pas de l'état de transition, tel que l'inhibiteur de l'état intermédiaire de la réaction enzymatique de la thymidylate synthétase décrit par Yang *et al.* (1988). Par définition, l'état de transition ne peut être synthétisé et les analogues de l'état de transition sont des structures qui tendent à mimer avec plus ou moins de succès un état hypothétique des ligands de l'enzyme dans un état non isolable. Dans le cadre de ce travail, nous avons montré par des études cinétiques que PP56B se comporte comme un analogue de l'état de transition de l'UGT1*6, ce qui est confirmé par la modélisation moléculaire.

II.4.6. Modèles QSAR

Nous nous sommes proposé d'analyser la relation structure-activité de ces inhibiteurs. L'alignement des structures a été développé comme indiqué précédemment. Les composés peuvent alors subir une QSAR par la méthode CoMFA, afin de tenter de déterminer les paramètres stériques et électrostatiques contribuant aux inhibitions observées pour les composés de la série PP.

II.4.6.1. Modèle CoMFA

Le premier modèle s'est révélé peu satisfaisant car trois inhibiteurs ont dû être exclus du modèle final (4, 7, 11).

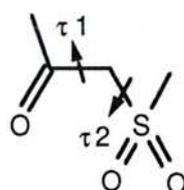
Les contributions relatives sont :

- 53 % stérique
- 47 % électrostatique

Ce modèle aboutit à une très bonne corrélation ($r^2 = 0,997$) mais trop peu de molécules sont considérées et nous avons donc recherché d'autres modèles plus fiables.

II.4.6.2. Modèle des angles τ

La raison pour laquelle notre étude s'est portée sur les angles τ (définis Figure 36) est évoquée en paragraphe II.4.5.2.



τ_1 : S-C(N)-C-O

τ_2 : O-S-C(N)-C

Figure 36. Définition des angles de torsion τ_1 et τ_2 des inhibiteurs.

En résumé, l'effet inhibiteur est potentialisé lorsque l'atome d'azote est remplacé par un atome de carbone dans le groupement représenté Figure 36 (composé **1** comparé à composé **7**, tableau 2, en terme de IC_{50} , soit PP55B et PP56B respectivement dans le Tableau 4). Nous avons donc choisi de caractériser le rôle possible de ce groupement dans l'inhibition observée, dirigeant vraisemblablement suivant sa géométrie le positionnement des groupements phényle et ribofuranose choisis pour l'alignement des inhibiteurs.

Les angles τ_1 et τ_2 sont analysés pour chaque conformère de plus basse énergie issu de la recherche conformationnelle systématique. Une validation croisée est appliquée aux valeurs prédictives afin de caractériser la validité de la prédiction par le modèle.

L'étape de validation croisée appliquée aux inhibiteurs a permis de définir les paramètres suivants de l'équation de prédiction des IC_{50} de cette série de composés :

équation de prédiction (Figure 37) :

$$IC_{50} = 358,8 - 9,49.\tau_1 - 1,94.\tau_2$$

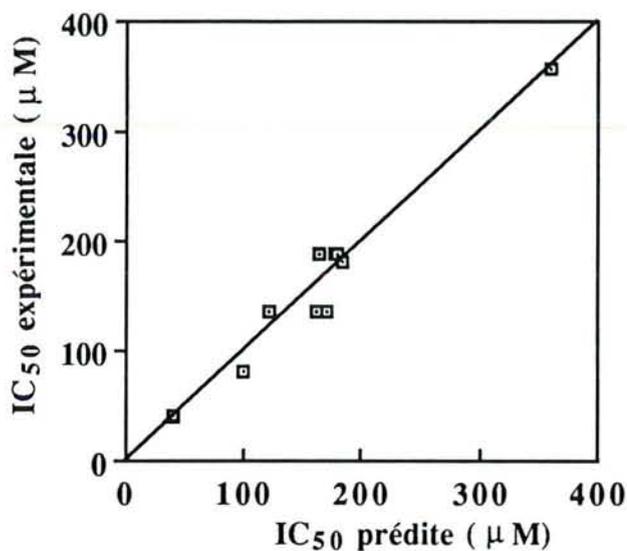
validation croisée : $r^2 = 0,941$

contributions relatives :

$$\tau_1 : 71 \%$$

$$\tau_2 : 29 \%$$

Toutes les molécules s'inscrivent dans ce modèle.



$r = 0,94$

Figure 37. *Corrélation entre IC_{50} prédites et expérimentales (modèles des angles τ)*

II.4.6.3. Modèle des angles τ associé au modèle CoMFA

Dans ce modèle, les paramètres finaux de l'équation de prédiction sont les suivants :

équation de prédiction (Figure 38) :

$$\log IC_{50} = -2,243 + 3,35.10^{-6}.\tau_1 - 1,33.10^{-6}.\tau_2$$

validation croisée : $r^2 = 0,822$

Ces valeurs peuvent être comparées aux limites de r^2 :

- $r^2 = 1$, correspondant à un modèle prédictif idéal (les champs d'interactions se situent à des endroits identiques pour toutes les molécules).

- $r^2 = 0$, correspondant à une valeur prédictive déterminée à partir d'une réponse biologique choisie de manière aléatoire parmi celles des structures étudiées.

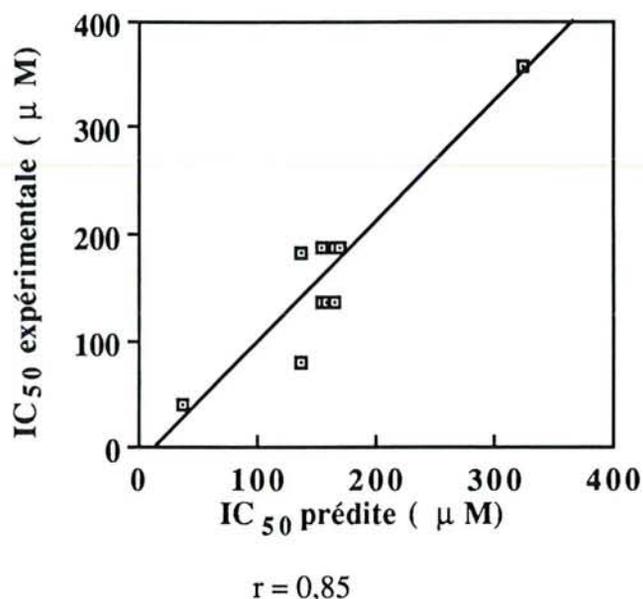


Figure 38. Corrélation entre les IC₅₀ prédites et expérimentales (modèle des angles τ associé au modèle CoMFA)

Dans le cas décrit dans cette étude, r^2 est supérieur à 0.3 ce qui minimise le risque d'une corrélation erronée ($p < 5\%$) entre les valeurs expérimentales et prédites (Thomas *et al.*, 1991). Ce modèle fournit donc les caractéristiques stérique (forme) et électrostatique (électronique) des inhibiteurs et peut donc être raisonnablement utilisé pour prédire l'effet inhibiteur de nouvelles molécules.

Les pondérations des différents facteurs considérés sont les suivantes :

| | |
|-----------------------------|--------|
| contributions relatives : | |
| interaction stérique | 10,4 % |
| interaction électrostatique | 10,6 % |
| angle τ_1 | 44,4 % |
| angle τ_2 | 34,6 % |

II.4.6.4. Modèle tridimensionnel d'interactions stérique et électrostatique

La maille autour des molécules représente 3094 points d'échantillonnage dont les énergies d'interaction stérique et électrostatique se répartissent selon les histogrammes représentés Figure 39.A et 39.B respectivement.

Plus l'atome-sonde s'éloigne de la molécule, plus les valeurs des énergies sont proches de 0 et ces valeurs correspondent à un nombre maximum de points. Les points d'échantillonnage dont les valeurs en énergie sont positives correspondent à des interactions stériques favorables à proximité du ligand, ceux d'énergie négative à des interactions stériques défavorables. Les valeurs d'énergie électrostatique négatives correspondent aux points d'échantillonnage favorables lors de l'interaction du ligand avec l'atome-sonde de charge positive. Les valeurs d'énergie électrostatique positives correspondent aux points de la maille au niveau desquels l'atome-sonde de charge +1 est en interaction défavorable avec le ligand. La figure 39.A représente le modèle d'interaction stérique issu de l'analyse CoMFA sur la série des inhibiteurs testés, visualisé ici autour du meilleur inhibiteur de cette série, le composé **7** (PP56B).

L'utilisation de la méthode CoMFA a mis en évidence une zone d'interaction stérique très favorable au niveau des fonctions hydroxyle vicinales du ribofuranose, là où se situent les groupements isopropylidène des composés **2**, **5**, **8**, **11**. Dans une moindre mesure, l'uracile possède une zone d'interaction stérique favorable. La zone entourant le groupement phényle des inhibiteurs contribue aussi de manière minime à l'inhibition. Les champs moléculaires d'interaction électrostatique sont représentés Figure 40.B.

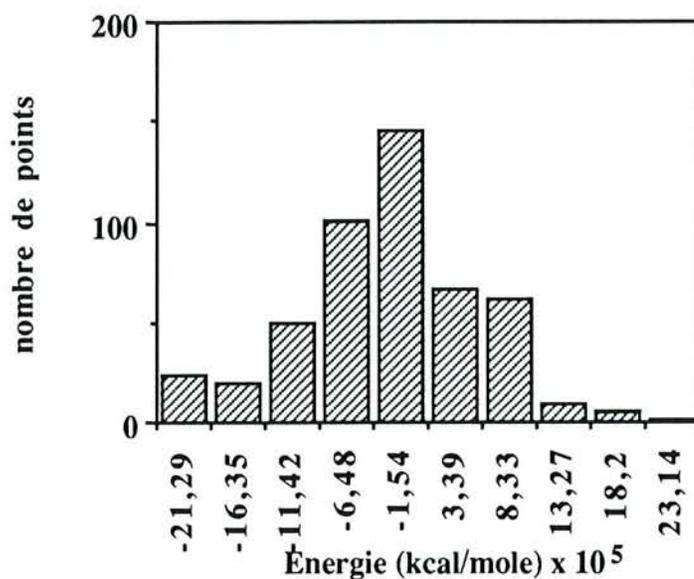


Figure 39.A. *Histogramme de distribution des interactions stériques de l'atome -sonde avec les inhibiteurs.*

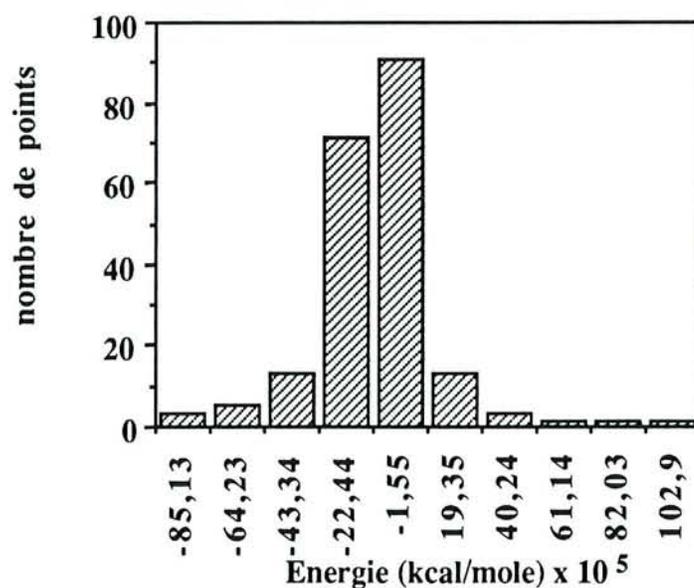


Figure 39.B. *Histogramme de distribution des interactions électrostatiques de l'atome -sonde avec les inhibiteurs.*

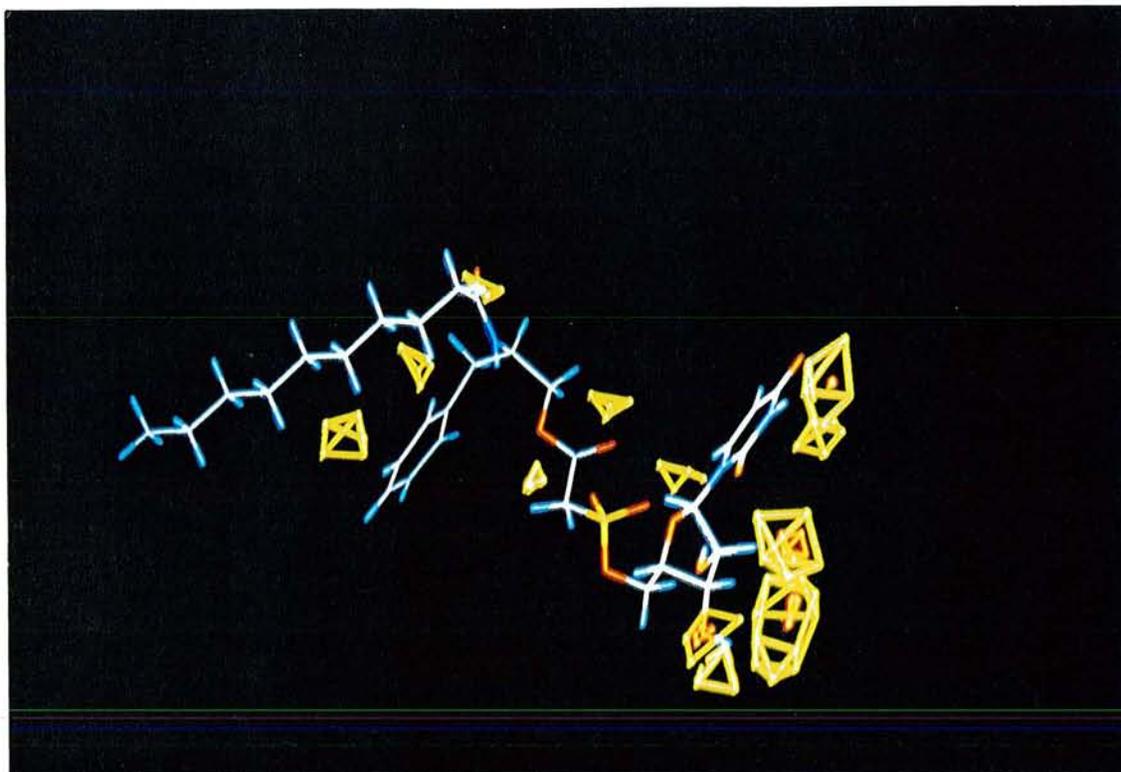


Figure 40.A. *Principales interactions stériques pour la modification de l'effet inhibiteur des composés étudiés, représentées ici autour du composé 7 (PP56B).*

Les limites de contributions stériques sont indiquées en pourcentage correspondant à un code de couleurs identique à celui indiqué sur la photographie ci-dessous.

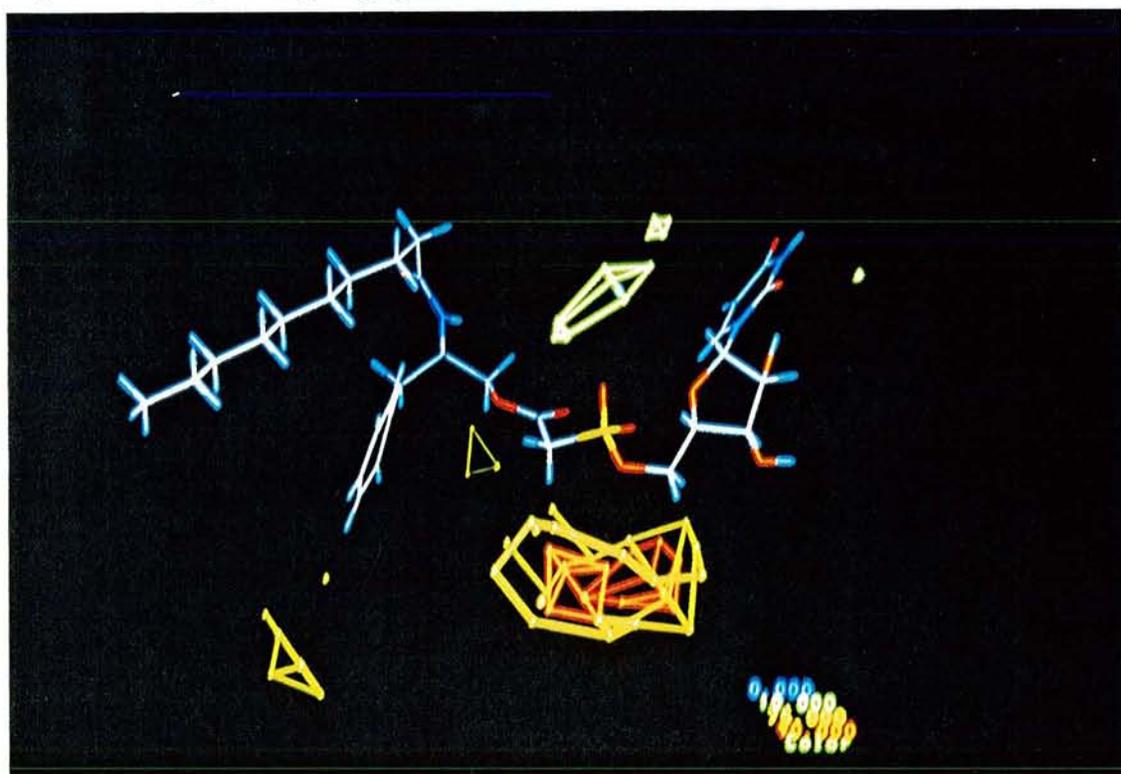


Figure 40.B. *Principales interactions électrostatiques pour la modification de l'effet inhibiteur des composés étudiés, représentées ici autour du composé 7 (PP56B).*

Les limites de contributions électrostatiques sont indiquées en pourcentage correspondant au code de couleurs.

Une forte contribution électrostatique à l'inhibition se situe autour du groupement sulfoxyde du bras séparant le groupement uridine du noyau phényle dans les composés testés. Il apparaît que l'étude par QSAR des IC_{50} sur cette série d'inhibiteurs permet de déterminer de manière fiable le pouvoir inhibiteur et les paramètres contribuant à l'inhibition enzymatique. La modification au niveau de l'uridine par greffage de groupements aliphatiques sur les groupements hydroxyle vicinaux du ribofuranose devrait accroître l'effet inhibiteur des structures similaires. Une étude de ce type devrait permettre de caractériser cette zone d'interaction (poche hydrophobe). Les modifications stériques au niveau du sulfoxyde sont à éviter.

III. EFFET DU PH SUR LES PARAMETRES CINETIQUES DE L'UGT1*6

Les paramètres cinétiques de la glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6 ont été examinés en fonction du pH afin d'identifier les résidus ionisables essentiels à la fixation des substrats donneur et accepteur et à la catalyse. Les valeurs de K_m apparent de la 4-MO et de l'UDPGA ainsi que la V_{max} ont été déterminées dans une gamme de pH compris entre 5,3 et 8,6.

La stabilité de l'activité de glucuroconjugaison a d'abord été estimée dans cette gamme de pH. La formation de glucuronide de 4-MO y est proportionnelle au temps d'incubation de l'enzyme (Figure 41).

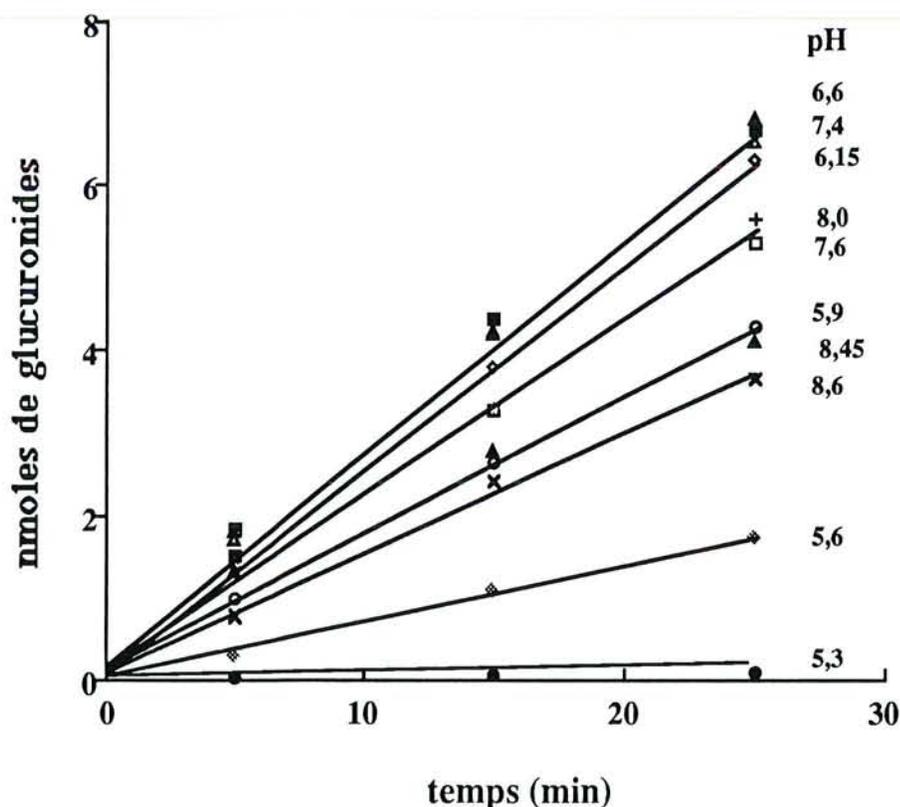


Figure 41. Effet du pH sur la stabilité de l'activité UGT1*6.

La production de glucuronide de 4-MO par l'UGT1*6 est évaluée en fonction du pH, pour différents temps d'incubation à 37°C des fractions membranaires de la lignée cellulaire V79-UGT1*6 avec l'UDPGA et la 4-MO. UDPGA : 5 mM ; 4-MO : 1 mM ; protéines de fractions membranaires : 3 µg

L'absence de dénaturation irréversible de l'UGT1*6 et la stabilité dans cette gamme de pH (5,3 - 8,6) du glucuronide de 4-MO produit sont mises en évidence. Ceci permet de s'assurer de la stabilité du produit de la réaction enzymatique et de l'UGT1*6 lors de l'analyse de l'influence du pH sur les paramètres cinétiques.

L'expression logarithmique de la V_{\max} apparente et du rapport V_{\max} apparente / K_m apparent (figure 42) en fonction du pH est linéaire entre des valeurs de pH de 5,3 et 6,0.

La V_{\max} est diminuée au delà de pH 7,5. L'influence du pH sur le rapport V_{\max} apparente / K_m apparent se fait par la titration de résidus d'acides aminés de l'enzyme impliqués dans la fixation des substrats et la catalyse. Elle peut aussi refléter l'ionisation du substrat plutôt que celle de l'enzyme. Le Tableau 7 résume les valeurs de pK_a du substrat donneur et de la 4-MO.

| substrats | pKa | références |
|---------------------|---------|---------------|
| 4-MO | 7,8 | Mattoo (1958) |
| UDPGA (carboxylate) | 3,2-4,4 | Dutton (1966) |
| UDPGA (uracile) | 9,7 | Dutton (1966) |

Tableau 7. pK_a des groupements ionisables des substrats utilisés pour la détermination de l'activité UGT1*6.

D'après ces valeurs, il apparaît que le substrat donneur ne possède pas de groupement ionisable dans l'intervalle de pH 5,3 - 8,2. En revanche la 4-MO est ionisable à pH basique. La fonction ionisable est le groupement hydroxyle en position 7 de la 4-MO, qui est conjugué à l'acide glucuronique par l'UGT1*6. Il est donc très probable que la diminution de la V_{\max} et du rapport V_{\max} apparente / K_m apparent à pH basique reflète, au moins en partie, l'ionisation de la fonction hydroxyle de la 4-MO.

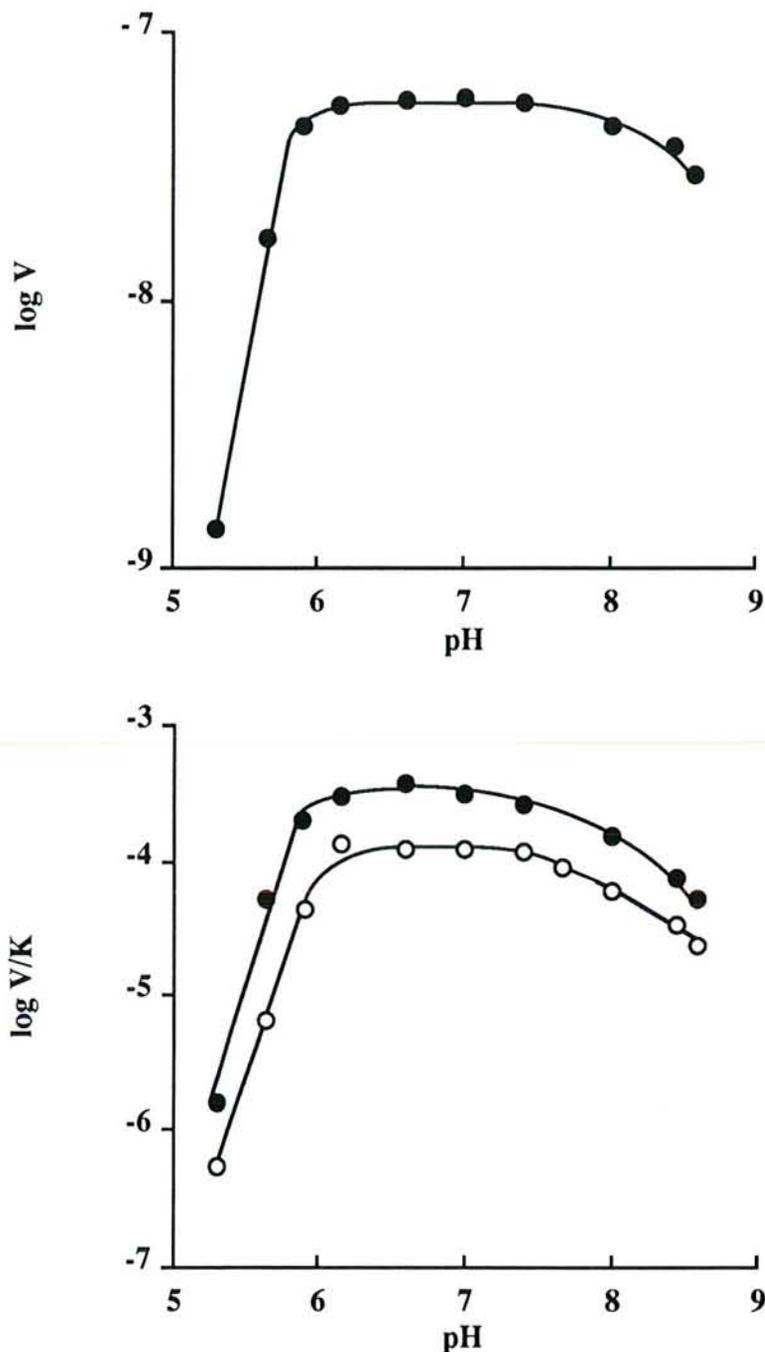


Figure 42. Effet du pH sur la V_{max} et le rapport V_{max} apparente / K_m apparent de l'UGT1*6 vis-à-vis de l'UDPGA (o) et de la 4-MO (●).

Les valeurs de K_m apparent sont déterminées à partir de la représentation de Lineweaver-Burk. Pour la détermination du K_m de l'UDPGA, la concentration en 4-MO est maintenue à 1 mM, les concentrations en UDPGA variant de 0,1 à 5 mM. Les valeurs de K_m apparent de la 4-MO sont déterminées en faisant varier la concentration en 4-MO de 0,05 à 1 mM, la concentration en UDPGA étant maintenue à 5 mM ; protéines de fractions membranaires, 3 μ g.

La pente des courbes V et V/K en fonction du pH (Figure 42) est de 2 à pH acide (5,3-6) ce qui suggère l'implication de deux résidus d'acide aminés dans la catalyse. Le pKa de ces

résidus est de l'ordre de 5,6-6. Ces résidus prototropiques sont non protonés au pH optimum de l'enzyme (7,4).

Zakim *et al.* (1983) ont démontré l'existence d'une interaction entre le groupement carboxylate de l'UDPGA et un résidu arginine du site actif, par modification chimique d'une UGT par la 2,3-butanedione. Le groupement guanidinium des résidus arginine ayant un pK_a compris entre 11,6 et 12,6 dans les protéines, il est peu probable que ce résidu corresponde à l'un des groupements mis en évidence dans les profils de pH décrits ci-dessus.

La contribution de résidus non protonés, de pK_a inférieur à 6,0, dans la fixation des substrats et/ou dans la catalyse est compatible avec les valeurs de pK_a de résidus histidine (5,4 - 7,0) et acide aspartique ou glutamique (3,0 - 5,0). Cependant l'absence de données précises à ce jour sur le mécanisme de la glucuroconjugaison limite la fiabilité de l'interprétation de ces résultats. L'utilisation d'agents de modification chimique de résidus acide aspartique, acide glutamique et histidine en particulier permettra de caractériser certains des acides aminés essentiels de l'UGT1*6 (Paragraphe IV).

IV. MODIFICATION CHIMIQUE DE L'UGT1*6

IV.1. Inactivation de l'UGT1*6 par le diéthyl pyrocarbonate

IV.1.1. Influence de la concentration en diéthyl pyrocarbonate

Afin d'évaluer l'effet éventuel du DEPC sur l'activité de glucuronoconjugaison par l'UGT1*6, les fractions membranaires ont été incubées pendant deux minutes en présence de concentrations croissantes en DEPC (0,1 - 10 mM), puis l'activité UGT1*6-4MO a été déterminée et comparée à un échantillon témoin traité avec 2% (v/v) d'éthanol absolu (solvant) dans des conditions identiques. Nous avons ainsi mis en évidence un effet inhibiteur, dépendant de la concentration (Figure 43). 95 % d'inhibition de l'activité sont observés pour une concentration de 5 mM en DEPC.

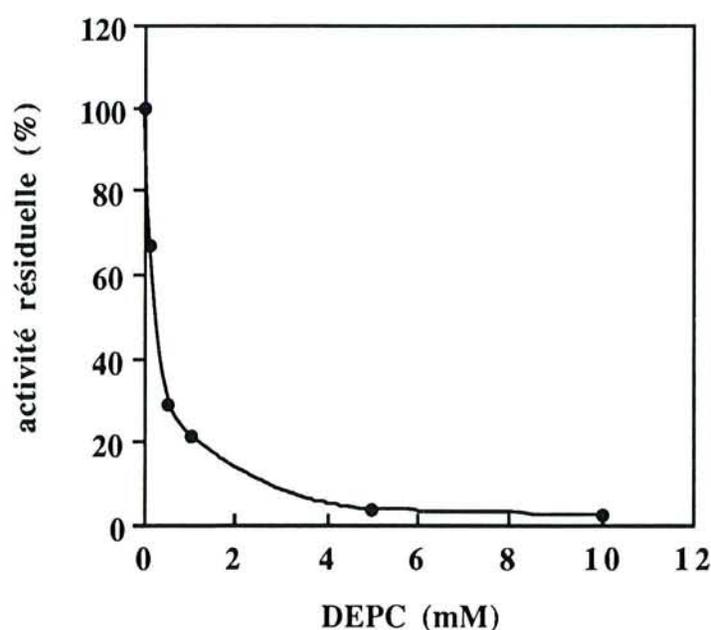


Figure 43. Effet du DEPC sur la glucuronoconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6.

L'inactivation est réalisée en incubant le DEPC (0,1-10 mM) avec les fractions membranaires (1,3 mg de protéines.ml⁻¹) pendant 2 minutes à pH 6,0.

Le DEPC est un réactif à haute spécificité envers les résidus histidine. Des fonctions phénolate, amine, sulfhydryle et guanidine peuvent cependant également être modifiées (Miles, 1977), mais la spécificité de la réactivité vis-à-vis des histidines est accrue à pH acide (Holbrook et Ingram, 1973). C'est pourquoi les expériences ont été réalisées à pH 6,0.

IV.1.2. Cinétique d'inactivation

Afin de déterminer la nature de l'interaction DEPC-UGT1*6, les fractions membranaires ont été incubées en présence de concentrations variables en DEPC. La glucuronoconjugaison de la 4-MO est ensuite déterminée en fonction du temps d'inactivation.

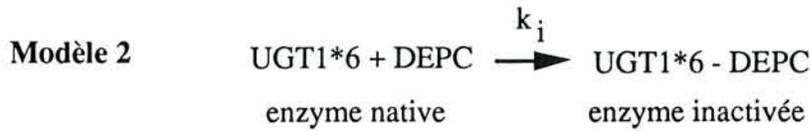
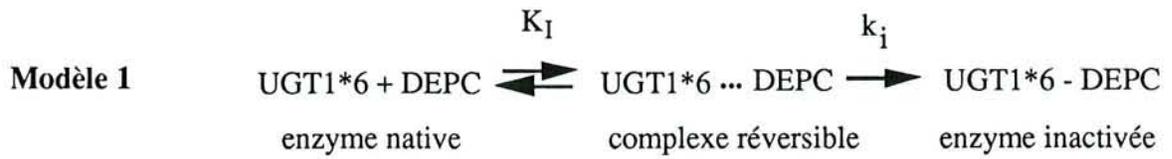
La Figure 1 de la publication n° 3 montre que l'inactivation dépend de la concentration en DEPC et du temps de présence de l'agent d'inactivation au contact des fractions membranaires. Par ailleurs, l'inhibition n'est pas levée par l'étape de dilution des fractions membranaires traitées au DEPC, ce qui suggère que le complexe UGT1*6-DEPC est de nature irréversible.

Cette représentation semi-logarithmique de l'activité résiduelle en fonction du temps d'inactivation est linéaire. La cinétique d'inactivation peut être modélisée par l'équation :

$$-\ln A/A_0 = k_i \cdot t$$

ou A/A_0 représente l'activité résiduelle à un temps t d'inactivation et k_i la constante d'inactivation de l'UGT1*6 pour une concentration en DEPC donnée. La pente de cette courbe correspond à $-k_i$ (ce qui permet de représenter les constantes d'inactivation observées en fonction de la concentration en DEPC) (Figure 1B, publication n° 3).

Deux modèles d'interaction entre l'inactivateur et l'enzyme sont envisageables :



Dans le modèle 1, le DEPC se lie au site de fixation avant que ne s'effectue l'étape de fixation covalente, c'est-à-dire que le phénomène est saturable (il est caractérisé par K_I , constante de dissociation du DEPC du complexe UGT1*6...DEPC). L'inhibiteur est de type marqueur d'affinité.

Dans le modèle 2, le DEPC réagit immédiatement avec l'UGT1*6 sans formation d'un complexe réversible, et le phénomène est donc non saturable. L'inhibiteur est simplement de type irréversible, non spécifique quant à son site de fixation.

La représentation des k_i en fonction des concentrations en DEPC est linéaire et passe par la valeur 0, ce qui suggère que la réaction entre le DEPC et l'UGT1*6 ne passe pas par une étape de formation d'un complexe réversible et suit donc le modèle 2 décrit ci-dessus. La grande majorité des processus d'inactivation de protéines par le DEPC suivent ce modèle. Notons cependant le cas décrit par Cheng et Nowak (1989) qui observe une cinétique d'inactivation de la phosphoénolpyruvate carboxykinase par le DEPC et le diméthyl pyrocarbonate conforme au modèle 1 (l'expression de k_i en fonction de la concentration en DEPC est linéaire, mais l'intersection sur l'axe des ordonnées est supérieure à 0).

Le processus d'inactivation peut être représenté de manière plus précise :

$$-d [\text{UGT1*6}] / dt = K \cdot [\text{UGT1*6}] \cdot [\text{DEPC}]^n$$

d'où l'on déduit, d'une part, comme indiqué précédemment :

$$- \ln A_0/A = k_i \cdot t$$

et si [DEPC] est très supérieure à [UGT1*6], qu'alors :

$$k_i = K.[DEPC]^n$$

soit

$$\log k_i = n.\log [DEPC] + \log K$$

La représentation logarithmique de k_i en fonction de [DEPC] permet donc de déterminer K et n (Figure 44).

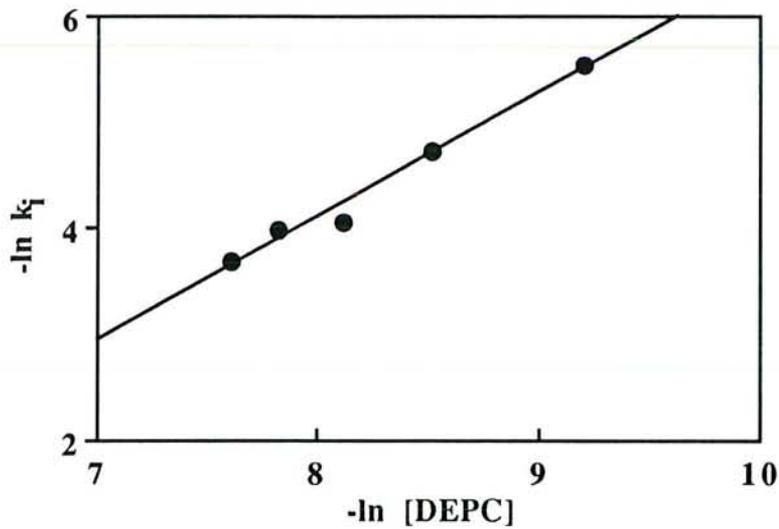


Figure 44. Représentation logarithmique des constantes d'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC en fonction de la concentration en inactivateur.

Les valeurs de k_i sont déterminées à pH 6,0 à partir de la représentation du logarithme de l'activité résiduelle en fonction du temps d'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC.

L'équation de la courbe ainsi obtenue est :

$$-\ln k_i = -5,13 - 1,1 \ln [DEPC]$$

d'où $n = 1,1$ et $K = 3110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (constante d'inactivation de deuxième ordre de l'UGT1*6 par le DEPC).

La valeur de n , peu différente de 1, suggère que la réaction d'un résidu d'acide aminé avec le DEPC provoque l'inactivation. Un seul résidu réactif essentiel serait donc impliqué dans ce phénomène d'inactivation. Notons que ceci ne signifie pas qu'un seul résidu soit modifié par le réactif, mais que parmi ceux modifiés par le DEPC, un seul joue un rôle essentiel dans la glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6. Ainsi, Zhang *et al.* (1992) montrent que l'inactivation de la prostaglandine synthétase par le DEPC est obtenue par inactivation d'un seul résidu histidine, bien que trois résidus soient modifiés chimiquement.

La valeur élevée de la constante d'inactivation de deuxième ordre ($3110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) met en évidence un processus d'inactivation très rapide. A titre de comparaison, dans les mêmes conditions de pH (6,0) et de température (25°C), Abdulwajid et Wu (1986) et Pelton et Ganzhorn (1992) obtiennent des valeurs de $0,00097 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et $22,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivement lors de l'inactivation d'autres enzymes. Dominici *et al.* (1985) soulignent qu'on peut raisonnablement conclure que la modification affecte des résidus histidine lorsque les constantes d'inactivation sont élevées. Le résidu essentiel de l'UGT1*6 modifié par le DEPC serait donc effectivement un résidu histidine. Par ailleurs, cette réactivité élevée du DEPC pour l'UGT1*6 permet d'évaluer la nucléophilie du résidu modifié. En effet, nous avons montré que l'agent d'inactivation chimique réagit avec l'UGT1*6 suivant le modèle 2, qui exclut un phénomène faisant intervenir un processus de fixation réversible avec une affinité déterminée. L'inactivation peut être interprétée en terme de réactivité vis-à-vis du résidu essentiel plutôt qu'en terme d'affinité puisque la vitesse d'inactivation n'est pas saturable. Lundblad *et al.* (1984) soulignent que la réactivité du DEPC reflète directement la nucléophilie du résidu modifié. Cette haute réactivité sera ultérieurement exploitée pour tenter de proposer le résidu essentiel probablement modifié par le DEPC.

IV.1.3. Réversibilité de l'inactivation en présence d'hydroxylamine

L'hydroxylamine est utilisée pour régénérer les histidines carbéthoxylées par le DEPC grâce à ses propriétés estérolytiques. Les fractions membranaires sont inactivées partiellement par le

DEPC, puis mises en présence d'hydroxylamine. L'activité résiduelle est déterminée en fonction du temps de présence de l'hydroxylamine avec les fractions inactivées.

Dans un premier temps, l'effet de l'hydroxylamine a été évalué sur l'activité enzymatique en absence de DEPC. Un traitement des fractions membranaires pendant une heure conduit à une activité résiduelle de 2 %, montrant ainsi un effet de l'hydroxylamine sur la formation de glucuronide de 4-MO. Certains auteurs (Gacheru *et al.*, 1988) ont de même observé des effets de cette nature sur d'autres activités enzymatiques en présence d'hydroxylamine et tiennent donc compte de cet effet lors de l'évaluation de la réversibilité de l'inactivation par le DEPC en présence d'hydroxylamine. Dans notre cas, l'effet est trop important pour permettre cet ajustement. Deux éventualités ont été envisagées pour justifier cet effet :

- l'hydroxylamine est un composé utilisé pour le clivage des liaisons peptidiques entre les résidus asparagine et glycine (Bornstein et Balian, 1977). Une liaison de cette nature existe dans la séquence protéique de l'UGT1*6 (déduite de l'ADNc, Harding *et al.*, 1988). Toutefois, les conditions d'hydrolyse décrites par Bornstein et Balian sont de loin plus drastiques (pH 10,0 ; 1M NH₂OH ; 40°C) que celles de nos essais (pH 6,0 ; 0,1 - 0,3 M NH₂OH ; 25°C). Le clivage de la liaison peptidique entre les résidus asparagine et glycine est donc peu probable.

- l'hydroxylamine peut interférer avec le glucuronide de 4-MO et modifier sa fluorescence. Du fait de la nature même de la structure de la 4-MO, il est possible d'envisager une réaction de ce type sur le glucuronide de 4-MO, qui aurait pour conséquence de faire disparaître la fluorescence permettant d'évaluer l'activité enzymatique.

Si cette dernière hypothèse est exacte, l'utilisation d'un autre substrat de l'UGT1*6 devrait permettre de s'affranchir de ce problème. Nous avons pour cela choisi d'utiliser le dosage de l'activité de glucuronoconjugaison de l' α -naphthol radiomarqué. L'activité enzymatique obtenue n'est pas affectée par la présence d'hydroxylamine pour des concentrations allant jusqu'à 300 mM dans les fractions membranaires, ce qui nous permet d'utiliser ce dosage pour évaluer l'effet de l'agent nucléophile sur la réversibilité de l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC.

Pour ce faire, l'UGT1*6 est inactivée jusqu'à 51 et 71 % d'activité résiduelle, puis les fractions membranaires sont traitées par des concentrations croissantes en hydroxylamine (0 - 300 mM). L'activité est estimée en fonction du temps de présence de l'hydroxylamine et comparée à celle d'une expérience contrôle pour laquelle l'enzyme non inactivée par le DEPC est traitée de manière identique.

La réversibilité est fonction de la concentration et du temps de présence de l'hydroxylamine avec les fractions membranaires partiellement inactivées (Figure 45).

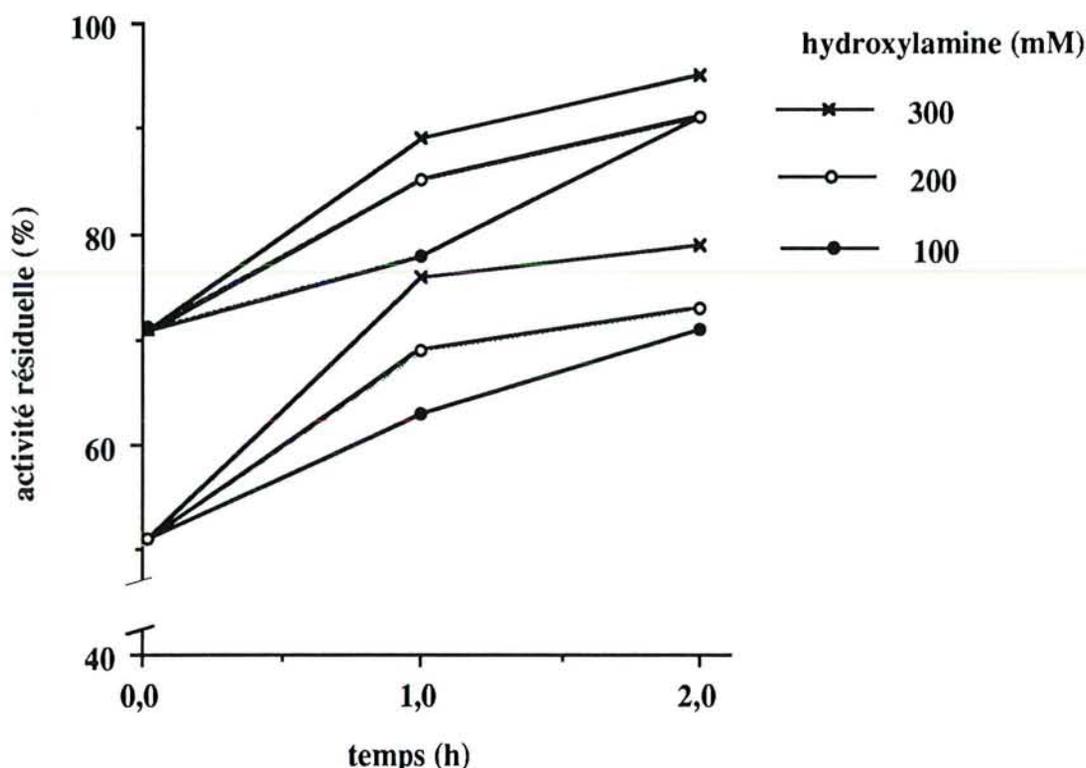


Figure 45. Réversibilité de l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC en présence d'hydroxylamine.

Les fractions membranaires sont traitées par le DEPC (71 et 51 % d'activité résiduelle de glucuroconjugaison de l' α -naphthol), puis mises en présence d'hydroxylamine à des concentrations croissantes.

Cette réversibilité de l'inactivation de l'UGT1*6 est lente. Par contre, elle est en général rapide et totale lorsque le résidu modifié d'une enzyme est une histidine (Grillo et Aronson, 1986 ; Ko *et al.*, 1991), et une modification lente et/ou incomplète est parfois due à la modification d'autres résidus (Melchior et Fahrney, 1970 ; Miles et Kumagai, 1974). Cependant, Meyer et Cromartie (1980) ou encore Chang et Nowak (1989) s'interrogent sur la validité de la réversibilité de carbéthoxylation des histidines par le DEPC sur la base de leurs

résultats qui prouvent sans ambiguïté la modification de résidus histidine par le DEPC. Rappelons que la valeur élevée de la constante d'inactivation de l'UGT1*6, ainsi que les conditions d'inactivation (pH 6,0) suggèrent que le résidu essentiel modifié est probablement une histidine. La lente réversibilité pourrait être due à la relative inaccessibilité du résidu modifié à l'hydroxylamine. En effet, la localisation luminale du site actif des UGT (Drake *et al.*, 1992, Yokota *et al.*, 1992) peut limiter l'accessibilité de l'hydroxylamine, de nature hydrophile. Par ailleurs, le résidu peut être enfoui au sein de la protéine et l'accessibilité du résidu modifié est de ce fait limitée, ce qui justifie la lente réversibilité de l'inactivation.

D'autres arguments apparaîtront au cours de ce travail en faveur de la modification d'un résidu histidine présent dans le site actif de l'UGT1*6.

IV.1.4. Effet d'une inactivation partielle sur les constantes cinétiques

Les fractions membranaires sont partiellement inactivées par le DEPC (60 secondes, 0,2 mM). Les paramètres cinétiques sont alors déterminés et comparés à ceux de l'enzyme native. Dans ces conditions, la V_{\max} est diminuée de 2,4 fois, alors que les K_m apparents pour les substrats donneur et accepteur ne sont pas affectés (Figure 47).

Bazaes *et al.* (1980) signalent qu'un effet d'inactivation affectant uniquement la V_{\max} met en évidence deux populations d'enzymes, l'une encore totalement active, et l'autre totalement inactivée. Cet effet est compatible avec la modification d'une histidine impliquée dans le processus catalytique de l'UGT1*6. L'effet de l'inactivation partielle se répercute uniquement sur la V_{\max} , sans affecter les K_m apparents, ce qui montre que ce résidu n'intervient pas dans la fixation des substrats, ni dans la stabilisation de l'état de transition (Planas *et al.*, 1992).

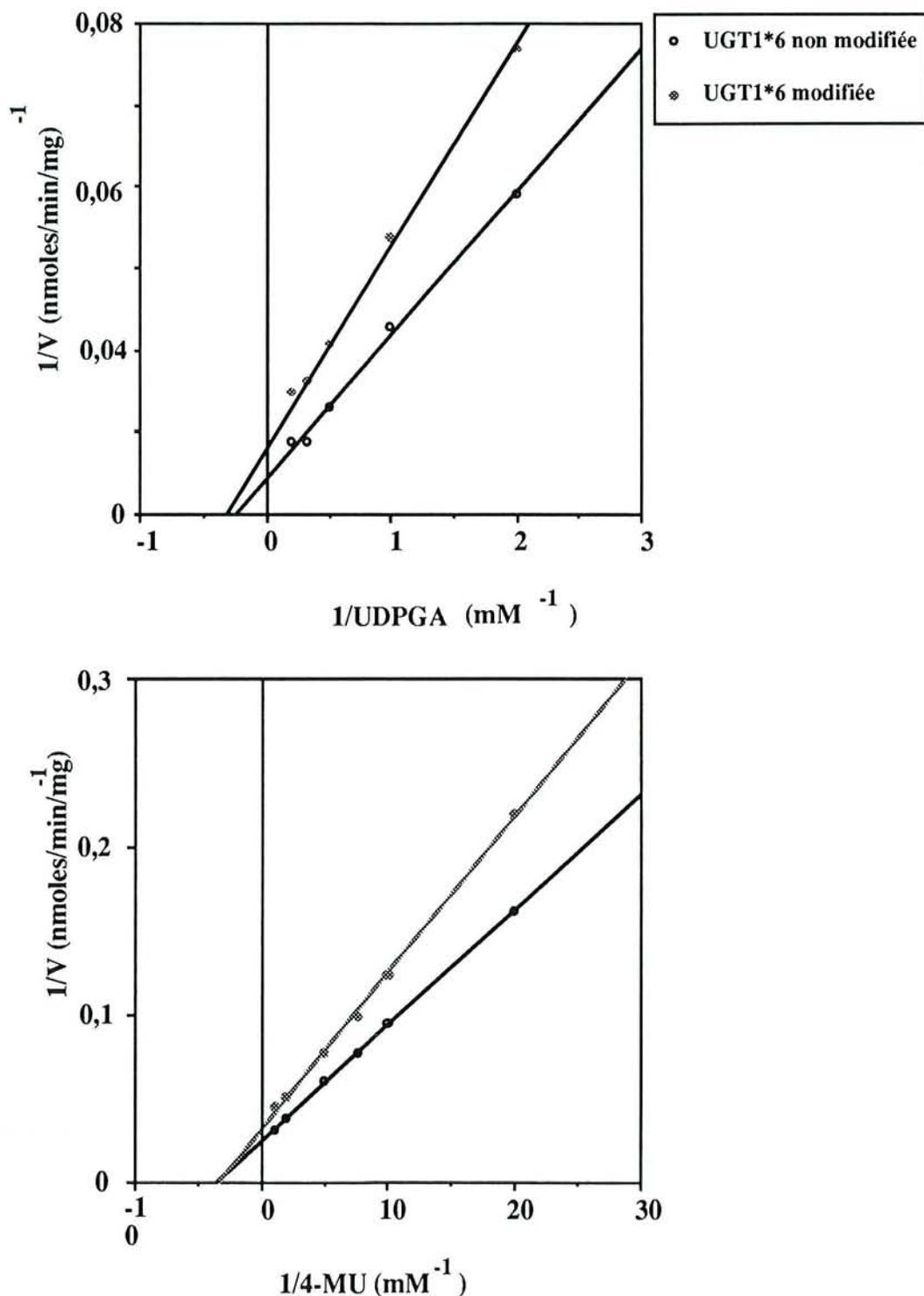


Figure 46. Effet d'une inactivation partielle de l'UGT1*6 sur les paramètres cinétiques.

Les fractions membranaires sont traitées par 0,2 mM de DEPC, puis l'activité enzymatique est déterminée pour des concentrations variables en UDPGA (0,5-5mM), à une concentration fixe en 4-MO (1mM), puis pour des concentrations variables en 4-MO (0,05-1mM), en maintenant la concentration en UDPGA à 5mM.

IV.1.5. Effet de la fixation des ligands de l'UGT1*6 sur l'inactivation

L'effet des substrats sur la cinétique d'inactivation est évalué en préincubant les différents ligands avec les fractions membranaires, avant de réaliser l'inactivation par le DEPC. Par ailleurs, l'UDP étant un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la fixation de l'UDPGA (Figure 47), son effet a été évalué de la même manière.

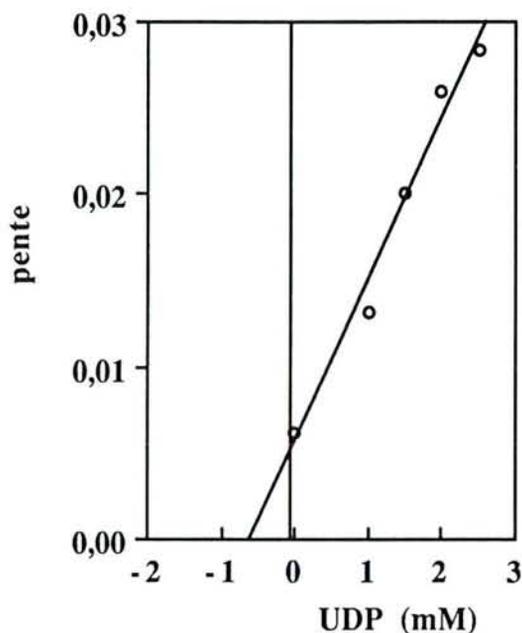


Figure 47. Représentation secondaire de la pente des droites d'inhibition selon la représentation de Lineweaver-Burk, en fonction de la concentration en UDP (0-2,5mM).

Les concentrations en substrats sont celles indiquées sur la Figure 46.

Afin de pouvoir comparer les effets des différents ligands, les incubations ont été réalisées à des concentrations en substrats ou en UDP de $10 \times K_m$ et $10 \times K_i$ apparent respectivement.

Le tableau 8 résume ces paramètres cinétiques qui seront analysés au fur et à mesure de la description de l'effet des différents substrats et inhibiteurs sur l'inactivation par le DEPC.

Nous avons exclu expérimentalement, selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes, une éventuelle modification chimique des ligands par le DEPC. Dans un premier temps, les expériences ont été réalisées dans les conditions habituelles de pH (6,0). L'inactivation est potentialisée en présence d'UDPGA, alors qu'aucun effet sur la cinétique d'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC n'est observé en présence de 4-MO (Figure 48).

| ligands | K_m app. (mM) | IC ₅₀ (mM) | K_i app. (UDPGA) (mM) |
|---------|--------------------|--------------------------|----------------------------|
| 4-MU | 0,195 | - | - |
| UDPGA | 0,500 | - | - |
| UDP | - | 4,5 | 0,590 |
| GA | - | >>100 | - |
| UDPG | - | >>50 | - |

Tableau 8. Différents paramètres cinétiques caractérisant la liaison de ligands potentiels de l'UGT1*6.

Les paramètres caractérisant la fixation des ligands (IC_{50} , K_i , K_m) ont été déterminés en présence de 20 mM de Mg^{2+} .

Le même effet de l'UDPGA sur l'inactivation est également observé à pH 7,0 et 7,5. En revanche, un effet de protection partielle par la 4-MO est mis en évidence à pH 7,0 et cette protection est encore améliorée à pH 7,5, diminuant la constante d'inactivation d'un facteur 1,9.

Deux points essentiels sont donc mis en évidence lors de ces expériences :

1) une protection partielle de la 4-MO vis-à-vis de l'inactivation, suggérant que la fixation du substrat limite l'accessibilité du DEPC au résidu essentiel.

Le résidu histidine impliqué dans la catalyse serait donc situé à proximité ou dans le site de fixation de la 4-MO. La protection observée n'est jamais totale, même à $10 \times K_m$ (4-MO), suggérant que la 4-MO limite partiellement l'accessibilité du DEPC au résidu essentiel.

2) une potentialisation de l'inactivation par le DEPC en présence d'UDPGA. Nous avons montré que l'effet du DEPC sur l'UGT1*6 traduit le caractère nucléophile du résidu modifié. En présence d'UDPGA, le résidu histidine essentiel est plus réactif avec le DEPC, donc plus nucléophile. Ces résultats suggèrent un changement conformationnel dans le site actif de l'UGT1*6 lors de la fixation de l'UDPGA, qui augmente le caractère nucléophile du résidu catalytique.

Ce changement conformationnel n'est pas dépendant du pH entre 6,0 et 7,5 (Figure 48). L'application de la loi de van't Hoff permet de caractériser un tel changement conformationnel. Le résidu inactivé par le DEPC possède un pK_a de 6,1 à 25°C. Cette inactivation a été réalisée en absence d'UDPGA. Nous avons tenté de déterminer de manière similaire le pK_a de ce résidu en présence d'UDPGA afin de caractériser la différence l'enthalpie d'ionisation (ΔH_1) indicatrice du changement conformationnel de l'enzyme lors de la fixation du substrat donneur (publication n° 3). Cependant, les profils d'inactivation observés quelle que soit la concentration en DEPC excluent la détermination des constantes d'inactivation du fait de la rapidité de cette phase d'inactivation (Figure 49).

Ce type d'inactivation rapide a été observé sur d'autres protéines (Bertran *et al.*, 1991). Nous avons donc choisi d'utiliser la valeur de pK_a du résidu essentiel déterminée à partir du profil d'activité enzymatique en fonction du pH (paragraphe II, $pK_a = 5,6$ à 37°C). Cette valeur correspond au pK_a du résidu histidine essentiel en présence d'UDPGA.

L'effet de la température sur la constante d'ionisation du résidu histidine peut être représenté par

$$pK_{a2} - pK_{a1} = \ln \frac{K_{a1}}{K_{a2}} = \frac{\Delta H^\circ}{2,3 R} \frac{T_1 - T_2}{T_1 \cdot T_2}$$

avec $pK_{a1} = 6,1$ à 25°C et $pK_{a2} = 5,6$ à 37°C, d'où $\Delta H_1 = 17 \text{ kcal.mole}^{-1}$. Cette valeur est compatible avec une énergie associée au changement conformationnel d'une enzyme (selon Cleland, 1977, ΔH_1 est compris entre 15 et 25 kcal.mole^{-1} dans ce cas).

Nous discuterons des conséquences possibles de la fixation du substrat donneur sur le processus catalytique de l'UGT1*6.

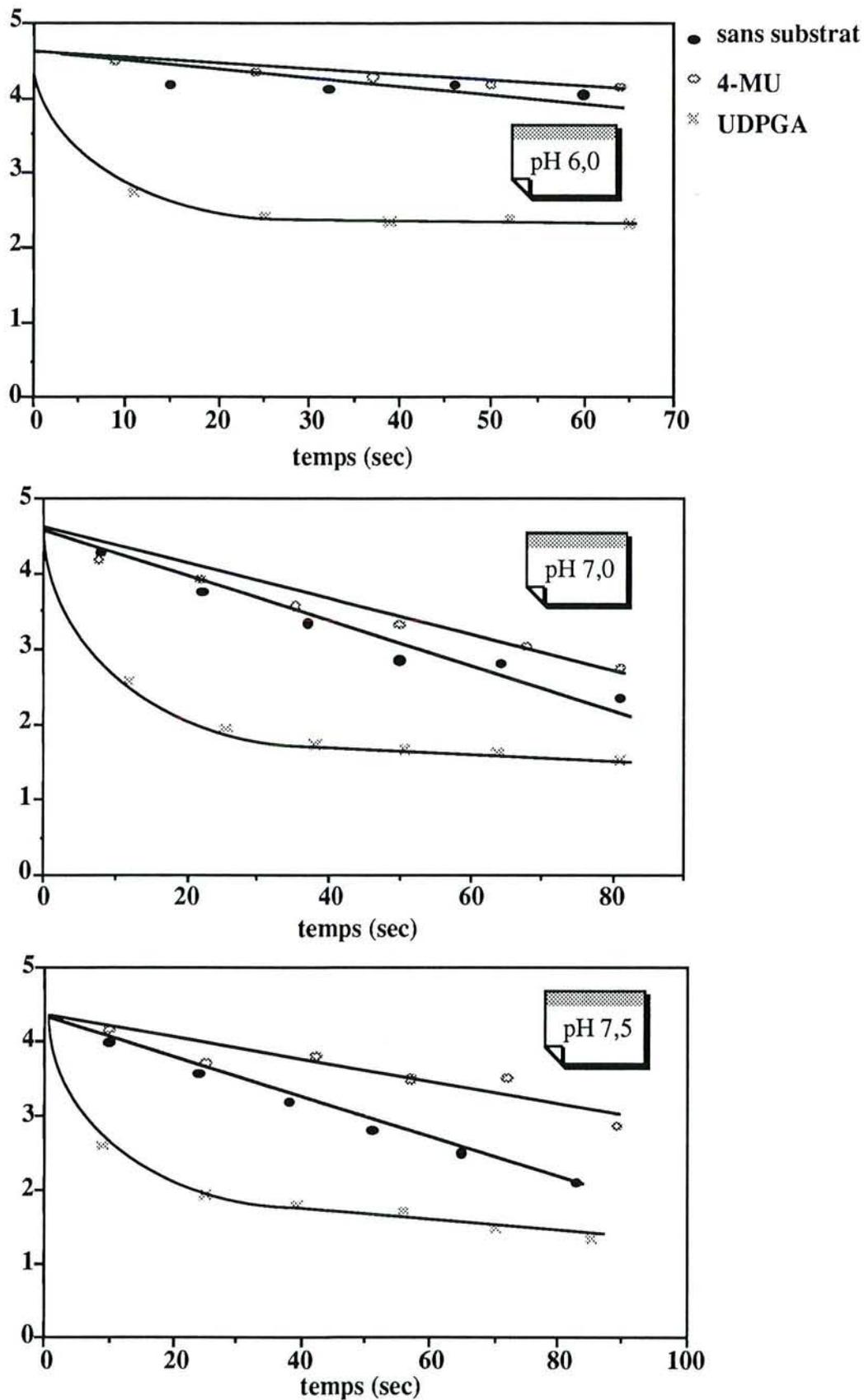


Figure 48. Effet du pH sur l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC, en présence de 4-MO ou d'UDPGA

Les concentrations en substrats lors de l'inactivation sont de $10 \times K_m$ apparent.

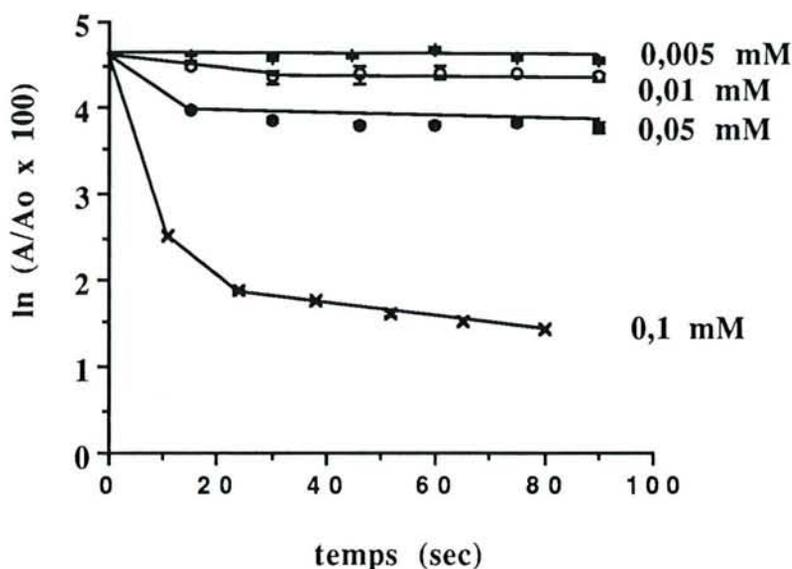


Figure 49. Inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC en présence d'UDPGA.

La concentration en UDPGA est de $10 \times K_m$ apparent.

Le changement conformationnel est un processus-clé dans le mécanisme de la réponse biologique impliquant des enzymes ou des récepteurs. Il est mis en évidence de multiples manières, parmi lesquelles la cristallographie (Eklund *et al.*, 1981), la fluorescence (Kubiseski *et al.*, 1992), le marquage de photoaffinité (Galzi *et al.*, 1991), ou encore la modification chimique (Stephens et Bauerle, 1992). Notre travail, par l'utilisation d'inhibiteurs réversibles de l'UGT1*6 a suggéré un changement conformationnel dans le site de fixation de l'aglycone induit par des interactions dans le site de fixation de l'UDPGA (paragraphe II). Yokota et Yuasa (1992) ont montré que la stabilité des UGT est améliorée en présence d'UDPGA, suggérant là aussi un changement de la conformation de la protéine lors de la fixation du substrat donneur.

Afin de déterminer quelle partie de l'UDPGA contribuerait plus particulièrement à augmenter la nucléophilie du résidu catalytique identifié dans cette étude, nous avons envisagé d'étudier l'effet de l'UDP, de l'acide glucuronique et de l'UDPG sur l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC et de comparer cet effet à celui observé en présence d'UDPGA. Malheureusement, l'acide glucuronique et l'UDPG n'inhibent pas l'activité de l'UGT1*6 à faibles concentrations (Tableau 8) et il n'est donc pas possible de distinguer les effets spécifiques des effets non

spécifiques obtenus à forte concentration en ligand (Cleland, 1977). Seul l'effet de l'UDP sur l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC a pu être finalement évalué et comparé à celui de l'UDPGA (Figure 50).

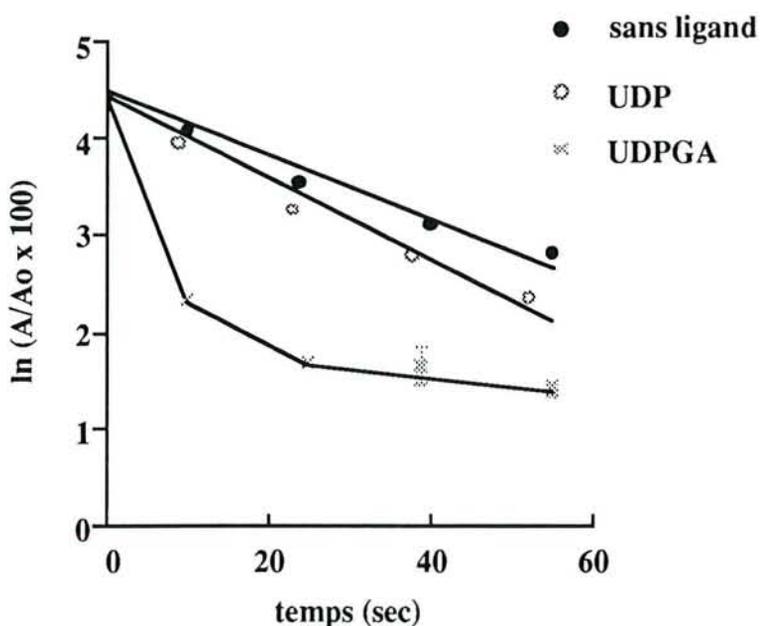


Figure 50. Effet de différents ligands sur l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC.

Les concentrations en substrats lors de l'inactivation sont de $10 \times K_m$ apparent. La concentrations en UDP est de $10 \times K_i$.

L'UDP potentialise l'inactivation par le DEPC, ceci suggérant que ce groupement contribue en partie au changement conformationnel observé. Ces résultats sont en accord avec ceux observés avec les inhibiteurs de la série PP (Paragraphe II) qui ont permis de mettre en évidence un phénomène synergique de fixation dans le site du substrat accepteur, lors de la fixation des inhibiteurs dans le site du substrat donneur. Le résidu histidine essentiel localisé dans le site de fixation de l'aglycone reflète, de par son changement de réactivité avec le DEPC en présence d'UDP (inhibiteur compétitif de l'UDPGA), cette modification de la conformation du site de fixation du substrat accepteur. L'effet de potentialisation de l'inactivation est cependant plus important en présence d'UDPGA qu'en présence d'UDP, mettant en évidence une contribution essentielle du groupement acide glucuronique du substrat donneur dans la potentialisation de la nucléophilie du résidu histidine impliqué dans

la catalyse. Afin d'évaluer plus précisément quelles sont les fonctions (hydroxyle ou carboxylate) impliquées dans ce phénomène et ne pouvant envisager une expérience d'inactivation par le DEPC en présence d'UDPG ou d'acide glucuronique dans les conditions décrites (10 fois le K_1), l'activité de glycosylation de la 4-MO par l'UGT1*6 a été évaluée sur les fractions membranaires.

Les fractions membranaires sont incubées en présence d'UDPG ou d'UDPGA et d' α -naphthol, $1-^{14}\text{C}$, puis la formation de glycoside ou de glucuronide de naphthol est évaluée après séparation des produits sur plaque de silice. Une activité de glucuronoconjugaison est mise en évidence (témoin positif) alors qu'aucun glucoside radiomarké n'est détectable (Figure 51).

La modification de la fonction acide carboxylique en alcool primaire en position C6 du substrat donneur conditionne donc de manière déterminante l'activité de conjugaison par l'UGT1*6.

Zakim *et al.* (1983) ont suggéré que le groupement arginine potentiel du site de fixation du substrat donneur interagissant avec le groupement carboxylate de l'UDPGA pourrait avoir, en plus de sa contribution à l'énergie de liaison acide glucuronique - UGT, un rôle dans l'augmentation de la constante catalytique, sur la base de la comparaison des vitesses de conjugaison des aglycones avec différents sucres. L'activité de glycosylation est 10^5 fois plus faible que l'activité de glucuronoconjugaison, la différence entre les deux substrats donneurs impliquant exclusivement l'interaction arginine - substrat donneur. Les auteurs soulignent que le mécanisme par lequel cette interaction accroît la constante catalytique reste inconnu. Notre travail, en accord avec l'hypothèse de Zakim, permet d'apporter une réponse quant à l'effet de cette interaction UDPGA-UGT sur la catalyse : la fixation de substrat donneur contribuerait en grande partie, de part l'interaction arginine (site actif) - carboxylate (UDPGA) à un changement conformationnel qui se traduit par un accroissement du caractère nucléophile du résidu histidine catalytique.

Cet effet, observé dans la gamme de pH 6,0 - 7,5, suggère que l'état d'ionisation de la paire ionique n'est pas affecté dans cette gamme de pH, en accord avec les valeurs de pK_a de la fonction carboxylate de l'UDPGA (entre 3,2 et 4,4 selon Dutton, 1966) et arginine (7,6 - 10,5).

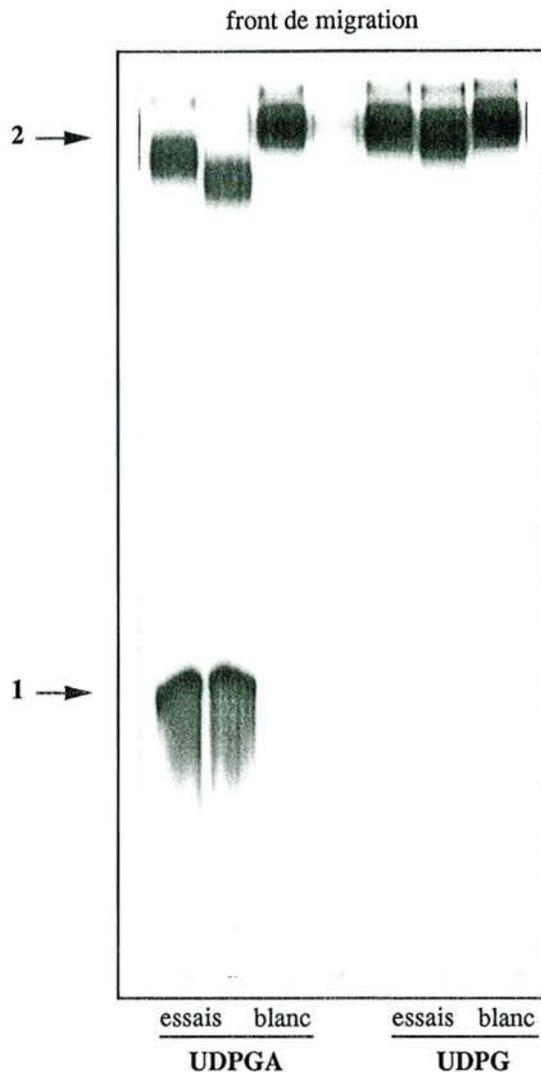


Figure 51. Détection d'activités de glucuronoconjugaison et de glycosylation de l' α -naphthol dans les fractions membranaires de cellules V79 recombinantes.

L'incubation s'est effectuée selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes. La plaque de silice est révélée par autoradiographie. 1 : glucuronide d' α -naphthol ; 2 : α -naphthol, $1-^{14}\text{C}$. Le Rf du glucoside (non détectable) est intermédiaire entre celui de l' α -naphthol et de son glucuronide.

L'augmentation du caractère nucléophile du résidu catalytique est compatible avec un accroissement de la constante catalytique dans le mécanisme de la glucuronoconjugaison proposé ultérieurement (paragraphe IV.3).

IV.1.6. Effet d'une inactivation partielle de l'UGT1*6 par le DEPC sur la fixation covalente de la sonde photoactivable [β - ^{32}P]5N₃-UDPGA

Afin d'évaluer l'effet de l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC sur la fixation de l'UDPGA, l'enzyme partiellement inactivée a été soumise à un marquage de photoaffinité par l'analogue

photoactivable du substrat donneur, le $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ et la photoincorporation de la sonde radiomarquée a été évaluée par densitométrie. L'autoradiogramme (Figure 2, publication n° 3) du gel d'électrophorèse met en évidence la fixation de la sonde photoactivable à l'UGT1*6. La Figure 52 représente l'effet du traitement des fractions membranaires au DEPC sur le pourcentage de photoincorporation du $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ à l'UGT1*6 et sur l'activité résiduelle de glucuronosylconjugaison de la 4-MO.

L'inactivation est fonction de la concentration en DEPC alors que la photoincorporation de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ n'est pas affectée par un traitement au DEPC des fractions membranaires. La fixation de l'UDPGA à l'UGT1*6 n'est donc probablement pas affectée par un traitement au DEPC, en accord avec l'absence d'effet d'une inactivation partielle de l'enzyme par le DEPC sur le K_m apparent de l'UDPGA (paragraphe IV.1.4). Cette expérience permet de confirmer, de manière complémentaire, que le résidu essentiel modifié par le DEPC ne semble pas impliqué dans la fixation du substrat donneur.

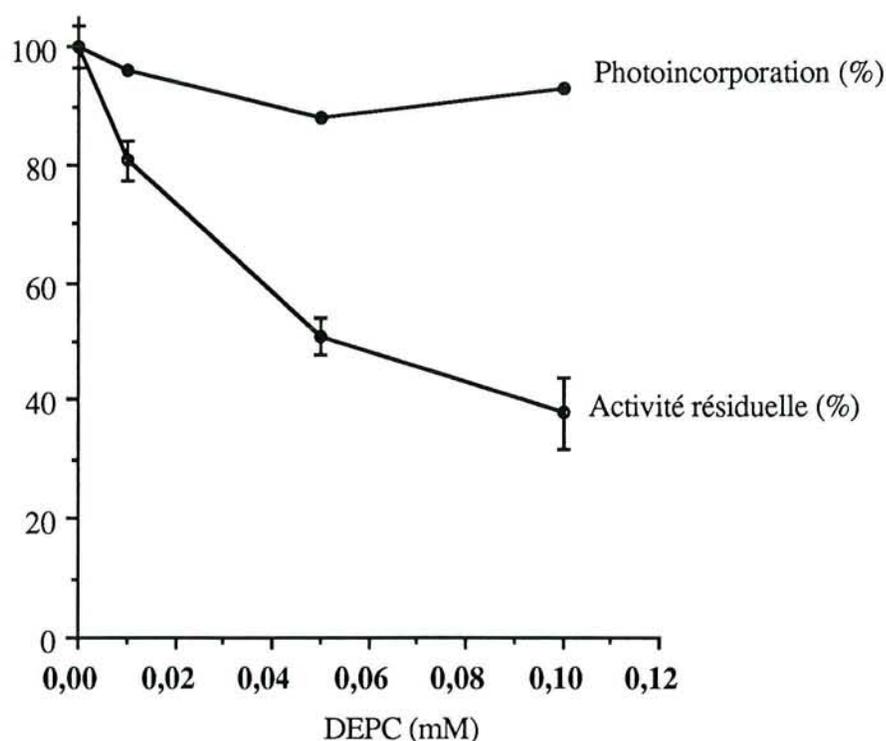
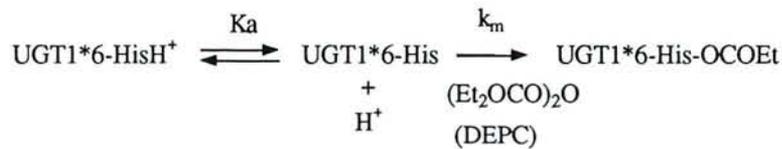


Figure 52. Effet de l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC sur la photoincorporation de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$.

L'UGT1*6 est partiellement inactivée (100-38 % d'activité résiduelle). 50 μg de protéines de fractions membranaires partiellement inactivées sont irradiées en présence de 40 μM de $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$. La quantification de la radioactivité associée à l'UGT1*6 s'effectue par vidéodensitométrie.

IV.1.7. Détermination du pK_a du résidu modifié

Les résidus nucléophiles non protonés sont modifiés par le DEPC (Hoolbrook et Ingram, 1973). L'étude de la dépendance au pH de l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC permet donc de caractériser le pK_a du résidu essentiel modifié. L'inactivation peut être schématisée de la manière suivante, en présumant de la modification d'un résidu histidine :



L'expression de la constante d'inactivation de pseudo-premier ordre (k_i) de l'UGT1*6 par le DEPC suit l'équation (Cousineau et Meighen, 1976) :

$$k_{m \text{ obs}} = \frac{k_m \cdot K_a}{K_a + H^+}$$

ou K_a est la constante de dissociation du groupement réactif et k_m la constante d'inactivation de pseudo-premier ordre du résidu non protoné, soit :

$$\frac{1}{k_{m \text{ obs}}} = \frac{1}{k_m} + \frac{H^+}{k_m \cdot K_a}$$

L'expression de $1/k_{m \text{ obs}}$ en fonction de $[H^+]$ est une droite de pente $1/k_m \cdot K_a$ et d'ordonnée à l'origine $1/k_m$.

La constante d'inactivation de pseudo-premier ordre de l'UGT1*6 par le DEPC (0,3 mM) a été déterminée à différents pH (Figure 5A, publication n°3). La constante d'inactivation augmente en fonction du pH entre 5,3 et 6,5. La représentation de $1/k_{m \text{ obs}}$ en fonction de $[H^+]$ suit l'équation (Figure 5B, publication n° 3):

$$1/k_i = 27,5 + 4,01 \cdot [H^+]$$

d'où $k_m = 0,0364 \text{ sec}^{-1}$ et $pK_a = 6,1$. Cette valeur de pK_a est compatible avec la modification d'un résidu histidine. Segel (1975) cite une gamme de pK_a comprise entre 5,5 et 7 pour le groupement imidazolium des histidines.

IV.8.1. Effet du DEPC sur d'autres activités UGT

L'effet du DEPC a été déterminé sur les activités de glucuroconjugaison du 1-naphtol, de la testostérone et de la bilirubine catalysées par des isoformes distinctes dans les microsomes de foie de rat.

Les activités sont affectées par un traitement au DEPC (Figure 53), avec des susceptibilités variables traduisant probablement des topologies différentes au niveau du site actif des isoformes impliquées. Une étude partielle de Arion *et al.* (1984) a également montré que l'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol dans les microsomes de foie de rat est inhibée par le DEPC. Ces résultats suggèrent la présence d'un résidu histidine essentiel conservé dans la famille des UGT.

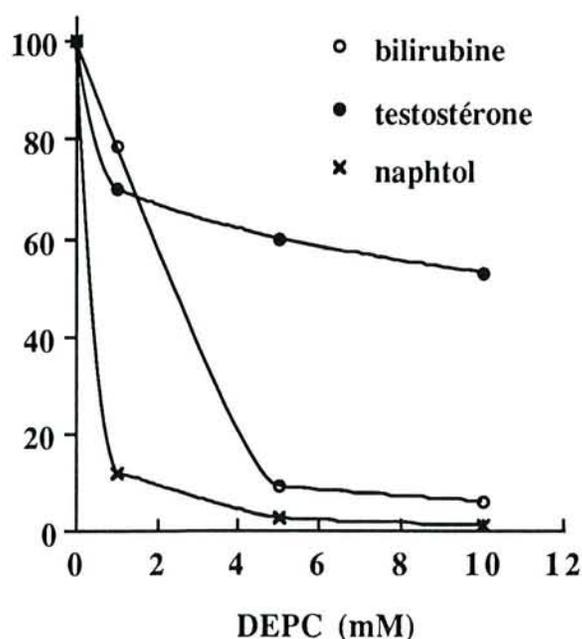


Figure 53. Effet d'un traitement au DEPC des microsomes de foie de rat sur les activités de glucuroconjugaison de la bilirubine, de la testostérone et de l' α -naphtol.

IV.1.9. Les résidus histidine conservés au sein des UGT

Les résidus conservés sont considérés comme étant le reflet d'une pression sélective contre toute mutation (Sanders et Schneider, 1991), du fait de leur rôle structural et fonctionnel dans la protéine d'intérêt. Afin d'identifier les résidus histidine conservés dans la famille des UGT, treize séquences déduites des ADNc et disponibles dans la banque de données protéiques et nucléotidiques EMBL ont été alignées (Figure 54). Les résidus histidine conservés sont, selon la numérotation des acides aminés décrites pour l'UGT1*6 par Harding *et al.* (1988) : H54, H361, H370, H466, H471, H477, H485. Les acides aminés conservés du peptide signal ne sont pas pris en compte. H38 est conservée dans toutes les séquences étudiées sauf celle décrite par Ritter *et al.* (1991), dans laquelle le résidu 38 est une proline.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| 27 | D | D | | | | | | | | | | | |
| | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| | L | L | I | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V |
| 30 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
| | V | V | L | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V |
| | V | V | I | V | F | W | W | W | W | W | W | W | W |
| | P | P | P | P | P | P | A | P | P | P | P | P | P |
| | Q | Q | V | T | M | T | T | A | M | M | T | M | M |
| | D | D | D | D | E | E | E | E | E | D | E | E | E |
| | G | G | G | G | G | Y | F | Y | F | F | Y | F | F |
| | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | H | H | H | P | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W |
| | L | L | L | L | L | I | M | M | M | M | I | M | M |
| | S | S | S | S | S | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | M | M | M | M | M | M | I | I | I | I | I | I | I |
| | K | K | L | R | R | R | K | K | K | K | K | K | K |
| | D | E | G | E | D | T | T | T | T | I | I | T | I |
| | I | I | A | A | V | I | I | I | I | I | I | I | I |
| | V | V | I | L | V | L | L | L | L | L | L | L | L |
| | E | E | Q | R | R | E | D | D | D | D | N | D | D |
| | V | H | Q | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E |
| | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
| 50 | S | S | Q | H | H | V | V | I | V | V | A | V | V |
| | D | E | Q | A | A | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q |
| | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| | E | D | E | Q | Q | E | E | E | E | E | E | E | E |
| | I | I | I | A | A | V | V | V | V | V | V | V | V |
| | I | V | V | V | V | T | T | T | T | T | T | T | T |
| | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V |
| | V | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L |
| | V | V | A | T | A | T | A | A | K | K | V | K | P |
| | P | P | P | P | P | S | S | S | P | P | S | P | S |
| | E | E | D | E | E | S | S | S | S | S | A | S | A |
| | V | V | A | S | V | A | S | A | A | Y | A | Y | Y |
| | N | N | N | S | N | T | S | S | Y | F | I | Y | Y |
| | L | L | L | Y | H | H | L | S | I | V | F | L | V |
| | L | L | L | I | I | M | V | F | F | L | L | I | L |
| | K | G | R | K | K | N | D | D | D | D | D | D | D |
| | E | E | D | E | E | G | A | P | P | P | P | P | P |
| 70 | Y | S | G | E | E | S | N | N | K | K | T | K | K |
| | K | K | A | K | D | K | S | N | K | K | K | K | K |
| | Y | Y | F | F | F | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | Y | Y | Y | F | F | S | S | S | L | S | S | S | L |

| accession (n°) | numéro | isoforme | références |
|-------------------|--------|----------|---|
| P19224 | 1 | UGT1*6 | Harding <i>et al.</i> , 1988 |
| P08430 | 2 | UGT1*06 | Iyanagi <i>et al.</i> , 1986 |
| P22309 | 3 | UGT1*4 | Ritter <i>et al.</i> , 1991 |
| P22310 | 4 | UGT1*1 | Ritter <i>et al.</i> , 1991 |
| P20720 | 5 | UGT1*0 | Sato <i>et al.</i> , 1990 |
| P23765 | 6 | UGT2B8 | Coffman <i>et al.</i> , 1990 |
| P06133 | 7 | UGT2B4 | Jackson <i>et al.</i> , 1987 |
| P16662 | 8 | UGT2B7 | Ritter <i>et al.</i> , 1990 |
| P08542 | 9 | UGT2B3 | Mackenzie, 1987 |
| P09875 | 10 | UGT2B1 | Mackenzie, 1986 ^b |
| P19488 | 11 | UGT2B6 | Mackenzie, 1990 |
| P17717 | 12 | Ugt2b-5 | Kimura & Owens, 1987 |
| P08541 | 13 | UGT2B2 | Mackenzie, 1986 ^a ; Jackson & Burchell, 1986 |

Figure 54. Alignement de séquences en acides aminés de treize UGT. Les références et le numéro d'accession de chaque séquence (banque EMBL) sont indiqués ci-dessus.

IV.1.10. Profil d'hydrophobie de l'UGT1*6

Afin de proposer plus précisément, parmi ces résidus histidine conservés, celui le plus probablement mis en évidence dans cette étude, l'analyse de la localisation de ces résidus conservés dans le profil d'hydrophobie a été effectuée.

En effet, le DEPC possédant des propriétés hydrophobes, il réagit très rapidement avec le résidu impliqué dans la catalyse par l'UGT1*6 (paragraphe IV.1.2). Par ailleurs, le résidu serait situé dans le site de fixation des aglycones plans tels que le 1-naphtol et la 4-MO, qui sont des composés hydrophobes. Ces observations suggèrent une localisation du résidu histidine essentiel dans un fragment hydrophobe de la protéine. Le profil d'hydrophobie déterminé par Harding *et al.* (1988) a donc été représenté et les résidus histidine conservés ont été localisés sur ce profil (Figure 55).

Par ailleurs, Mackenzie (1990) a identifié, par construction de protéines chimériques, le site de fixation des aglycones aux UGT dans la partie amino-terminale et le domaine de fixation de l'UDPGA dans le domaine carboxy-terminal. H54, localisé dans un fragment hydrophobe très conservé (50 % d'identité dans le fragment 49-58, Figure 54) de la structure primaire de l'UGT1*6 appartenant au site de fixation de la 4-MO est un candidat probable au rôle de résidu catalytique. H485 est localisé dans un fragment hydrophobe, mais dans le site de fixation de l'UDPGA et à proximité du fragment d'ancrage membranaire, ce qui est peu compatible avec les expériences de protection contre l'inactivation par le DEPC en présence de 4-MO.

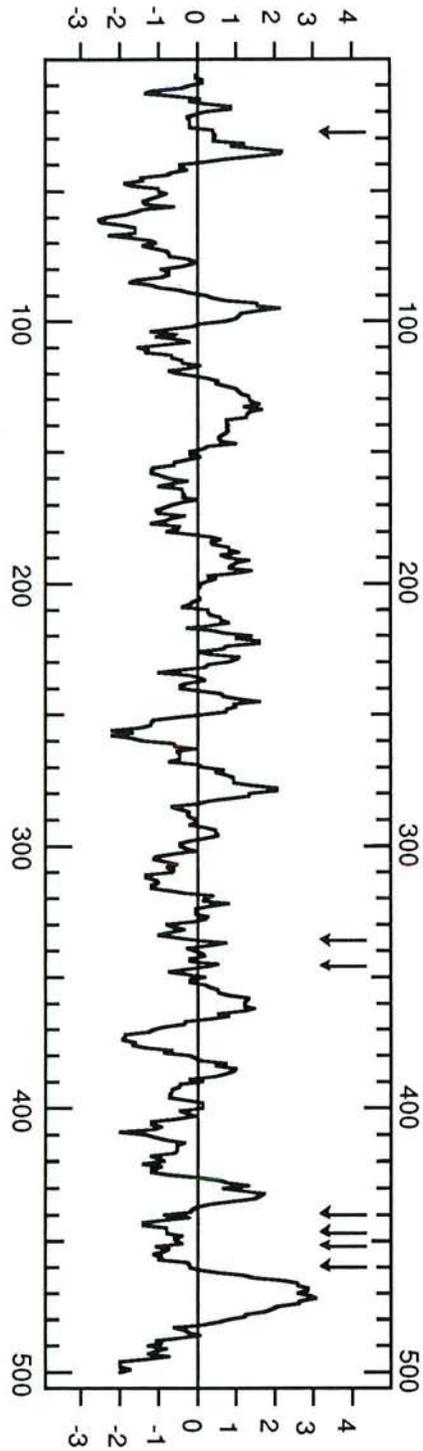


Figure 55. Profil d'hydrophobie de l'UGT1*6.

La fenêtre utilisée est de 19 résidus d'acides aminés (Kyte et Doolittle, 1982). Les résidus histidine conservés sont indiqués par des flèches.

Les résidus conservés H361, H370, H466, H471, H477 sont localisés dans des fragments peu ou non hydrophobes (Figure 55) et dans le site de fixation du substrat donneur. Afin d'identifier le groupement essentiel impliqué dans le processus catalytique, la mutagenèse du résidu H54 en alanine a été réalisée au laboratoire par M. Ouzzine et S. Fournel-Gigleux.

IV.1.11. Effet du DEPC sur le mutant histidine 54 alanine (H54A)

Le mutant H54A a été obtenu par mutagenèse dirigée. L'ADNc muté a été sous-cloné dans le même vecteur pCDNAI que celui utilisé pour l'établissement de la lignée sauvage. La lignée cellulaire recombinante a été établie selon la méthode décrite par Fournel-Gigleux *et al.* (1990) et les colonies recombinantes ont été sélectionnées par Immunoblot avec les anticorps anti-UGT1*6.

L'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO dans les cellules V79 transfectées par l'ADNc "sauvage" et/ou muté est fonction du niveau d'expression de la protéine recombinante. Ainsi les V_{\max} dans les cellules recombinantes ne peuvent être interprétées et comparées sans information sur le niveau d'expression des UGT (Bock *et al.*, 1993).

La quantification de l'expression par immunoblot étant approximative, des études ultérieures sont nécessaires afin d'estimer les niveaux d'expression respectifs des enzymes mutées et sauvages. Cependant, afin de pouvoir vérifier de manière non ambiguë si l'histidine 54 est catalytique, nous avons choisi de caractériser l'effet du DEPC sur le mutant H54A et de le comparer à celui observé sur l'UGT1*6 sauvage. Pour cela, les fractions membranaires de cellules recombinantes exprimant l'UGT1*6 sauvage (W) et mutée (H54A) sont traitées de manière identique par des quantités croissantes de DEPC et l'activité résiduelle est déterminée.

L'enzyme mutante H54A reste sensible au DEPC (Figure 56) et l'inactivation est similaire pour l'enzyme sauvage et l'enzyme mutée.

La sensibilité au DEPC de l'activité de glucuroconjugaison du mutant indique que le résidu essentiel mis en évidence par modification chimique de l'UGT1*6 sauvage n'est pas le résidu H54. Tomme *et al.* (1991) et Park et Hausinger (1993) ont utilisé eux aussi la mutagenèse

dirigée combinée à la modification chimique pour analyser le rôle de plusieurs résidus conservés dans diverses enzymes.

L'effet d'une inactivation partielle par le DEPC est du même type que celle observée sur l'enzyme sauvage (paragraphe IV.1.4) : la V_{\max} de l'enzyme mutée est diminuée par un traitement au DEPC alors que le K_m apparent vis-à-vis de l'UDPGA (Figure 57.B) ou de la 4-MO (Figure 57.A) n'est pas modifié par ce traitement.

Ces résultats fournissent des arguments supplémentaires montrant que l'histidine impliquée dans la catalyse est toujours présente dans le mutant H54A. Le résidu catalytique reste donc à identifier parmi les autres résidus conservés.

Ainsi, le caractère hydrophobe des résidus histidine conservés dans les UGT n'est pas un critère suffisant pour présumer de l'identité du résidu catalytique. Le choix de ce résidu a été dirigé suivant une stratégie similaire à celle de Wang *et al.* (1992) qui ont choisi des résidus cystéine conservés et localisés dans des fragments hydrophobes de la séquence primaire d'une synthétase impliquée dans la modification des phospholipides.

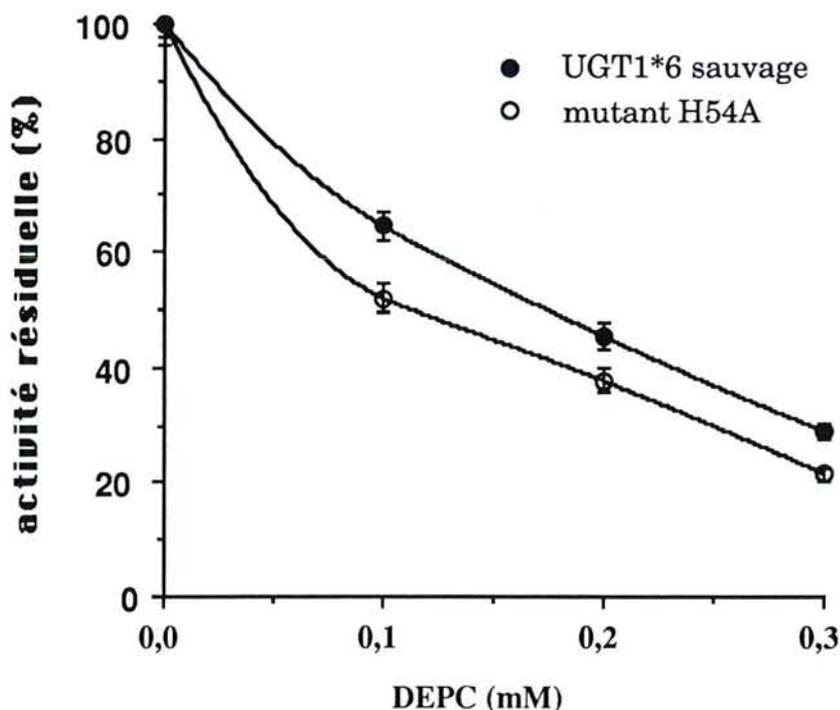


Figure 56. Effet comparatif du DEPC sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO dans les fractions membranaires de cellules recombinantes "sauvages" et mutées (H54A).

L'inactivation est réalisée à pH 6,0 et à $1,3 \text{ mg.ml}^{-1}$ en protéines pendant 60 secondes aux concentrations en DEPC indiquées.

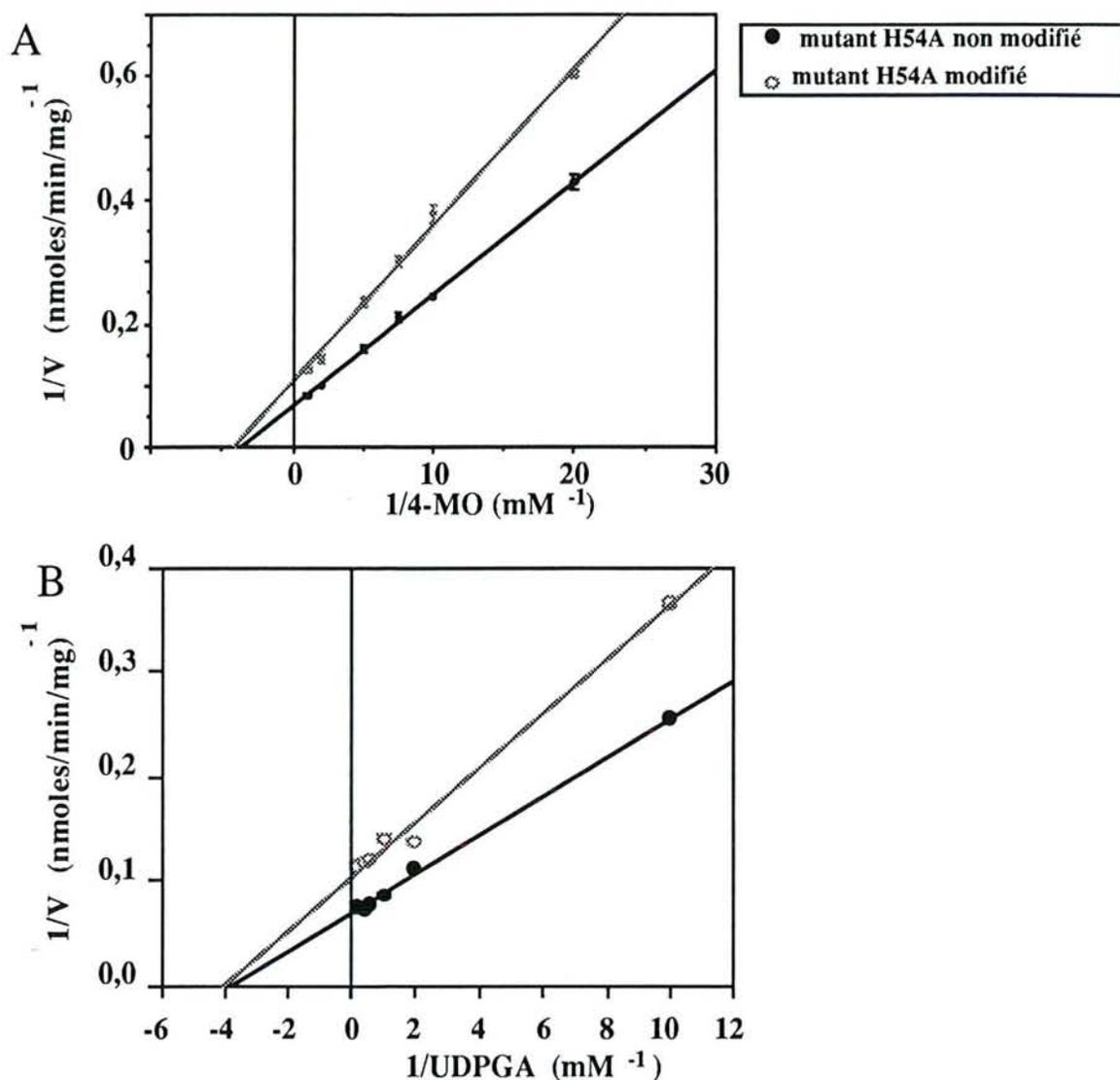


Figure 57. Détermination des paramètres cinétiques apparents de l'UGT1*6 mutante (H54A) dans les fractions membranaires.

Les expériences d'inactivation ont été développées à la concentration de 0,2 mM en DEPC pendant 40 secondes à 25°C. Les concentrations en substrats sont décrites en Matériels et Méthodes.

Les auteurs ont choisi les résidus sur la base du profil d'hydrophobie, le résidu d'intérêt étant vraisemblablement localisé dans une poche hydrophobe car l'inactivation par les dérivés maléimide augmente avec leurs propriétés hydrophobes. Par ailleurs, ils focalisèrent leur intérêt sur deux résidus appartenant au site de fixation du substrat car l'inactivation est réduite en présence de substrat. Ces auteurs n'ont cependant pas précisé si cette stratégie a effectivement permis d'identifier le résidu proposé. Notre choix du résidu histidine catalytique le plus probable au sein de la séquence primaire de l'UGT1*6 est basé sur un raisonnement identique. Le rôle non catalytique du résidu H54 montre que la stratégie suivie justifiant le

choix du résidu en vue de la mutagénèse dirigée n'est pas suffisante. Plusieurs explications peuvent être considérées pour expliquer nos observations sans pour autant porter notre choix sur le résidu H54 : d'une part, le résidu histidine catalytique peut être localisé au niveau de la structure primaire dans le site de fixation du substrat donneur, mais être à proximité du site de fixation du substrat accepteur ; d'autre part, sa localisation peut être dans une poche hydrophobe, mais non identifiable dans la structure primaire de la protéine. Malheureusement, aucune indication structurale sur les UGT n'est disponible à ce jour et la mutagénèse dirigée devra donc être menée systématiquement sur les résidus histidine conservés.

IV.2. Effet d'autres agents de modification chimique sur les UGT

IV.2.1. Rôle des cystéines

Le rôle des résidus cystéine est évalué par l'analyse de l'effet de différents réactifs de modification chimique des cystéines ainsi que par l'étude de l'effet de composés susceptibles d'oxyder et de réduire ces groupements.

L'effet du *N*-éthyl maléimide (NEM) et du *N*-phényl maléimide (NPM) est déterminé sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6 (Figure 58). Une incubation du NEM avec les fractions membranaires pendant 30 minutes n'affecte pas l'activité de glucuroconjugaison dans une gamme de concentrations en agent de modification comprise entre 0 et 15 mM. En revanche, l'activité enzymatique est affectée par le NPM dans des conditions expérimentales identiques. Winsnes (1971) a suggéré que le site actif des UGT de rat et de souris ne contient pas de groupements sulfhydryle essentiels et conteste les résultats obtenus par Storey (1965) en expliquant que les concentrations en UDPGA utilisées par ce dernier sont trop faibles pour déterminer l'activité de glucuroconjugaison. Contrairement à Winsnes, les résultats obtenus sur l'UGT1*6 montrent que l'activité de glucuroconjugaison est bien affectée par un traitement avec des agents de modification chimique des cystéines. Winsnes a utilisé dans ses expérimentations des réactifs de modification des cystéines tels que le NEM, l'iodoacétamide et le *p*-mercuribenzoate ayant un caractère moins hydrophobe que le NPM. Le NEM est effectivement sans effet significatif sur l'activité de l'UGT1*6 mais le

NPM, de caractère plus hydrophobe, inhibe l'activité enzymatique. Ainsi, l'activité enzymatique dépend d'un ou plusieurs groupements sulfhydryle. Rao *et al.* (1976) ont eux aussi observé une inhibition de l'activité de glucuronoconjugaison dans les microsomes de foie de porc en présence de réactifs de modification des résidus cystéine. L'absence d'effet des réactifs de modification utilisés par Winsnes est interprétée comme étant la preuve de l'absence de groupements cystéine essentiels dans les UGT, alors qu'il conviendrait plutôt de l'interpréter en terme d'accessibilité du ou des résidu(s) essentiel(s). Nos résultats suggèrent donc que l'UGT1*6 possède un ou plusieurs groupements sulfhydryle dont la modification affecte l'activité enzymatique, ceux-ci étant probablement enfouis dans une poche hydrophobe de la protéine. Soulignons cependant que les concentrations en inhibiteur utilisées sont élevées et il sera nécessaire de mieux caractériser cette inactivation afin d'exclure tout effet aspécifique sur l'activité enzymatique.

Par ailleurs, l'effet du dithiothréitol (DTT) et du chlorure de cuivre sur l'activité enzymatique a été évalué. Le DTT est utilisé très fréquemment comme agent réducteur dans les processus de purification enzymatique car il limite la formation de ponts disulfure indésirables.

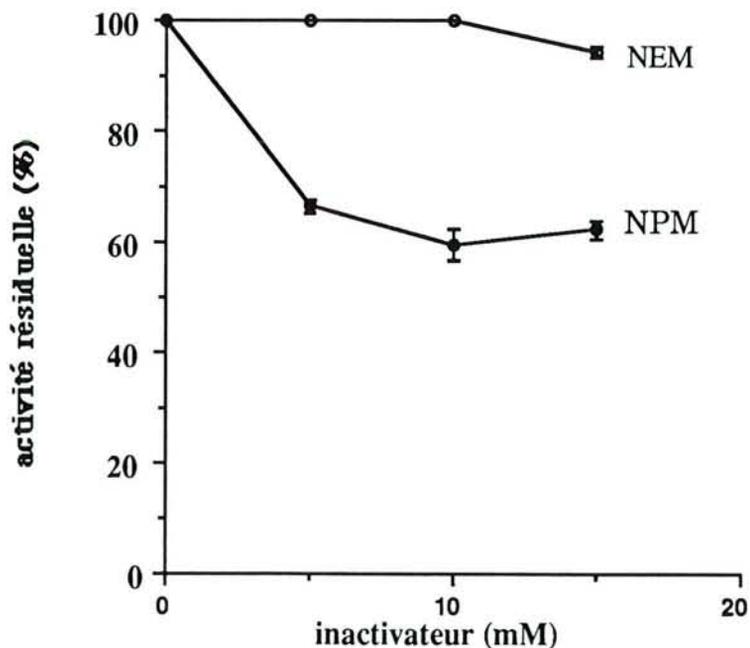


Figure 58. Effet du *N*-éthyl maléimide et du *N*-phényl maléimide sur la glucuronoconjugaison de la 4-MO catalysée par l'UGT1*6.

L'incubation des agents alkylants avec les fractions membranaires est réalisée pendant 30 minutes à 25°C.

Le potentiel positif d'oxydo-réduction de l'ion cuivrique (Cu^{2+}) lui confère des propriétés d'oxydation des fonctions sulfhydryle et est utilisé, de ce fait, pour inactiver les enzymes à cystéine (Landgraf *et al.*, 1991 ; Ahn *et al.*, 1991). L'activité enzymatique est fortement inhibée en présence de Cu^{2+} (Figure 59.A) mais n'est pas affectée par le DTT (Figure 59.B).

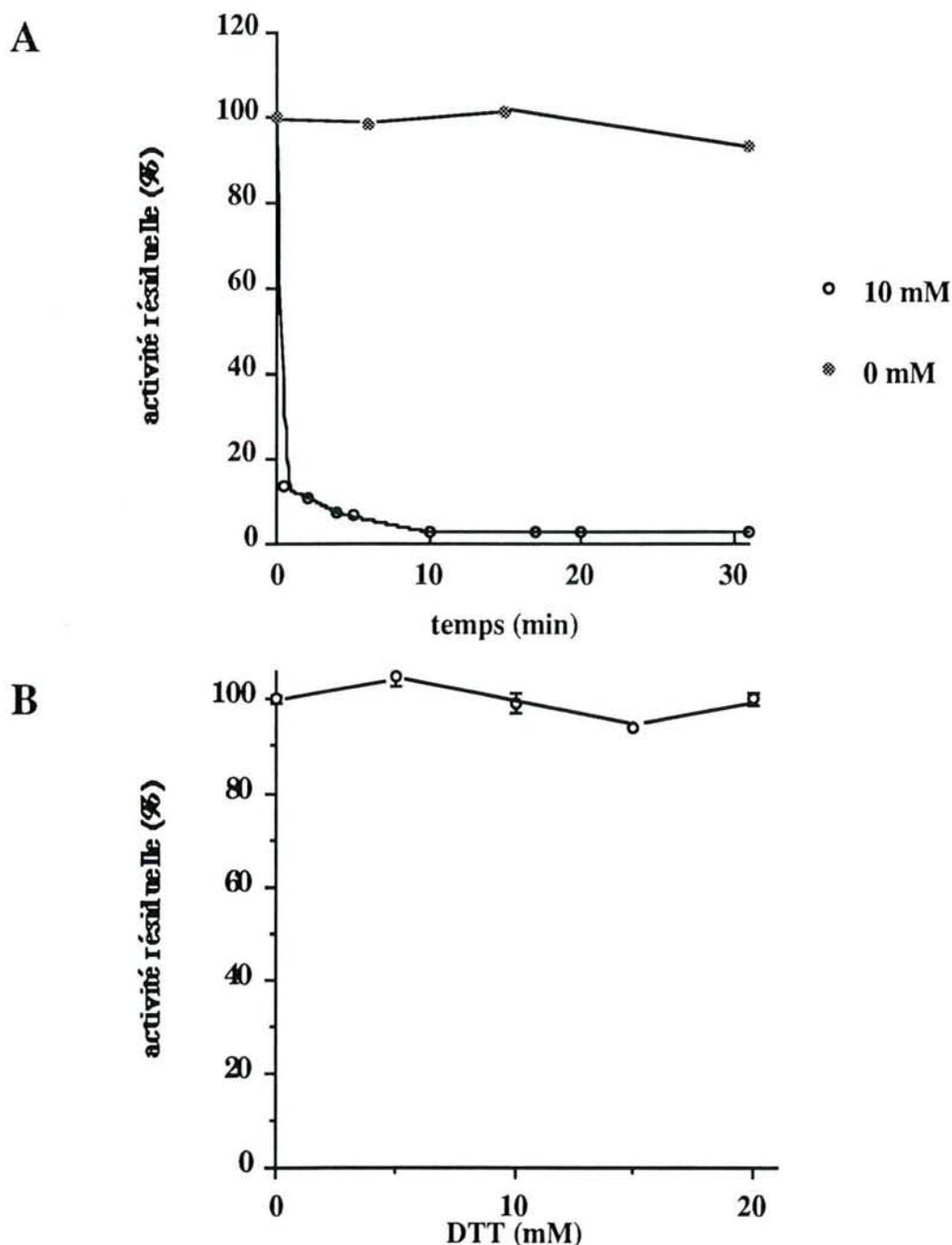


Figure 59. Effet du chlorure de cuivre (A) et du DTT (B) sur l'activité UGT1*6.

L'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO est déterminée en fonction du temps d'incubation de CuCl_2 (10 mM) avec les fractions membranaires, tandis que l'effet du DTT sur l'activité enzymatique est évalué pour des concentrations en DTT croissantes après 15 minutes d'incubation avec les fractions membranaires.

Ces résultats suggèrent la présence d'au moins un résidu cystéine essentiel pour l'activité enzymatique. Notons cependant qu'il n'est pas possible d'exclure un effet d'une autre nature de l'ion cuprique, par exemple une interaction avec le site de fixation des ions divalents tels que Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} qui ont un effet activateur sur la glucuroconjugaison (Zakim *et al.*, 1973, et paragraphe I.2.). L'inactivation de l'UGT1*6 peut également être provoquée par la formation d'un pont disulfure indésirable en présence de Cu^{2+} plutôt que par la modification d'un résidu cystéine essentiel.

Le rôle fonctionnel des groupements sulfhydryle de l'UGT1*6 a été partiellement caractérisé par l'utilisation d'agents de modification chimique des cystéines (NEM, NPM), ainsi que par des composés modifiant l'état d'oxydation et de réduction de ces groupements (Cu^{2+} , DTT), suggérant un rôle en tant qu'acide aminé essentiel d'au moins un résidu cystéine de l'UGT1*6. L'analyse de l'alignement des séquences protéiques déduites des ADNc de treize UGT (figure 54 et paragraphe IV.1.9) met en évidence deux résidus cystéine hautement conservés : les résidus C126 et C278. L'absence d'effet du DTT suggère que ces résidus ne sont pas engagés dans un pont disulfure mais auraient un rôle fonctionnel sous leur forme réduite.

IV.2.2. Effet du NBD-Cl sur l'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol dans les fractions solubilisées de microsomes de foie de rat

Le NBD-Cl est un inhibiteur irréversible modifiant les fonctions amine, sulfhydryle et tyrosine. Nous avons souligné en introduction l'intérêt de ce composé pourtant peu spécifique souvent utilisé pour inactiver les enzymes à ATP du fait de son analogie structurale avec l'adénine. Nous avons souhaité utiliser ce même composé après avoir comparé sa structure avec celle de quelques substrats accepteurs des UGT conjuguant les aglycones plans dans les microsomes de foie de rat. D'autre part, il possède une analogie de structure avec des substrats tels que le *p*-nitrophénol ou le 1-naphtol (Figure 60).

D'autre part, le site électrophile réactif du NBD-Cl est idéalement placé pour réagir avec un hypothétique acide aminé essentiel du site actif impliqué dans la glucuroconjugaison de ces substrats.

L'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol est inhibée dans le temps par des concentrations croissantes en NBD-Cl (Figure 61), ce qui suggère une inactivation d'un résidu essentiel à l'activité de glucuroconjugaison dans les microsomes de foie de rat.

L'identification de la nature du résidu modifié par analyse spectrophotométrique n'est pas possible en absence d'enzyme purifiée. Nous avons donc choisi de suivre une voie autre afin de cerner en partie la nature de ce résidu par l'utilisation d'un autre réactif de modification chimique des acides aminés, le *N*-acétyl imidazole. Nous avons choisi de tester ce composé sur l'UGT1*6 recombinante, afin de s'affranchir des problèmes liés à la variabilité des isoformes conjuguant les substrats plans dans les microsomes.

Le NAI est un agent de modification chimique des groupements hydroxyle (Lundblad, 1984). L'effet de ce réactif a été évalué sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6 dans les fractions membranaires. L'inactivation de l'UGT1*6 par le NAI est fonction de sa concentration (Figure 62), suggérant la possibilité d'un résidu essentiel tyrosine.

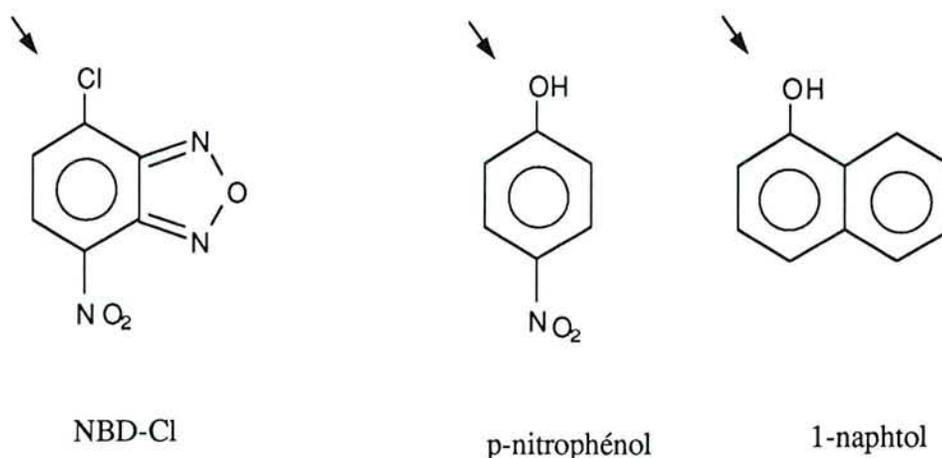


Figure 60. Structure du NBD-Cl et analogie possible avec les composés plans substrats de l'UGT1*6.

La flèche indique la localisation de la fonction conjuguée à l'acide glucuronique (*p*-nitrophénol, 1-naphtol) et le groupement partant lors de la modification chimique d'un résidu d'acide aminé par le NBD-Cl.

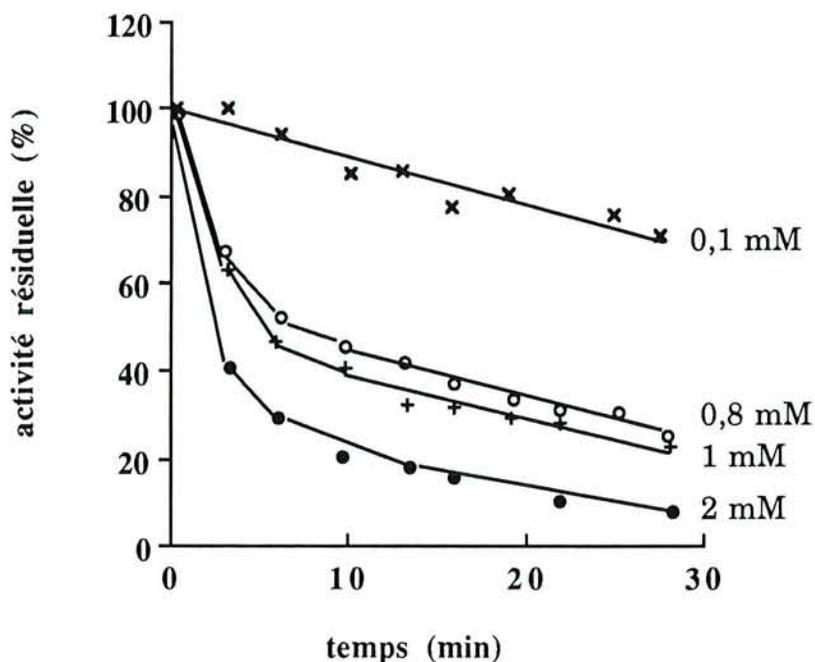


Figure 61. Inhibition par le NBD-Cl de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO dans les microsomes de foie de rat induits au 3-MC.

L'inactivation est développée à pH 8,0 en présence de $5,6 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines microsomales, aux concentrations en NBD-Cl indiquées sur la figure.

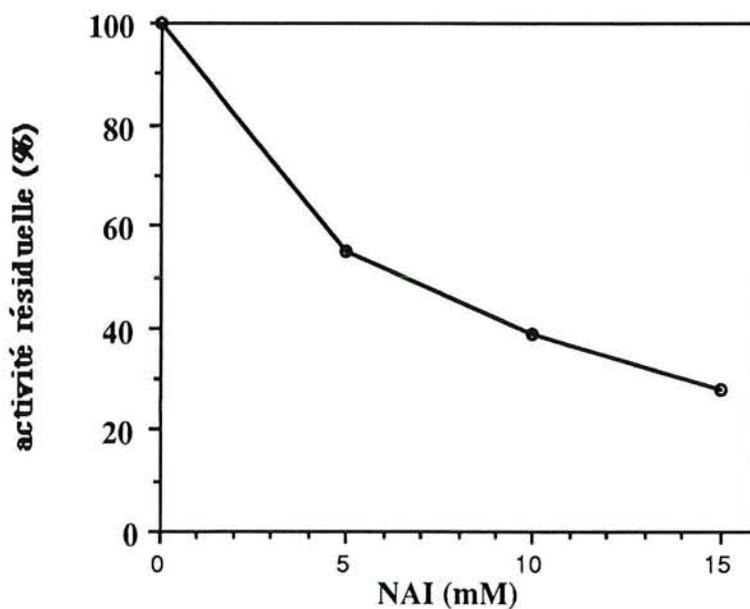


Figure 62. Effet du N-acétyl imidazole sur l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6.

L'incubation du N-acétyl imidazole avec les fractions membranaires ($1,3 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines) s'effectue pendant 30 minutes à pH 7,5.

Ces observations sont en accord avec une modification possible d'un résidu tyrosine essentiel par le NBD-Cl dans les microsomes de foie de rat.

IV.2.3. Inactivation par le dicyclohexylcarbodiimide

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) est un agent de modification chimique des groupements carboxylate qui exerce un pouvoir inhibiteur sur l'activité de glucuroconjugaison de la bilirubine (publication n° 4) dans les microsomes de foie de rat. L'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO par l'UGT1*6 dans les fractions membranaires est également sensible à cet agent (Figure 63).

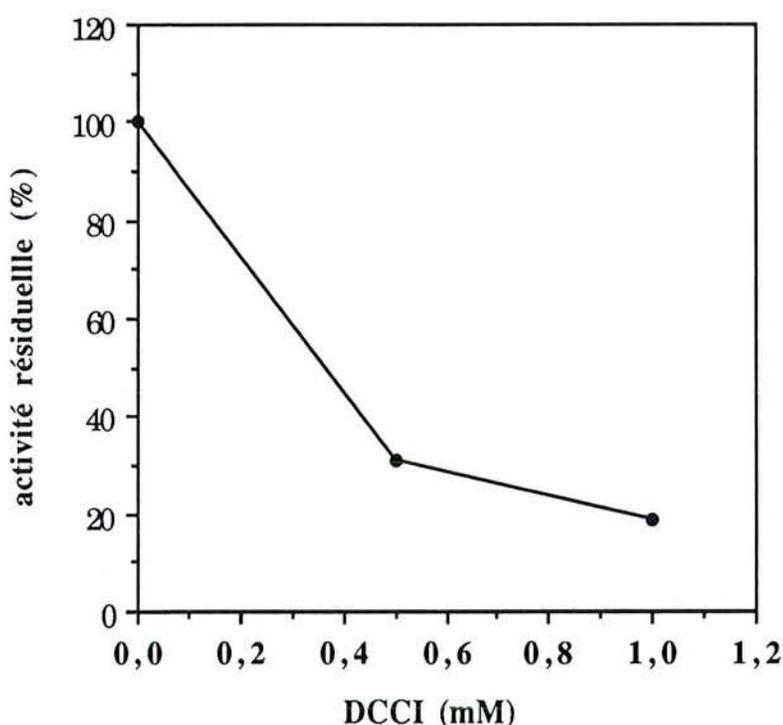


Figure 63. Effet d'une préincubation du dicyclohexylcarbodiimide avec les fractions membranaires sur l'activité enzymatique de l'UGT1*6.

L'agent de modification est incubé pendant 10 minutes à pH 6,0 avec $1,3 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines de fractions membranaires.

L'effet d'une inactivation partielle par le DCCI a été évalué sur les paramètres cinétiques de l'UGT1*6. Dans ces conditions, la V_{max} est diminuée de moitié sans que le K_m apparent de l'UDPGA (Figure 64.B) ou de la 4-MO (Figure 64.A) ne soit affecté.

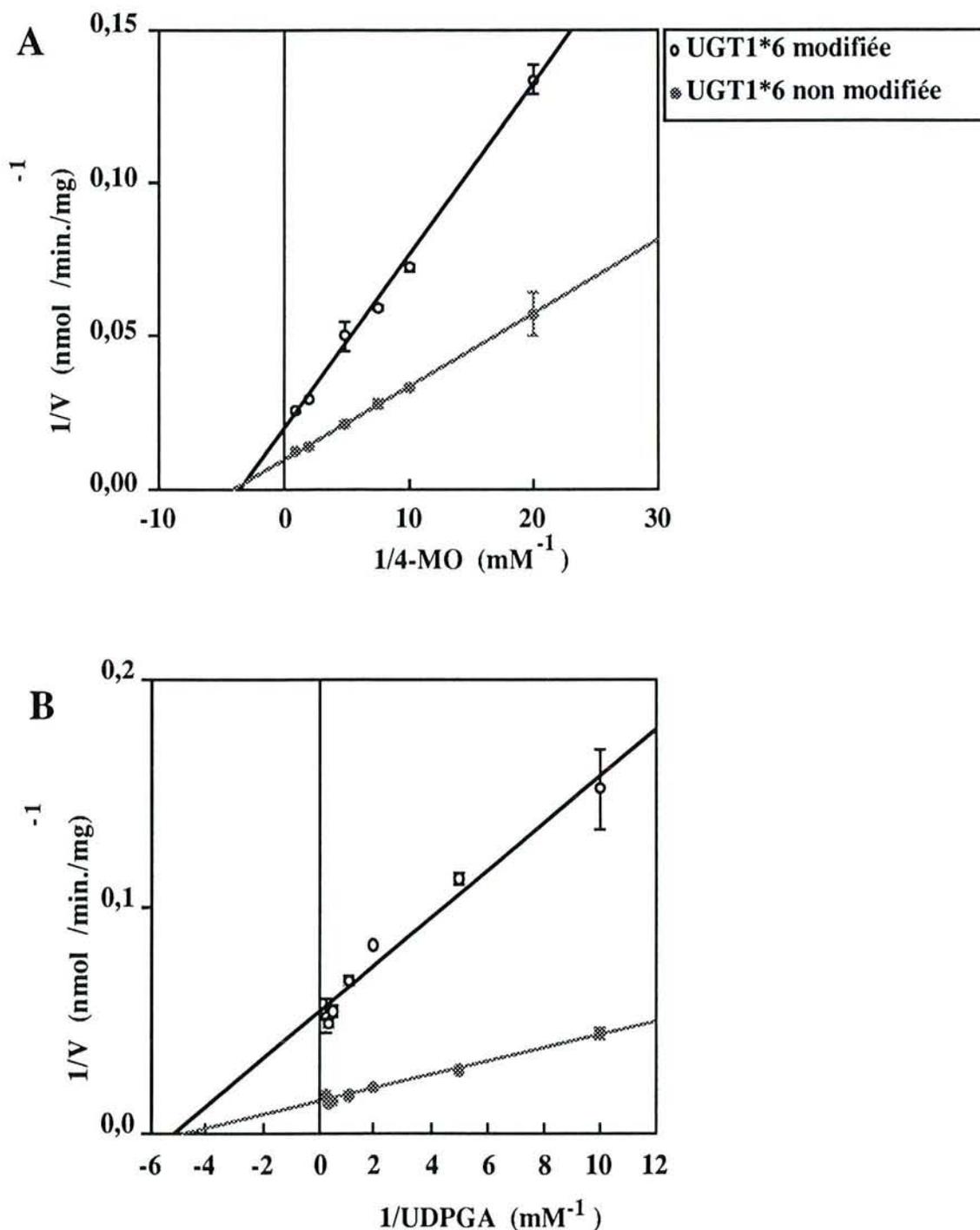


Figure 64. Effet d'une inactivation partielle de l'UGT1*6 par le dicyclohexylcarbodiimide sur les paramètres cinétiques de l'UGT1*6.

L'inactivation de l'enzyme est obtenue par incubation de 0,3 mM d'agent de modification des acides carboxyliques. Les paramètres cinétiques sont déterminés dans les conditions indiquées en Matériels et Méthodes.

L'effet d'une inactivation partielle sur les paramètres cinétiques est de même nature que celui observé lors de l'inactivation par le DEPC : un résidu aspartate ou glutamate serait donc impliqué dans la catalyse. D145, D150, E389, E314, D357, D397, D447, D454, E461 et D488

sont conservés dans les séquences protéiques (Figure 54, paragraphe IV.1.9). Nous discuterons et proposerons un mécanisme catalytique de l'UGT1*6 rendant compte de l'ensemble des faits expérimentaux issus de l'analyse de l'effet d'agents d'activation chimique et d'inhibiteurs réversibles analogues de l'état de transition dans le paragraphe suivant.

IV.3. Proposition d'un mécanisme catalytique

Nos travaux fournissent différents arguments en faveur de l'intervention d'un résidu histidine dans le mécanisme catalytique de l'UGT1*6.

Les résidus histidine sont parfois impliqués dans la catalyse en chélatant un ion essentiel impliqué, par exemple, dans le maintien d'une conformation active ou dans un mécanisme de catalyse électrophile (Tainer *et al.*, 1992 ; Cooper, 1993). Cependant, nous avons montré que la dépendance de l'activité de glucuroconjugaison au magnésium n'est pas stricte, ce qui exclut un mécanisme catalytique dans lequel l'ion magnésium serait impliqué.

Les résidus histidine peuvent également être impliqués dans une catalyse nucléophile avec formation d'un intermédiaire covalent (résidus histidine phosphorylés, Kim *et al.*, 1990). Cependant, Magdalou *et al.* (1982) suggérèrent un mécanisme de transfert direct de l'aglycone sur le carbone 1 de l'acide glucuronique, incompatible avec un tel mécanisme catalytique impliquant un intermédiaire covalent.

La plupart des processus catalytiques impliquant un résidu histidine sont du type acido-basique (Fersht, 1985). L'analyse de l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC ainsi que celle du profil d'activité enzymatique en fonction du pH mettent en évidence un résidu histidine non protoné au pH optimum de glucuroconjugaison de la 4-MO (pH 5,8-7,6). Ce résidu agirait donc sous forme de base dans le processus catalytique. L'effet de protection par la 4-MO contre l'inactivation par le DEPC suggère que la localisation de ce résidu catalytique est à proximité du site de fixation de l'aglycone. Les aglycones conjugués par cette isoforme possèdent des valeurs de pK_a basiques (7,8 pour la 4-MO) et se trouvent donc probablement sous forme protonée dans le site actif de l'UGT1*6 au pH de glucuroconjugaison (pH 7,4).

Il semble vraisemblablement que le rôle du résidu histidine catalytique consiste à déprotoner la fonction hydroxyle de la 4-MO, ce qui permet au groupement nucléophile du substrat accepteur ainsi activé d'effectuer une attaque nucléophile sur le carbone 1 de l'acide glucuronique (Figure 55). Cette attaque provoquerait alors le départ du groupement UDP⁻. Lors de cette étape, le groupement UDP⁻ pourrait recevoir un proton d'un des résidus du site actif. Ce proton ne provient probablement pas du résidu histidine protoné lors de l'activation de l'aglycone pour des raisons structurales et mécanistiques. Ainsi Garrard (1985) souligne que lorsqu'une réaction de transfert suit une stéréochimie conduisant à une inversion de configuration, comme dans le cas des UGT, un deuxième résidu doit être impliqué dans le processus catalytique. La nature de cette entité catalytique peut être un acide aminé protoné au pH optimum de glucuroconjugaison ou encore une molécule d'eau (Meyer, 1992). Le Tableau 9 résume les entités basiques pouvant être impliquées dans ce mécanisme.

| groupement | pK _a |
|---------------------|-----------------|
| imidazole | 4-7 |
| sulfhydryle | 8-9 |
| H ₂ O-Mg | 8-10 |
| amino | 7,6-10,5 |
| tyrosine | 10-10,5 |

Tableau 9. pK_a de résidus d'acides aminés pouvant jouer le rôle d'une base dans un processus catalytique de type acide/base général.

L'analyse du profil de pH n'est pas indicatrice de la nature du résidu impliqué (comme nous l'avons indiqué précédemment) du fait de l'ionisation possible de la 4-MO. L'inactivation par le NBD-Cl de la glucuroconjugaison du 1-naphtol dans les fractions solubilisées de microsomes de foie de rat ou encore par les dérivés maléimide ou le NAI dans les fractions membranaires, suggère un rôle possible d'un résidu tyrosine ou cystéine. Il faut pour cela caractériser davantage l'effet de ces réactifs sur l'UGT1*6. Rappelons par ailleurs que l'inactivation de l'UGT1*6 par le DEPC met en évidence un seul résidu histidine essentiel. Cependant, ceci n'exclut pas l'éventualité de l'implication d'un résidu histidine protoné dans le mécanisme catalytique puisque le DEPC ne réagit qu'avec les résidus non protonés. Un

mécanisme de catalyse acido-basique des UGT par une paire imidazolium/imidazole (Histidine protonée/Histidine) comparable à celui de la ribonucléase A (Breslow et Xu, 1993) n'est donc pas exclu.

Nous avons montré que deux acides aminés sont impliqués dans la glucuroconjugaison:

- un résidu histidine non protoné au pH optimum de glucuroconjugaison (pH 7,4)
- un résidu acide aspartique ou acide glutamique probablement non protoné à pH 7,4.

Deux mécanismes de catalyse acide/base sont compatibles avec une implication de ces deux groupements dans la glucuroconjugaison par les UGT (Figure 55).

Dans le modèle 2, l'acide carboxylique est impliqué dans l'étape d'activation de l'aglycone tandis que le groupement imidazole de l'histidine fournit un proton dans le processus catalytique au groupement partant UDP^- . Cependant, la paire imidazole/imidazolate et non imidazolium/imidazole doit être impliquée dans cette étape puisque le DEPC ne réagit pas avec l'ion imidazolium (Hoolbrook et Ingram, 1973). Davenport *et al.* (1991) ont souligné que la paire imidazole/imidazolate n'est qu'exceptionnellement rencontrée dans les protéines. Par ailleurs, le pK_a du résidu essentiel inactivé par le DEPC (6,1) est compatible avec la titration de la paire imidazolium/imidazole. Le modèle de catalyse acide/base générale "histidine/acide aspartique ou glutamique" est donc peu probable, mais ne peut être exclu.

Dans le modèle 1 (Figure 55), l'histidine est catalytique sous sa forme imidazole et le résidu cédant un proton au groupement UDP^- partant est inconnu. Le résidu acide aspartique ou glutamique ne peut jouer ce rôle du fait de sa forme probablement anionique au pH optimum de glucuroconjugaison. Il peut toutefois être impliqué dans la catalyse s'il forme par exemple une interaction essentielle avec le résidu histidine non protoné, suivant un modèle comparable au système de relai de charges décrit par Fersht et Sperling (1973) dans la chymotrypsine.

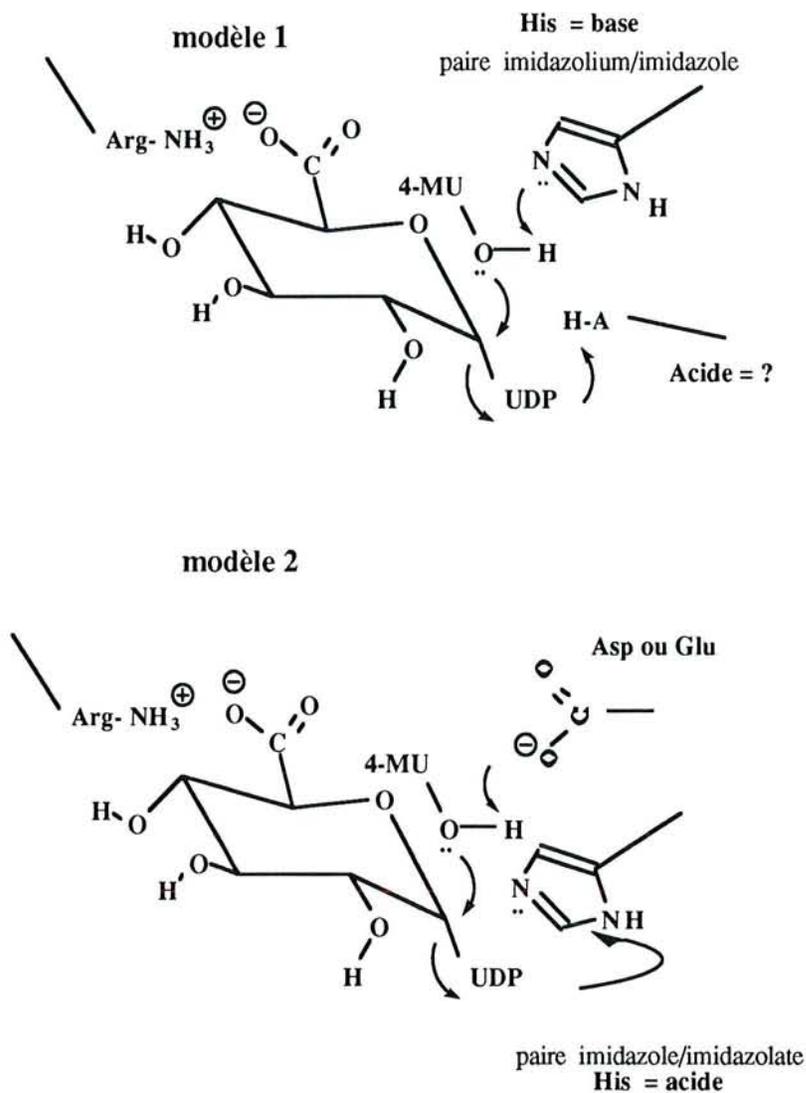


Figure 55. Proposition de deux mécanismes catalytiques de type acide/base général compatibles avec la glucuroconjugaison catalysée par l'UGT1*6.

La modification chimique de ce résidu carboxylique par le DCCI pourrait dans ce cas rompre l'interaction histidine-carboxylate (Figure 56) essentielle au positionnement ou à la réactivité du résidu histidine impliqué dans la catalyse et, de ce fait, inactiver complètement l'enzyme. Cette hypothèse est en accord avec un mécanisme de glucuroconjugaison impliquant la paire imidazole/imidazolium (modèle 1) et est la plus probable. Enfin, l'augmentation de la nucléophilie du résidu histidine impliqué dans la catalyse lors de la fixation du substrat donneur (paragraphe IV.1.5) s'inscrit fidèlement dans le mécanisme acido-basique proposé.

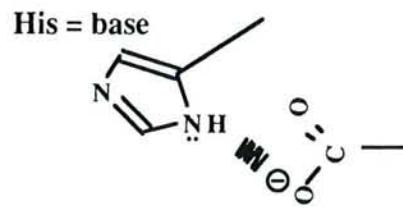


Figure 56. *Relai de charges entre un résidu histidine et un résidu acide aspartique ou acide glutamique*

FINITE DES UGT

se et la caractérisation du $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$.

ation covalente et spécifique de cette sonde photoactivable
ation du substrat donneur de la réaction de glucuroconjugaison dans les
osomes. La multiplicité des isoformes restreint cependant son utilisation. Pour pallier
cette difficulté, nous avons choisi de développer l'utilisation de cette sonde analogue du
substrat donneur sur les fractions membranaires de la lignée cellulaire V79 recombinante
exprimant l'UGT1*6 de manière stable (Fournel-Gigleux *et al.*, 1990).

Le marquage de photoaffinité de cette isoforme a été comparé à celui observé dans les
microsomes de foie humain. L'autoradiogramme révèle une incorporation de la radioactivité à
des protéines de poids moléculaires compatibles avec un marquage des UGT dans les
microsomes de foie humain (51-54 kDa, Drake *et al.*, 1991) et de l'UGT1*6 (54 kDa,
Fournel-Gigleux *et al.*, 1990) dans les fractions membranaires de la lignée recombinante.

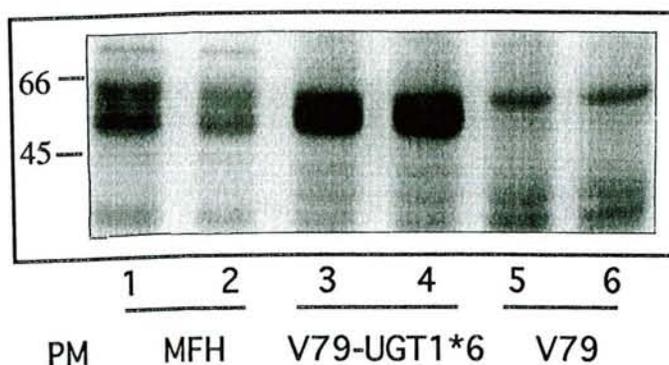


Figure 57. Autoradiogramme d'un gel d'électrophorèse après marquage de microsomes de foie humain, de fractions membranaires de la lignée cellulaire V79 exprimant l'UGT1*6 et de la lignée cellulaire non transfectée, par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$.

MFH : microsomes de foie humain (20 μg de protéines) ; V79-UGT1*6, lignée cellulaire recombinante (50 μg de protéines) ; V79, lignée cellulaire non transfectée (50 μg de protéines)

Hormis un polypeptide non reconnu par les anticorps anti-UGT1*6, (publication n° 2), aucune photoincorporation n'est observée à ce niveau dans les fractions membranaires de cellules V79 non transfectées, qui ne possèdent pas d'activité de glucuronoconjugaison détectable (Fournel-Gigleux *et al.*, 1990) ; ceci suggère une fixation spécifique de la sonde à l'UGT1*6.

Le marquage spécifique de l'UGT1*6 par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ est finalement démontré par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie *N*-terminale de l'UGT1*6. Deux polypeptides de masses moléculaires apparentes 54 et 56 kDa ayant incorporé la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ sont spécifiquement reconnus par cet anticorps après immunoblot d'un gel d'électrophorèse de fractions membranaires exprimant l'UGT1*6 (Figure 2, publication n° 2).

T. Pillot a montré au laboratoire, par l'utilisation d'une endoglycosydase F, que la présence de ces deux polypeptides est la conséquence d'une glycosylation différentielle de l'UGT1*6.

La photoincorporation de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ ne peut s'effectuer en présence du substrat donneur de la glucuronoconjugaison, ce qui est compatible avec un mécanisme de compétition entre les deux molécules au niveau du même site de fixation. Aucun polypeptide n'est reconnu par ces anticorps dans les fractions membranaires de cellules V79 non transfectées (Figure 2, publication n° 2).

Nous avons démontré la spécificité de fixation de la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{-UDPGA}$ dans le site de fixation du substrat donneur de l'UGT1*6. Ce marqueur de photoaffinité a été utilisé pour évaluer l'effet d'inhibiteurs compétitifs de l'UDPGA (paragraphe II) et pour mettre au point un protocole de purification de l'UGT1*6 par électrophorèse préparative.

V.1.2. Purification de l'UGT1*6 par électrophorèse préparative

Le principal facteur ayant limité à ce jour une caractérisation de la structure des UGT est l'étape de purification de ces protéines. L'apparition d'une nouvelle technique de purification par électrophorèse préparative nous a incités à développer cette méthode à partir des fractions membranaires de cellules V79 recombinantes exprimant l'UGT1*6. Nous nous sommes

proposés de purifier cette isoforme dans des conditions électrophorétiques dénaturantes en présence de SDS après marquage de photoaffinité par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$.

10 mg de protéines de fractions membranaires, dont 3 mg ont été soumis au marquage par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$, ont été déposés sur le gel d'électrophorèse préparative. Les fractions collectées lors de l'élution sont soumises à un dot blot afin de localiser les fractions enrichies en UGT1*6. Les fractions d'élution sont déposées sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Le gel est séché et placé au contact d'un film photosensible. Les deux polypeptides révélés par immunoblot en présence d'anticorps anti-UGT1*6 et par autoradiographie (Figure 2, Publication n° 2) apparaissent successivement sur le profil d'élution (Figure 58).

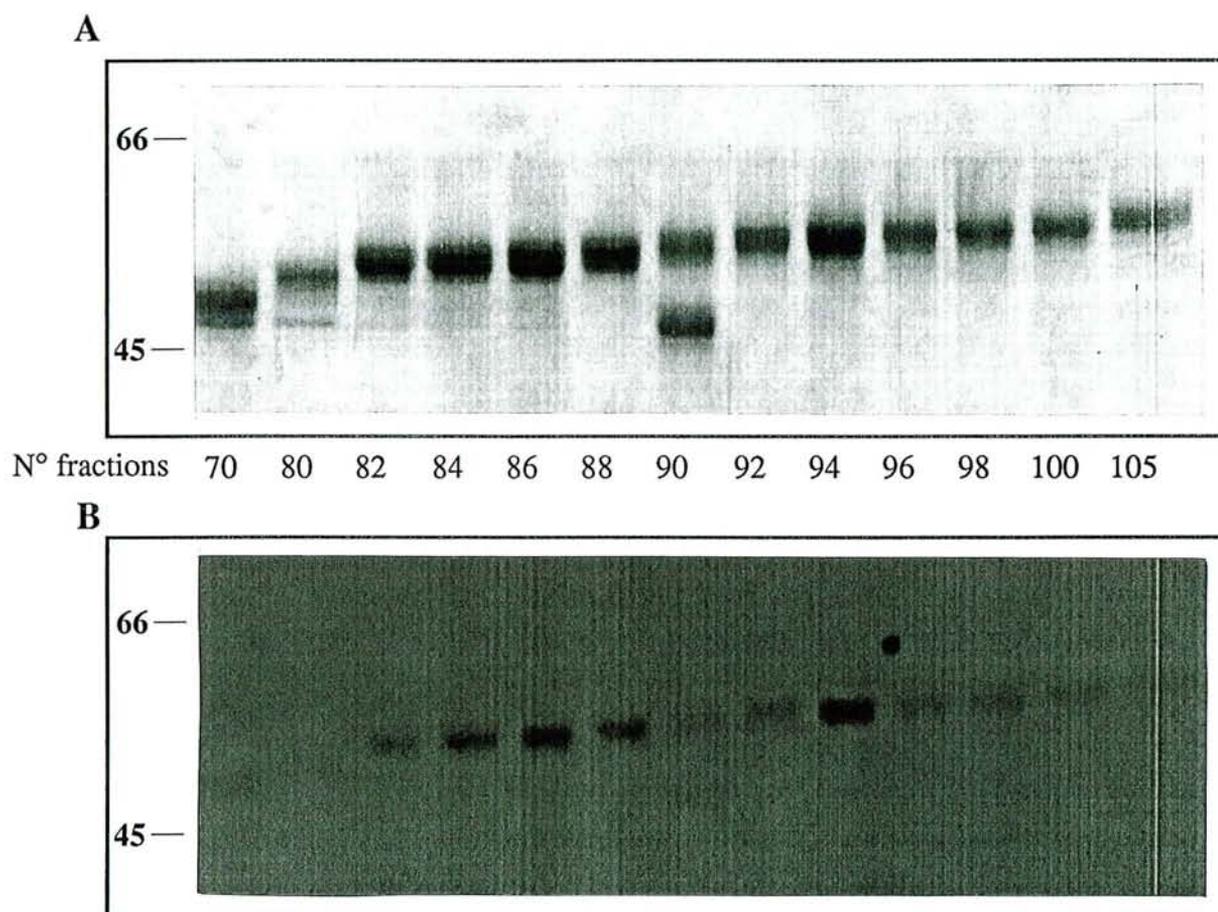


Figure 58. Profil d'élution par électrophorèse préparative de fractions membranaires après marquage de photoaffinité par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$.

A. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des fractions d'élution.

B. Autoradiogramme du gel d'électrophorèse.

Protéines déposées sur l'électrophorèse préparative, 10 mg ; débit d'élution, $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; révélation de l'immunoblot par anticorps anti-UGT1*6.

Le polypeptide de masse moléculaire apparente de 54 kDa apparaît à partir de la fraction n° 80. Les fractions 82 à 88 sont constituées des deux polypeptides correspondant à l'UGT1*6 dans les cellules recombinantes, puis le polypeptide de masse moléculaire apparente 56 kDa est identifié dans les fractions 90 à 100. La combinaison du marquage de photoaffinité et de la purification par électrophorèse préparative permet donc d'obtenir l'UGT1*6 sous forme purifiée en une seule étape. Une technique similaire a été mise au point pour purifier une enzyme membranaire, l'UDP-glucose : dolichylphosphate glycosyltransférase (Radomska et Drake, 1993). Nous utiliserons cette méthode de purification de l'enzyme radiomarquée par la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}_3\text{UDPGA}$ pour tenter d'identifier ultérieurement le(s) peptide(s) du site de fixation du substrat donneur dans la réaction de glucuroconjugaison catalysée par l'UGT1*6.

V.2. Glucuronide de 8-azido-2-naphtol

La synthèse du 8-azido-2-naphtol et d'autres analogues photoactivables du 1-naphtol (4-azido-1-naphtol, 5-azido-1-naphtol) a été développée au laboratoire par M. Said et J.C. Ziegler suivant le protocole décrit sur la Figure 59 (étape 1 et 2).

Ces analogues photoactivables du 1- et 2-naphtol ont été testés en tant que substrats des UGT microsomaux de foie de rat.

V.2.1. Glucuroconjugaison des analogues photoactivables du naphtol par les UGT de foie de rat

La glucuroconjugaison des 1-naphtol, 4-azido-1-naphtol, 5-azido-1-naphtol et 8-azido-2-naphtol est analysée selon la méthode décrite par Bansal et Gessner (1980) permettant de séparer les glucuronides par CCM et de mettre en évidence leur formation par autoradiographie.

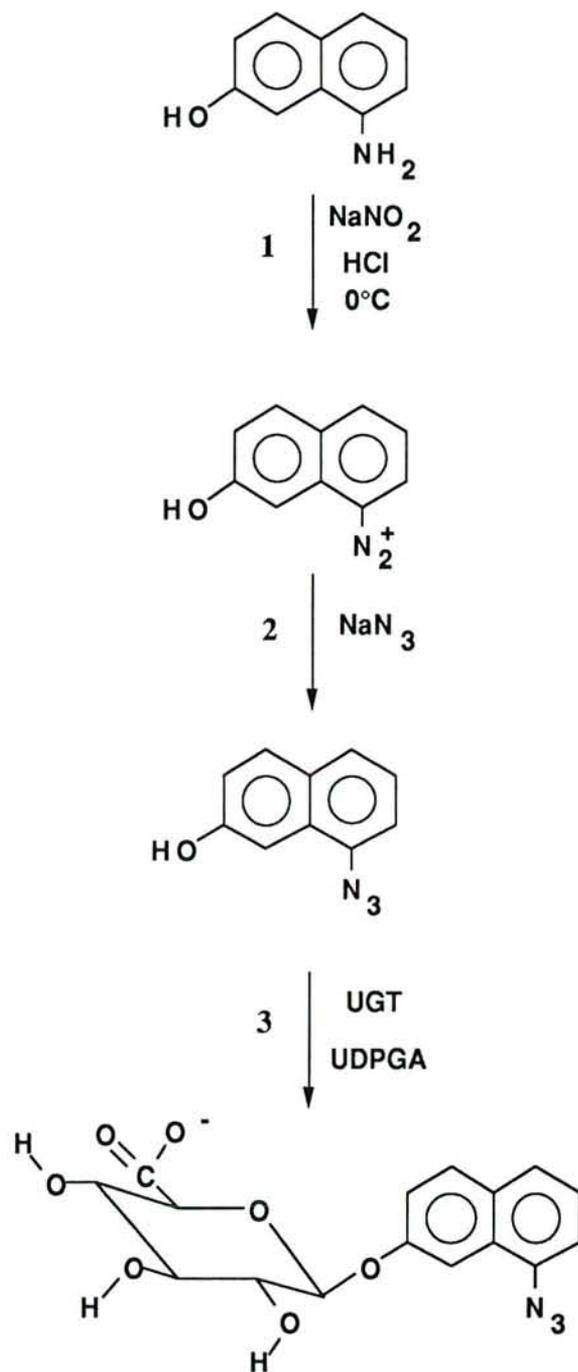


Figure 59. Schéma de synthèse du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide.

L'autoradiographie de la plaque de migration des produits de la réaction révèle la présence de glucuronides de 1-naphtol, 4-azido-1-naphtol, 5-azido-1-naphtol et 8-azido-2-naphtol (Figure

60). Les composés photoactivables sont donc des substrats des UGT (en absence d'irradiation) au même titre que le 1-naphtol.

Par ailleurs, la glucuronoconjugaison des sondes photoactivables analogues du naphtol est induite dans les microsomes de foie de rats Wistar traités au 3-MC. L'induction de la glucuronoconjugaison de ces substrats plans par le 3-MC dans les microsomes de foie de rat a déjà été mise en évidence (Iyanagi *et al.*, 1986 ; Yokota et Yuasa, 1990). Nous avons choisi d'utiliser les microsomes de foie de rats Wistar induits au 3-MC pour développer la production de glucuronides photoactivables. Cependant, les substrats photoactivables 4-azido-1-naphtol et 5-azido-1-naphtol se sont révélés être d'une grande instabilité, ce qui a interrompu leur utilisation.

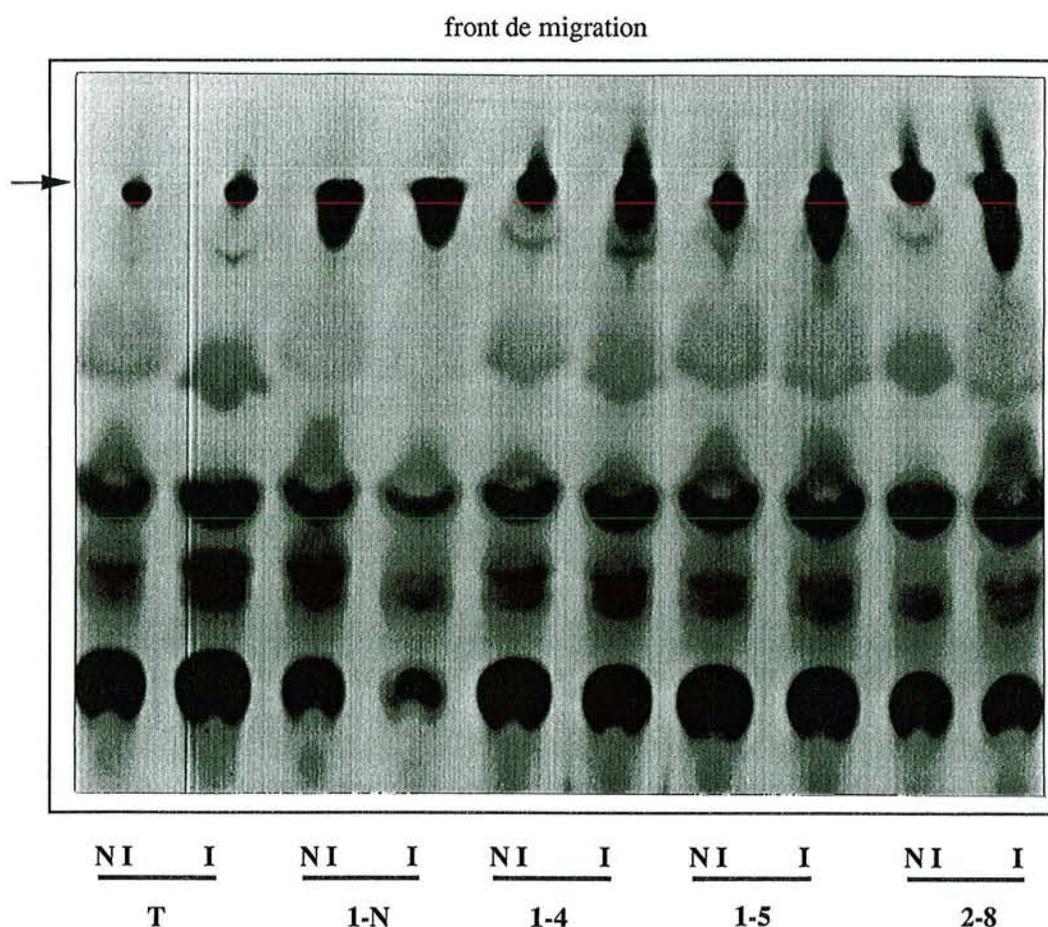


Figure 60. *Glucuronoconjugaison du 1-naphtol et de ses analogues photoactivables par les UGT microsomaux de foies de rats induits et non induits au 3-méthylcholanthrène.*

NI, rats non induits, I, rats induits ; T, témoin sans aglycone ; 1-N, 1-naphtol ; 1-4, 4-azido-1-naphtol ; 1-5, 5-azido-1-naphtol ; 2-8, 8-azido-2-naphtol. La flèche indique la position des glucuronides radiomarqués séparés sur CCM. Protéines microsomaux, 60 µg ; aglycones, 1 mM ; UDPGA radiomarqué (dilution isotopique), 3 mM

V.2.2. Synthèse du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide (NAG)

Nous avons utilisé, pour produire cette sonde photoactivable, une technique mise au point au laboratoire et permettant une production en masse de glucuronides à partir de microsomes immobilisés dans des billes d'alginate de sodium (Haumont *et al.*, 1991). L'incubation de 36 mg de protéines microsomales immobilisées dans des billes d'alginate avec 20 μ moles d'UDPGA et 15 μ moles de 8-azido-2-naphtol pendant 90 minutes permet de produire 11 μ moles de glucuronide photoactivable. Par ailleurs, les microsomes immobilisés sont réutilisables pour de nouvelles synthèses. Lors de la synthèse du glucuronide radiomarqué (8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- 14 C (U)]), les quantités de 8-azido-2-naphtol sont en excès (400 nmoles) par rapport à celle d'UDPGA, [glucuronyl- 14 C (U)] (70 nmoles) afin de favoriser la conjugaison de l'acide glucuronique radiomarqué par rapport au substrat non radiomarqué. Le glucuronide photoactivable radiomarqué (289,1 mCi.mmoles $^{-1}$) est utilisé après dilution isotopique pour marquer de manière irréversible les protéines des fractions membranaires.

V.2.3. Photochimie

Le spectre UV du NAG est déterminé en fonction du temps d'irradiation. Le pic d'absorbance à 230 nm disparaît en fonction du temps d'irradiation tandis qu'apparaît un pic d'absorbance à 260 nm (Figure 61).

Ce décalage du pic d'absorbance en fonction du temps d'irradiation suggère la disparition d'un produit et la formation d'un nouveau composé, compatible avec la formation d'un nitrène qui donne alors un adduit avec le solvant ou subit un réarrangement intramoléculaire (Evans *et al.*, 1986). La nature de l'adduit formé n'a pas été déterminée.

V.2.4. Stabilité du glucuronide en présence des fractions membranaires

La localisation de la radioactivité dans le groupement acide glucuronique du NAG soulève un problème majeur quant à l'utilisation de ce glucuronide en tant que sonde photoactivable. Le NAG peut être substrat de la β -glucuronidase et le produit de la réaction (8-azido-2-naphtol)

est encore susceptible de se fixer au site actif de l'UGT1*6, tout en ayant perdu le groupement [glucuronyl-¹⁴C, (U)].

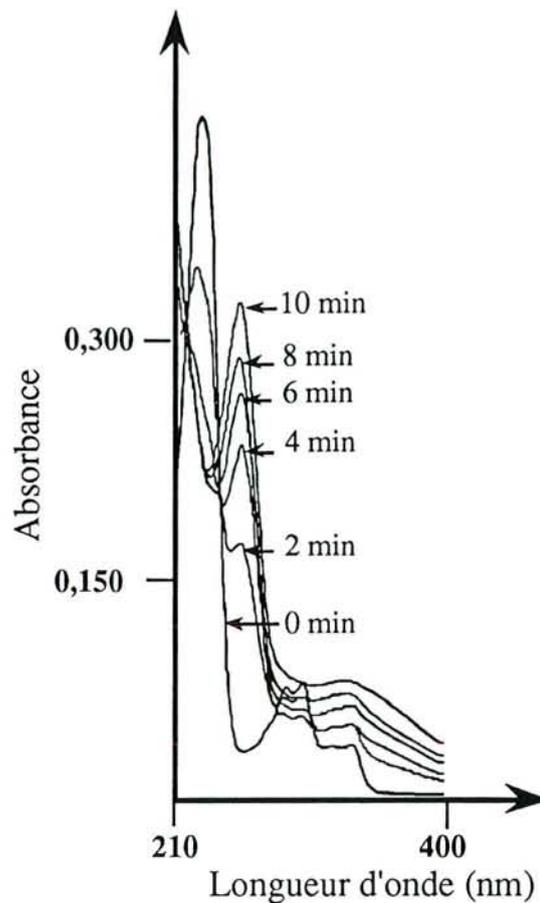


Figure 61. Spectre d'absorption UV du 8-azido-2-naphtol-β-D-glucuronide en fonction du temps d'irradiation.

lampe VL215G, 254nm (Bioblock) ; tube en verre Pyrex ; 10^{-5} M NAG (méthanol).

Pour pallier cette éventualité, les expériences de photoactivation en présence de protéines microsomales sont développées en ajoutant au milieu d'incubation 5 mM d'acide D-saccharique-1,4-lactone (inhibiteur de la β-glucuronidase). Afin de vérifier la stabilité du glucuronide dans le milieu d'incubation en absence d'irradiation, le NAG est incubé en présence des fractions membranaires pendant 20 minutes, puis les protéines sont précipitées

et le surnageant est analysé par CLHP. Les temps de rétention du NAG et du 8-azido-2-naphtol sont déterminés (Figure 62).

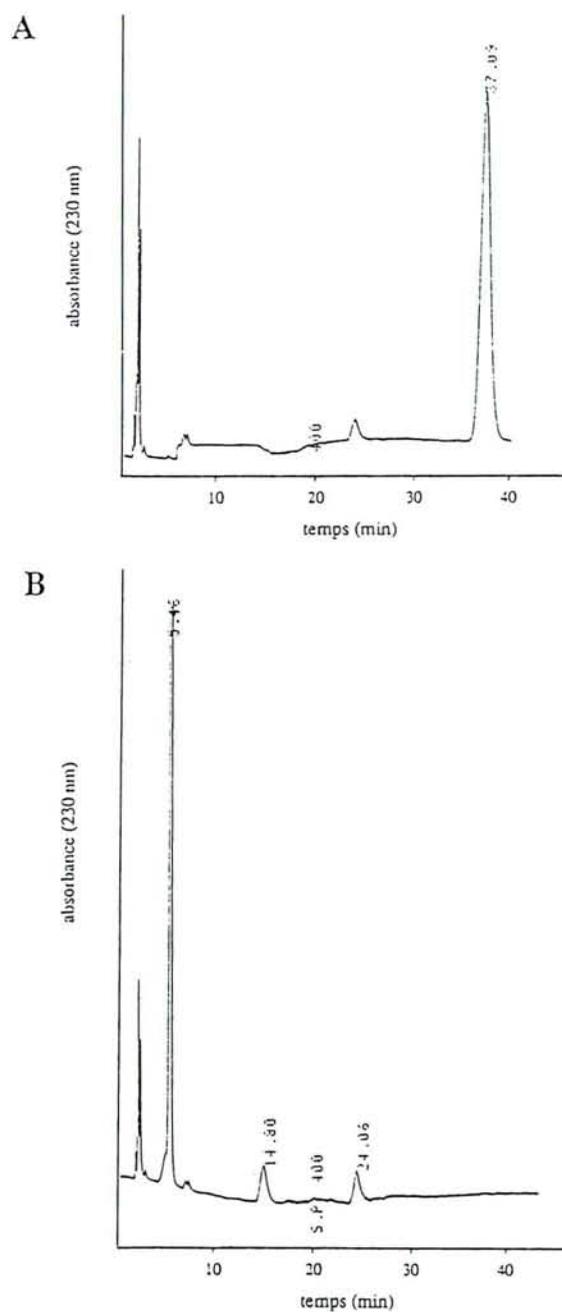


Figure 62. Profil d'éluion du 8-azido-2-naphtol et 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide par CLHP. A. 8-azido-2-naphtol. B. 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide.

8-azido-2-naphtol (NAG), 1nmole ; colonne LiChrosphere RP-18 (7 μ m) ; phase mobile, acétonitrile/H₂O, 32/68 (V/V), 0,004 % TFA (v/v) ; débit d'éluion, 1ml.min⁻¹

L'injection sur la colonne CLHP d'un mélange de NAG et de 8-azido-2-naphtol (ou des différents composés séparément) permet de définir leurs temps de rétention respectifs, 5,5 et 37,1 min. Un composé contaminant (ayant un temps de rétention de 24 minutes) qui n'a pas été visualisé après migration des deux composés photoactivables en chromatographie sur couche mince de silice est présent dans chacun des échantillons injectés. Après précipitation des protéines, le surnageant est injecté sur cette colonne et l'élution des composés est suivie jusqu'à 40 minutes après injection. Le profil d'élution après 20 minutes d'incubation du NAG avec les fractions membranaires ne met pas en évidence la présence de 8-azido-2-naphtol (Figure 63), suggérant ainsi que le glucuronide n'est pas hydrolysé par la β -glucuronidase dans les conditions expérimentales utilisées.

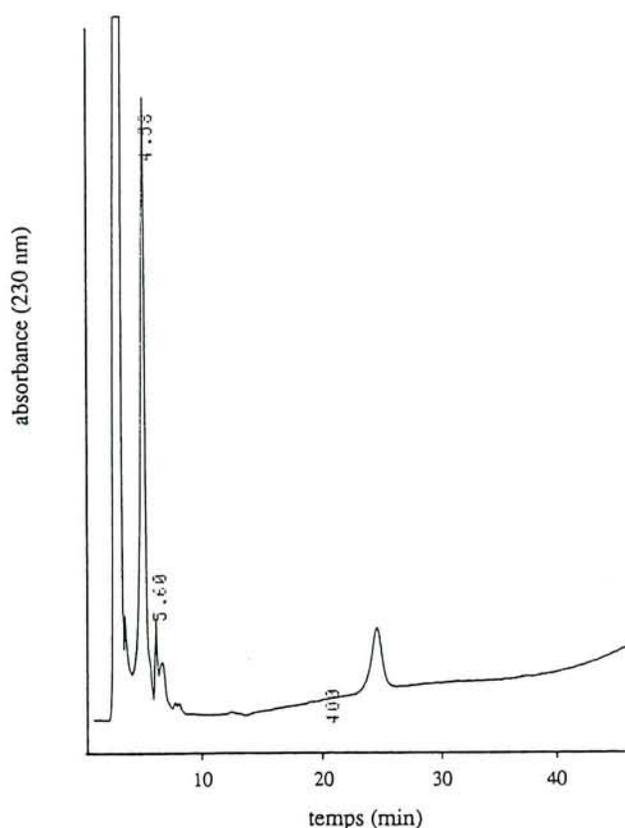


Figure 63. Profil d'élution par CLHP du surnageant après incubation des fractions membranaires à pH 4,0 avec le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide et précipitation des protéines au TCA.

8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, 0,96 nmole ; colonne LiChrosphere RP-18 (7 μ m) ; phase mobile, acétonitrile/H₂O, 32/68 (V/V), 0,004 % TFA (v/v) ; débit d'élution, 1ml.min⁻¹

V.2.5. Effet d'une irradiation sur la glucuroconjugaison par l'UGT1*6 en présence de NAG

Les fractions membranaires ont été mises en présence de NAG et irradiées. L'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO est déterminée en fonction du temps d'irradiation (Figure 64). Nous avons vérifié qu'aucune interférence avec la fluorescence du glucuronide de 4-MO n'était observée en présence de NAG.

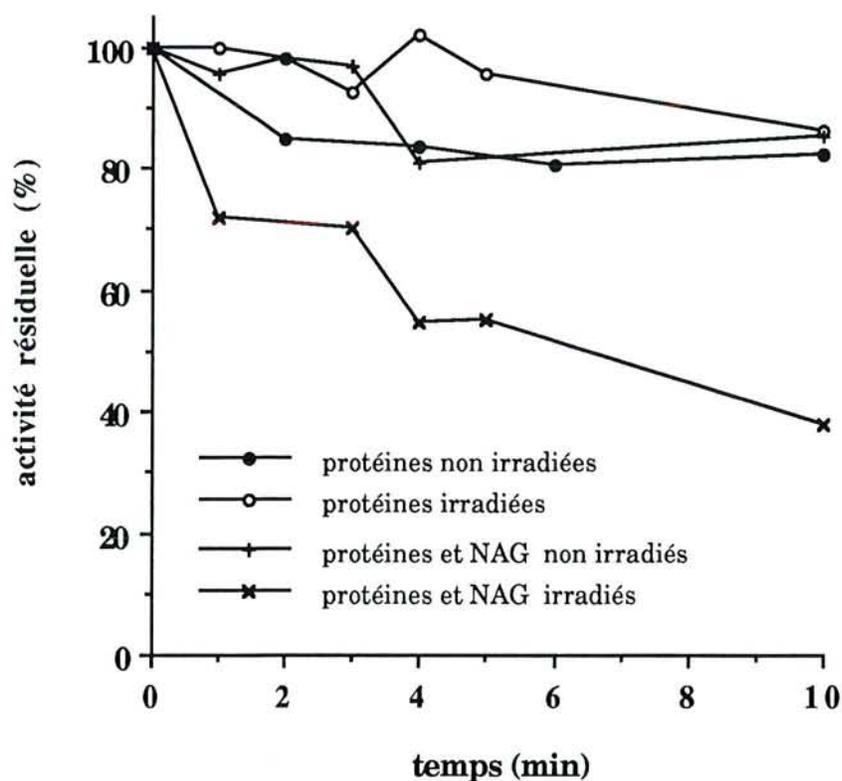


Figure 64. Photoinactivation de la glucuroconjugaison de la 4-MO en présence de 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide dans les fractions membranaires.

La photoinactivation a lieu à pH 5,1 en présence de $1,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines et $50 \mu\text{M}$ en NAG. L'activité enzymatique de l'UGT1*6 est déterminée après dilution (23 fois) dans le tampon de détermination de l'activité de glucuroconjugaison de la 4-MO de fractions de protéines prélevées en fonction du temps d'irradiation.

L'activité enzymatique est stable durant le temps d'incubation en absence de NAG et sans irradiation. L'irradiation des fractions membranaires en absence de NAG n'affecte pas davantage l'activité enzymatique. De même, l'activité enzymatique n'est pas significativement affectée en présence de NAG si le milieu réactionnel n'est pas irradié, alors qu'une diminution de l'activité de glucuronoconjugaison de la 4-MO est observée en fonction du temps d'irradiation. La diminution de l'activité enzymatique dépend de l'irradiation du NAG. Cette inhibition n'est pas levée par la dilution des fractions membranaires inactivées, suggérant une photoincorporation de la sonde avec liaison covalente à l'UGT1*6. L'inhibition dépend du temps d'irradiation dans l'intervalle de temps 0-10 min. Baylet (1991) a souligné que la photoincorporation d'un marqueur de photoaffinité doit s'effectuer dans les premières minutes d'irradiation et a indiqué que dans le cas contraire, le marquage est probablement de type pseudo-affinité : le nitrène généré sous irradiation subit un réarrangement pour donner une fonction moins réactive, ce qui a pour conséquence de diminuer la spécificité de fixation de la sonde à son site. Toutefois, une inactivation corrélée à la photoincorporation de sondes photoactivables dans diverses enzymes a été observée par plusieurs auteurs lorsque des temps d'irradiation bien supérieurs à 10 minutes sont utilisés (Katzenellenbogen *et al.*, 1974 ; Sakakibara *et al.*, 1984 ; Hoesch et Boyer, 1989). Les auteurs ne rencontrent pourtant pas de problèmes liés à un marquage de type pseudo-affinité. En outre, le temps de photolyse nécessaire à l'incorporation du NAG dans l'UGT1*6 peut-être élevé du fait de la complexité de l'homogénat protéique qui absorbe probablement une partie de l'énergie lumineuse.

V.2.6. Marquage de photoaffinité des fractions membranaires par le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- 14 C (U)]

V.2.6.1. Identification de l'UGT1*6 par immunoblot

Les fractions membranaires sont irradiées en présence d'une dilution isotopique du glucuronide photoactivable. Les protéines sont alors séparées sur gel d'électrophorèse en présence de SDS. Le gel est transféré sur membrane de nitrocellulose et l'UGT1*6 est révélée par immunoblot avec les anticorps anti-UGT1*6.

L'autoradiogramme du fragment de nitrocellulose met en évidence une incorporation de la radioactivité dans les polypeptides (54 et 56 kDa) révélés par les anticorps anti-UGT1*6 dans les cellules recombinantes (Figure 65).

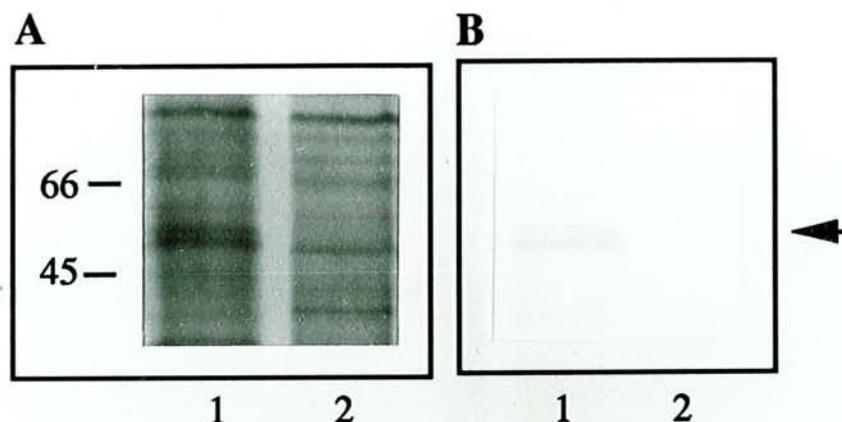


Figure 65. Autoradiogramme (A) et immunoblot (B) de fractions membranaires de la lignée cellulaire recombinante (1) exprimant l'UGT1*6 et de la lignée cellulaire V79 non transfectée (2).

Ligne 1, lignée recombinante (50 μg de protéines) ; ligne 2, lignée non transfectée (50 μg de protéines). Conditions d'irradiation : protéines $1,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ (pH 4,0) ; NAG 50 μM ; temps d'irradiation, 2 min.

Ces polypeptides ne sont pas mis en évidence par les anticorps anti-UGT1*6 dans les cellules V79 non transfectées (Figure 65.B, ligne 2) et la radioactivité n'est pas détectable à ce niveau lorsque les cellules V79 non transfectées ont été irradiées (Figure 65.A, ligne 2).

Il semble donc que le glucuronide photoactivable s'est fixé de manière covalente à l'UGT1*6 lors de l'irradiation lumineuse. Mackenzie (1988) a montré que la déconjugaison (réaction inverse) d'un glucuronide est catalysée par la même isoforme que celle impliquée dans la réaction de conjugaison, ce qui explique que la sonde 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide puisse se fixer au site actif de l'UGT1*6. D'autres polypeptides, non révélés par les anticorps anti-UGT1*6, ont inséré la sonde radioactive (Figure 65), soulevant l'éventualité d'une photoinsertion aspécifique dans les protéines des fractions membranaires. Afin d'analyser la spécificité de photoinsertion de la sonde sur l'UGT1*6, le marquage des fractions membranaires a été réalisé en fonction du pH.

V.2.6.2. Effet du pH sur la photoincorporation de la sonde

L'irradiation des fractions membranaires est initiée en présence d'un mélange isotopique de 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- ^{14}C (U)] (50 μM) à des pH variant entre 3,6 et 7,6. L'UGT1*6 est révélée par immunoblot. La membrane de nitrocellulose est découpée en fragments puis la radioactivité associée à chaque fragment est quantifiée.

Aucun pic de radioactivité n'est détectable en absence d'irradiation (Figure 66).

L'incorporation de la radioactivité aux protéines dépend donc de l'irradiation, ce qui n'est pas le cas de tous les marqueurs photoactivables : Drake et Elbein (1992) ont montré que l'incorporation de ^{32}P dans la phosphoglucomutase sous irradiation en présence de [β - ^{32}P]5N₃-UDP-glucose était due à un processus de phosphorylation et non de photoinsertion.

Nous avons en outre observé que la photoincorporation de la sonde radiomarquée dans l'UGT1*6 est fonction du pH. L'UGT1*6 incorpore d'autant plus de glucuronide radiomarqué que l'irradiation est réalisée à pH plus acide.

A pH 7,5, la réaction catalysée par l'UGT1*6 est favorisée dans le sens de la formation de glucuronides (paragraphe III). Vessey et Zakim (1972) ont montré que le glucuronide de *p*-nitrophénol est un inhibiteur compétitif de l'aglycone dans les microsomes de foie de rat. L'incorporation du 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide à l'UGT1*6 (Figure 66) suggère que le glucuronide peut se fixer à l'enzyme dans ces conditions, en accord avec ces résultats. D'autres auteurs ont utilisé un analogue de produit de réaction enzymatique pour développer le marquage de photoaffinité de diverses enzymes (Lee et Preiss, 1986 ; Drake *et al.*, 1991). Peters *et al.* (1986) ont analysé le mécanisme de la déconjugaison des glucuronides catalysée par les UGT. Ces auteurs ont montré que le pH optimum pour la déconjugaison de la 4-MO dans les microsomes de foie de rat est compris entre 4,5 et 5,3.

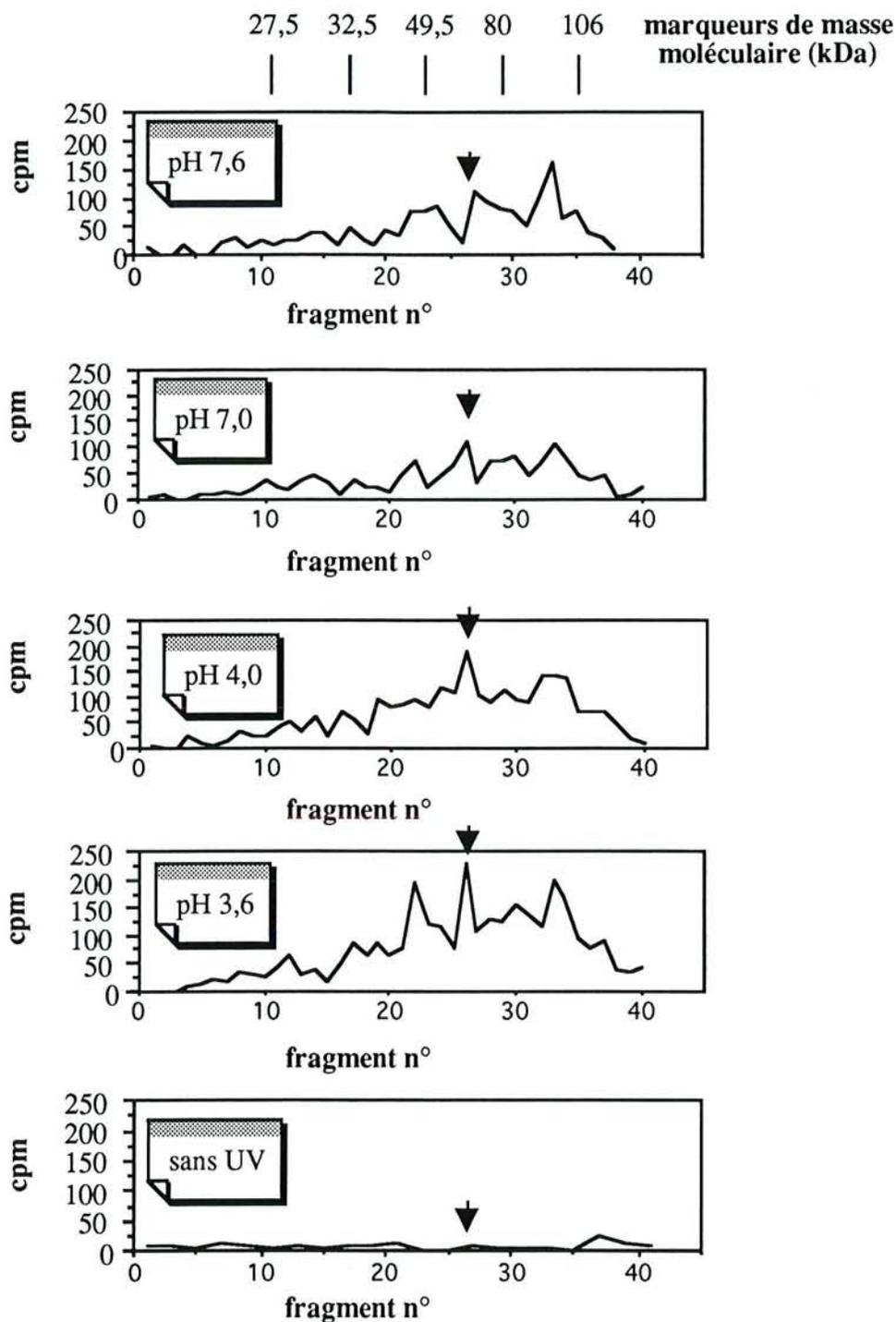


Figure 66. Marquage de photoaffinité des fractions membranaires par le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- 14 C (U)] en fonction du pH.

La photoinsertion du NAG ($50 \mu\text{M}$) est obtenue en présence de $1,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines de fractions membranaires. Les protéines sont soumises à un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en présence de SDS, puis transférées sur membrane de nitrocellulose et soumises à un immunoblot en présence des anticorps anti-UGT1*6. La nitrocellulose est découpée en portions de $0,2 \text{ cm}^2$ puis la radioactivité associée aux fragments est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation. Les flèches indiquent la position des polypeptides de masses moléculaires apparentes de 54 et 56 kDa, correspondant à l'UGT1*6.

L'augmentation de la photoinsertion du glucuronide à pH acide suggère que l'affinité du glucuronide est améliorée d'autant, en accord avec les résultats de Peters *et al.* (1986). La fixation de la sonde est donc vraisemblablement site-spécifique.

L'ensemble de ces expériences suggèrent que le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide se fixe de manière irréversible au site actif de l'UGT1*6 par formation d'un adduit sous irradiation lumineuse. Cependant de nombreuses autres protéines insèrent également la sonde, quel que soit le pH, suggérant une fixation de nature aspécifique du glucuronide sur ces dernières. Une mise au point plus poussée des conditions expérimentales devrait améliorer la spécificité du marquage pour envisager l'utilisation de cette sonde sur des homogénats de protéines. Ce manque de spécificité apparent peut être dû à la formation, lors de l'irradiation, d'un intermédiaire réactif à durée de vie longue (Shields *et al.*, 1987). Cela peut aussi être dû à la concentration de sonde utilisée dans ces expériences préliminaires. Il sera nécessaire de vérifier que la photoincorporation de la sonde est un phénomène saturable. Nous développerons la caractérisation de la fixation de la sonde NAG dans l'UGT1*6 en vérifiant que :

- 1) la photo-incorporation du NAG dans l'UGT1*6 est saturable
- 2) le NAG peut être spécifiquement incorporé sous irradiation dans au maximum quelques protéines des fractions membranaires
- 3) la photoincorporation peut être limitée en présence de glucuronides substrats de l'UGT1*6 dans la réaction de déconjugaison

**conclusions
et
perspectives**

Au cours de ce travail, nous avons contribué à caractériser le mécanisme moléculaire de la glucuronocouplage catalysée par l'UGT1*6, ainsi que l'aspect dynamique de la fixation des substrats à l'enzyme. Nous avons proposé une réaction catalytique de type acido-basique impliquant un résidu histidine et un résidu acide aspartique ou glutamique. L'état de transition de cette isoforme a été approché par l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs et par la modélisation moléculaire, ce qui a permis de suggérer un mécanisme de transfert concerté du substrat donneur sur le groupement acide glucuronique de l'UDPGA. Le changement conformationnel du site actif de l'UGT1*6 lors de l'interaction entre l'UDPGA et son site de fixation a été démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs et d'un inhibiteur irréversible (DEPC). D'une part, l'analyse de l'effet inhibiteur d'une série de composés se fixant spécifiquement dans le site de l'aglycone et de l'UDPGA a suggéré que le groupement uridine présent dans ces structures pourrait contribuer, par des interactions hydrophobes, à un effet synergique augmentant l'affinité des aglycones pour le site actif de l'UGT1*6. D'autre part, nous avons montré par modification chimique de l'UGT1*6 avec le DEPC que l'interaction du groupement carboxylate avec le site actif contribue à accroître le caractère nucléophile du résidu histidine situé dans le site de fixation des aglycones et impliqué dans la catalyse (Figure 67).

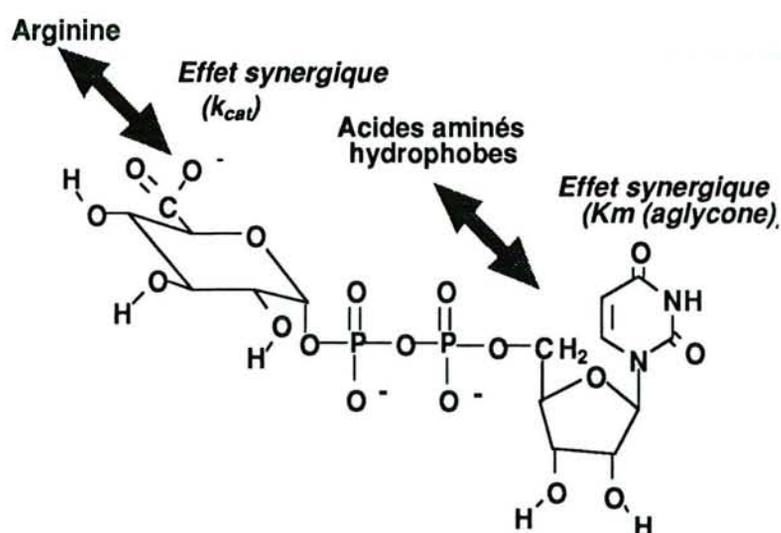


Figure 67. Représentation schématique de l'interaction entre l'UDPGA et le site actif de l'UGT1*6 : effet synergique de fixation des substrats et contribution de l'interaction arginine - carboxylate dans la réactivité du résidu histidine impliqué dans la catalyse.

Nous avons par ailleurs mis au point un processus de purification de l'UGT1*6 marquée de manière covalente par la sonde photoactivable $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$. Une nouvelle sonde photoactivable, le 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide (8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- ^{14}C (U)] a été synthétisée pour cibler le site actif de l'UGT1*6.

Nous proposons de poursuivre ce travail en caractérisant le résidu histidine catalytique par mutagenèse dirigée. Cette étude est d'ores et déjà en cours au laboratoire. La mise au point d'un protocole de purification de l'UGT1*6 dans les fractions membranaires de cellules recombinantes devrait permettre une caractérisation du site actif de cette isoforme. En particulier, nous tenterons d'isoler le peptide fixant la sonde $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDPGA}$. Le marquage de photoaffinité directe des UGT par l'UDPGA radiomarké pourra être développé de manière similaire. Nous tenterons de caractériser les résidus inactivés par des inhibiteurs irréversibles comme le NBD-Cl ou encore par des marqueurs d'affinité (tel que la bilirubine ou les inhibiteurs compétitifs de la glucuronocjugaison de la bilirubine, l'un ou l'autre modifié par le réactif de Woodward) en suivant une stratégie voisine. Ceci devrait permettre dans ce dernier cas de déterminer si la liaison présumée entre un résidu acide aspartique ou glutamique et le groupement carboxylique de la bilirubine (publication n° 4) est effective. Nous développerons la caractérisation de la sonde 8-azido-2-naphtol- β -D-glucuronide, [glucuronyl- ^{14}C (U)] en étudiant sa fixation à divers sites récepteurs potentiels tels que l'UGT, la β -glucuronidase et le transporteur de glucuronide.

bibliographie

Abdulwajid, A.W. & Wu, F.Y.-H Chemical modification of *Escherichia coli* RNA polymerase by diethyl pyrocarbonate: evidence of histidine requirement for enzyme activity and intrinsic zinc binding (1986), *Biochemistry* **25**, 8167-8172.

Abe, N., Abe, E. & Yyasa, A. Purification and properties of 5-hydroxytryptamine UDP-glucuronyltransferase from rat liver microsomes (1988), *J. Biochem.* **104**, 421-426

Ahn, H. S., Foster, M., Foster, C., Sybertz, E. & Wells, J. N. Evidence for essential histidine and cysteine residue in calcium/calmodium-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase (1991), *Biochemistry*. **30**, 6754-6760.

Arion, W.J., Burchell, B. & Burchell, A. Specific inactivation of the phosphohydrolase component of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system by diethyl pyrocarbonate (1984), *Biochem. J.* **220**, 835-842.

Bansal, S.K. & Gessner, T. A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronosyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-C¹⁴]glucuronic acid. (1980), *Anal. Biochem.* **109**, 321-329

Bartlett, P.A. & Marlowe, C.K. Phosphoramidates as transition -state analogue inhibitors of thermolysin (1983), *Biochemistry* **22**, 4618-4624

Baylet, H. (1983) Photogenerated reagents in biochemistry and molecular biology *in* laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Work & Burton Ed.), Elsevier.

Baylet, H. & Knowles, J.R. (1977) Photoaffinity labeling *in* Methods in Enzymology (Jakoby & Milchek Ed.), **46**: 69-114, Academic press, New York.

Bazaes, S., Beytia, E., Jabalquinto, A.M., Solis de Ovanto, F., Gomez, I. & Eyzaguirre J. (1980) Pig liver phosphomevalonate kinase. 2. Participation of cysteinyl and lysyl groups in catalysis, *Biochemistry* **19**, 2305-2310.

Bazaes, S., Cardemil, E., Churchich, J., Cid, H., Eyzaguirre J., Kemp, R., Nowak, T., Schäfer, H. J., Silva, E. & Wilson, J. (1987) Chemical Modification of Enzymes: Active Site Studies. J. Eyzaguirre Ed., New York.

Benghiat, E. & Crooks, P.A. Multisubstrate adducts as potential of *S*-adenosylmethionine dependent methylases by [5'-deoxyadenosyl](3-3indolyl)prop-1-yl)methylsulfonium and [5'-deoxyadenosyl](4-3indolyl)but-1-yl)methylsulfonium salts (1983), *J. Med. Chem.* **26**, 1470-1477

Bertics, P.J., Edman, C.F. & Karavolas, H.J. Potent inhibition of the hypothalamic progesterone 5 α -reductase by a 5 α -dihydroprogesterone analog (1984), *J. Biol. Chem.* **259** (1), 107-111

Bertran, J., Roca, A., Pola, E., Testar, X., Zorzano, A. & Palacin, M. Modification of system A amino acid carrier by diethyl pyrocarbonate (1991), *J. Biol. Chem.* **266**, 798-802.

Bhattacharyya, D. Kr., Bandyopadhyay & Banerjee, R.K. Chemical and kinetic evidence for an essential histidine in horseradish peroxidase for iodide oxidation (1992), *J. Biol. Chem.* **267**, 9800-9804

Blicq, S., Danze, P. M., Dumur, V., Formstecher & Dautrevaux, M. Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation, and temperature-dependant inactivation by various N-substituted maleimides (1988), *Biochemistry*. **27**, 8436-8442.

- Bock, K.W. Roles of UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis (1991), *Critical Reviews in Biochem. Molec. Biol.* **26** (2), 129-150
- Bock, K.W., Forster, A., Gschaidmeier, H., Brück, M., Münzel, P., Schareck, W., Fournel-Gigleux, S. & Burchell, B. Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases (1993), *Biochem. Pharmacol.* **45** (9), 1809-1814
- Bornstein, P. & Balian, G. (1977), *Methods Enzymol.* **47**, 132-145.
- Boyer, T.D. Covalent labeling of the nonsubstrate ligand-binding site of glutathione S-transferases with bilirubin-Woodward's reagent K (1986) *J. Biol. Chem.* **261** (12), 5363-5367
- Boyer, T.D., Zakim, D. & Vessey D.A. Direct, rapid transfer of estrone from liposomes to microsomes (1980), *J. Biol. Chem.* **255** (2), 627-631
- Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976), *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Breslow, R. & Xu, R. Recognition and catalysis in nucleic acid chemistry (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1201-1207.
- Breslow, R. Kinetics and mechanism in RNA cleavage (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1208-1211.
- Broom, A.D. Rational design of enzyme inhibitors : multisubstrate analogue inhibitors (1989), *J. Med. Chem.* **32**, 2-7
- Burchell, B. Substrate specificity and properties of uridine diphosphate glucuronyltransferase purified to apparent homogeneity from phenobarbital-treated rat liver (1978), *Biochem. J.* **173**, 749-757.
- Burchell, B., Nebert, D. W., Nelson, D. R., Bock, K. W., Iyanagi, T., Jansen, P. L. M., Lancet, D., Mulder, G. J., Roy Chowdhury, J., Siest, G., Tephly, T. & Mackenzie, P. I. The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily : suggested nomenclature based on evolutionary divergence (1991), *DNA Cell Biol.* **10**, 487-494.
- Bush, K. Screening and characterisation of enzyme inhibitors as drug candidates (1983), *Drug Metabolism Reviews*, **14**, 689-708.
- Camarasa, M.-J., Fernandez-Resa, P., Garcia-Lopez, M.-T., De las Heras, F., Mendez-Castrillon, P.P., Alarcon, B. & Carrasco, L. Uridine 5'-diphosphate glucose analogues, inhibitors of protein glycosylation that show antiviral activity (1985), *J. Med. Chem.* **28**, 40-46
- Chatrenet, B., Trémau, O., Bomtens, F., Goeldner, M.P., Hirth, C.G. & Ménez, A. Topography of toxin-acetylcholine receptor complexes by using photoactivatable toxin derivatives (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3378-3382
- Cheng, K.-C. & Nowak, T. A histidine residue at the active site of avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (1989), *J. Biol. Chem.* **264** (33), 19666-10676
- Cho, Y.-K. & Cook, P.F. Inactivation of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Propionibacterium freudenreichii* by pyridoxal 5'-phosphate (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 5135-5140.
- Chuan, H., Lin, J. & Wang, J.H. 8-Azido-2'-O-dansyl-ATP : A. Fluorescent photoaffinity reagent for ATP-binding proteins and its application to adenylate kinase (1989), *J. Biol. Chem.* **264** (14), 7981-7988

- Cleland, W.W. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies *in* *Advances in Enzymology and related areas of molecular biology*, vol. 15, pp. 274-383, A. Meister Ed., John Wiley & Sons
- Coffman, B.L., Tephly, T.R., Irshaid, Y.M., Green, M.D., Smith, C., Jackson, M.R., Wooster, R. & Burchell, B. Characterization and primary sequence of a human hepatic microsomal estriol UDPglucuronosyltransferase (1990), *Arch. Biochem. Biophys.* **281** (1), 170-175.
- Cohen, N.C., Blaney, J.M., Humblet, C., Gund, P. & Barry, D.C. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry (1990), *J. Med. Chem.* **33** (3), 883-893
- Cole, D.G. & Yount, R.G. Photolabeling of the 6 and 10 S conformations of gizzard myosin with 3'(2')-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (36), 22537-22546
- Collins, K.D. & Stark, G.R. Aspartate transcarbamylase, interaction with the transition state analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate (1971), *J. Biol. Chem.* **246** (21), 6599-6605
- Cook, P.F., Kenyon, G.L. & Cleland, W.W. Use of pH studies to elucidate the catalytic mechanism of rabbit muscle creatine kinase (1981), *Biochemistry* **20**, 1204-1210
- Cooper, R.D.G. The enzymes involved in biosynthesis of penicillin and cephalosporin; Their structure and function, *Bio. Med. Chem.* **1**(1), 1-17
- Cousineau, J. & Meighen, E. Chemical modification of bacterial luciferase with ethoxyformic anhydride: Evidence for an essential histidyl residue (1976), *Biochemistry.* **15**, 4992-5000.
- Craik, J. M., Gounden, K. & Reithmeier, R. A. F. Inhibition of phosphate transport in human erythrocytes by 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) (1986), *Biochim. Biophys. Acta.* **856**, 602-609.
- Cramer, R.D. III, Patterson, D.E. & Bunce, J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). I. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins (1988), *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5959-5967.
- Danenberg, P.V. & Danenberg, K.D. Inhibition of hexokinase by multisubstrate analogs (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **480**, 351-356
- Davenport, R.C., Bash, P.A., Seaton, B.A., Karplus, M., Petsko, G.A. & Ringe, D. Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex : an analogue of the intermediate on the reaction pathway (1991), *Biochemistry* **30**, 5821-5826
- Del Boccio, G., Penelli, A., Whithead, E. P. & Lo Bello, M. Interaction of glutathione transferase from horse erythrocytes with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (1991), *J. Biol. Chem.* **266**, 13777-13783.
- Delmer, D.P., Solomon, M. & Read, S.M. Direct photolabeling with (³²P)UDP-glucose for identification of a subunit of cotton fiber callose synthase (1991), *Plant Physiol.* **95**, 556-563
- Dominici, P., Tancini, B. & Borri Voltattorni, C. Chemical modification of pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase with diethyl pyrocarbonate, evidence for an essential histidyl residue (1985), *J. Biol. Chem.* **260** (19), 10583-10589
- Drake, R.R. & Elbein, A.D. Photoaffinity labeling of glycosyltransferases (1992), *Glycobiology* **2** (4), 279-284
- Drake, R.R., Evans, R.K., Wolf, M.J. & Haley, B.E. Synthesis and properties of 5-azido-UDP-glucose (1989), *J. Biol. Chem.* **264**, 11928-11933.
- Drake, R.R., Igary, Y., Elbein, A.D., Lester, R. & Radominska, A. Application of 5-azido-UDP-glucose and 5-azido-UDP-glucuronic acid photoaffinity probes for the determination of

- the active site orientation of microsomal UDP-glucosyltransferases and UDP-glucuronosyltransferases (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**, 11360.
- Drake, R.R., Zimniak, P., Haley, B.E., Lester, R., Elbein, A.D. & Radomska, A. Synthesis and characterization of 5-azido-UDP-glucuronic acid (1991), *J. Biol. Chem.* **266**, 23257-23260.
- Dutton, G.J. (1966) in *Glucuronic acid*, Academic press, New York & London.
- Ebner, T. & Burchell, B. Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family (1993), *Drug Metab. Dispos.* **21**, 50-55.
- Eklund, H., Samama, J.-P., Wallen, L., Brändén, C.-I., Akeson, A. & Jones, T.A. Structure of a tricyclic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution (1981), *J. Mol. Biol.* **146**, 561-587
- Evans, R. K., Johnson, J. D. & Haley, B. E. 5-Azido-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate: a photoaffinity-labeling reagent and tool for the enzymatic synthesis of photoactive DNA (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5382-5386.
- Falany, C.N., Green, M.D., Swain, E. & Tephly, T.R. Substrate specificity and characterization of rat liver *p*-nitrophenol, 3 α -hydroxysteroid and 17 β -hydroxysteroid UDP-glucuronosyltransferases (1986), *Biochem. J.* **238**, 65-73
- Fersht, A. (1985) in *Enzyme structure and mechanism*, second edition, p.343, W.H. Freeman company, New York.
- Fersht, A.R. & Sperling, J. The charge relay system in chymotrypsin and chymotrypsinogen (1973), *J. Mol. Biol.* **74**, 137-149
- Fersht, A.R. The hydrogen bond in molecular recognition (1987), *Trends Biochem. Sci.* **12**, 301-304
- Fersht, A.R., Shi, J.-P., Knill-Jones, J., Lowe, D., Wilkinson, A.J., Blow, D.M., Brick, P., Carter, P., Waye, M.M.Y. & Winter, G. Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering (1985), *Nature* **314**, 235-238
- Fournel, S., Grégoire, B., Magdalou, J., Carré, M.C., Lafaurie, C., Siest, G. & Caubère, P. Inhibition of bilirubin UDP glucuronosyltransferase activity by triphenylacetic acid and related compounds (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 190-196
- Fournel-Gigleux, S., Shepherd, S.R.P., Carré, M.C., Burchell, B., Siest, G. & Caubère, P. Novel inhibitors and substrates of bilirubin : UDP-glucuronosyltransferase arylalkylcarboxylic acids (1989), *Eur. J. Biochem.* **183**, 653-659
- Fournel-Gigleux, S., Sutherland, L., Sabolovic, N., Burchell, B. & Siest, G. Stable expression of two human liver UDP-glucuronosyltransferase cDNA in V79 cell cultures (1990), *Mol. Pharmacol.* **39**, 177-183
- Frost, D.J., Read, S.M., Drake, R.R., Haley, B.E. & Wasserman, B.P. Identification of the UDP-glucose-binding polypeptide of callose synthase from *Beta vulgaris* L. by photoaffinity labeling with 5-azido-UDP-glucose (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (4), 2162-2167
- Gacheru, S.N., Trackman, P.C. & Kagan H.M. Evidence for a functional role for histidine in lysyl oxydase catalysis (1988), *J. Biol. Chem.* **263** (32), 16704-16708
- Galzi, J.L., Revah, F., Bouet, F., Menez, A., Goeldner, M., Hirth, C. & Changeux, J.P. Allosteric transitions of the acetylcholine receptor probed at the amino acid level with a photolabile cholinergic ligand (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5051-5055

- Garabedian, T.E. & Yount, R.G. Direct photoaffinity labeling of gizzard myosin with [³H]uridine diphosphate places Glu-185 of the heavy chain at the active site (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (36), 22547-22553
- Garrard, L.J., Bui, Q.T.N., Nygaard, R. & Raushel, F.M. Acid-base catalysis in the argininosuccinate lyase reaction (1985), *J. Biol. Chem.* **260**, 5548-5553.
- Gomi, T. & Fujioka, M. Evidence for an essential histidine residue in S-adenosylhomocysteinase from rat liver (1983), *Biochemistry* **22**, 137-143.
- Gordillo, E., Ayala, A., F-Lobato, M., Bautista, J. & Machado, A. Possible involvement of histidine residues in the loss of enzymatic activity of rat liver malic enzyme during aging (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 8053-8057.
- Grenot, C., de Montard, A., Blachère, T., Rolland de Ravel, M., Mappus, E. & Cuilleron, C.Y. Characterization of Met-139 as the photolabeled amino acid residue in the steroid binding site of sex hormone binding globulin using Δ^6 derivatives of either testosterone or estradiol as unsubstituted photoaffinity labeling reagents (1992), *Biochemistry* **31**, 7609-7621
- Grillo, F.G. & Aronson, P.S. Inactivation of the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger by histidine-specific reagents (1986), *J. Biol. Chem.* **261**, (3) 1120-1125
- Guillory, R.J. & Jeng, S.J. Photoaffinity labeling : theory and practice (1983), *Federation Proceedings* **42** (11), 2826-2830
- Haley, B.E. Development and utilization of 8-azidopurine nucleotide photoaffinity probes (1983), *Federation Proceedings* **42** (11), 2831-2836
- Haley, B.E. Nucleotide photoaffinity of protein kinase subunits (1991) in *Methods of Enzymology*, vol.200, pp. 477-487 (S.P. Colowick & N.O. Kaplan Ed.)
- Harding, D., Fournel-Gigleux, S., Jackson, M.R. & Burchell, B. Cloning and substrate specificity of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8381-8385.
- Haumont, M., Magdalou, J., Ziegler, J.-C., Bidault, R., Siest, J.P. & Siest, G. Immobilization of microsomes into alginate beads is a convenient method for producing glucuronides from drugs (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 440-446
- Hauser, S.C., Ziurys, J.C. & Gollan, J.L. A membrane transporter mediates access of uridine 5'-diphosphoglucuronic acid from the cytosol into the endoplasmic reticulum of rat hepatocytes : implications for glucuronidation reactions (1988), *Biochem. Biophys. Acta* **967**, 149-157
- Heirwegh, K.P.M., van de Vijver, M. & Fevery, S. Assay and properties of digitonin activated bilirubine UDP-glucuronosyltransferase from rat liver (1972), *Biochem. J.* **129**, 605-618
- Heller, J.S., Canellakis, E.S., Bussolotti, D.I. & Cowaed, J.K. Stable multisubstrate adducts as enzyme inhibitors, potent inhibition of ornithine decarboxylase by N-(5'-phosphopyridoxyl)-ornithine (1975), *Biochim. Biophys. Acta* **403**, 197-207
- Hibert, M.F., Gittos, M.W., Middlemiss, D.K., Mir, A.K. & Fozard, J.R. Graphics computer-aided receptor mapping as a predictive tool for drug design : development of potent, selective and stereospecific ligands for the 5-HT_{1A} receptor (1988), *J. Med. Chem.* **31**, 1087-1093

- Hindsgaul, O., Kaur, K.J., Srivastava, G., Blaszczyk-Thurin, M., Crawley, S.C., Heerze, L.D. & Palcic, M.M. Evaluation of deoxygenated oligosaccharide acceptor analogs as specific inhibitors of glycosyltransferases (1991), *J. Biol. Chem.* **266** (27), 17858-17862
- Ho, J. W. & Wang, J. H. Identification of the initially NBD-labeled essential tyrosine residue in bovine heart MF₁-ATPase (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **116**, 599-604.
- Hochman, Y. & Zakim, D. A comparison of the kinetic properties of two different forms of the microsomal UDP-glucuronosyltransferase (1983), *J. Biol. Chem.* **258** (7), 4143-4146
- Hoesch, R.M. & Boyer, T.D. Localization of a portion of the active site of two rat liver glutathione S-transferases using a photoaffinity label (1989), *J. Biol. Chem.* **264** (80), 17712-17716
- Hogeboom, G.H. (1955) Fractionation of cell components of animal tissues. General method for the isolation of liver cell components in *Methods in Enzymology* **1**, Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 16-19
- Holbrook, J.J. & Ingram, V.A. Ionic properties of an essential histidine residue in pig liver heart lactate dehydrogenase (1973), *Biochem. J.* **131**, 729-738
- Houk, T. W., Ovnicek, M. & Karipides, S. pH and polymerisation dependence of the site of labeling of actin by 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (1983), *J. Biol. Chem.* **258**, 5419-5423.
- Hundle, B.S., O'Brien, D.A., Alberti, M., Beyer, P. & Hearst, J.E. Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9321-9325
- Hutchinson, D.W. & Mutopo, D.S. Photoactivated covalent binding of [³H]bilirubine to human serum albumin (1979) *Biochem. J.* **181**, 779-781
- Ito, S., Hashimoto, H., Negishi, M., Suzuki, M., Koyano, H., Noyori, R. & Ichikawa, A. Identification of the prostacyclin receptor by use of (15-³H)19-(3-azidophenyl)-20-norisocarbacyclin, an irreversible specific photoaffinity probe (1992), *J. Biol. Chem.* **267** (28), 20326-20330
- Iyanagi, T., Haniu, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Shively, J.E. & Anan, K.F. Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for UDP-glucuronosyltransferase (1986), *J. Biol. Chem.* **261** (33), 15607-15614.
- Jackson, M.R. & Burchell, B. The full length coding sequence of rat liver androsterone UDP-glucuronosyltransferase cDNA and comparison with other members of this gene family (1986), *Nucleic Acids Res.* **14** (2), 779-795
- Jackson, M.R., McCarthy, L.R., Harding, D., Wilson, S., Coughtrie, M.W.H. & Burchell, B. Cloning of a human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase cDNA (1987), *Biochem. J.* **242**, 581-588.
- Janssen, G.G. & Nes W.D. Structural requirements for transformation of substrates by the S-adenosyl-L-methionine : $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase, inhibition by analogs of the transition state coordinate (1992), *J. Biol. Chem.* **267** (36), 25856-25863
- Jähnig, F. Structure predictions of membrane proteins are not that bad (1990), *Trends Biochem. Sci.* **15**, 93-95.
- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., van Tilbeurgh, H., Lasters, I., De Maeyer, M., Van Belle, D., Wodak, S. J., Lauwereys M., stanssens, P., Mrabet, N.T., Snauwaert, J.,

- Matthyssens, G. & Lambeir, A.M. Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 1. Crystallography and site-directed mutagenesis of metal binding sites (1992), *Biochemistry* **31**, 5449-5458.
- Katzenellenbogen, J.A., Johnson, H.J., Carlson, K.E. & Myers, H.N. Photoreactivity of some light-sensitive estrogen derivatives. Use of an exchange assay to determine their photointeraction with the rat uterine estrogen binding protein (1974), *Biochemistry* **13** (14), 2986-2994
- Kazuta, Y., Tagaya, M., Tanizawa, K. & Fukui, T. Probing the pyrophosphate-binding site in potato tuber UDP-glucose pyrophosphorylase with pyridoxal diphosphate (1993), *Protein Sci.* **2**, 119-125
- Kim, K.H. Quantitative structure-activity relationships of the metabolism of drugs by uridine diphosphate glucuronosyltransferase (1991), *J. Pharm. Sci.* **80** (10), 966-970
- Kim, K.H. & Martin, Y.C. Direct prediction of dissociation constants (pK_a 's) of clonidine-like imidazolines, 2-substituted imidazoles, and 1-methyl-2-substituted-imidazoles from 3D structures using a comparative molecular field analysis (CoMFA) approach (1991), *J. Med. Chem.* **34**, 2056-2060.
- Klebe, G. & Abraham, U. On the prediction of binding properties of drug molecules by comparative molecular field analysis (1993), *J. Med. Chem.* **36**, 70-80
- Kochetkov, N.K. and Shibaev, V.D. Glycosyl esters of nucleoside pyrophosphates (1973) in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 28, pp. 307-3, Tipson, R.S. and Horton, D. Eds., Academic Press
- Kim, J., Ruzicka, F. & Frey, P.A. Remodeling hexose-1-phosphate uridylyltransferase : mechanism-inspired mutation into a new enzyme, UDP-hexose synthase (1990), *Biochemistry* **29**, 10590-10593
- Kimura, T. & Owens, I.S. Mouse UDP glucuronosyltransferase : cDNA and complete amino acid sequence and regulation (1987), *Eur. J. Biochem.* **168**, 515-521.
- Kinosaki, M., Masuko, T., Sogawa, K., Iyanagi, T., Yamamoto, T., Hashimoto, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells (1993), *Cell Struct. Function* **18**, 41-51
- Koster, A. & Noordhoek, J. Kinetic properties of the rat intestinal microsomal 1-naphthol UDP-glucuronosyl transferase, inhibition by UDP and UDP-*N*-acetylglucosamine (1983), *Biochim. Biophys. Acta* **761**, 76-83
- Kubiseski, T.J., Hyndman, D.J., Morjana, N.A. & Flynn, T.G. Studies on pig muscle aldose reductase : kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding (1992), *J. Biol. Chem.* **267**, 6510-6517.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970), *Nature* **227**, 680-685
- Lambeir, A.M., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N.T., Snauwaert, J., van Tilbeurgh, H., Matthyssens, G., Lasters, I., De Maeyer, M., Wodak, S.J., Jenkins, J., Chiadmi, M. & Janin, J. Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 2. Site-directed mutagenesis of the xylose binding site (1992), *Biochemistry* **31**, 5459-5466.
- Landgraf, W., Regulla, S., Meyer, H.E. & Hofmann, F. Oxidation of cysteines activates cGMP-dependent protein kinase (1991), *J. Biol. Chem.* **266** (25), 16305-16311

- Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M. & Lancet, D. Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyltransferase (1991), *Nature* 349, 790-793
- Lee, Y.M. & Preiss, J. Covalent modification of substrate-binding sites of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase (1986), *J. Biol. Chem.* **261** (3), 1058-1064
- Leininger, B., Gherzi-Egea, J.-F., Siest, G. & Minn, A. In vivo study of the elimination from rat brain of an intracerebrally formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl- β -D-glucuronide (1991), *J. Neurochem.* **56** (4), 1163-1168
- Lewis, R.A. Autocoid and hormone receptors : rational drug design. Rational methods for site-directed drug design : novel approaches for the discovery of potential ligands (1991), *Biochem. Soc. Transactions* **19**, 883-887
- Lienhard, G. E. Transition-state analogues in Enzymes Inhibitors as Drugs. (Merton Sandler Ed), 43-51.
- Lilienblum, W., Walli, A. K. & Bock, K. W. Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents (1982), *Biochem. Pharmac.* **31**, 907-913.
- Lin, F.C., Brown, R.M., Drake, R.R., & Haley, B.E. Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (9), 4782-4784.
- Lundblad, R.L., Nesheim, M.E., Straight, D.L., Sailor, S., Bowie, J., Jenzano, J.W., Roberts, J.D. & Mann, K.G. Bovine α - and β -thrombin, reduced fibrinogen-clotting activity of β -thrombin is not a consequence of reduced affinity for fibrinogen (1984), *J. Biol. Chem.* **259** (11), 6991-6995
- MacIntosh, D.B., Woolley, D.G. & Berman, M.C. 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-8-azido-AMP and -ATP photolabel Lys-492 at the active site of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (1992), *J. Biol. Chem.* **267** (8), 5301-5309
- Mackenzie, P.I. Rat liver UDP-glucuronosyltransferase : cDNA sequence and expression of a form glucuronidating 3-hydroxyandrogens (1986^a), *J. Biol. Chem.* **261** (30), 14112-14117.
- Mackenzie, P.I. Rat liver UDP-Glucuronosyltransferase : sequence and expression of a cDNA encoding a phenobarbital-inducible form (1986^b), *J. Biol. Chem.* **261** (13), 6119-6125.
- Mackenzie, P.I. Rat liver UDP-glucuronosyltransferase : identification of cDNAs encoding two enzymes which glucuronidate testosterone, dihydrotestosterone and β -estradiol (1987), *J. Biol. Chem.* **262** (20), 9744-9749.
- Mackenzie, P.I. The cDNA sequence and expression of a variant 17 β -hydroxysteroid UDP-glucuronosyltransferase (1990), *J. Biol. Chem.* **265**, 8699-8703.
- Mackenzie, P.I. Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDP glucuronosyltransferase involved in substrate selection (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (6), 3432-3435.
- Mackenzie, P.I., Rodbourne, L. & Stranks, S. Steroid UDP glucuronosyltransferases (1992), *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43** (8), 1099-1105
- Magdalou, J., Hochman, Y. & Zakim, D. Factors modulating the catalytic specificity of a pure form of UDP-glucuronosyltransferase (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 13624-13629.

- Manning, T.A. & Wilson, J.E. Inhibition of brain hexokinase by a multisubstrate analog results from binding to a discrete regulatory site (1984), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **118** (1), 90-96
- Martyr, R.J. & Benisek, W.F. Affinity labeling of the active sites of Δ^5 -ketosteroid isomerase using photoexcited natural ligands (1973), *Biochemistry* **12** (11), 2172-2178
- Matern, H., Lappas, N. & Matern, S. Isolation and characterization of hydoxycholeic-acid : UDP-glucuronosyltransferase from human liver (1991), *Eur. J. Biochem.* **200**, 393-400.
- Mattoo, B.N. Dissociation constants of hydroxy coumarins (1958), *Trans Faraday Soc.* **54**, 19-24.
- Melchior, W.B. & Fahrney, D. Ethoxyformylation of proteins. Reaction of ethoxyformic anhydride with α -chymotrypsin, pepsin, and pancreatic ribonuclease at pH 4 (1970), *Biochemistry* **9**, 251-258.
- Melese, T., Xue, Z., Stempel, K.E. & Boyer, P.D. Catalytic properties of chloroplast F1-ATPase modified at catalytic or noncatalytic sites by 2-azido adenine nucleotides (1988), *J. Biol. Chem.* **263** (12), 5833-5840
- Meyer, E. Internal water molecules and H-bonding in biological macromolecules : a review of structural features with functional implications (1992), *Protein Sci.* **1**, 1543-1562
- Meyer, S.E. & Cromartie, T.H. Role of essential histidine residues in L- α -hydroxy acid oxidase from rat kidney (1980), *Biochemistry* **19**, 1774-1781.
- Miles, E. W. & Kumagai, H. Modification of essential histidyl residues of the β_2 subunit of tryptophan synthetase by photo-oxidation in the presence of pyridoxal 5'-phosphate and L-serine and by diethylpyrocarbonate (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 2843-2851.
- Miles, E.W. Modification of histidine by diethylpyrocarbonate (1977), *Methods Enzymol.* **47**, 431-442.
- Milla, M.E., Clairmont, C.A. & Hirschberg, C.B. Reconstitution into proteoliposomes and partial purification of the Golgi apparatus membrane UDP-galactose, UDP-xylose and UDP-glucuronic acid transport activities (1992), *J. Biol. Chem.* **267** (1), 103-107
- Mimura, C.S., Admon, A., Hurt, K.A. & Ferro-Luzzi Ames, G. The nucleotide-binding site of HisP, a membrane protein of the histidine permease : identification of amino acid residues photoaffinity labeled by 8-azido-ATP (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (32), 19535-19542
- Miners, J.O., Lillywhite, K.J., Matthews, A.P., Jones, M.E. & Birkett, D.J. Kinetic and inhibitor studies of 4-methylumbelliferone and 1-naphtol glucuronidation in human liver microsomes (1988), *Biochem. Pharmacol.* **37** (4), 665-671
- Moss, D.E. & Fahrey, D. Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources (1973), *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2696-2698
- Mölher, H., Battersby, M.K. & Richards, J.G. Benzodiazepine receptor protein identified and visualized in brain tissue by photoaffinity label (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (3), 1666-1670
- Mulder, G.J. Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs (1992), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 25-49

- Mulder, G.J., Coughtrie, M.W.H. & Burchell, B. (1990), Glucuronidation *in* Conjugation Reactions in Drug Metabolism (G.J. Mulder Ed.), 51-104, Taylor & Francis Ltd.
- Noort, D., Coughtrie, M.W.H., Burchell, B., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., van der Gen, A. & Mulder, G.J. Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase activity by possible transition-state analogues in rat-liver microsomes (1990), *Eur. J. Biochem.* **188**, 309-312.
- Noort, D., Meijer, E.A., Visser, T.J., Meerman, J.H.N., van der Marel, G.A., van Boom, G.H. & Mulder, G.J. Selective inhibition of glucuronidation by 2,2,2-triphenylethyl-UDP in isolated rat hepatocytes : conjugation of harmol, 3,3',(-triiodothyronine, and *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene (1991), *Mol. Pharmacol.* **40**, 316-320
- Oka, S., Terayama, K., Kawashima, C. & Kawasaki, T. A novel glucuronyltransferase in nervous system presumably associated with the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate epitope on glycoproteins (1992), *J. Biol. Chem.* **267** (32), 22711-22714
- Olson, G.L., Voss, M.E., Hill, D.E., Kahn, M., Madison, V.S. & Cook, C.M. Design and synthesis of a protein β -turn mimetic (1990), *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 323-333.
- Ondetti, M. A., Rubin, B. & Cushman, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzymes: new class of orally active antihypertensive agents. (1977), *Science*, **196**, 441-444.
- Ouzzine, M., Pillot, T., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Burchell, B. & Siest, G., *manuscript soumis*
- Park, I.S. & Hausinger, R. P. Site-directed mutagenesis of *Klebsiella aerogenes* urease: identification of histidine residues that appear to function in nickel ligation, substrate binding, and catalysis (1993), *Protein Sci.* **2**, 1034-1041.
- Paul, P., Lutz, T., Asborn, C., Kyosseva, S., Elbein, A., Towbin, H., Radomska, A. & Drake, R.R. Synthesis and characterisation of a new class of inhibitors of membrane associated UDP-glycosyltransferases (1993), *J. Biol. Chem.* **268**, 12933-12938.
- Pelton, P.D. & Ganzhorn, A.J. The effect of histidine modification on the activity of myo-inositol monophosphatase from bovine brain (1992), *J. Biol. Chem.* **267**, 5916-5920.
- Peters, W. H. L., Jansen, P. L. M., Cuypers, H. T. M., Abreu, R. A. & Nauta, H. Deconjugation of glucuronides catalysed by UDP-glucuronyltransferase (1986), *Biochim. Biophys. Acta.* **873**, 252-259.
- Pham, M.-A., Magdalou, J., Totis, M., Fournel-Gigleux, S., Siest, G. & Hammock, B.D. Characterization of distinct forms of cytochrome P-450, epoxide metabolizing enzymes and UDP-glucuronosyltransferases in rat skin (1989), *Biochem. Pharmacol.* **38** (13), 2187-2189
- Pillot, T., Battaglia, E., Said, M., Ziegler, J. C., Fournel-Gigleux, S., Cartier, A., Magdalou, J. & Siest, G. (1991) *in* Hepatic Metabolism and Disposition of Endo- and Xenobiotics (Bock, K. W., Gerok, W., Matern, S. and Schmid, R., Eds.), Falk Symposium 57, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 161-167.
- Planas, A., Juncosa, M., Lloberas, J. & Querol, E. Essential catalytic role of Glu¹³⁴ in endo- β -1,3-1,4-D-glucan 4-glucanohydrolase from *B. licheniformis* as determined by site-directed mutagenesis (1992), *FEBS Lett.*, **308** (2), 141-145
- Pot D.A. & Dixon J.E., Active site labeling of a receptor-like protein tyrosine phosphatase (1992) *J. Biol. Chem.*, **267** (1), 140-143

- Powers, S.P., Foo, I., Pinon, D., Klueppelberg, U.G., Hedstrom, J.F. & Miller, L.J. Use of photoaffinity probes containing poly(ethylene glycol) spacers for topographical mapping of the cholecystokinin receptor complex (1991), *Biochemistry* **30**, 676-682
- Quioco, F.A. and Vyas, N.K. Novel stereospecificity of the L-arabinose-binding protein (1984), *Nature* **310**, 381-386
- Radomska, A., Little, J., Pyrek, J.S., Drake, R.R., Igary, Y., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Burchell, B., Elbein, A.D., Siest, G. & Lester, R. A novel UDP-Glc-specific glucosyltransferase catalyzing the biosynthesis of 6-O-glucosides of bile acids in human liver microsomes (1993), *J. Biol. Chem.* **268** (20), 15127-15135
- Rao, M.L., Rao, G.S. & Breuer, H. Investigations on the kinetic properties of estrone glucuronosyltransferase from pig kidney (1976), *Biochem. Biophys. Acta* **452**, 89-100.
- Rich, D.H. & Sun, E.O. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin : effect of inhibitor structure on dissociation constant and time-dependant inhibition (1980), *Biochem. Pharmacol.* **29**, 2205-2212
- Riordan, J.F., Wacker, W.E.C. & Vallee, B.L. N-Acetylimidazole : a reagent for the determination of "free" tyrosyl residues of proteins (1965), *Biochemistry* **4** (9), 1758-1765
- Ritter, J.K., Crawford, J.M. & Owens, I.S. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells (1991^a), *J. Biol. Chem.* **266** (2), 1043-1047.
- Ritter, J.K., Sheen, Y.Y. & Owens, I.S. Cloning and expression of human liver UDP-glucuronosyltransferase in COS-1 cells : 3,4-catechol estrogens and estriol as primary substrates (1990), *J. Biol. Chem.* **265** (14), 7900-7906.
- Said, M., Noort, D., Magdalou, J., Ziegler, J. C., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Mulder, G. J. & Siest, G. Selective and potent inhibition of different hepatic UDP-glucuronyltransferase activities by ω,ω,ω -triphenylalcohols and UDP derivatives (1992), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **187**, 140-145.
- Said, M. Doctorat de l'Université de Nancy I (1993) UDP-Glucuronosyl-transférase-bilirubine : approche du site actif et du mécanisme réactionnel par la synthèse d'inhibiteurs
- Sakakibara, R., Kitajima, S. & Uyeda, K. Limited proteolysis and photoaffinity labeling with 8-azido-ATP of fructose-6-phosphate,2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase (1984), *J. Biol. Chem.* **259** (13), 8366-8371
- Sanchez, E., Del Villar, E. & Tephly, T.R. Structural requirements in the reaction of morphine uridine diphosphate glucuronyltransferase with opioid substances (1978), *Biochem. J.* **169**, 173-177
- Sanders, C. & Schneider, R. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment (1991), *Proteins* **9**, 56-68.
- Sandler, M. *Enzymes inhibitors as drugs* (1980) M. Sandler Ed., London.
- Sato, H., Koiwai, O., Tanabe, K. & Kashiwamata, S. Isolation and sequencing of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA : possible alternative splicing of a common primary transcript (1990), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **169** (1), 260-264.
- Segel, I.H. (1975) *in Enzyme Kinetics*, p.885, John Wiley & Sons, New York.

- Shepherd, S.R.P., Baird, S.J., Hallinan, T. & Burchell, B. An investigation of the transverse topology of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in rat hepatic endoplasmic reticulum (1989), *Biochem. J.* **259**, 617-620
- Shields, C. J. & Chrisope, R. D. Photochemistry of aryl azides: detection and characterisation of a dehydroazepine by time-resolved infrared spectroscopy and flash photolysis at room temperature (1987), *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 4723-4728.
- Smyth, G.E. & Colman, R.F. Cysteinyl peptides of pig heart NADP-dependent isocitrate dehydrogenase that are modified upon inactivation by N-ethylmaleimide (1991), *J. Biol. Chem.* **265** (23), 14918-14925
- Sokol, P.P., Holohan, P.D. & Ross, C.R. Essential disulfide and sulfhydryl groups for organic cation transport in renal brush-border membranes (1986) *J. Biol. Chem.* **261** (7), 3282-3287
- Stephens, C.M. & Bauerle, R. Essential cysteines in 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*, analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis of the phenylalanine-sensitive isozyme (1992), *J. Biol. Chem.* **267** (9), 5762-5767
- Street, I.P., Armstrong, C.R. & Withers, S.G. Hydrogen bonding and specificity. Fluorodeoxy sugars as probes of hydrogen bonding in the glycogen phosphorylase-glucose complex (1986), *Biochemistry* **25**, 6021-6027
- Stroop, S.D., Charbonneau, H. & Beavo J.A. Direct photolabeling of the cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (1989), *J. Biol. Chem.* **264** (15), 13718-13725
- Styczynski, P., Green, M., Puig, J., Coffman, B. & Tephly, T Purification and properties of a rat liver phenobarbital-inducible 4-hydroxybiphenyl UDP-glucuronosyltransferase (1991), *Mol. Pharmacol.* **40**, 80-84
- Sutton, R. & Ferguson S.J. The nature of the reaction of an essential tyrosine residue of bovine heart mitochondrial ATPase with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan and related compounds (1984), *Eur. J. Biochem.* **142**, 387-392
- Tainer, J.A., Roberts, V.A. & Getzoff, E.D. Protein metal-binding sites (1992), *Current Opin. Biotechnol.* **3**, 378-387
- Takahashi K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins (1968), *J. Biol. Chem.* **243** (23), 6171-6179
- Taylor, C.A., Smith, H.E. & Danzo, B.J. Photoaffinity labeling of rat androgen binding protein (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1), 234-238
- Tephly, T.R. Isolation and purification of UDP-glucuronosyltransferases (1990), *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 509-516
- Tephly, T.R. & Burchell, B. UDP-glucuronosyltransferases : a family of detoxifying enzymes (1990), *Trends Pharm. Sci.* **11**, 276-279
- Thomas, B.F., Compton, D.R., Martin, B.R., & Semus, S.F. Modeling the cannabinoid receptor : a three-dimensional quantitative structure-activity analysis (1991), *Mol. Pharmacol.* **40**, 656-665.
- Thomassin, J. & Tephly, T.R. Photoaffinity labeling of rat liver microsomal morphine UDP-glucuronosyltransferase by [³H]flunitrazepam (1990) *Mol. Pharmacol.* **38**, 294-298

- Thomassin, J., Cartier, A., Boutin, J.A., Magdalou, J., Siest, G., Costa, M.T. & Loppinet, V. In vitro evaluation of glucuronidation of monohydroxylated aglycones related to quantum chemically-calculated parameters (1987), *Eur. J. Med. Chem.* **22**, 393-402
- Tisdale, M., Kemp, S.D., Parry, N.R. & Larder, B.A. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5653-5656
- Todd, M.J. & Hausinger, R.P. Competitive inhibitors of *Klebsiella aerogenes* urease (1989), *J. Biol. Chem.*, **264** (27), 15835-15842
- Tomme, P., Chauvaux, S., Béguin, P., Millet, J., Aubert, J.-P. & Claeysens, M. Identification of a histidyl residue in the active center of endoglucanase D from *Clostridium thermocellum* (1991), *J. Biol. Chem.* **266** (16), 10313-10318
- Topham, C.M. & Dalziel, K. Chemical modification of sheep-liver 6-phosphogluconate dehydrogenase by diethylpyrocarbonate (1986), *Eur. J. Biochem.* **155**, 87-94
- Tukey, R.H., Pendurthi, U.R. & Nguyen, N.T. Cloning and characterization of rabbit liver UDP-glucuronosyltransferase cDNAs (1993), *J. Biol. Chem.* **268** (20), 15260-15266
- van de Rijn, I. & Drake, R.R. Analysis of the streptococcal hyaluronic acid synthase complex using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-glucuronic acid (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**(34), 24302-24306
- van Tilbeurgh, H., Jenkins, J., Chiadmi, M., Janin, J., Wodak, S.J., Mrabet, N.T. & Lambeir, A.M. Protein engineering of xylose (glucose) isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. 3. Changing metal specificity and the pH profil by site-directed mutagenesis (1992), *Biochemistry* **31**, 5467-5471.
- Vanstapel, F. & Blanckaert, N. Topology and regulation of bilirubin UDP-glucuronyltransferase in sealed native microsomes from rat liver (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, **263** (1), 216-225
- Verburg, J. G., Smith, C. E., Lisek, C. A. & Huynh, Q. K. Identification of an essential tyrosine residue in catalytic site of a chitinase isolated from *Zea mays* that is selectively modified during inactivation with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**(6), 2886-2893.
- Vessey, D.A. & Zakim, D. Regulation of microsomal enzymes by phospholipids, kinetic studies of hepatic uridine diphosphate-glucuronyltransferase (1972), *J. Biol. Chem.* **247** (10), 3023-3028
- Wang, A.I., Grogan, D.W. & Cronan, J.E. Jr Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli* : deduced amino acid sequence, purification, and studies of the enzyme active site (1992), *Biochemistry* **31**, 11020-11028
- Wang, R.W., Kari, P.H., Lu, Y.H., Thomas, P.E., Guengerich, F.P. & Vyas, K.P. Biotransformation of lovastatin. IV. Identification of cytochrome P450 3A proteins as the major enzymes responsible for the oxidative metabolism of lovastatin in rat and human liver microsomes (1991), *Arch. Biochem. Biophys.* **290** (2), 355-361
- Wells, I. & Marnett, L.J. Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthase by N-acetylimidazole : comparison to acetylation by aspirin (1992), *Biochemistry* **31**, 9520-9525
- Winsnes, A. The effects of sulfhydryl reacting agents on hepatic UDP-glucuronyltransferase *in vitro* (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **242**, 549-559.

Yang, I.-Y., Slusher, R.M., Broom, A.D., Ueda, T. & Cheng, Y.-C. A pyrimidine-based "flexible" bisubstrate analogue inhibitor of human thymidylate synthase (1988), *J. Med. Chem.* **31**, 2126-2132

Yokota, H. & Yuasa, A. Increase of a form of UDP-glucuronyltransferase glucuroniding various phenolic xenobiotics and the corresponding translatable mRNA in 3-methylcholantrene-treated rat liver (1990), *J. Biochem.* **107**, 92-96

Yokota, H. & Yuasa, A. Activation and stabilization of UDP-glucuronosyltransferase by lysophosphatidylcholine (1992), *J. Biochem.* **112**, 309-313

Yokota, H., Yuasa, A. & Sato, R. Topological disposition of UDP-glucuronyltransferase in rat liver microsomes (1992), *J. Biochem.* **112**, 309-313.

Zakim, D, Goldenberg, J. & Vessey, D.A. Effects of metals on the properties of hepatic microsomal uridine diphosphate glucuronyltransferase (1973), *Biochemistry* **12**, 4068-4074.

Zakim, D. & Dannenberg, A.J. How does the microsomal membrane regulate UDP-glucuronosyltransferase ? (1992), *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1385-1393

Zakim, D., Cantor, M. & Eibl, H.J. Phospholipids and UDP-glucuronosyltransferase. Structure/function relationships (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 5164-5169

Zakim, D., Hochman, Y. & Kenney, W.C. Evidence for an active site arginine in UDP-glucuronosyltransferase (1983), *J. Biol. Chem.* **258** (10), 6430-6434

Zhang, X., Tsai, A.-L. & Kulmacz, R.J. Chemical modification of prostaglandin H synthase with diethyl pyrocarbonate (1992), *Biochemistry* **31**, 2528-2538



publications

Publication n°1

(acceptée dans *Falk Symposium*)

18

Design of inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase chemically related to arylcarboxylic acids

T. PILLOT, E. BATTAGLIA, M. SAID, J. C. ZIEGLER, S. FOURNEL-GIGLEUX, A. CARTIER, J. MAGDALOU and G. SIEST

INTRODUCTION

Glucuronidation is one of the major routes of elimination from the body of drugs and other potentially toxic endogenous compounds such as bilirubin. The reaction is mediated by the membrane-bound UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT, EC 2.4.1.17), which corresponds to a family of isoenzymes, each presenting a narrow specificity toward chemically related substrates^{1,2}. UDPGT catalyses the binding of glucuronic acid to a large variety of compounds which possess a hydroxyl-, carboxyl-, sulphhydryl- or amino group, leading to more polar metabolites (glucuronides) easily excreted into urine or bile.

Until now the investigation of the physicochemical and molecular properties of UDPGT has not followed the same successful development compared to cytochromes P450. Among the reasons, the lack of selective inhibitors as tools to elucidate the spatial organization of the active site and the type of amino acids involved in the catalysis slowed the understanding of the structure and function of the protein.

However, in 1985 we reported for the first time that triphenylacetic acid competitively inhibited bilirubin UDPGT in rat liver microsomes with an apparent K_i of $96 \mu\text{mol/l}$ ^{3,4}. The UDP derivatives of these molecules developed as transition-state analogues were shown to exhibit good inhibitory potency⁵. On the other hand, Tephly's group recently described the use of flunitrazepam to specifically label the active site of morphine UDPGT⁶.

This chapter describes the inhibitory potency of several new compounds structurally related to arylcarboxylic acids on UDPGT. Their potential usefulness in the modelling of the enzyme active site is discussed.

MATERIAL AND METHODS

Chemical synthesis of inhibitors

Compounds chemically related to triphenylacetic acid (3,3,3-triphenylpropanoic, 4,4,4-triphenylbutanoic-, 5,5,5-triphenylpentanoic-, 6,6,6-triphenylhexanoic-, 7,7,7-triphenylheptanoic, 8,8,8-triphenyloctanoic- and 9,9,9-triphenylnonanoic) were synthesized as previously reported^{4,7}.

Triphenylmethyl and triphenylsilylether of glycol derivatives were synthesized as follows. To a stirred mixture of mono-, di- or triethylene glycol (0.1 mol) and triethylamine (0.03 mol) in anhydrous dichloromethane (50 ml) was added a solution of triphenylmethyl- or triphenylsilylchloride (0.02 mol) in 10 ml tetrahydrofuran at 0°C. The progress of the reaction was monitored by thin-layer chromatography with ethyl ether-petroleum ether 50:50 v/v as the developing solvent mixture. The excess of glycol was removed with water. The organic phase was washed with HCl 1.2 N and saturated sodium chloride, and dried in vacuum. The resulting white powder was purified by chromatography on silica gel. The final yield ranged from 50% to 67%. The [¹H]NMR spectra were in accordance with the proposed structures.

Molecular modelling

The molecular geometry of inhibitors has been optimized with the GEOMOS programme⁸, using the semi-empirical MNDO hypothesis⁹.

Preparation of the enzyme fraction and inhibition of UDPGT

Male Wistar rats weighing 180–200 g (St Germain l'Arbresle, France) were kept in an environmentally controlled room (24°C, 12-h light cycle). Liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation at 4°C according to Hogeboom¹⁰. Their protein content was measured by the technique of Bradford¹¹, with bovine serum albumin as standard. Bilirubin glucuronidation was assayed by the method of Heirwegh *et al.*¹².

The concentration in inhibitors ranged from 0 (control) to 1 mmol/l. Controls were used to represent 100% enzyme activity. I₅₀ values were determined using the linear portion of the inhibition curve and calculated by least-squares regression analysis. The apparent K_i was determined by varying both the concentration of bilirubin and inhibitors, whereas that of UDP-glucuronic acid was kept constant at 5 mmol/l.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to determine which part of the triphenylacetic acid molecule was important to competitively inhibit bilirubin UDPGT, a series of compounds was tested in which either the number of phenyl rings varied or the terminal carboxyl group was modified (Table 1). Diphenyl- and phenylacetic acid (or

INHIBITORS OF UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE

Table 1 *In vitro* effect of different arylcarboxylic acids and related compounds on bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in rat liver microsomes

| Compounds | <i>Bilirubin glucuronidation</i> (nmol/min per mg protein) |
|-----------|---|
| Control | 0.81 ± 0.05 |
| 1 | 0.40 ± 0.05 |
| 2 | 0.82 ± 0.03 |
| 3 | 0.81 ± 0.05 |
| 4 | 0.75 ± 0.03 |
| 5 | 0.77 ± 0.06 |
| 6 | 0.78 ± 0.05 |

Microsomes activated by digitonin were incubated in presence of 2.25 mmol/l UDP-glucuronic acid, 0.125 mmol/l bilirubin, and 1 mmol/l tested compounds added in 20 μ l dimethylsulphoxide, just before bilirubin. Data represent the means \pm SD for duplicate assays performed on two batches of microsomes: 1, triphenylacetic acid; 2, triphenylmethane; 3, triphenylmethanol; 4, biphenylacetic acid; 5, phenylacetic acid; 6, 9-anthracene carboxylic acid

fatty acids, results not shown) did not significantly decrease bilirubin glucuronidation. Similarly, triphenylmethane or triphenylmethanol were ineffective in that respect (Table 1). Finally, when the triphenyl part was replaced by the flat structure 9-anthracene carboxylic acid, no inhibition was observed either. These results clearly define the characteristic features of an inhibitor of bilirubin UDPGT: the simultaneous presence of a bulky hydrophobic moiety and of an ionic carboxyl group.

In order to increase the inhibitory potency of triphenylacetic acid, other structurally related compounds were synthesized in which both the triphenyl part and the carboxyl group were maintained. A series of structures, which possessed an increasing number of methylene groups in between, was prepared and tested as inhibitors of bilirubin UDPGT (Figure 1). The value of apparent K_i decreased as the lateral chain length increased. A minimal value was obtained for five methylene groups found in 7,7,7-triphenylheptanoic acid. The apparent K_i (12 μ mol/l) in rat liver microsomes was about 10 times lower than that of 3,3,3-triphenylacetic acid. Determination of the type of inhibition revealed that, except for 9,9,9-triphenylnonanoic acid, all the other compounds of this series competitively inhibited bilirubin glucuronidation⁷.

On the purified rat liver bilirubin UDPGT, 7,7,7-triphenylheptanoic acid also inhibited the enzyme in a competitive fashion ($K_i = 1.6 \mu$ mol/l), i.e. 7.5 times lower than the K_i value for the microsomal activity⁷.

This study suggested that the binding site of bilirubin should possess both a large hydrophobic pocket able to contain the triphenyl moiety and a region able to bind the end-terminal ionized carboxylic acid. The optimal distance between these two parts apparently corresponds to five methylene groups.

In order to go further in more detail on the spatial organization of the active site, other inhibitors have been designed and synthesized in which the triphenyl moiety, the nature of the hydrocarbon chain and the carboxyl group have been successfully modified (Figure 2).

Substitution of the triphenyl group of fluorenyl-, adamantane, indene- or the positively charged triphenylphosphonium moiety led to non-effective

HEPATIC ENDO- AND XENOBIOTIC METABOLISM

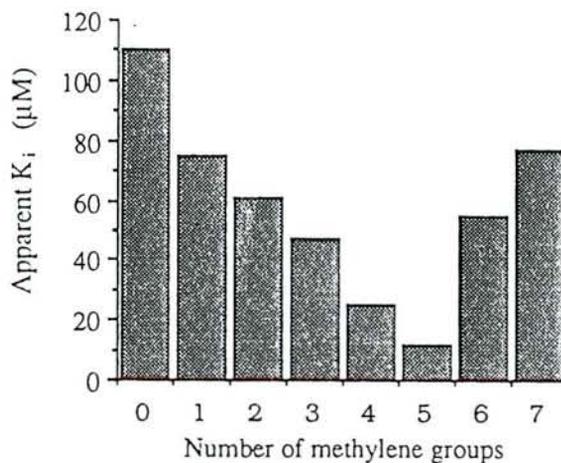


Figure 1 Inhibition of microsomal bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity by analogues of triphenylacetic acid of increasing chain length. The activity was measured on fully activated microsomes by digitonin. The apparent K_i values were calculated using five concentrations of inhibitors for six different concentrations of bilirubin (0.01–0.14 mmol/l) at a saturating concentration of UDP-glucuronic acid of 5 mmol/l. The number of methylene groups corresponds to 0, triphenylacetic acid; 1, 3,3,3-triphenylpropanoic acid; 2, 4,4,4-triphenylbutanoic acid; 3, 5,5,5-triphenylpentanoic acid; 4, 6,6,6-triphenylhexanoic acid; 5, 7,7,7-triphenylheptanoic acid; 6, 8,8,8-triphenyloctanoic acid; 7, 9,9,9-triphenylnonanoic acid

inhibitors. By contrast, potent inhibitors of bilirubin UDPGT were obtained when a triphenylsilyl-, ter-butyl-diphenylsilyl-, or tribenzylsilyl group was introduced (Table 2).

On the other hand, when the lateral chain was composed of ethylene glycol or polyethylene glycol parts, good inhibitors were obtained (Table 2). Substitution of the carbon atom linked to the three phenyl rings by silicon did not significantly affect the inhibitory potency. The best structures (triphenylmethyldiethylene glycol, triphenylsilylmethyldiethylene glycol) corresponded, like 7,7,7-triphenylheptanoic acid, to a 7-atom (carbon and oxygen) chain length, and presented I_{50} values similar to those found for this model inhibitor (190–170 $\mu\text{mol/l}$) (Figure 3). When the chain length was shortened (monoethylene glycol) or increased (triethylene glycol), the inhibitory potency was decreased (Table 2, Figure 3).

The molecular modelling of 7,7,7-triphenylheptanoic acid, triphenyldi- and triethylene glycols in three-dimensional representation (Figure 3) reveals that the total length, width and height of these molecules were quite similar (about 1.6 nm). A reason why the triethylene glycol derivative had the lowest inhibitory potency could be due to the bend of the lateral chain, which should partially exclude the compound from the active site of UDPGT. Other inhibitors, especially photoaffinity labels, are tested in order to determine the amino acids which belong to the substrate binding site.

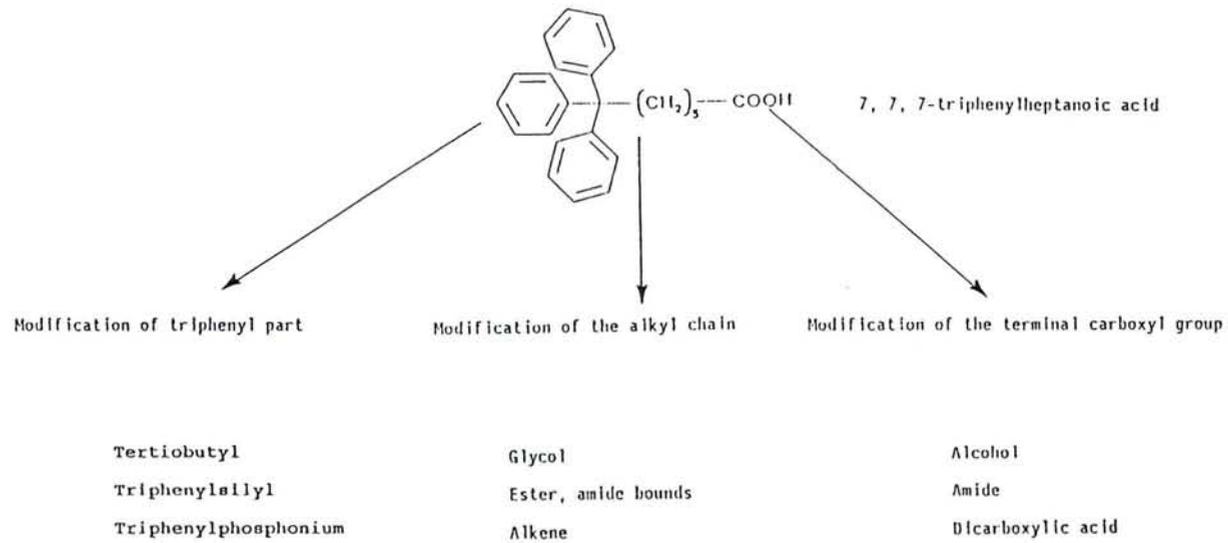


Figure 2 Design of new inhibitors of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase structurally related to 7,7,7-triphenylheptanoic acid

HEPATIC ENDO- AND XENOBIOTIC METABOLISM

Table 2 Inhibitory potency of structures chemically related to 7,7,7-triphenylheptanoic acid on bilirubin UDP-glucuronosyltransferase

| Compounds | I_{50} (mmol/l) |
|--|-------------------|
| 7,7,7-Triphenylheptanoic acid | 0.21 |
| Triphenylmethylethylene glycol | 0.25 |
| Triphenylmethyldiethylene glycol | 0.19 |
| Triphenylmethyltriethylene glycol | 0.88 |
| Triphenylsilylethylene glycol | 0.29 |
| Triphenylsilyldiethylene glycol | 0.17 |
| Tribenzylsilyldiethylene glycol | 0.45 |
| <i>tert</i> -Butyldiphenylsilyldiethylene glycol | 0.15 |

The putative inhibitors (10^{-6} – 10^{-3}) were added in $10 \mu\text{l}$ of dimethylsulphoxide 2 min before addition of bilirubin. The fraction was gently vortexed and incubated for 20 min at 37°C . Controls without inhibitors were always run to represent 100% enzyme activity. I_{50} values were determined using the linear portion of the inhibition curve and calculated by least-squares regression analysis

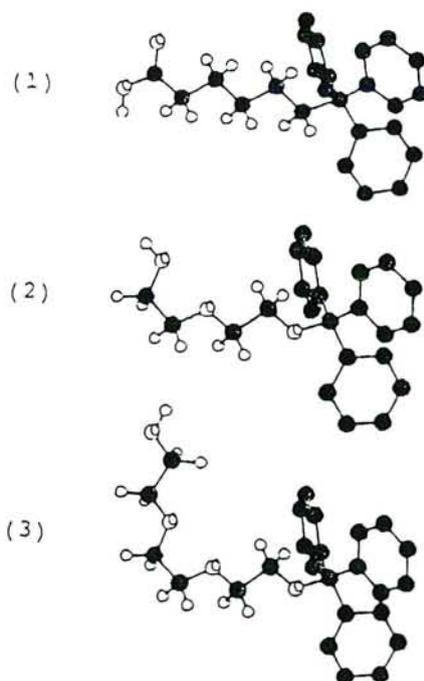


Figure 3 Molecular modelling of inhibitors: 1, 7,7,7-triphenylheptanoic acid; 2, triphenylmethyldiethylene glycol; 3, triphenylmethyltriethylene glycol. The black circles indicate carbon atoms

INHIBITORS OF UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE

Acknowledgements

The expert technical assistance of Mrs C. Lafaurie is gratefully acknowledged. S.F.G. wishes to thank Professor B. Burchell (Dundee, UK) for his help in performing the experiments on purified UDPGT in his laboratory. This work was supported by a grant from CNRS (URA no. 597).

References

1. Siest, G., Antoine, B., Fournel, S., Magdalou, J. and Thomassin, J. (1987). The glucuronosyltransferase: what progress can pharmacologists expect from molecular biology and cellular enzymology? *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 983-9
2. Burchell, B. and Coughtrie, M. W. H. (1989). UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol. Ther.*, **43**, 261-89
3. Fournel, S., Magdalou, J., Thomassin, J., Villoutreix, J., Siest, G., Caldwell, J. and André, J. C. (1985). Structure-dependent induction of bilirubin glucuronidation and lauric acid hydroxylation by arylcarboxylic acids chemically related to clofibrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **842**, 202-13
4. Fournel, S., Grégoire, B., Magdalou, J., Carré, M. C., Lafaurie, C., Siest, G. and Caubère, P. (1986). Inhibition of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity by triphenylacetic acid and related compounds. *Biochim. Biophys. Acta*, **883**, 190-6
5. Noort, D., Coughtrie, M. W. H., Burchell, B., Van der Marel, G. A., Van Boom, J. H., Van der Gen, A. and Mulder, G. J. (1990). Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase activity by possible transition-state analogues in rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, **188**, 309-12
6. Thomassin, J. and Tephly, T. R. (1990). Photoaffinity labelling of rat liver microsomal morphine UDP-glucuronosyltransferase by [³H]flunitrazepam. *Mol. Pharmacol.*, **38**, 294-8
7. Fournel-Gigleux, S., Shepherd, S. R. P., Carré, M. C., Burchell, B., Siest, G. and Caubère, P. (1989). Novel inhibitors and substrates of bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase: aryl-alkylcarboxylic acids. *Eur. J. Biochem.*, **183**, 653-9
8. Rinaldi, D., Hoggan, P. E. and Cartier, A. (1989). GEOMOS: semi-empirical SCF system for dealing with solvent effects and solid surface adsorption. *Quantum Chemistry Exchange Programme*, **9** (Vol. 9), p. 128
9. Dewar, M. J. S. and Thiel, W. (1977). Ground state of molecules (38). 1 - The MNDO method approximation and parameter. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4899-917
10. Hogeboom, G. H. (1955). Fractionation of cell component of animal tissues. General method for the isolation of liver cell components. In Colonic, S. P. and Kaplan, N. O. (eds), *Methods in Enzymology*, vol. 1 (New York: Academic Press), pp. 16-19
11. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54
12. Heirwegh, K. P. M., Van der Vijver, M. and Fevery, J. (1972). Assay and properties of digitonin activated bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase activities. *Biochem. J.*, **129**, 605-11

Publication n°2

(en préparation pour *Biochem. Biophys. Acta*)

**Characterization of a new class of inhibitors of a recombinant
human liver UDP-glucuronosyltransferase, UGT1*6**

Eric Battaglia**, **Abdelaziz Ellass¶**, **Richard R. Drake‡**, ***Pascal Paul***, **Susan Treat‡**, **Jacques Magdalou****, **Sylvie Fournel-Gigleux****, **Thierry Pillot****, **Mohamed Ouzzine****, **Gérard Siest****, **Gérard Vergoten¶**, **Roger Lester‡**, and **Anna Radomska‡§**.

From the **Centre du Medicament, URA CNRS 597, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 54000 Nancy, France; Departments of ‡Internal Medicine and ‡*Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas 72205, *Pharmaceutical Research Laboratories, Ciba-Geigy Ltd., R-1065.3.07, 4002 Basel, Switzerland; and ¶INSERM U 279, Institut Pasteur, 59019 Lille, France.

§To whom correspondence and reprints should be addressed. Tel: 501-686-5414; Fax: 501-686-6248.

Running title: Novel inhibitors of UGT1*6

The inhibitory effect of a series of novel structurally related compounds on the human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*₆ stably expressed in a V79 cell line was investigated. The inhibitors contain a lipophilic *N*-acyl phenylaminoalcohol residue and a uridine moiety connected by a spacer varying for each compound. The effects of these compounds on the inhibition of photoaffinity labeling of the protein by [β -³²P]5-azido-UDP-glucuronic acid, and that of the glucuronidation reaction measured with 4-methylumbelliferone as substrate were determined. Only two compounds, PP36 and PP56B, showed weak or no inhibition of the photoaffinity labeling. When enzymatic glucuronidation of 4-methylumbelliferone was studied, the best inhibitor of the series, PP56B, had an IC₅₀ of 39.5 μ M. With PP56B, low K_i values were found toward both UDP-glucuronic acid and 4-methylumbelliferone (17 and 21 μ M respectively) and the inhibition was competitive towards both substrates. A similar strong inhibitory effect was observed with two other inhibitors, PP37 and PP37P, which also exhibited pure competitive inhibition toward both UDP-glucuronic acid and 4-methylumbelliferone. Another compound, PP50B, showed a pure competitive inhibition towards UDP-glucuronic acid, but a non-competitive inhibition towards the acceptor substrate. Molecular modeling of the inhibitors showed that PP56B and PP37P could be closely superimposed with a structure built of SYBYL on the basis of the hypothetical transition state. These data provide evidence that some of these compounds may be possible transition state analog inhibitors of the recombinant UGT1*₆ enzyme.

In the past few years, several specific inhibitors of the UDP-glucuronosyltransferases (EC 2.4.1.17; UGT¹) have been developed. Triphenylacetic acid and chemically related compounds (1) were found to be potent inhibitors of rat and human liver bilirubin-UGT. A series of active site-directed derivatives related to alkanolic and arylalkanoic acids (2) was thereafter synthesized and tested. Recently, other powerful compounds (triphenylmethyl glycol derivatives) were synthesized and characterized in order to probe the bilirubin-UGT binding site (3). UDP-derivatives of arylcarboxylic acids and of various substrates have been found to behave as possible transition-state inhibitors (4). Two compounds, 2-(1-naphthyl)ethyl-UDP and 2,2,2-(triphenyl)ethyl-UDP, could inhibit, in a competitive way, the rat liver microsomal enzyme with respect to both UDP-glucuronic acid (UDP-GlcUA) and 4-nitrophenol. Finally, a series of chemically related ω,ω,ω -triphenylalcohols and corresponding ω,ω,ω -triphenylalkyl-UDP derivatives were found to be powerful and selective inhibitors of different UGTs, including recombinant human and rat liver isoforms, whose cDNAs have been expressed in V79 cells (5).

In previous studies, a series of novel active-site directed inhibitors (6) (Fig. 1) were evaluated in relation to the structural requirements and the specificity of the inhibition of UGTs in rat liver microsomes using [β -³²P]5-azido-UDP-glucuronic acid ([β -³²P]5N₃-UDP-GlcUA) and [β -³²P]5-azido-UDP-glucose ([β -³²P]5N₃-UDP-Glc) photoaffinity analogs. In rat, the microsomal UGT proteins (50-56 kDa) could be photolabeled with both probes. The photo-incorporation of these probes was reduced with some inhibitors of this series, suggesting that they could compete with the probe at the UDP-GlcUA binding site. One compound, PP50B, was a competitive inhibitor of UGT isoforms that glucuronidate lithocholic acid on the 3-hydroxyl or the carboxyl group².

In the present study, the inhibitory effect of these compounds on a human UGT isoenzyme has been evaluated. In order to overcome the difficulties associated with the purification of UGTs in an active form from human liver and in sufficient amounts for such a study, the work was performed on a recombinant cell line expressing a single active form

of UGT, UGT1^{*6} (7), an enzyme which presents a restricted specificity towards 1-naphthol, 4-methylumbelliferone (4-MU) and other planar and short phenols. The type of inhibition generated towards the acceptor substrate, 4-MU, and the cosubstrate, UDP-GlcUA, binding sites was investigated. Experiments were performed in order to determine the ability of these inhibitors to act as possible transition-state analogs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

4-MU (free acid), 4-MU β -D-glucuronide, and UDP-GlcUA (ammonium salt) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other reagents were of analytical grade. [β -³²P]5N₃-UDP-GlcUA was synthesized and purified as previously described (8), using [³²P]P_i from ICN. The inhibitors PP36: 5'-[[N-(2-decanoylamino-3-hydroxy-3-phenyl-propyloxycarbonyl)glycyl]amino]-5'-deoxyuridine; PP37P: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-hydroxy-3-phenyl-propyloxycarbonyl]amino]sulfonyl]-2',3'-O-isopropylideneuridine; PP37: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-hydroxy-3-phenyl-propyloxycarbonyl]amino]sulfonyl]uridine; PP50: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-phenyl-propyloxycarbonyl]amino]sulfonyl]-2',3'-O-isopropylideneuridine; and PP55: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-phenyl-propyloxycarbonyl]amino]sulfonyl]uridine were synthesized as described in (6). The synthesis of PP56: 5'-O-[[2-decanoyl-3-phenyl-propyloxycarbonyl)methyl]sulfonyl]uridine has been described separately ².

*Preparation of specific anti-UGT1^{*6} antibodies* - Monospecific polyclonal antibodies raised in sheep against the 120 N-terminal amino-acids of UGT1^{*6} were used for the identification of this protein in recombinant V79 cells ³.

Cell culture and transfection - The recombinant human enzyme UGT1^{*6} was stably expressed in a eukaryotic V79 cell line, as described by (7), with the following modifications: the *Hind*III fragment for the initial PKCRH2-HP1 plasmid (9) was inserted into the multiple cloning site of the pcDNA I expression vector (Invitrogen, San Diego, USA). 20 μ g of the recombinant plasmid were co-transfected with 4 μ g of SFV neo vector, kindly provided by Dr. H. Garoff of the EMBL (Heidelberg, Germany), on semi-

confluent cells on 10 mm-diameter dishes in the presence of Transfectam^R (IBF, Villeneuve-la-Garenne, France) according to the suppliers' recommendations. 24h later, the cultures were split 1:10 and placed in selection medium (G418, Sigma, 1 mg/ml). Thirty resistant colonies were isolated, amplified and screened for maximal UGT activity.

Membrane fraction preparation - An enriched membrane fraction was prepared from cells harvested three days after replating and treated with 2 mM sodium butyrate (Sigma) for the last 24 h of culture. The cell pellets, obtained from one hundred 90 mm-diameter dishes by centrifugation at 5,000 g for 10 min, were resuspended in 60 ml of 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.4), and subjected to 3 x 10 sec sonication (Ultrasons-Annemasse S.A., 60 Watts). The homogenate was then centrifuged at 6,500 g for 10 min and the resulting supernatant was centrifuged at 100,000 g for 60 min. The membrane pellet was homogenized in about 10 ml of the same buffer, and frozen at -80°C. Protein concentration was measured according to (10) using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

Photoaffinity labeling with [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA - Enriched membrane fractions (50 μ g protein) of the V79 cell line expressing recombinant human UGT1*6 were incubated in 250 mM HEPES (pH 7.0) containing 12.5 mM MgCl₂, for 5 min at room temperature in the presence of 150 and 300 μ M inhibitors. [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA (2-5 mCi/ μ mol) was then added (final concentration: 40 μ M) and the mixture was allowed to equilibrate for 1 min, prior to UV-irradiation with a hand-held lamp (UVP-11, 254 nm, Ultraviolet Products, Inc.) for 90 sec at room temperature. Reactions were terminated and processed by SDS-PAGE as previously described (11). Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (12), which were then dried before being subjected to autoradiography for 1-2 days. In some cases, the separated proteins were transferred from the gel to nitrocellulose and Western blot analysis was performed by the method of Towbin *et al* (13). Blotted proteins were then examined by using the monospecific polyclonal antibody to UGT1*6 described above. The percentage of photo-incorporation was

determined by densitometry using a Zeineh video densitometer (Biomed Instruments).

*UGT1*6 activity* - Glucuronidation of 4-MU was assayed according to (14), with the following modifications. Ethyl acetate was used instead of chloroform as solvent for the extraction of the unconjugated aglycone. The reaction was initiated by the addition of UDP-GlcUA (5 mM final concentration) to 3 μ g of enriched membrane fractions and incubated at 37°C for 35 min in 0.125 M Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM MgCl₂, 1 mM 4-MU in a total volume of 200 μ l in presence or absence of inhibitors. All inhibitors were solubilized at various concentrations in a fixed volume of dimethyl sulfoxide (Me₂SO; 7% v/v), which was shown not to affect the initial specific activity (results not shown). The reaction was stopped by addition of 800 μ l ice-cold water and mixed with ethyl acetate (4 ml) and, after 10 min centrifugation at 1000 g, 200 μ l of the aqueous phase were added to 1.8 ml of 0.25 M glycine-NaOH (pH 10.3). The fluorescence of 4-MU- β -D-glucuronide was measured at 20°C using excitation and emission wavelengths of 320 and 380 nm, respectively, on a Perkin-Elmer LS-5 spectrofluorimeter. Quantitation was achieved using a concentration range of 0 to 10 nmoles of authentic 4-MU- β -D-glucuronide standard. IC₅₀ values were determined from the linear part of the semi-logarithmic plot of inhibition data obtained under the assay conditions described above. Each point corresponded to the mean of three measurements, and IC₅₀ were the mean value of two independent experiments. For the determination of the kinetic parameters, K_m 's were determined using initial glucuronidation rates and experiments to establish K_i were carried out with at least four different concentrations of inhibitor, using varying concentrations of UDP-GlcUA (0.5-5 mM) for a fixed saturating concentration of 4-MU (1 mM), and various concentrations of 4-MU (0.1-1 mM) for a fixed saturating concentration of UDP-GlcUA (5 mM). Apparent K_i were determined from the slope (competitive inhibition) or the intercept (non-competitive inhibition) of the Lineweaver-Burk plot as a function of the concentration from the analysis of the experimental data by the Enzyme Kinetics program (Trinity Software). Rate, defined as a specific activity, was expressed in nmoles/min x mg protein.

Molecular modeling - Modeling of the inhibitors was performed with the SYBYL molecular modeling system, version 5.5 (Tripos associates, St Louis, MO) on a PS 350 graphics terminal (Evans and Sutherland, USA). Calculations were carried out on a VAX 6320 computer (Digital Equipment Corporation, USA). Energy minimization was obtained by using the MAXIMIN 2 program with its Tripos force field (15). Conformational analysis was carried out by the SEARCH subroutine by fixing a 30-deg increment to the torsion angles and the selected conformations were minimized again. Atom charges were obtained from the Modified Neglected of Differential Overlap Method (16).

RESULTS

Structures of the inhibitors - The inhibitors previously detailed² (6), and used in the present study, contain a lipophilic *N*-acyl phenylaminoalcohol and a hydrophilic uridine moiety connected by a spacer arm varying for each compound (Fig 1). The PP36 compound is characterized by a [(methoxy)carbonyl]glycylamide spacer. PP37, PP55A, PP55B and their isopropylideneuridine forms (PP37P, PP50A and PP50B) contain a [[(methoxy)carbonyl]amino]sulfonyl spacer. PP37 and PP36 compounds possess two chiral centers in the phenylaminoalcohol moiety bearing the secondary hydroxyl and the amino groups. Their stereochemistry was not characterized and they were tested as a mixture of isomers. PP55A was derived from *L*-phenylalaninol; PP55B as well as PP56B were derived from *D*-phenylalaninol and, thus, are stereochemically pure. PP56B contained [(methyl)sulfonyl]uridine as a bridge.

Photolabeling and identification of the UGT1^{}6 protein* - The photoaffinity probe [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA, previously used for the labeling of the microsomal UGTs (8, 17), was tested on the human recombinant UGT1^{*}6 expressed in V79 cells (7). Figure 2A shows the photoaffinity labeling by [β -³²P]5N₃-UDP-GlcUA of membrane fractions of non-transfected (lanes 1, 2) and transfected (lanes 3, 4) cells as revealed by autoradiography of a representative Western blot. The non-transfected V79 cells showed

no photo-incorporation of [β - 32 P]5N₃UDP-GlcUA in the area of the molecular mass corresponding to UGT1*₆ (54 kDa) nor any visible immunoreactive band of UGT protein as revealed by Western blot analysis (Fig. 2B, lanes 1 and 2). In contrast, two protein bands, in the area of 54 kDa, were photolabeled with the probe in transfected cells (Fig. 2A). The photoaffinity labeling was fully protected by 0.3 mM UDP-GlcUA (Fig. 2A, lane 4) and the two radioactive bands corresponded to the immunoreactive proteins revealed by the Western blot (Fig. 2B, lanes 3 and 4). The UDP-glucose: dolichylphosphate glycosyltransferase (GPDS), with a molecular weight of about 37 kDa, was also extensively labeled by the same photoaffinity probe; the labeling was also fully protected by UDP-GlcUA, but the polypeptide was not recognized by the antibodies (Fig. 2B).

Photoaffinity labeling in the presence of inhibitors - Photoaffinity experiments with [β - 32 P]5N₃UDP-GlcUA were performed on enriched membrane fractions of transfected cells in the presence of 150 and 300 μ M inhibitors and 40 μ M probe (Fig. 3A and 3B). PP56B and PP36 did not show any significant dose-dependent modification of the photo-incorporation of the probe in the area of the UGT1*₆, even at the highest concentration (84 and 99 % incorporation respectively). All other compounds produced a dose-dependent decrease of the photo-incorporation. PP37 had the most potent protective effect, producing a 84% decrease in the incorporation of radioactivity at 150 μ M and a 87% decrease at 300 μ M. The isopropylideneuridine form of PP37, PP37P, inhibited the labeling by 23% at a concentration of 150 μ M, and by 69% at 300 μ M. With PP50, protection against photo-incorporation of the probe at a concentration of 300 μ M was observed with no detectable difference in the inhibitory effect between the A and B stereoisomers (83% for both). The inhibitors PP55A and PP55B, (the uridine, or unprotected, forms of PP50), were slightly less effective at the same concentration (300 μ M), with 71% and 82% inhibition respectively.

Kinetic characterization of the uridinyl-derived inhibitors - We verified that the inhibitors were not hydrolyzed by serine proteases and/or esterases under the experimental

conditions. Indeed, preincubation of the membrane fractions with 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride for 30 min, at room temperature, did not affect the inhibitory potency of the compounds (results not shown). In order to determine the inhibitory potency of the compounds, they were tested on the enzymatic glucuronidation of 4-MU by UGT1^{*6}. IC₅₀ values for each inhibitor were determined graphically and are summarized in Table I. The isopropylideneuridine (protected) forms of the inhibitors generally showed a higher inhibitory potency than the corresponding unprotected compounds (uridine forms). Thus, the inhibition of UGT1^{*6} activity by PP37P was slightly greater than that produced by PP37 (IC₅₀ values of 136 and 188 μM, respectively) and PP50B was a much more potent inhibitor (IC₅₀ value of 67 μM) than PP55B (IC₅₀ value of 182 μM). Similarly, the IC₅₀ value for PP50A was 80 μM, and that for PP55A was 358 μM. As concerns the PP50, inhibitors corresponding to the two isomers of phenylalanine, the inhibition was strong but not stereoselective since no significant difference in IC₅₀ values was found between PP50A and PP50B compounds. In contrast, a stereoselective inhibition was observed when the effects of PP55B and PP55A compounds were compared (IC₅₀ values of 182 and 358 μM, respectively).

In order to further characterize the inhibitors, apparent K_i values and the corresponding type of inhibition towards UDP-GlcUA and 4-MU were determined. The enzyme followed classical Michaelis-Menten kinetics with apparent K_m values of 120 ± 5 μM for 4-MU, 411 ± 39 μM for UDP-GlcUA, and apparent V_{max} of 64 ± 9 nmoles/min x mg protein for both substrates. PP50B produced an inhibition which was competitive toward UDP-GlcUA and non competitive toward 4-MU, with similar apparent K_i , 10 and 11 μM, respectively (Table I and Fig. 5). PP37 competitively inhibited both binding sites, with an apparent K_i of 23 μM for the UDP-GlcUA site and 99 μM for the aglycone site (Table I and Fig. 4). For the protected form of PP37, PP37P, the apparent K_i 's were 25 μM for UDP-GlcUA, and 31 μM for 4-MU. PP56B presented inhibition constants in the same range, with an apparent K_i of 17 μM for 4-MU and 21 μM for UDP-GlcUA.

Surprisingly, as indicated in Fig 2, lanes 8 and 9, PP56, shown above to be a potent inhibitor of enzymatic activity, did not exhibit any significant protective effect on the photolabeling under our experimental conditions. Two possible explanations could account for these observations: (i) PP56B could act as an irreversible inhibitor affecting the enzymatic assay but not the binding of the photoaffinity probe; (ii) the inhibitor could bind to the active site slowly, so that, under our experimental conditions, photoaffinity labeling would not be impaired in the presence of the inhibitor. In order to establish whether or not the inhibitor was acting irreversibly, enriched membrane fractions of recombinant V79 cells (1.3 mg of protein/ml) were incubated with 100 μ M PP56B in Me₂SO for 0 to 40 min at 37°C. Aliquots were withdrawn at various time points, diluted 60 fold, and assayed for glucuronidation of 4-MU. No inhibition of the activity was observed between 0 to 40 min pre-incubation of the inhibitor with the enriched membrane fractions (Table II). At the same time, a control experiment in which proteins were preincubated with Me₂SO showed that the enzyme activity was stable under these conditions (results not shown). In addition, a photoaffinity labeling experiment with [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA was performed with PP56B to ascertain whether the inhibition was time dependent. This inhibitor was preincubated with 50 μ g protein for various time periods (0-40 minutes) at 37°C before photoactivation of the probe. No decrease in the photo-incorporation of the radioactivity was observed under these conditions (Table II).

Molecular modeling - On the basis of the hypothetical existence of the transition state species postulated by Noort *et al.* (4), which assumes a direct transfer of the aglycone onto the C1 atom of UDP-GlcUA, a transition state analog of the 4-MU glucuronidation reaction was modeled and the lowest energy conformer obtained is shown in Fig.4A and 4B. A possible similarity between our transition-state inhibitors and the above described transition-state analog was evaluated by superimposition of lowest energy conformations of two inhibitors described in this work, PP56B and PP55A, respectively the best and the worst inhibitors, as far as IC₅₀ values were concerned. Since some of those compounds

characterized were competitive towards both 4-MU and UDP-GlcUA, we assumed that the superimposition could reasonably be performed by superimposing the uridine part of both structures and the phenyl ring of the inhibitors tested in this work with that of 4-MU in the transition state analog previously described. Fig.4 reveals that the phenyl and ribofuranose moieties of the two transition state analogs could be partially superimposed in the case of PP56B (Fig. 4A), whereas the superimposition was not optimal in the case of PP55A (Fig. 4B). Torsion angles τ_1 and τ_2 in the various spacers separating the phenyl ring and the uridine moiety of the inhibitors are indicated in Table III. The values of the two angles differed between inhibitors. In particular, the values of the two angles were highly different between PP55A and PP56B, respectively the best and the worst inhibitors as estimated by IC₅₀ values.

DISCUSSION

The aim of this study was to characterize the active site and catalytic mechanism of UGT1*6, an isoform conjugating planar and short phenol derivatives, using novel UDP-GlcUA-active site directed inhibitors, some of them being putative transition-state analogs. For this purpose, a new approach was developed based on the combination of the use of a single isoform expressed in eukaryotic cells and photoaffinity labeling. The photoaffinity labeling technique was primarily used for the characterization of the recombinant protein and preliminary screening of the inhibitory potencies of the novel inhibitors towards the UDP-GlcUA-binding site alone as opposed to their effect of catalytic activity, in which the aglycone binding site is also involved.

As presented in Figure 2, the recombinant UGT1*6 protein, when compared to the microsomal enzyme (8, 17), was also efficiently labeled by the photoaffinity probe and was fully protected by UDP-GlcUA against photolabeling. Therefore, this isoform was a suitable model for the study of the effect of the new inhibitors on the photo-incorporation of [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA into UGT1*6. On Western blot (Fig. 2B), two radiolabeled polypeptides with an apparent molecular mass of approximately 54 kDa corresponding to

the UGT1^{*6} enzyme were identified. The same observation has been reported previously (7, 9). To date, it is unclear whether these two bands correspond to a differential processing of the mRNAs or to a differential maturation of the same polypeptide. The GPDS was also photolabeled in these conditions and extensively protected by UDP-GlcUA (Fig. 2A). The effect of these inhibitors on the GPDS has been described elsewhere (6). The potential inhibitory effect of the compounds on the photoaffinity labeling of the UGT1^{*6} isoenzyme was subsequently estimated. Among the eight compounds considered, PP36 and PP56B did not show any significant inhibitory effect. The other inhibitors exhibited a concentration-dependent decrease in photoincorporation. A concentration of 150 μ M (Fig. 3A and 3B) was sufficient, in most cases, to significantly decrease the incorporation of [β -³²P]5N₃UDP-GlcUA into UGT1^{*6}.

A more detailed characterization of the inhibitors was elaborated using enzymatic glucuronidation assays which involve both UDP-GlcUA and aglycone. This approach was used for the estimation of the kinetic constants and mode of inhibition for the recombinant protein in the presence of the inhibitors.

The inhibitory potency of all available inhibitors was analyzed with the recombinant enzyme and, on the basis of the IC₅₀ data, four inhibitors were selected for a detailed enzymatic study (Table I). On the basis of these kinetic analyses, the compounds could be divided into two classes: PP50B represented a first class which did not show the same type of inhibition for the aglycone and UDP-GlcUA. The mode of inhibition was competitive for UDP-GlcUA, but non-competitive for the acceptor substrate, suggesting that the inhibitor could not optimally interact with the 4-MU binding site. A second class, including PP37, PP37P, and PP56B, corresponded to inhibitors showing a competitive mode of inhibition towards the binding of both 4-MU and UDP-GlcUA, supporting a random order mechanism of substrate binding (18). In this class, PP37P and PP56B presented a similar apparent K_i for both 4-MU and UDP-GlcUA, whereas the apparent K_m 's of the recombinant enzyme for 4-MU and UDP-GlcUA were significantly different.

This result suggests that the inhibitors bind at one single site overlapping both donor and acceptor sites. The inhibitors combine structural features of both substrates and/or reaction products: both the uridine moiety of UDP-GlcUA and the phenyl moiety of the acceptor substrate are part of the structure. The glucuronidation reaction for phenolic compounds has been described as following a possible S_N2 mechanism (19), proceeding via a ternary complex of enzyme-UDP-GlcUA-aglycone. Thus, PP37P and PP56B are likely to probe the transition state since a high energy intermediate can be ruled out from the postulated mechanism of glucuronidation.

As concerns PP37, the K_i values versus UDP-GlcUA and 4-MU were not comparable (Table I). Its behavior as a transition-state analog is uncertain, although the inhibition mode was found to be competitive toward both 4-MU and UDP-GlcUA.

Of the series of inhibitors tested, PP56B appeared to be the best inhibitor of enzymatic glucuronidation. It had an even stronger inhibitory effect than the compounds containing a protected uridine (PP37P, PP50A and PP50B). Unfortunately, the protected form of this inhibitor was not available for characterization. Interestingly, PP56B did not significantly affect the photoincorporation of $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDP-GlcUA}$, and no concentration-dependent effect was observed under the experimental conditions. Moreover, the compound behaved as a competitive inhibitor toward both the UDP-GlcUA and 4-MU binding sites (Table I). Preincubation of PP56B with enriched membrane fractions at 37°C for up to 30 min did not affect the binding of $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDP-GlcUA}$ to UGT1*6, thus excluding a slow binding process for this inhibitor (Table II). Furthermore, preincubation of PP56B at 100 μM concentration, which under standard assay conditions should result in 100% inhibition, with enriched membrane fractions for various times, followed by dilution reducing the inhibitor concentration to an ineffective level, did not affect the glucuronidation of 4-MU, therefore excluding an irreversible binding process in which inhibition would have remained even after dilution. This indicates that the inhibition of UGT1*6 activity by PP56B is reversible and not time dependent.

Molecular modeling was used to confirm the postulated transition state described by Noort (4). Assuming a direct transfer of aglycone to UDP-GlcUA, a transition state analog was accordingly built on SYBYL; the lowest energy conformer was selected and compared with the structures of PP56B and PP55A. Figure 6A shows the superimposition of PP56B inhibitor with the model of the postulated transition state analog of the 4-MU glucuronidation reaction. Uridine and the [[(methoxy)carbonyl]methyl]sulfonyl linker mimicking the diphosphate bond (20) and the lipophilic *N*-acyl phenylaminoalcohol moiety, a part of which should be related to 4-MU in the transition state (Fig. 6), present some common structural features with the hypothetical transient species schematized by Noort et al. (4), as shown in Fig. 6A. Thus, PP56B closely superimposed with a part of the transition-state analog built according to the presumed mechanism for the glucuronidation reaction, further suggesting a direct transfer of the aglycone onto the C1 atom of UDP-GlcUA. Similarly, a close superimposition was observed with PP37P (not shown). On the other hand, the weak inhibitor, PP55A, failed to superimpose closely with the same model (Fig. 6B). Either conformation or charge repartition plays an essential role in the inhibition of enzymes by transition-state analogs. In our case, the presence of the NH group in the spacer for all the compounds, except PP56B, could be responsible for the differential inhibitory effect observed between PP55A and PP56B. Thus, the decrease in inhibitory effect (IC₅₀ value of 358 μM for PP55A versus 39.5 μM for PP56B) could be explained by a less favorable geometry and/or charge repartition of the transient intermediate analog due to resonance in the spacer. In the case of PP55A, the conformations of the spacer would be more constrained and it could give a typical charge repartition, as described in Fig. 7, which cannot be observed with PP56B, since NH is replaced by CH₂. Conformational studies have thus shown that torsion angles τ_1 and τ_2 in the spacer arm between the uridine moiety and the phenyl ring (Table III) are essential for the positioning and orientation of the uridine and phenyl rings and the alkyl chain, as illustrated in Fig 6A and 6B for PP56B and PP55A inhibitors. Simply stated, PP56B

conformed more closely to the structure of the hypothetical transition state analog than did PP55A and, therefore, should be the better inhibitor. This prediction is borne out by the enzymatic studies presented and the results provide support for the existence of the postulated transition state as part of the glucuronidation mechanism.

Interestingly, on the basis of the IC_{50} values, compounds with the isopropylideneuridine moiety (protected form) were better inhibitors than the corresponding unprotected form even though the unprotected compounds resemble the uridine part of UDP-GlcUA more closely than the protected structures. Several explanations could account for this observation. First, increasing the lipophilicity of the inhibitors could facilitate the access of these compounds to the active site of this membrane-bound enzyme. Second, this also would suggest that the active site of the enzyme in the transition state possesses hydrophobic properties. The lower inhibitory potency of the protected compounds with a hydroxyl function located in position R, (PP37P versus PP50A and B, Fig. 1) suggests that the presence of the hydroxyl group does not provide a favorable interaction with the enzyme. This could be due to the higher hydrophilic properties of these compounds and explained, as discussed above, by the essential role of the hydrophobic properties of the inhibitors for the binding into the active site of this enzyme.

Whether the hydrophobic properties of the active site during the transition state could facilitate the release of the hydrophilic UDP and glucuronide from the active site upon the enzyme reaction cannot be ruled out. Moreover, a conformational change upon catalysis is likely to occur since the hybridization of the C1 atom of UDP-GlcUA is changed during the nucleophilic attack of the aglycone on this atom, which could induce the release of the reaction products from the active site. Interestingly, protection of the uridine moiety of in PP37 did not significantly affect the apparent K_I for UDP-GlcUA (23 μ M for PP37, 25 μ M for PP37P), while the apparent K_I for 4-MU was decreased by the introduction of a protected uridine moiety, suggesting that the modification of the uridine part by introduction of an isopropylideneuridine moiety could affect the interaction of the 4-

MU with its binding site. Previous studies have shown ligand-induced changes in the affinity of pig liver UGTs and also that most of the free binding energy could be provided by the UDP part of the cosubstrate (21). Our results suggest, additionally, that the interaction of the uridine moiety with the enzyme could be the driving force for a conformational change affecting the aglycone site, due to hydrophobic interactions in the uridine binding site.

The data presented suggest that the active site of the UGT1*6 isoform can predominantly bind ligands during the transition state through hydrophobic interactions. A direct transfer of 4-MU onto the C1 atom of UDP-GlcUA is likely to be the catalytic mechanism of the glucuronidation reaction supported by the UGT1*6 isoenzyme, in agreement with Noort (4). Hydrophobic interactions between the uridine part of the inhibitors and the active site could be responsible for a conformational change increasing the affinity for the aglycone. The glucuronic acid moiety does not seem to be essential for the binding to the active site, in accordance with previous observations about transition state analogs (4) and UDP-GlcUA (21); the latter authors suggested that most of the binding energy of the cosubstrate could be provided by UDP. Since phosphate is not present in these inhibitors, it should be emphasized that it is the uridine moiety of UDP which is essential to their action. It is well established that ligand-receptor binding is essentially due to hydrophobic interactions, while electrostatic interactions and hydrogen bonding are more involved in ligand binding specificity (22). It is not known whether the presence of a glucuronic acid moiety correctly located on a similar structure would greatly increase the inhibitory potency and/or specificity. This should be of particular interest when considering the postulated model of the transition state.

In conclusion, kinetic analyses and molecular modeling have provided evidence for PP55B being a transition state analog of the UGT1*6 enzyme.

Footnotes:

*This work was supported in part by NIH grants DK-38678 (to A.R.), HD-14198 (to R.L.), and grants from INSERM N° 920308 (J.M.) and Institut des Biotechnologies (J.M.) and DRED (E.B.).

§To whom correspondence should be addressed.

¹The abbreviations used are:

[$\beta^{32}\text{P}$]5-N₃ UDP-GlcUA, [$\beta^{32}\text{P}$]5-azido-UDP-glucuronic acid; UDP-GlcUA, UDP-glucuronic acid; 4-MU, 4-methylumbelliferone; GPDS, UDP-glucose: dolichylphosphate glycosyltransferase. PP36: 5'-[[N-(2-decanoylamino-3-hydroxy-3-phenyl-propyloxycarbonyl)glycyl]amino]-5'-deoxyuridine; PP37P: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-hydroxy-3-phenyl-propyloxycarbonyl)amino]sulfonyl]-2',3'-O-isopropylideneuridine; PP37: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-hydroxy-3-phenyl-propyloxycarbonyl)amino]sulfonyl]uridine; PP50: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-phenyl-propyloxycarbonyl)amino]sulfonyl]-2',3'-O-isopropylideneuridine; PP55: 5'-O-[[2-decanoylamino-3-phenyl-propyloxycarbonyl)amino]sulfonyl]uridine; PP56: 5'-O-[[2-decanoyl-3-phenyl-propyloxycarbonyl)methylsulfonyl] uridine.

² Radomska, A., Paul P, Treat S, Towbin H, Pratt C, Little J, Magdalou J, Elbein A, Lester R, and Drake R. Photoaffinity labeling for evaluation of uridinyl analogs as specific inhibitors of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferases. (in preparation).

³ 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*. (submitted).

Acknowledgments

We wish to thank Joanna Little for her critical evaluation of this manuscript.

Figure legends

Figure 1. *Structures of the inhibitors.*

Figure 2. *Western blot analysis of membrane fractions of non-transfected and transfected V79 cells after photoaffinity labeling with [β - 32 P]5N₃UDP-GlcUA. A,* Autoradiogram photolabeled proteins from non-transfected V79 cells and from cells expressing recombinant UGT1*₆. B, Western blot with specific sheep anti N-terminal UGT1*₆ antibody. 50 μ g of human recombinant UGT1*₆ membrane fractions were photolabeled with 40 μ M [β - 32 P]5N₃UDP-GlcUA as described in *Experimental Procedures*. For the protection experiments, samples (lanes 2 and 4) were preincubated with 0.3 mM UDP-GlcUA for 10 min on ice before photolabeling. For A and B, lanes 1 and 2, V79 control membrane fractions; lanes 3 and 4, membrane fractions of V79 cells expressing the human UGT1*₆.

Figure 3. *Effect of uridinyI-derived inhibitors on the photoaffinity labeling of the human recombinant UGT1*₆ with [β - 32 P]5N₃UDP-GlcUA.* Experiments were performed as described in *Experimental Procedures* with 50 μ g of enriched membrane fractions of recombinant V79 cells expressing the human UGT1*₆ and 40 μ M [β - 32 P]-5N₃-UDP-GlcUA. Two concentrations of the inhibitors (150 μ M and 300 μ M) were used. A. PP36, PP37, PP37P and PP50A; B. PP50B, PP55A, PP55B and PP56B.

Figure 4 A and B. Plot of K_m (from Lineweaver-Burk plots) versus PP37 concentration demonstrating in both cases competitive inhibition of 4-MU glucuronidation by PP37. Human recombinant UGT1*6 enriched membrane fractions were assayed for 4-MU-UGT activity at (A) varying concentrations of aglycone (0.1-1.0 mM), in fixed concentration of UDP-GlcUA (5.0 mM), and (B) varying concentration of UDP-GlcUA (0.5-5.0 mM), and fixed concentration of 4-MU (1.0 mM) in the presence of different concentrations (0.14, 0.16, 0.18 and 0.2 mM) of PP37 as described under "Experimental Procedures". Each point represents the average value obtained from three determinations. Velocity is expressed as nmol of glucuronides formed/min/mg of protein.

Figure 5 A and B. Plot of the intercept of the $1/V$ axis from the Lineweaver-Burk plots versus PP50B concentration demonstrating non-competitive (with respect to 4-MU) and competitive inhibitions (with respect to UDP-GlcUA) of 4-MU glucuronidation by PP50B inhibitor. Human recombinant UGT1*6 enriched membrane fractions were assayed for 4-MU UGT activity at (A) varying concentrations of aglycone (0.1-1.0 mM), fixed concentration UDP-GlcUA (5.0 mM), and (B) varying concentration of UDP-GlcUA (0.5-5.0 mM) at fixed concentration of 4-MU (1.0 mM) in the presence of different concentrations (0.04, 0.05, 0.06 and 0.07 mM) of PP50B as described under "Experimental Procedures". Each point represents the average value obtained from three determinations. Velocity is expressed as nmol of glucuronides formed/min/mg of protein.

Figure 6. *Superimposition of a putative transition state analog (shown in green) of the 4-MU glucuronidation reaction by UGT1^{*}6 with PP56B (A) and PP55A (B) inhibitors. Structures were built on a PS350 graphic station (Evans and Sutherland, USA) and calculations were performed on a VAX 6320 computer (Digital Equipment Corporation, USA), using the SYBYL program (Tripos Associates, St. Louis, MO).*

Figure 7. *Structure and charge repartition of the [(methoxycarbonyl)amino]sulfonyl spacer.*

TABLE I

IC₅₀ values and kinetic characterization of the inhibition of the glucuronidation catalyzed by the human recombinant UGT1*6 isoform. Values were obtained as described in *Experimental Procedures*. ND: not determined.

| Inhibitor | IC ₅₀ (μ M) | UDP-GlcUA | | 4-MU | |
|-----------|--------------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | | K_i app (μ M) | Inhibition type | K_i app (μ M) | Inhibition type |
| PP37 | 188.0 \pm 4.9 | 23 | competitive | 99 | competitive |
| PP37P | 136.0 \pm 20.0 | 25 | competitive | 31 | competitive |
| PP50A | 80.0 \pm 10.0 | ND | ND | ND | ND |
| PP50B | 67.0 \pm 9.9 | 10 | competitive | 16 | noncompetitive |
| PP55A | 358.0 \pm 25.0 | ND | ND | ND | ND |
| PP55B | 182.0 \pm 3.5 | ND | ND | ND | ND |
| PP56B | 39.5 \pm 6.4 | 17 | competitive | 21 | competitive |

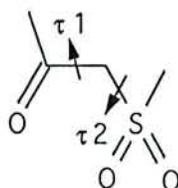
TABLE II

*Effect of preincubation with PP56B on the enzymatic activity of the human recombinant UGT1*6 and on photoincorporation of [β - 32 P]5N $_3$ UDP-GlcUA .* For the study of the reversibility of the inhibition on the human recombinant UGT1*6 by PP56B, enriched membrane fractions were incubated with 100 μ M PP56B, diluted and assayed for the glucuronidation of 4-MU as described in the text. Activities were related to control experiments with Me $_2$ SO alone and the data shown are the means of triplicate measurements. For photoaffinity labeling experiments, proteins (50 μ g) from enriched membrane fractions of V79 cells expressing the enzyme were preincubated with 300 μ M of PP56B and photoaffinity labeling with [β - 32 P]5N $_3$ UDP-GlcUA was performed at 37°C as described in *Experimental Procedures*. Photoincorporation of the probe was related to controls without PP56B.

| Preincubation time (min) | Relative UGT1*6 activity | Relative photoincorporation |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 0 | 1.00 | 0.91 |
| 10 | 0.95 | 1.02 |
| 20 | 0.99 | 0.84 |
| 30 | 0.96 | 1.07 |
| 40 | 0.99 | 0.93 |

TABLE III

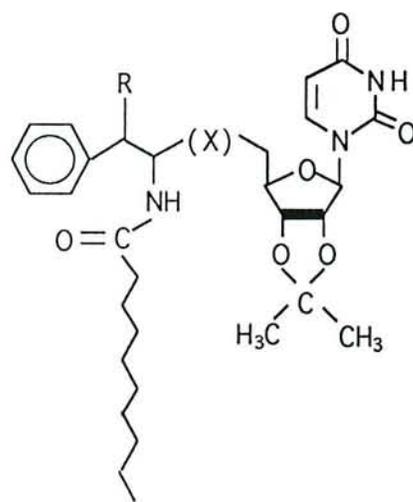
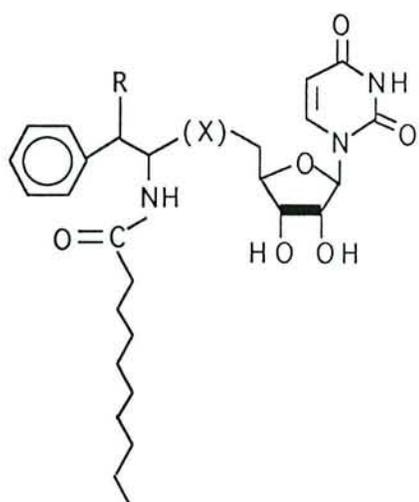
Comparison of the torsion angles τ_1 and τ_2 in the spacer of the inhibitors. The angles, defined as described in the following scheme, were determined on modeled inhibitors as described in *Experimental Procedures*. ^a Range of τ_1 and τ_2 values for PP37 and PP37P inhibitors, when analyzed as a mixture of four isomers for both (see Fig. 1 and *Results*).



τ_1 : S-C(N)-C-O

τ_2 : O-S-C(N)-C

| inhibitor | τ_1 (deg) | τ_2 (deg) |
|-----------|------------------------|------------------------|
| PP 37 | 14.1-15 ^a | 20.1-29.8 ^a |
| PP 37P | 13.7-17.7 ^a | 25.2-36.1 ^a |
| PP 50A | 20.9 | 31.7 |
| PP 55A | -7.6 | 35.9 |
| PP 55B | 15.8 | 13.2 |
| PP 56B | 42.6 | -43.5 |



PP36: R=OH, X= -CH₂O-CO-NH-CH₂-CO-NH-

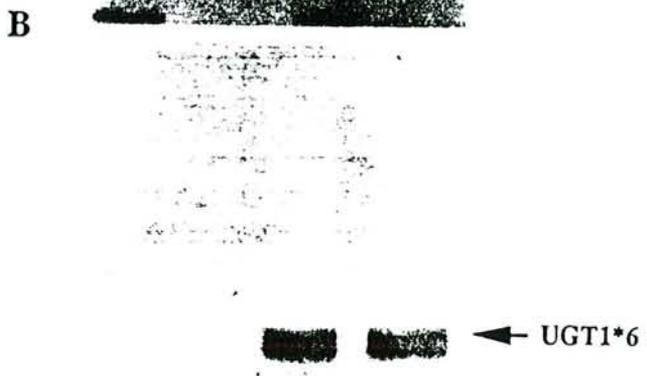
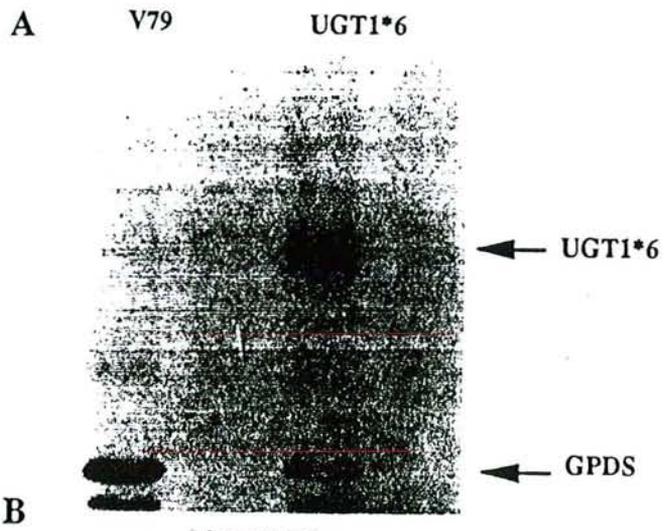
PP37: R=OH, X= -CH₂O-CO-NH-SO₂-O-

PP55A,PP55B: R=H, X= -CH₂O-CO-NH-SO₂-O-

PP56B: R=H, X= -CH₂O-CO-CH₂-SO₂-O-

PP37P: R=OH, X= -CH₂O-CO-NH-SO₂-O-

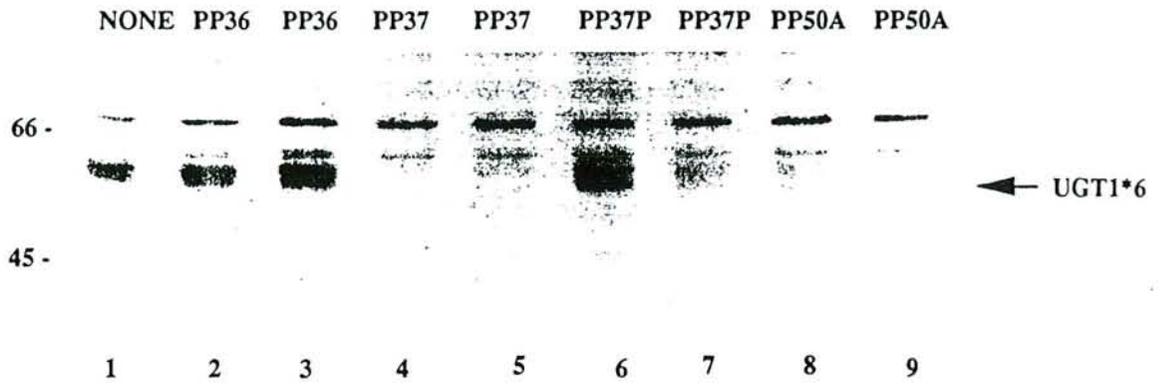
PP50A,PP50B: R=H, X= -CH₂O-CO-NH-SO₂-O-



| | | | |
|----------------|----------|----------|----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| - | + | - | + |
| cold UDP-GlcUA | | | |

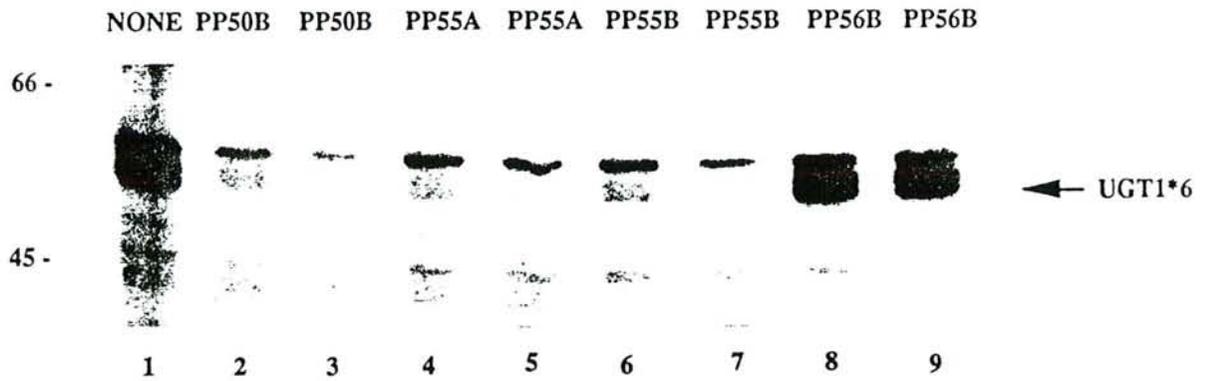
A

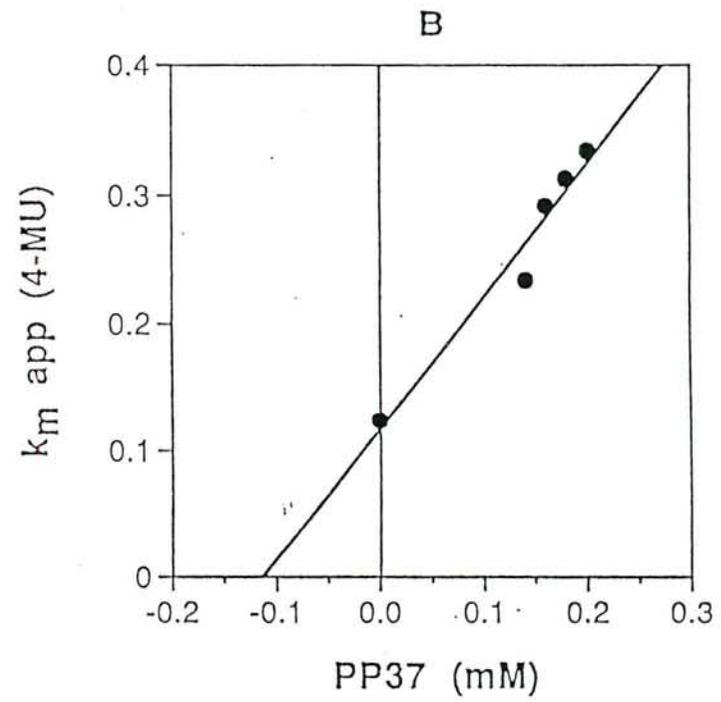
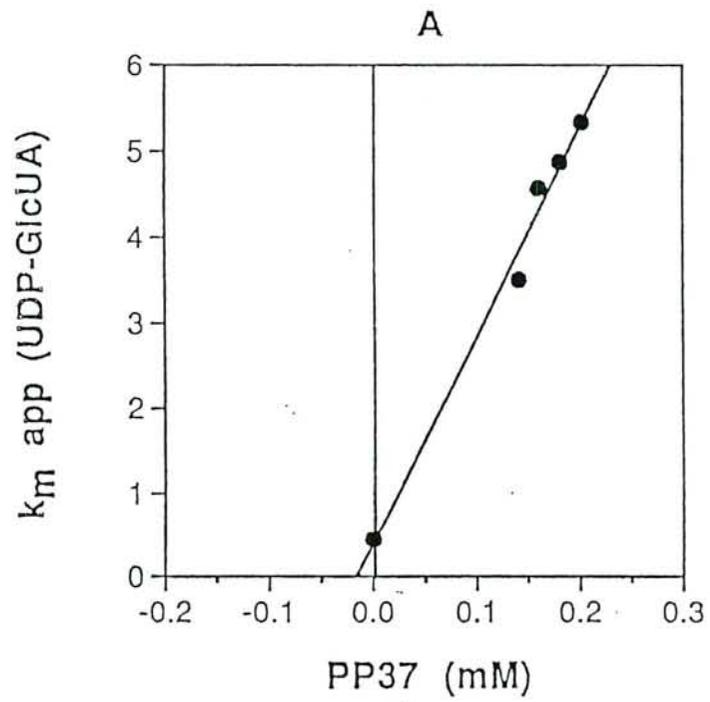
INHIBITORS



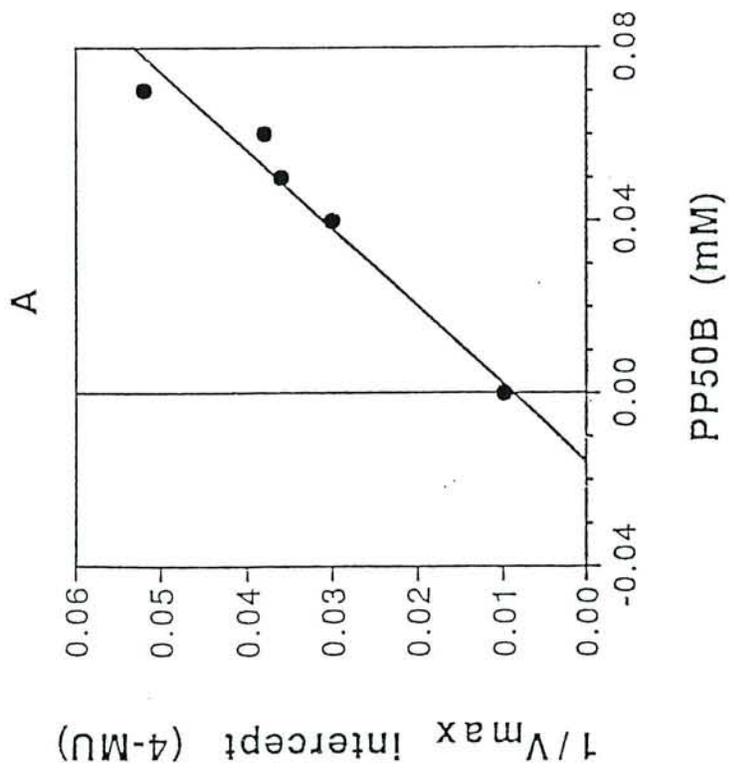
B

INHIBITORS

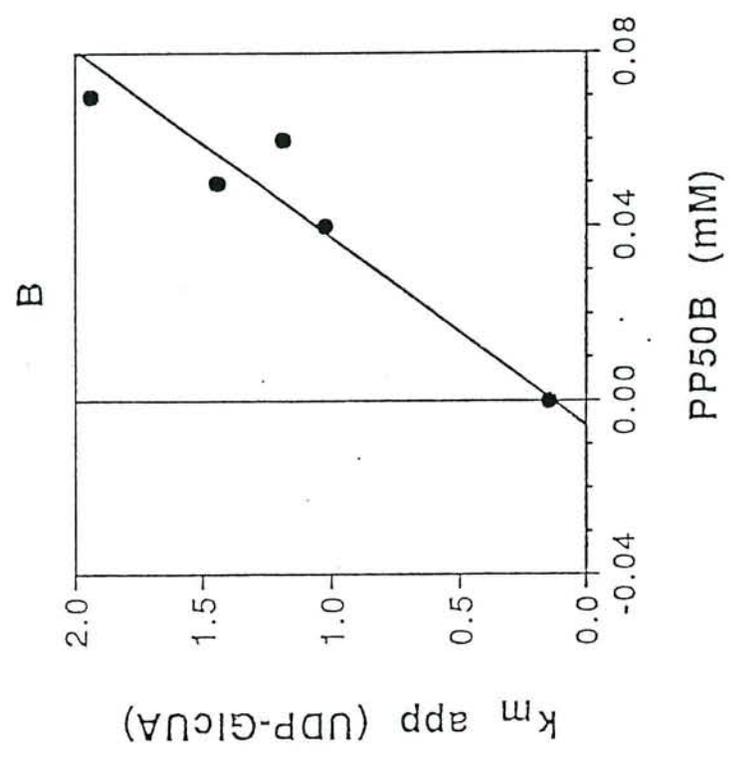




$$k_m \text{ app} = (k_m/k_i)[I] + k_m$$

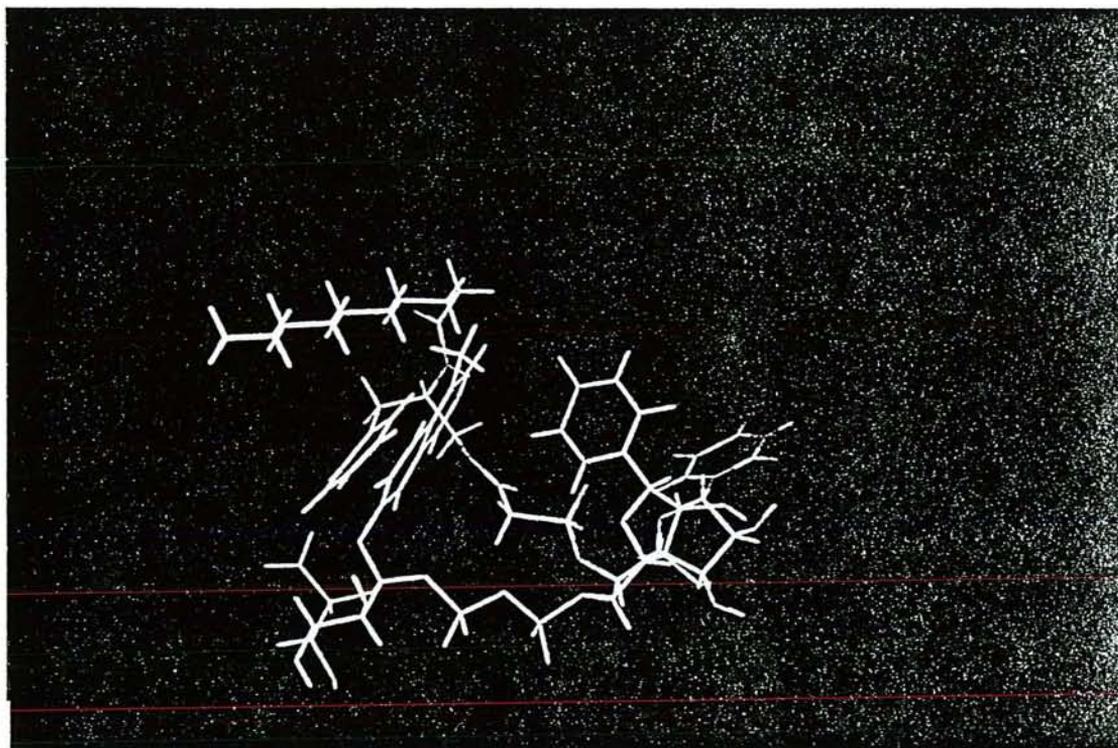


$$1/V_{\max} \text{ intercept} = (1/V_{\max} \times K_i)[I] + 1/V_{\max}$$

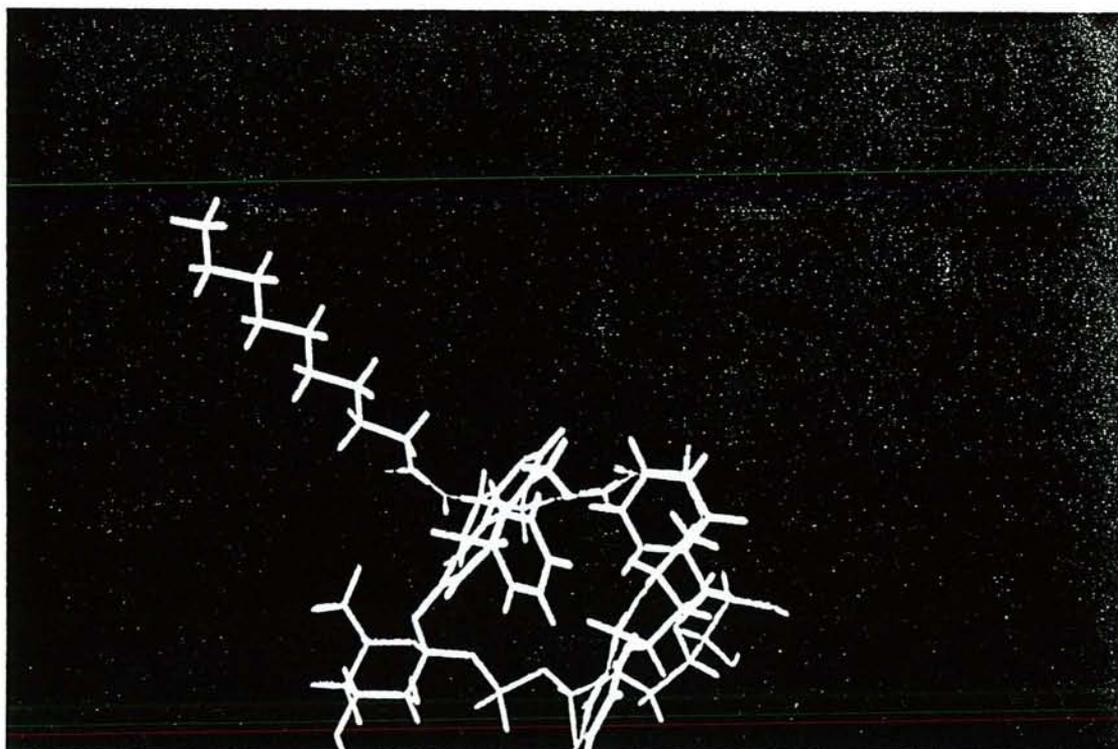


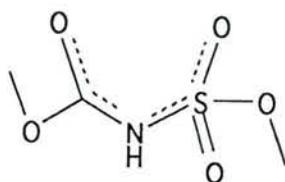
$$k_m \text{ app} = (k_m/k_i)[I] + k_m$$

A



B





References

1. Fournel, S., Gregoire, B., Magdalou, J., Carre, M. C., Lafaurie, C., Siest, G. and Caubere, P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 190-196
2. Fournel-Gigleux, S., Shepherd, S. R. P., Carre, M. C., Burchell, B., Siest, G. and Caubere, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 653-59
3. Pillot, T., Battaglia, E., Said, M., Ziegler, J. C., Fournel-Gigleux, S., Cartier, A., Magdalou, J. and Siest, G. (1991) in *Hepatic Metabolism and Disposition of Endo- and Xenobiotics* (Bock, K.W., Gerok, W., Matern, S. and Schmid, R., eds.) 161-167, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
4. Noort, D., Coughtrie, M. W. H., Burchell, B., van der Marel, G. A., Van Boon, J. H. and Mulder, G. J. (1990) *Eur. J. Biochem* **188**, 309-312
5. Said, M., Noort, D., Magdalou, J., Ziegler, J. C., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Mulder, G. J. and Siest, G. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **187**, 140-145
6. Paul, P., Lutz, T., Osborn, C., Kyosseva, S., Elbein, A., Towbin, H., Radomska, A. and Drake, R. (1993) *J. Biol. Chem.* In press.
7. Fournel-Gigleux, S., Sutherland, L., Sabolovic, N., Burchell, B. and Siest, G. (1991) *Mol. Pharmacol.* **39**, 177-183
8. Drake, R. R., Zimniak, P., Haley, B. E., Lester, R., Elbein, A. D. and Radomska, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23257-23260
9. Harding, D., Fournel-Gigleux, S., Jackson, M. R. and Burchell, B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **85**, 8381-8385
10. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
11. Drake, R. R., Jr., Evans, R. K., Wolf, M. J. and Haley, B. E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 11928-11933
12. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
13. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354

14. Lilienblum, W., Walli, A. K. and Bock, K. W. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**, 907-913
15. Clark, M., Cramer, R. D. I. and van Opdenbosch, N. (1989) *J. Comput. Chem.* **10**, 982-1012
16. Dewar, M. J. S. and Thiel, W. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4899-4907
17. Drake, R., Igari, I., Lester, R., Elbein, A. and Radominska, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11360-11365
18. Vessey, D. A. and Zakim, D. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3023-3028
19. Magdalou, J., Hochman, Y. and Zakim, D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13624-13629
20. Camarasa, M. J., Fernandez-Resa, P., Garcia-Lopez, M. T., De Las Heras, F. G., Mendez-Castrillon, P. P., Alarcon, B. and Carrasco, L. (1985) *J. Med. Chem.* **28**, 40-46
21. Hochman, Y. and Zakim, D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11758-11762
22. Cohen, M. C., Blaney, J. M., Humblet, C., Gund, P. and Barry, D. C. (1990) *J. Med. Chem.* **33**, 883-894

Publication n°3

(acceptée dans *Arch. Biochem. Biophys.*)

Revised manuscript

Chemical modification of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 by diethyl pyrocarbonate. Possible involvement of a histidine residue in the catalytic process ¹

Eric Battaglia^{\$}, Michael Pritchard^{\$°}, Mohamed Ouzzine^{\$}, Sylvie Fournel-Gigleux^{\$}, Anna Radomska^{*}, Gérard Siest^{\$}, and Jacques Magdalou^{\$+}

^{\$} Centre du Médicament, URA CNRS n° 597, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

^{*} Department of Internal Medicine, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas 72205.

[°] Present address: Biomedical Research Centre, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee DD1 9SY, Scotland.

Running title: UDP-glucuronosyltransferase inactivation by diethyl pyrocarbonate

⁺ to whom correspondence should be sent: Centre du Médicament, URA CNRS n° 597, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France. tel: (33) 83 32 29 23; FAX: (33) 83 32 13 22

Subject Area: Enzyme Structure and Mechanisms

Key words: UDP-glucuronosyltransferase, human liver, chemical modification, diethyl pyrocarbonate, essential residue.

ABSTRACT

Chemical modification with diethyl pyrocarbonate of the recombinant human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 in enriched membrane fractions from a V79 cell line resulted in a rapid inactivation of the glucuronidation reaction, measured with 4-methylumbelliferone as aglycone substrate, with a second-order rate constant of $3110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ at pH 6.0 and 25°C. The enzymatic activity was restored by hydroxylamine. Chemical modification with 0.2 mM DEPC for 60 sec decreased the apparent V_{max} 2.4 fold without significantly affecting the apparent K_m towards 4-methylumbelliferone and UDP-glucuronic acid. Similarly, the binding of the photoactivatable cosubstrate analog [β - ^{32}P]5-azido-UDP-glucuronic acid to the active site was not affected by the chemical modification. The enzyme was protected against this inactivation by 4-methylumbelliferone, suggesting that the modified residue was located in or near the aglycone binding site. In contrast, the cosubstrate UDP-glucuronic acid potentiated the irreversible inhibition, indicating a conformational change in the protein upon binding. The pH-dependence of the inactivation was in agreement with the modification of an amino acid residue with a pKa of 6.1. On the other hand, analysis of the variation of V_{max} and V_{max}/K_m values of the glucuronidation reaction as a function of the pH revealed the presence of two essential residues with a pKa within the range 5.7-6.0. The data of the chemical modification of the recombinant enzyme together with that of the pH dependence of the activity strongly suggest the involvement of a histidine residue, highly reactive towards diethyl pyrocarbonate, which could be the base catalyst of the glucuronidation reaction supported by human UGT1*6.

INTRODUCTORY STATEMENT

UDP-glucuronosyltransferases (UGT², EC 2.4.1.17) are a multigenic family of enzymes that catalyze the transfer of glucuronic acid from UDP-glucuronic acid (UDP-GlcU) to a large variety of structurally unrelated compounds (aglycones) with a hydroxyl-, carboxyl-, amino- or thiol- group (1). The reaction leads to the formation of water-soluble β -D-glucuronides, which are excreted into the bile or urine. Although glucuronidation is generally accepted as an efficient detoxification pathway in human (the elimination of the highly toxic bilirubin as glucuronide is significant to this respect), attention has recently been drawn to the formation of glucuronides that possess pharmacological or toxicological activity (2). The analgesic effect of morphine 6-glucuronide is much stronger than that of morphine itself (3). On the other hand, the acylglucuronides formed from carboxylic acid-containing molecules, such as the non-steroidal anti-inflammatory drugs, are reactive species at physiological pH (4). They can undergo undesirable reactions (isomerization, hydrolysis and transacylation) leading to adduct formation with albumin (5).

UGTs also play a major role in the metabolism of endogenous molecules (steroid and thyroid hormones, fatty acids) that are key substances in cell growth, differentiation and homeostasis (6).

Sequence comparison of several cDNAs from various isoenzymes in man and in rodent, and expression of chimeric proteins allowed to suggest that the C-terminal region, which is highly conserved, would correspond to the domain of the enzyme interacting with the common cofactor UDP-glucuronic acid (UDP-GlcU), whereas the heterogeneous N-terminal part would bind the aglycone and determine the substrate specificity (7). To date, little information is available concerning the organization of the active site, namely the amino acids that play a crucial role in the glucuronidation reaction. Using the irreversible inhibitor 2,3-butanedione, Zakim *et al.* (8) suggested, from studies of a purified form of UGT from pig liver, the involvement of an arginyl residue able to interact ionically with the carboxylate group of UDP-GlcU. Recently, by means of potent and competitive inhibitors of bilirubin glucuronidation derived from triphenylalkylcarboxylic acids, we were able to propose, with the aid of structure/activity relationships and molecular modeling, a structural model for the bilirubin-UGT binding site (9, 10). Photoaffinity labeling of UGTs with a UDP-GlcU analog has been developed for probing the cosubstrate binding site (11, 12) but no attempt to identify catalytic residues has been

performed to date, due to the difficulties in obtaining pure human enzyme in an active form and in sufficient amounts.

In this study, diethyl pyrocarbonate (DEPC) was used as inactivating agent to identify possible catalytic residues of human hepatic UGT1*6. This isoform is specifically involved in the glucuronidation of planar and short phenolic compounds such as 4-methylumbelliferone (4-MU) and 1-naphthol. The inhibitor was tested on enriched membrane fractions prepared from a V79 recombinant cell line stably expressing the recombinant enzyme (13). This allowed us to characterize the effect of DEPC on a single UGT isoform without the need for further purification of this labile enzyme. Inactivation studies on rat liver microsomes have been published previously (14) but only preliminary experiments on UGTs were described.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

1-Naphthol-[1-¹⁴C] (9.4 mCi/mmol), 4-MU (free acid), 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide, UDP, and diethyl pyrocarbonate were obtained from Sigma (St. Louis, MO). UDP-GlcU was purchased from Boehringer (Mannheim, Germany), 1-naphthol and imidazole from Merck (Darmstadt, Germany), and hydroxylamine hydrochloride from Fluka (Buchs, Switzerland). All other reagents were of the best quality commercially available.

Establishment and culture of V79 cells expressing UGT1*6

V79 cells (Chinese hamster lung fibroblasts) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% Nuserum^R (Tebu, le Perray en Yvelines, France), antimetabolites and antibiotics as previously described (13). A pcDNA eukaryotic expression vector was constructed by subcloning the full length coding sequence of *UGT1*6* cDNA generated by *Hind*III digestion of the initial pKCRH2 expression vector (15). This recombinant plasmid was cotransfected as previously described (13) into V79 cells at early passages seeded 24h before cotransfection at 0.5×10^6 cells/plate with the plasmid SFVneo (kindly provided by Dr H. Garoff, Heidelberg, Germany) using Transfectam^R according to the recommendations of the manufacturers. Twenty four hours after transfection, cultures were split, and after a further 12 h, were placed in selection medium containing Geneticin (1mg/ml, Sigma). Two weeks later, approximately 30 colonies were isolated, amplified and screened for maximal 4-MU glucuronidation activity. One of these colonies exhibited a specific activity of approximately 20 nmol/min x mg protein in cell homogenate and was therefore selected for further analysis. Stability of expression was demonstrated over more than 10 passages (30 days of culture). Induction by sodium butyrate (2 mM), 24h before harvesting of the cells produced up to a 2.5-fold increase in the initial specific activity measured in cell homogenates.

Membrane fraction preparation

Enriched membrane fractions were prepared according to the following protocol. Pellets of cloned V79 cells (110 mg) were homogenized in about 60 ml of 0.25 M sucrose, 5 mM Hepes (pH 7.4) and subjected to 3 x 10 sec sonication (Ultrasons-Annemasse S.A., France). The homogenate was then centrifuged at 3000 x *g* for 10 min. The resulting supernatant was centrifuged at 100,000 x *g* for 60 min. The pellet was homogenized in about 10 ml of the same buffer and frozen at -20°C. 62% of the total enzymatic activity was recovered in the membrane fraction with an enrichment of about 1.4 fold, when compared with the starting cell homogenate. Protein concentrations were measured according to Bradford (16), using bovine serum albumin as standard.

Measurement of UGT1*6 activity

Glucuronidation of 4-MU was assayed according to Lilienblum *et al.* (17), using ethyl acetate instead of chloroform for the extraction of the unconjugated substrate. The reaction was initiated by the addition of 5 mM UDP-GlcU to 3 µg protein from enriched membrane fractions and incubated at 37°C for 30-40 min in 200 µl 0.125 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 20 mM MgCl₂ and 1 mM 4-MU. The reaction was stopped by the addition of 800 µl ice-cold water, and ethyl acetate (4 ml) was added. After shaking, the sample was centrifuged for 10 min at 1000 x *g*, and 200 µl of the aqueous phase was mixed with 1.8 ml of 0.25 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3). Fluorescence measurements of 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide, at excitation and emission wavelengths of 320 and 380 nm, respectively, were carried out on a Hitachi F2000 spectrofluorimeter (ScienceTec, Les Ulis, France) with authentic 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (0 to 10 nmoles, Sigma) as standard.

Glucuronidation of 1-naphthol was determined by the method of Bock & White (18), by incubating 10 µg of protein from membrane fractions with 0.5 mM 1-naphthol and 1-¹⁴C-naphthol (104,000 dpm) in 100 µl of 100 mM Tris maleate-NaOH buffer (pH 7.4) containing 5 mM MgCl₂. The reaction was initiated by the addition of 5 mM UDP-GlcU. After a 15 min incubation at 37°C, the reaction was stopped with 200 µl of 0.6 M glycine-trichloroacetic acid (pH 2.2) and the unconjugated substrate was extracted into 4 ml chloroform. After centrifugation for 10 min at 1000 x *g*, 100 µl of the aqueous phase was removed

and added to 5 ml of Aquasafe 500 scintillation cocktail (Berthold, Elancourt, France); the radioactivity was quantitated using a Beckman LS 1801 liquid scintillation counter (Irvine, CA).

Inactivation with diethyl pyrocarbonate

The modification of UGT1*6 by DEPC was carried out at 25°C with enriched membrane fractions adjusted to 1.3 mg protein/ml with 50 mM sodium/potassium phosphate buffer, 5 mM MgCl₂ (pH 6.0).

DEPC solutions were prepared in ice-cold absolute ethanol under nitrogen just before use. The exact DEPC concentration was evaluated according to Ovadi *et al.* (19), using a molar absorption coefficient of 3200 M⁻¹.cm⁻¹ at 242 nm for the carbethoxy derivative. Inactivation was started by the addition of DEPC (0.1-0.5 mM, final concentration, 2% v/v). Aliquots were removed every 10 sec and quenched by a 60 fold-dilution in the buffer containing 5 mM imidazole. UGT1*6 activity was then determined as described above. A control sample containing 2% (v/v) absolute ethanol, representing 100% residual activity was run simultaneously. Addition of 0.5 mM DEPC to enriched membrane fractions previously diluted as described above did not affect the enzyme activity, thus showing the efficiency of the dilution in stopping the reactivity of the irreversible inhibitor. A control experiment was also performed in which both substrates were preincubated with DEPC before the enzymatic assay, since under the conditions of the inactivation reaction both the pyrimidine ring of UDP-GlcU (20) and the phenolic group of 4-MU (21) could be carbethoxylated by DEPC. The effective concentration of the acetylating agent was not corrected as previously described (22), as the non-enzymatic hydrolysis of the DEPC was not significant under our experimental conditions. Pseudo-first-order rate constants of inactivation (k_i) were determined according to the equation

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

in which A/A_0 is the residual activity at t sec of inactivation, and k_i the pseudo-first-order inactivation constant of UGT1*6 for a given concentration of DEPC. The inactivation reaction order (n) with respect to the DEPC concentration was calculated using the equation

$$\log k_i = n \cdot \log [I] + \log k_i'$$

where I is the DEPC concentration, and k_i' the $(n + 1)$ -order inactivation constant. Inactivation experiments in the presence of 4-MU, UDP-GlcU, and UDP were carried out for a given concentration

of DEPC at 10 apparent K_m (4-MU) (2 mM), 10 apparent K_m (UDP-GlcU) (5 mM) and 10 apparent K_i (UDP) (5.9 mM). The reversing effect of hydroxylamine (100-300 mM) on the partially inactivated enzyme was monitored. Controls were performed in the same range of hydroxylamine concentrations to verify the absence of effect of this nucleophile on enzyme activity and stability. Kinetic constants for the native and partially inactivated enzyme were determined from Lineweaver-Burk plots in the range of 0.05 - 1 mM 4-MU, at a saturating concentration of 5 mM UDP-GlcU, and 0.5 - 5 mM UDP-GlcU, at a saturating concentration of 1 mM 4-MU. The pH profile for the native enzyme was carried out in 50 mM Tris-maleate-NaOH (pH 5.3-8.6) at 37°C and constant ionic strength. The stability of the enzyme and that of the 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide was checked in this pH range and found to be unaffected under these experimental conditions.

pH dependence of the inactivation kinetics

The pH dependence of the inactivation reaction was determined in 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 5.3-6.6). The influence of the pH on the inactivation by DEPC was analyzed using the relation

$$1/k_i = [H_3O^+]/k_m \cdot K_a + 1/k_m$$

where k_m is the maximal pseudo-first-order inactivation rate constant and K_a the ionization constant of the modified residue (23).

Photoaffinity labeling with [β -³²P]5-azido-UDP-Glucuronic acid

The photoaffinity probe was synthesized as previously described (11). Enriched membrane fractions of the human recombinant UGT1*6 V79 cell line were inactivated at pH 6.0 by various concentrations of DEPC, as described above, and the residual activity was calculated. The enriched membrane fractions (50 μ g protein), either non-inactivated (control) or inactivated to various extents by DEPC, were simultaneously incubated for 20 sec with 40 μ M of [β -³²P]5N₃-UDP-GlcU, and then irradiated for 90 sec with a hand-held lamp (UVS-11, 254 nm, Ultra-Violet Products, Inc.). Proteins were then

treated with 200 μ l of 10 % trichloroacetic acid, and processed on SDS-PAGE as described (24). Autoradiograms were developed after 2-4 days exposure and quantified using a videodensitometer (Zeneid, Biomed Instruments).

RESULTS

Influence of DEPC on the recombinant UGT1*6 activity

DEPC produced a time- and concentration-dependent decrease in the UGT1*6 activity towards 4-MU which followed pseudo-first order kinetics (Fig. 1A). The glucuronidation of 4-MU was inhibited up to 95 % after 80 sec of treatment with 2 mM DEPC at 25°C and at pH 6.0 (results not shown). No effect on UGT1*6 activity was observed when the enriched membrane fractions were incubated with 2% (v/v) absolute ethanol (control). Plotting the pseudo-first-order inactivation constants as a function of the DEPC concentration (0.1 mM-0.5 mM) allowed the determination of a second-order inactivation constant of $3110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and indicated that no reversible complex between the inactivating agent and the enzyme occurred (Fig.1B). A double logarithm plot of the pseudo-first-order inactivation rate constants versus the inactivator concentration produced a slope of 1.1, suggesting that the order of the inactivation reaction according to the decrease of the enzymatic activity was 1 with respect to DEPC (not shown).

Effect of inactivation on the kinetic constants for the glucuronidation of 4-MU by UGT1*6

The UGT1*6 in enriched membrane fractions was partially inactivated by DEPC as described above by treatment with 0.2 mM DEPC for 60 sec. The apparent K_m versus UDP-GlcU and 4-MU, and the apparent V_{\max} were then determined and compared with those of the native enzyme. Both apparent affinity constants were not significantly affected by the inactivation (Table I), whereas the apparent V_{\max} was decreased about 2.4-fold.

Effect of DEPC on the binding of [β - 32 P]5N₃-UDP-GlcU on UGT1*6

In order to further characterize the effect of the DEPC-inactivation of UGT1*6 on the binding of UDP-GlcU, a photoactivatable analog of the cosubstrate, [β - 32 P]5N₃-UDP-GlcU, previously used to label microsomal UGTs (11, 12), was used. Radiolabeled UGT1*6 was identified by Western blot analysis as described in ³ with monospecific anti-UGT1*6 antibodies ⁴. Fig. 2 shows that no significant effect on the binding of the photoactivatable cosubstrate analog on the basis of densitometric measurements was observed within the range 100%-38% of residual activity.

Effect of ligands on the inactivation of UGT1*6 by DEPC

When 4-MU (2 mM) was preincubated with the membrane fractions at pH 7.5, the enzyme was partially protected against inactivation (Fig. 3). The same protection was observed in the presence of 5.9 mM UDP plus 2 mM 4-MU. Further assays with higher concentrations of 4-MU could not be performed due to limited solubility of the substrate in the reaction mixture. No protection was observed when the inactivation was performed at pH 6.0. By contrast, UDP-GlcU exerted a reverse effect on the inactivation by DEPC: it enhanced the inactivating effect of DEPC (Fig. 3) and the rate of inactivation was too fast (most of the activity was lost within 10 sec) to allow the calculation of the inactivation constant whatever the DEPC concentration. The inactivation was also enhanced when performed in the presence of UDP but to a lesser extent than in the presence of the cosubstrate. A partial protective effect of 4-MU plus UDP-GlcU was also observed, especially within the first 60 sec of inactivation, when compared with the inactivation observed in the presence of the cosubstrate alone (Fig. 3).

Effect of pH on UGT1*6 activity and on the inactivation reaction.

The effect of pH on the kinetic parameters, apparent V_{\max} and V_{\max}/K_m for the glucuronidation of 4-MU, was studied in the pH range 5.3-8.6. The V_{\max} and V_{\max}/K_m profiles *versus* pH showed a slope of 2 in the acidic pH-range (Fig. 4), suggesting that two amino acids were titrated. The two pH profiles indicated the presence of ionized groups in the pH-range 5.7-6.0 at 37°C, which are unprotonated in

the optimum pH range of the enzyme reaction (pH 7.4). Assuming pKa values of 3.2-4.4 for the carboxyl- group and 9.7 for the pyrimidine ring of UDP-GlcU (25), it would appear that the cosubstrate has no ionizable groups in this pH range. In addition, the pKa value of 4-MU is 7.8 (26), suggesting that protein residues were titrated in the lower range of pH, whereas at basic pH, a modification of the ionization of the aglycone could account for the decrease in activity observed. No correction of the V_{max} as a function of the ionization of the 4-MU was made since less than 1.6 % of the aglycone substrate is in its anionic form at acidic pH (6 or less) (27).

Furthermore, inactivation by DEPC was carried out as a function of the pH, since this reagent reacts with the unprotonated imidazole ring (28). Plotting the first-order inactivation rate constants as a function of the pH (Fig. 5A) showed that the inactivation by DEPC was increased with the pH. The determination of one essential ionizable residue, with a pKa of 6.1 ± 0.1 at 25°C was obtained from Fig. 5B, which is in the range of the pKa of histidine residues in proteins.

Reversibility of the DEPC Inactivation of UGT1*6 by hydroxylamine

Nitrogen nucleophiles are efficient at reversing the histidine carbethoxylation produced by DEPC (21). Experiments using hydroxylamine were first carried out using 4-MU as substrate. However, controls treated with hydroxylamine indicated a sensitivity of 4-MU glucuronide to this nucleophilic compound (results not shown). The products of such a reaction between 4-methylumbelliferyl glucuronide and hydroxylamine have not been identified, but hydroxylamine is known to be an esterolytic agent (29), and could thus markedly reduce the fluorescence of this glucuronide. Therefore, further attempts to regenerate the acetylated enzyme using hydroxylamine were carried out using 1-naphthol as aglycone instead of 4-MU. The recovery of the inactivated enzyme (71 and 51% residual activity) was function of the hydroxylamine concentration and the activity was almost totally recovered after 2h in the presence of 300 mM hydroxylamine when UGT1*6 was inactivated to 71% of residual activity (Table II).

DISCUSSION

This work characterizes a catalytic amino-acid involved in the glucuronidation reaction, on the basis of the chemical modification of human recombinant UGT1*6 by DEPC. Since DEPC is able to react with

several amino acid residues (21), care should be taken in the inactivation experimental conditions. In order to increase the specificity of the reagent towards histidine residues, the experiments were carried out at pH 6.0 (28), unless otherwise specified. The value of the second-order rate constant for the inactivation of UGT1*6 by DEPC ($3110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) was high, when compared with that measured for other enzymes under the same conditions of pH and temperature (30, 31). Furthermore, the rate of inactivation was in accordance with a pseudo-first-order mechanism, which suggests the presence of a highly reactive residue critical for enzyme activity. No biphasic pattern of inactivation as a function of time was observed, suggesting the involvement of a single type of residue rather than two different classes of essential residues modified by DEPC. The partial inactivation on the kinetic parameters suggested, as proposed by Bazaes *et al.* (32), the presence of two populations of active and totally inactive enzymes respectively. Thus the absence of effect of a partial inactivation by DEPC on either the apparent K_m of 4-MU and UDP-GlcU or on the photoaffinity labeling of UGT1*6 with [β - ^{32}P]5N $_3$ -UDP-GlcU suggested that the essential residue is not likely to be involved in the binding of 4-MU or UDP-GlcU but in the catalytic mechanism, although a modification in the protein conformation upon carbethoxylation by DEPC cannot be totally ruled out. A partial protection against inactivation was observed in the presence of 4-MU when the experiment was performed at pH 7.4, suggesting that the catalytic residue modified by DEPC was in or near the 4-MU binding site. The absence of protection against inactivation in the presence of 4-MU at pH 6.0 is likely to be due to a lower affinity of the ligand at this pH (results not shown). The enhancement of the inactivation in the presence of UDP-GlcU suggests a conformational change following binding of UDP-GlcU to UGT1*6. Prevention of the heat inactivation of UGTs in the presence of UDP-GlcU (33) is also in accordance with a conformational change upon coenzyme binding. On the other hand, drastic modifications in the pK_a of essential residues are often observed upon ligand binding (34). The promotion of the reactivity suggests that the pK_a of this residue is decreased upon ligand binding since DEPC reacts with unprotonated residues (28).

In addition, the pK_a value of 6.1 observed for the inactivated residue was consistent with titration of a histidine residue in UGT1*6 (35), the non-protonated form of this residue being involved in the catalytic process at the optimal pH. The pH-dependence of the kinetic parameters indicated two essential ionizable residues with a pK_a in the range of 5.7-6.0 at 37°C, and both are in unprotonated

form at optimum pH of the glucuronidation reaction (pH 7.4). The inactivation order of the UGT1*6 enzyme by DEPC showed that one of this group was a histidine residue. Preliminary studies in our laboratory indicated that the second unprotonated residue essential for the glucuronidation reaction possesses a carboxyl group.

A reactivation of DEPC-modified proteins by hydroxylamine is often considered as a clue for the modification of histidine residues. The slow reactivation obtained in this study as compared with others (36-37) could be due to the luminal localization of the enzyme in the endoplasmic reticulum (12) or the accessibility of the essential residue to hydroxylamine in the active site.

Arion *et al.* (14) reported that 1-naphthol UGT-activity was also affected by DEPC in rat liver microsomes. We observed that glucuronidation of bilirubin and testosterone, supported by distinct isoforms was also sensitive to DEPC as well as glucuronidation by other recombinant enzymes (results not shown). This suggested that an histidine residue may be essential for the glucuronidation process supported by various UGT isoforms, as a base catalyst. Work is in progress, using site-directed mutagenesis, to identify unequivocally this essential residue for the catalytic activity of human liver UGT1*6.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Doctor R. R. Drake and S. Treat (Little Rock, AR) for the [β - 32 P]5N₃-UDP-GlcU synthesis and use. We thank J. Little (Little Rock, AR) for her helpful critical reviewing of the manuscript. Professor B. Burchell (Dundee, UK) is acknowledged for providing the UGT1*6 cDNA which was used to construct the recombinant plasmid.

REFERENCES

1. Burchell, B., Nebert, D. W., Nelson, D. R., Bock, K. W., Iyanagi, T., Jansen, P. L. M., Lancet, D., Mulder, G. J., Roy Chowdhury, J., Siest, G., Tephly, T. and Mackenzie, P. I. (1991) *DNA Cell Biol.* **10**, 487-494.
2. Mulder, G. J. (1992) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 25-49.
3. Paul, D., Standifer, K. M., Inturrisi, C. E., and Pasternak, G. W. (1989) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 477-483.
4. Spahn-Langguth, H. and Benet, L. Z. (1992) *Drug Metab. Rev.* **24**, 5-48.
5. Ding, A., Ojingwa, J.C., McDonagh, A.F., Burlingame, A.L., and Benet, L.Z. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3797-3801.
6. Nebert, D. W. (1991) *Mol. Endo.* **5**, 1203-1214.
7. Mackenzie, P.I. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3432-3435.
8. Zakim, D., Hochman, Y., and Kenney, W.C. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6430-6434.
9. Fournel-Gigleux, S., Shepherd, S.R.P., Carré, M.C., Burchell, B. Siest, G. and Caubère, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 653-659.

10. Pillot, T., Battaglia, E., Said, M., Ziegler, J. C., Fournel-Gigleux, S., Cartier, A., Magdalou, J., and Siest, G. (1991) in *Hepatic Metabolism and Disposition of Endo- and Xenobiotics* (Bock, K. W., Gerok, W., Matern, S. and Schmid, R., Eds.), Falk Symposium 57, pp. 161-167, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
11. Drake, R.R., Zimniak, P., Haley, B.E., Lester, R., Elbein, A.D., and Radomska, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23257-23260.
12. Drake, R.R., Igary, Y., Elbein, A.D., Lester, R., and Radomska, A. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 11360-11365.
13. Fournel-Gigleux, S., Sutherland, L., Sabolovic, N., Burchell, B., and Siest, G. (1990) *Molec. Pharmacol.* **36**, 177-183.
14. Arion, W.J., Burchell, B., and Burchell, A. (1984) *Biochem. J.* **220**, 835-842.
15. Harding, D., Fournel-Gigleux, S., Jackson, M.R., and Burchell, B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8381-8385.
16. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
17. Lilienblum, W., Walli, A.K., and Bock, K.W. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**, 907-913.
18. Bock, K.W., and White, I.N.H. (1974) *Eur. J. Biochem.* **46**, 451-459.
19. Ovadi, J., Libor, S., and Elodi, P. (1967) *Acta Biochim. Biophys.* **2**, 455-458.
20. Leonard, N.J., Mc Donald, J.J., and Reichmann, M.E. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 93-98.

21. Miles, E.W. (1977) *Methods Enzymol.* **47**, 431-442.
22. Topham, C.M., and Dalziel, K. (1986) *Eur. J. Biochem.* **155**, 87-94.
23. Tian, W.X., Hsu, R.Y., and Wang, Y.S. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11375-11387.
24. Drake, R.R., Evans, R.K., Wolf, M.J., and Haley, B.E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 11928-11933.
25. Dutton, G.J. (1966) *in* Glucuronic acid, free and combined (Dutton, G.J. Ed.), p 202, Academic Press , New York and London.
26. Mattoo, B.N. (1958) *Trans Faraday Soc.* **54**, 19-24.
27. Albert, A., and Serjeant, E.P. (1984) *in* The determination of ionization constants, p 202, Chapman and Hall Eds.
28. Hoolbrook, J.J., and Ingram, V.A. (1973) *Biochem. J.* **131**, 729-738.
29. Bornstein, P, and Balian, G. (1977) *Methods Enzymol.* **47** , 132-145.
30. Abdulwajid, A.W., and Wu, F.Y.-H (1986) *Biochemistry* **25**, 8167-8172.
31. Pelton, P.D.,and Ganzhorn, A.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5916-5920.
32. Bazaes, S., Beytia, E., Jabalquinto, A.M., Solis de Ovanto, F., Gomez, I., and Eyzaguirre J. (1980) *Biochemistry* **19**, 2305-2310.
33. Yokota, H., and Yuasa, A. (1992) *J. Biochem.* **112**, 309-313.

34. Cleland, W.W. (1977) *Adv. Enzymol.* **45**, 273-387.
35. Rao, M.L., Rao, G.S., and Breuer, H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **452**, 89-100.
36. Grillo, F.G., and Aronson, P.S. (1986) *J. Biol. Chem.* **264**, 1120-1125
37. Ko, H.Y., Vanni, P., Munske, G.R., and McFadden, B.A. (1991) *Biochemistry* **30**, 7451-7456

FOOTNOTES

¹ This work was supported by a grant from INSERM (CRE n° 920308) and by "Essor des Biotechnologies" (Région Lorraine, France).

² The abbreviations used are: [β -³²P]5N₃-UDP-GlcU, [β -³²P]5-azido-UDP-glucuronic acid; DEPC, diethyl pyrocarbonate; 4-MU, 4-methylumbelliferone; UDP-GlcU, UDP-glucuronic acid; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

³ Battaglia, E., Ellass, A., Drake, R.R., Paul, P., Treat, S., Fournel-Gigleux, S., Pillot, T., Ouzzine, M., Magdalou, J., Siest, G., Vergoten, G., Lester, R., and Radomska, A., *submitted manuscript*.

⁴ Ouzzine, M., Pillot, T., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Burchell, B., and Siest, G., *submitted manuscript*.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Inactivation of recombinant human liver UGT1*6 by DEPC.* **A.** Inactivation was carried out by incubating various concentrations of DEPC (●, 0.1 mM; x, 0.2 mM; o, 0.3 mM; ■, 0.4 mM; ▲, 0.5 mM) with enriched membrane fractions (1.3 mg protein/ml) of the UGT1*6-transfected V79 cell line in 50 mM phosphate buffer (pH 6), at 25°C. Inactivation was quenched at the indicated times and the residual activity A/Ao was determined. **B.** Plot of the pseudo-first-order inactivation rate constants as a function of the DEPC concentration. The slope represents the second-order inactivation rate constant ($3110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Figure 2. *Effect of the inactivation of recombinant human liver UGT1*6 by DEPC on the incorporation of [β - ^{32}P]5N₃UDP-GlcU.* Enriched membrane fractions were DEPC-inactivated to various extents (lanes 1-4, from 100 to 37.8 % residual activity), and labeled with the photoactivatable cosubstrate analog, [β - ^{32}P]5N₃UDP-GlcU, as described in *Materials and Methods*. The percentage of photoincorporation into the UGT1*6 polypeptide evaluated by densitometry was: lane 1, 100 % \pm 2.9 (control); lane 2, 96 % \pm 5.6 ; lane 3, 88 % \pm 5.6 ; lane 4, 93 % \pm 12.7 (mean \pm SE of two independent experiments).

Figure 3. *Kinetics of inactivation of UGT1*6 with DEPC in the presence of various ligands.* Inactivation (0.1 mM DEPC) was performed on enriched membrane fractions (1.3 mg protein/ml) in 50 mM sodium/potassium phosphate, 5 mM MgCl₂ (pH 7.5) with no ligands (●), 5 mM UDP-GlcU (x), 5.9 mM UDP (o), 2 mM 4-MU (■), 5.9 mM UDP plus 2 mM 4-MU (Δ), and 5 mM UDP-GlcU plus 2 mM 4-MU (◼). Residual activities A/Ao were calculated as described in *Materials and Methods*.

Figure 4. *pH-dependence of apparent V_{max} and V_{max}/K_m for the glucuronidation of 4-MU by UGT1*6.* Apparent kinetic parameters were determined by Lineweaver-Burk plot, in the conditions described in *Materials and Methods*. V_{max}/K_m were determined for UDP-GlcU (o) and 4-MU (●).

Figure 5. pH-dependence of the pseudo-first-order inactivation constant of recombinant human liver UGT1*6 by DEPC. **A.** The inactivation procedure was performed using 0.3 mM DEPC in the presence of enriched membrane fractions (1.3 mg protein/ml) in the pH range 5.4-6.6. k_i values were determined as described in *Materials and Methods*. **B.** Plot of $1/k_i$ as a function of the H_3O^+ concentration, assuming a pK_a of 6.1 ± 0.1 at $25^\circ C$ for the essential residue modified.

TABLE I

*Kinetic parameters of intact and DEPC-modified human UGT1*6 in enriched membrane fractions.* Experiments were performed with 0.2 mM irreversible inhibitor in 2% (v/v) absolute ethanol (modified enzyme), or 2% v/v absolute ethanol (intact enzyme) for 60 sec at 25°C under the conditions described in *Materials and Methods*. Kinetic parameters were determined on a Lineweaver-Burk plot and were the mean of two independent determinations.

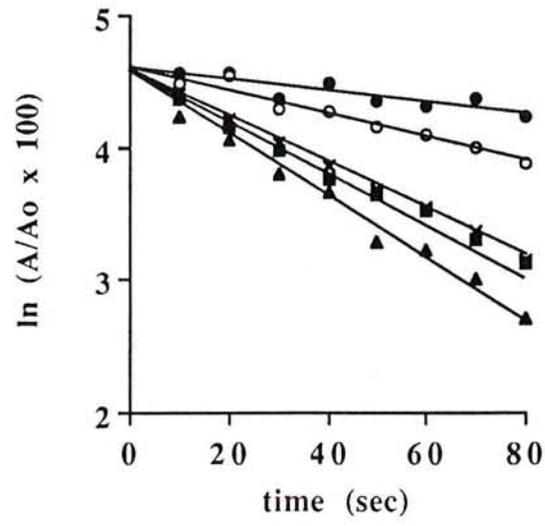
| enzyme | app. K_m (4-methyl- umbelliferone) (μM) | app. K_m (UDP-glucuronic acid) (μM) | app. V_m (nmol/min x mg) |
|---------------|---|---|-------------------------------|
| native | 195 | 500 | 64 |
| DEPC-modified | 182 | 470 | 27 |

TABLE II

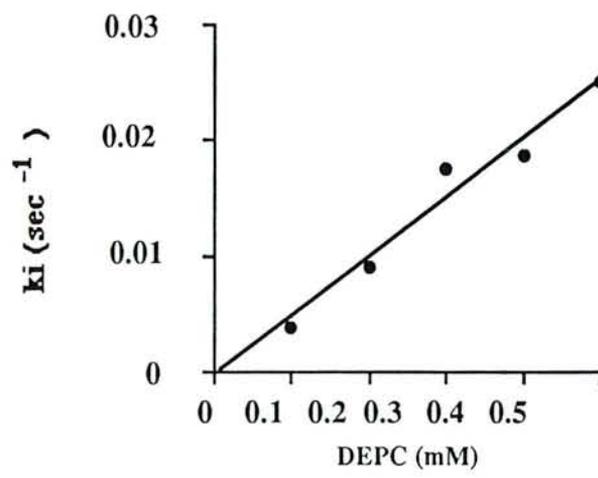
*Reactivation of UGT1*6 in the presence of hydroxylamine.* Enriched membrane fractions were inactivated to 51% (A) and 71% (B) of residual activity, measured with 1-naphthol as substrate, and treated with 100-300 mM hydroxylamine at pH 7.0 and 25°C for 0, 1, and 2 hours as described in *Materials and Methods*. Percentages of reactivation were related to non-inactivated enzyme, similarly treated with hydroxylamine.

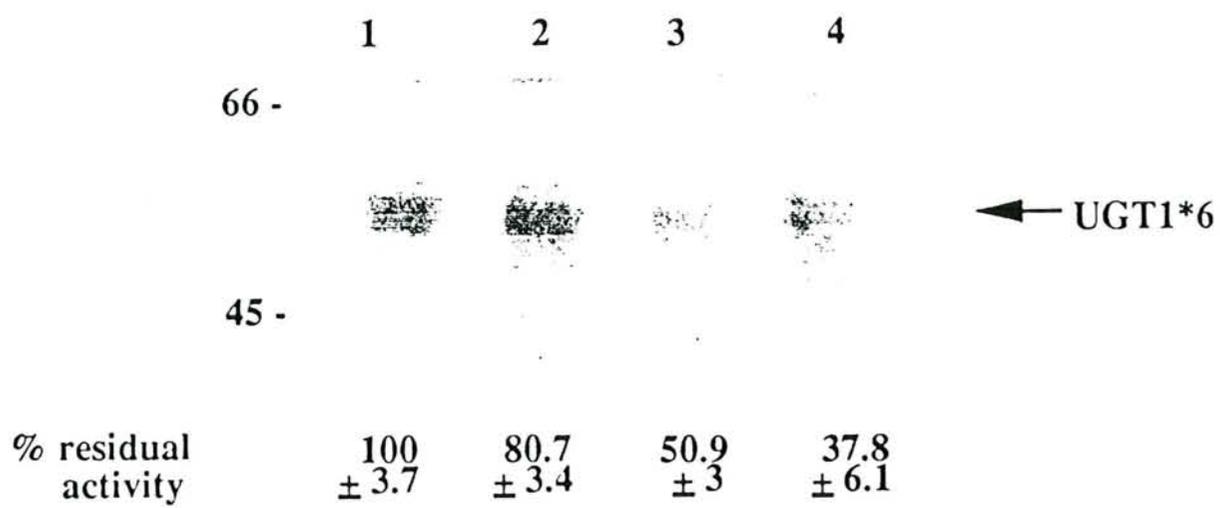
| hydroxylamine | | residual activity (%) | | |
|---------------|------|-----------------------|-----|-----|
| | (mM) | 0 h | 1 h | 2 h |
| A | 100 | 51 | 63 | 71 |
| | 200 | 51 | 69 | 73 |
| | 300 | 51 | 76 | 79 |
| B | 100 | 71 | 78 | 91 |
| | 200 | 71 | 85 | 91 |
| | 300 | 71 | 89 | 95 |

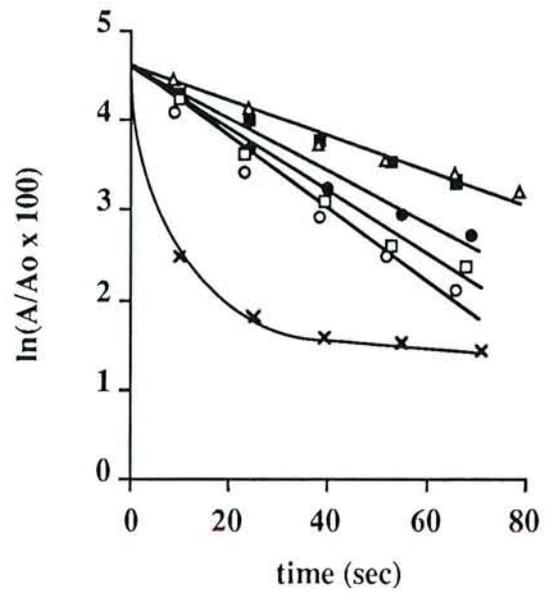
A

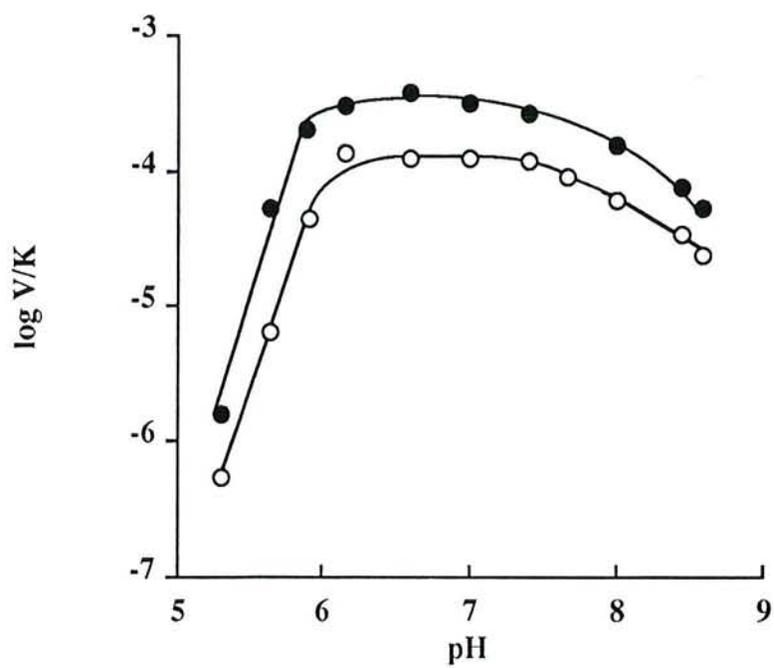
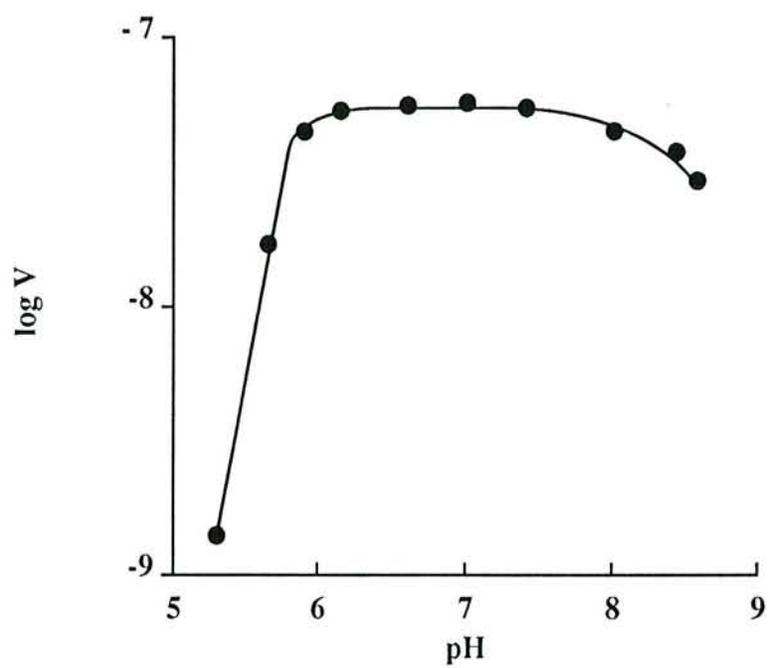


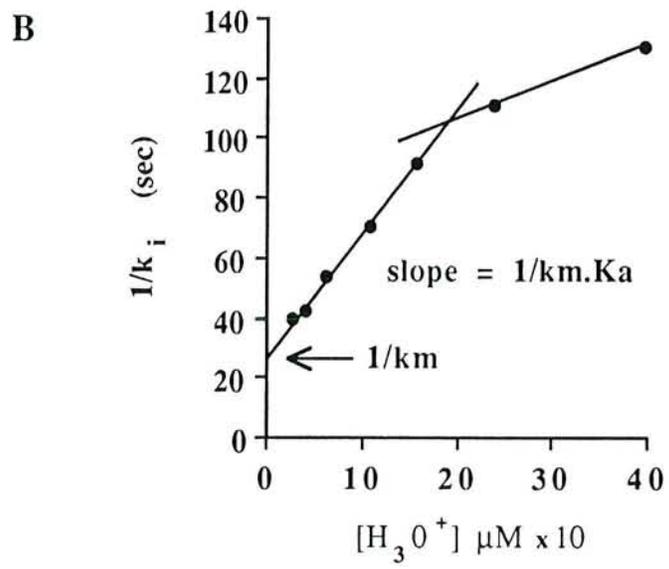
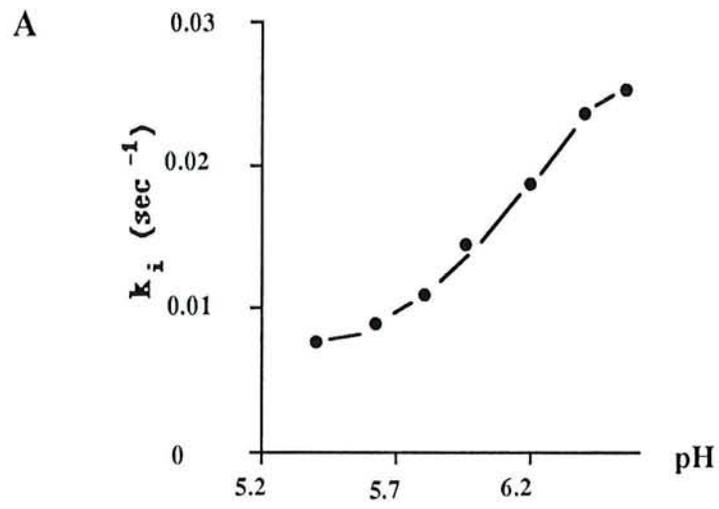
B











Publication n°4

(en préparation pour *J. Med. Chem.*)

Synthesis of potent competitive inhibitors of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase to probe the bilirubin binding site ⁺

Mourad Said[¶], Eric Battaglia[¶], Jean-Claude Ziegler[¶], Alain Cartier[§], Marie-Hélène Livertoux[¶], Sylvie Fournel-Gigleux[¶], Thierry Pillot[¶], Abdelaziz Elaiss[‡], Gérard Vergoten[‡], Gérard Siest[¶] and Jacques Magdalou^{¶*}

[¶]Centre du Médicament, URA CNRS n° 597, 30, rue Lionnois, 54000 Nancy, France; [§]Laboratoire de Chimie Théorique, URA CNRS n°510, Faculté des Sciences, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. [‡]UFR Chimie, Université des Sciences et Technniques, 59650 Villeuve d'Ascq, France.

Running title: Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase inhibitors

* To whom correspondence should be sent.

⁺ Supported by grants from Laboratoires Servier, Orléans, France, from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (n°920308), and from the Institut des Biotechnologies, Nancy, France.

¹ Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; THF, tetrahydrofuran; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

ABSTRACT: A series of potent and competitive inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) derived from 7,7,7-triphenylheptanoic acid has been synthesized in order to probe the active site of the isozyme involved in the glucuronidation of bilirubin IX α . Triphenylalkylcarboxylic acids and triphenyl alcohols were found to be very effective competitive inhibitors of the reaction (K_i 12 to 112 μ M). Superimposition of the best inhibitors with bilirubin, whose structure has been modeled, indicated a marked spatial similarity. The inhibitors such as 3,3,3-triphenylpropoan-1-ol superimposed well on the part of the bilirubin molecule containing three of the four pyrrole rings. Substitution of the triphenylmethyl moiety by planar structures such as fluorenyl or indenyl rings completely suppressed the inhibition and did not show any structural similarity with bilirubin IX α . Inhibition potency was strongly related to the pK $_a$ of the molecules; the more acidic, the less inhibitory suggesting that interaction with the binding site by hydrogen bonding is a prerequisite for inhibition. The ionisation of the carboxyl group reduces the inhibitory potency. This suggests that a partially positive charge on the hydrogen of the functional group, such as the hydroxyl group of the arylalcohols, is a prerequisite for inhibition.

UDP-glucuronosyltransferase (UGT¹, EC 2.4.1.17) is a multigenic family of enzymes that catalyzes the binding to glucuronic acid of a wide variety of chemically unrelated molecules such as drugs, pollutants and endogenous compounds (bilirubin, steroid-, thyroid hormones and biliary acids) ¹⁻².

(4Z,15Z)-Bilirubin IX α , the main product of haemoglobin and haemoprotein breakdown, represents the major physiological substrate of this enzyme system, as glucuronidation of this cytotoxic compound is a critical step in its elimination from the body. Bilirubin is mainly transformed in the liver to acylglucuronides (mono- and diacylglucuronides) that are eliminated into bile, thus preventing the neurotoxicity that can occur under pathological conditions such as the potentially fatal Crigler-Najjar syndrome ³, or during neonatal icterus in premature babies.

In man and in rat, bilirubin is glucuronidated by, at least, two different UGT isoforms with extensive homology generated by alternative splicing of the 5'end of a common gene ^{2,4,5}. Three cDNA clones have been isolated from a human and rat cDNA library ^{6,7}.

Though the gene organization and regulation are beginning to be elucidated, very little is known about the structure of the active site of the related proteins. Comparison of sequences from several cDNAs encoding various UGTs reveals a high degree of homology in the C-terminal part which might encode the region of the protein corresponding to the binding site of the common substrate UDP-glucuronic acid ⁸. In contrast, the N-terminal part of these sequences, which is much more variable, would encode a domain interacting with the different aglycones, as confirmed by the expression of chimeric proteins ⁸. Attempt to purify the protein from liver microsomes led to inactive and very unstable enzyme ⁹. The activity can be partially restored by membrane reconstitution upon addition of phospholipid liposomes ¹⁰. The low concentration of the protein within the membranes, the similar physico-chemical properties of the different isoforms (molecular weight, Pi) made the isolation of the protein and subsequent investigations difficult ¹. Therefore, the microsomal enzyme isoform which glucuronidates bilirubin still represents the only biological model suitable for the study of a fully active protein.

To provide information on the active site of bilirubin UGT, we previously designed and synthesized potent and competitive inhibitors derived from 2,2,2-triphenylacetic acid ¹¹. The most promising molecules were a series of triphenylalkylcarboxylic acids. The best inhibitor found was 7,7,7-triphenylheptanoic acid which competitively inhibits bilirubin glucuronidation in rat liver microsomes or purified enzyme ¹². This study also indicated that 7,7,7-triphenylheptanoic acid was a substrate of purified bilirubin-UGT. In addition, structure-activity relationships revealed that the bilirubin binding site may include a large hydrophobic pocket able to bind the bulky triphenylmethyl moiety and an ionic part which would interact with the carboxylate ion; the optimal distance between these two regions appeared to correspond to a 5-methylene chain length ¹³.

This work was undertaken in order to delineate more precisely the topography of the active site of bilirubin UGT. Further analogs have been synthesized and tested as inhibitors of bilirubin glucuronidation in rat liver microsomes. Using molecular modeling and energy minimisation

calculations, and by comparison with the structure of (4Z, 15Z) bilirubin IX α itself, we have been able to define structural and electronic requirements for an inhibitor to bind to the active site.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to define the structural and electronic requirements of a compound that are critical for inhibiting bilirubin UGT, a series of molecules related to the competitive inhibitor 7,7,7-triphenylheptanoic acid were designed and synthesized. The triphenylmethyl moiety, the carboxyl group and the hydrocarbon chain were successively modified. The compounds were synthesized and tested for inhibition of the glucuronidation reaction in rat liver microsomes. To avoid interfering effects on enzyme kinetics by possible membrane translocation processes of the molecules, microsomes fully disrupted by detergent were used in which the membrane permeability barrier was eliminated.

Modification of the structure of the hydrophilic group and of the hydrocarbon chain. The inhibitory effect of a series of triphenylalkanoic acids and of their corresponding alcohols with an increasing number of methylene groups (0 to 8) on the glucuronidation of bilirubin is shown in Table I. The inhibitory potency of the carboxylic acids, which exhibited pure competitive inhibition, increased as the function of the chain length, with a maximal inhibitory effect for a number of 5 methylene groups (7,7,7-triphenylheptanoic acid, apparent K_i 12 μM)¹². In contrast, when the corresponding arylalcohols were considered, except for the shortest (triphenylmethanol, **0b**) and the longest (9,9,9-triphenyl-1-nonanol, **8b**) molecules of this series, the chain length was not critical for the inhibition. Competitive inhibition was found for all the acids, except for 9,9,9-triphenylnonanoic acid (**7a**, Table I). The alcohols tested also markedly and competitively inhibited the reaction, with apparent K_i of 75 and 112 μM for the compound **2b** and **6b**, respectively (Table I). The compound **4b** also showed competitive inhibition. By contrast, we found that, like 9,9,9-triphenylnonanoic acid (**7a**), the longest alcohol of this series (compound **8b**, 9,9,9-triphenyl-1-nonanol) did not present competitive inhibition (Table I). The carboxylic acids and the alcohols exhibited a fairly good specificity towards bilirubin glucuronidation, since, except for **1b** and **2b**, all of them failed to inhibit 1-naphthol or testosterone glucuronidation that are supported by other distinct isozymes¹⁴. Substitution of carbon by oxygen atoms into the hydrocarbon chain also led to potent and competitive inhibitors (Table II). 2-(2,2,2-Triphenylethoxy)ethanol (**I**), triphenylmethyl ethylene glycol (**III**) and triphenylmethyl diethylene glycol (**IV**) had I_{50} values 0.16, 0.25 and 0.25 mM similar to their corresponding hydrocarbon analogs respectively (Table II). Substitution of the carbon atom bearing the three phenyl groups by silicon did not further increase the inhibitory potency significantly: I_{50} 0.25 mM for the compounds (**III**) and (**IV**),

and 0.25 mM, 0.17 mM for the compounds (**V**) and (**VI**), respectively (Table II).

All together, the results indicate that the putative ionic and hydrophobic parts of the bilirubin binding site, previously thought to be optimally separated from each other by five methylene groups¹² are in fact closer. The molecules tested show high conformational flexibility. Therefore each compound, bearing either a terminal carboxyl or an alcohol group, is free to adopt a conformation which permits simultaneous interaction with both parts of the binding site, irrespective of the length of the hydrocarbon chain.

The results obtained from the triphenylalkanoic acids series suggest that the acidity of the inhibitor and consequently the ionization state of the carboxylic acid are critical for the inhibition. Therefore the pK_a of the inhibitors was measured in DMSO (Table I). As the chain length increased, the pK_a increased due to the subsequent decrease in the inductive electron attraction of the triphenylmethyl group. Concomitantly the inhibition potency was enhanced. The attractive effect exerted by the three phenyl groups extended up to 4,4,4-triphenylbutanoic acid (**2a**) (Table I). For longer structures, (compounds **3a**, **4a**, **5a**, **6a** and **7a**), the pK_a was not affected. Thus, the weak inhibition exerted by the shortest carboxylic acids could be related to the higher acidity of these molecules.

Similarly, the molecular charge distribution of the corresponding triphenylalcohols is likely to change with the chain length. The attractive effect of the triphenylmethyl group¹⁵ on the electrons of the terminal C-O-H is effective, but would be much weaker than that observed with the corresponding carboxylic acids. The series from 2,2,2-triphenylethanol (**1b**) to 5,5,5-triphenyl-1-pentanol (**4b**) arylalcohols with 1 to 4 methylene groups (compounds **1b**, **2b**, **3b** and **4b**) were better inhibitors with I_{50} 0.36, 0.18, 0.20, 0.19 mM, respectively than the other larger compounds with 5 to 8 methylene groups (compounds **5b**, **6b**, **7b** and **8b**), (Table I).

The optimum distance in the chain length could be between one to four methylene groups because of the flexibility of the compounds. The longest structures could not accommodate their geometry with that of the bilirubin binding site. On the other hand, triphenylmethanol (**0b**) failed to inhibit bilirubin glucuronidation probably because of the important steric hindrance exerted by the large triphenylmethyl group which hides the vicinal hydroxyl group.

The results suggest that ionisation of the terminal group may prevent compounds from inhibiting bilirubin glucuronidation. In contrast, a partially positive charge on the hydrogen of the hydroxyl group may be associated with an increase in the inhibition potency. The existence of an interaction by hydrogen bonding between the partially positive charge of the hydrogen atom of the alcohols compounds or the protonated form of the carboxylic groups in the inhibitor with an anionic site in the bilirubin UGT protein was therefore postulated. In order to verify this hypothesis, other compounds were synthesized and tested. As expected, 5,5,5-triphenylpentenyl-1-sulfonate (**VII**) and 5,5,5-triphenylpentyl-2-maleate (**VIII**) which are stronger acid than the alkanolic derivatives did not inhibit bilirubin glucuronidation ($I_{50} > 1$ mM). N-(2,2,2-triphenylacetyl)-4-aminobutyric acid (**IX**) has an optimal chain-length for inhibition, but did not inhibit bilirubin glucuronidation ($I_{50} > 1$ mM). Molecular modeling led

to a low-energy conformer which contains intramolecular hydrogen bonds (GEOMOS, $d = 1.81 \text{ \AA}$), thus increasing the acidity of the carboxyl group¹⁶.

Other compounds with an electropositively charged hydrogen, which could theoretically bind by hydrogen bonding, were synthesized by replacing the hydroxyl- or carboxylic group by an aldehyde, amine or thiol group. The inhibitory effect obtained with these compounds was in the same range as that observed with the hydroxyl or carboxyl analogs, in accordance with our hypothesis (results not shown). In contrast, compounds lacking an electropositively charged hydrogen such as aliphatic hydrogens did not inhibit bilirubin glucuronidation¹². Finally the ester derivatives methyl-7,7,7-triphenylheptanoate (**X**) and methyl-2-(2,2,2-triphenylethoxy)acetate (**II**) were tested after inhibition of the microsomal esterase by phenylmethylsulfonyl fluoride. As expected, these esters showed only weak inhibition (Table II) as they could not interact with a putative anionic binding site. These results indicate that the presence of a hydrogen atom linked to an electronegative atom such as O, N, S is critical for the interaction with the active site of the bilirubin UGT by hydrogen bonding.

The apparent pK_a of the two propionic acid groups of bilirubin in water is 4.4¹⁷. However, at physiological pH, the major species were the monoanion and the fully protonated form, but not the dianion¹⁸. The pK_a of triphenylalkanoic acids containing a number of methylene groups higher than two (Table I) were similar to that of acetic acid in DMSO (pK_a 11.3,¹⁹). In water, acetic acid has a pK_a of 4.75; this value is similar to that reported for bilirubin¹⁷. Therefore, at physiological pH, the carboxylic compounds described in that study could behave similarly, as their pK_a and hydrophobic character were similar to those of bilirubin. Previous studies by Brodersen¹⁷ demonstrated by varying the pH, that only the negatively charged bilirubin could bind to serum albumin. On the other hand, Crawford *et al.*²⁰ pointed out that the presence of serum albumin was not essential for bilirubin glucuronidation, since the lipophilic bilirubin had readily access to the active site located at the luminal side of the membrane. Indeed, studies by Erikson *et al.*²¹, and Yang and Morris²² demonstrated that the carboxylate groups must be protonated for the access of bilirubin into the membrane core. Tiribelli & Torres²³ also pointed out the importance of the protonation of bilirubin in governing the uptake of the pigment by liver cells. In the light of these findings, it is likely that only the protonated form of bilirubin has access to the UGT binding site.

Modification of the hydrophobic moiety. The hydrophobic triphenylmethyl part of inhibitors was also modified in order to gain information on the influence of this bulky hydrophobic structure on the inhibitory effect. Substitution of the triphenylmethyl moiety with benzyl or diphenylmethyl gave poor inhibitors; by contrast, substitution by diphenyl-*tert*-butylsilyl (**XI**) or triphenylsilyl (**VI**) gave potent inhibitors with I_{50} 0.15 and 0.17 μM respectively. Tribenzylsilyl (**XII**), triphenyl phosphonium (**XIII**) groups were poor inhibitors with I_{50} 0.45 and $> 1 \text{ mM}$ respectively. The introduction of planar structures such as fluorenyl (**XIV**) or indenyl (**XV**) led to ineffective inhibitors (Table III). In contrast, the increase of the Van der

Waals volume of the triphenylmethyl group by introduction of silicon atom in compounds (VI), (XI) and (XII) led to powerful and competitive inhibitors (Table III). The triphenylmethyl, triphenylsilyl and *tert*-butyl diphenylsilyl groups appear to have a suitable stereochemical and/or physicochemical properties for binding to the hydrophobic site of bilirubin UGT.

On the other hand, introduction of a positive charge in 6-hexanoyl 6,6,6-triphenylphosphonium bromide acid (XIII), and/or variation in the geometry generated upon introduction of the phosphorous atom abolished the inhibitory potency (Table III).

Structural analogy between bilirubin and inhibitors. Molecular modeling was used to investigate stereochemical similarities between the inhibitors and bilirubin which would explain the competitive binding to the UGT enzyme. Previous X-ray analysis^{24,25} indicated that bilirubin is composed of two blades, each containing a pyrromethenone chromophore (two adjacent pyrrole rings), connected to the other at the central C-10 carbon atom (Fig. 1 A). The pitch of the blades is controlled by rotations about bonds C-9 - C-10 and C-10 - C-11. These rotations generate sets of conformational enantiomers that are in dynamic equilibrium. Modeling of bilirubin by GEOMOS gave a low-energy conformer (-181.15 Kcal/mol in vacuum) in which the pyrrole rings of the pyrromethenone generate an angle Q of about 140° with respect to six intramolecular hydrogen bonds, and an angle of about 86° between the two halves of the molecule (Fig. 1 B). Cartesian coordinates reported by Bonnet et al.²⁴ were used to build a three dimensional model of the crystallized bilirubin molecule. Its minimum energy conformation in the environment of the crystal was determined, and the heat of formation was calculated to be +13.15 Kcal/mol, this model being less stable than the GEOMOS model. In the most stable conformation obtained by GEOMOS modeling, the pyrromethenone moieties were not planar, indicating that the molecule is less constrained than in the crystalline state, in which there is a steric interaction between the hydrogen atoms of N-21 and N-22 and between those of N-23 and N-24. We suggest that the GEOMOS model (Fig. 1 B) represents the preferred conformation of bilirubin in solution or when bound to the active site of UGT. The Figure 2 illustrates the structure of the competitive inhibitor 3,3,3-triphenylpropan-1-ol (Fig. 2 A) and that of bilirubin (Fig. 2 B). By comparing their conformation, we found that two phenyl rings of the inhibitor could superimpose with two of the adjacent rings of the bilirubin pyrromethenones with simultaneous superimposition of the third phenyl group with the pyrrolic ring of the other pyrromethenone moiety (Fig. 2 C). The edge of the triangle drawn corresponding to the centers of the aromatic rings of the triphenylalkanol molecule surimposed with the center of the pyrrole rings of bilirubin. The same situation was observed with the other triphenyl-containing molecules. In contrast, the planar structures with benzylanthracene, fluorenyl or indenyl ring systems, which were poor inhibitors, had no structural similarity with the natural ligand, bilirubin IX α .

It is noteworthy that the inhibitors tested in this work superimposed with a part of bilirubin IX α (Fig. 2). Bilirubin can be described (Fig. 3) as a pseudosymmetric molecule²⁶ in which each blade possesses (i) a hydrophobic region which corresponds to the two aromatic rings A & B

(or C & D) resulting from the rotation of the NH groups and the C = O group and their immobilisation by hydrogen bonding, in addition to the substituent alkyl groups; (ii) a hydrophilic region in which a carboxylic group forms three hydrogen bonds with two NH groups belonging to A & B (or C & D) and one C=O group belonging to pyrrole A (or D); (iii) the second blade containing the C or B ring represents a steric region. The second half part of bilirubin IX α containing the second blade possesses a similar region with the rings D, C and B. In good agreement with our results, McDonagh & Lightner²⁷ emphasized the importance of the three dimensional structure of bilirubin stabilized by hydrogen bonding for the disposition of this molecule. By the use of synthetic bilirubin analogs possessing altered propionic acid chain length, they have shown that moving or making small changes in the structure of the hydrocarbon side-chains had little effect on the metabolism of the pigment²⁷⁻²⁸⁻²⁹. By contrast, when the propionic acid groups were removed from the two central positions C-8 and C-12, in order to prevent the hydrogen bonding, the pigment was not glucuronidated^{27,30}. In addition, esterification of one carboxyl group by methanol did not prevent the bilirubin monomethyl ester from being glucuronidated on the free carboxyl group²⁷ or did not significantly change the conformation²⁹. McDonagh et al.^{31,32} and Lightner et al.²⁹ showed that the photoisomers bilirubin III α and IX α , in which one half of the structure differs from the model described above, were predominantly monoglucuronidated in rats, the propionic acid group glucuronidated being the one that is covalently attached to the unnatural half. This was in accordance with the proposed structure (Fig. 3). The kinetic studies of bilirubin UGT by Vanstapel & Blanckaert³³ indicated that the C-8 and C-12 bilirubin monoglucuronides were formed at a single enzymatic site. Recent data by Crawford et al.²⁰ confirmed their conclusions as they demonstrated that bilirubin and bilirubin monoglucuronide were competitive binding substrates for the formation of bilirubin diglucuronide at the same active site.

With the help of competitive inhibitors, we further characterized the binding of the ligands by proposing that when bilirubin binds to the active site, the hydrogen atom belonging to the carboxyl group can establish a hydrogen bond with the anionic binding site.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Synthesis of inhibitors. Chemicals and solvents were the best quality commercially available. When necessary, they were further purified by crystallization or distillation under standard procedure. All the inhibitors synthesized had infra red and ¹H-NMR spectra (Brucker AM 400 MHz) consistent with their proposed structures.

The progress of chemical reactions was monitored by thin layer chromatography on Kieselgel 60-F254 plates (Merck, Darmstadt, Germany). Products were purified by flash chromatography on silica Chromagel 40-60 μ (Merck, Darmstadt, Germany).

The arylalkyl carboxylic acids related to triphenylacetic acid with an increasing methylene groups (0 to 7) (series a, compounds **0a** to **7a**, Table I) were synthesized as described in

Fournel-Gigleux et al.¹². The corresponding alcohols (series b) were obtained or synthesized as described below. *Triphenylmethanol* (**0b**) was purchased from Aldrich.

2,2,2-Triphenyl-1-ethanol (**1b**). 2,2,2-triphenylacetic acid (10 g, 34.6 mmol) was dissolved in dry THF. Borane methyl sulfide complex 2 M in THF (20 mL, 41.52 mmol) was added dropwise according to the method of Brown & Stocky³⁴. The mixture was heated at reflux for 12 h at 60 °C and decomposed with excess methanol. The final product was obtained after evaporation of the solvent in a 99 % yield. mp 104-105 °C; IR ν (KBr) 3300-3500 cm^{-1} (OH); NMR (CDCl_3) δ 4.6 (s, 2 H), 7-7.5 (m, 15 H).

3,3,3-Triphenyl-1-propanol (**2b**). This compound was prepared by the same method as that used for *2,2,2-triphenyl-1-ethanol* with 3,3,3-triphenylpropanoic acid as the starting material, yield 99 %, NMR (CDCl_3) δ 2.4 (m, 2H), 2.5 (t, 2H), 2.4 (m, 2H), 7.0-7.5 (m, 15H). IR ν (KBr) 3300-3500 cm^{-1} (OH).

4,4,4-Triphenyl-1-butanol (**3b**), *6,6,6-triphenyl-1-hexanol* (**5b**), *8,8,8-triphenyl-1-octanol* (**7b**) and *9,9,9-triphenyl-1-nonanol* (**8b**). These compounds were synthesized by method used for *2,2,2-triphenyl-1-ethanol* (**1b**), starting from the corresponding carboxylic acids, which were synthesized as previously reported¹².

7,7,7-Triphenyl-1-heptanol (**6b**). The hydroxy group of 6-chloro-1-hexanol (10 g, 73 mmol) was protected according to Miyashita *et al.*³⁵ with dihydropyran (6.8 g, 81 mmol) in 20 mL dichloromethane and catalytic *p*-toluene sulfonic acid monohydrate. The tetrahydropyranyl 6-chlorohexylether was purified by distillation under reduced pressure to yield 96%: boiling point 110-120 °C under 16 mm Hg, clear oil, n_D^{20} 1.4652; NMR (CDCl_3) δ 1.3-2 (m, 16 H), 3.1-3.5 (m, 2 H), 3.6-3.8 (m, 2 H), 4.5-4.6 (t, 1 H). IR ν (KBr) 3300-3600 cm^{-1} (OH). Triphenylmethyl lithium was synthesized according to Gilman and Gaj³⁶. Triphenylmethane (3.83 g, 15 mmol) in 20 mL THF at 0 °C was added to (7.5 mL, 15 mmol) of 2 M butyllithium in hexane under nitrogen, and was stirred for 30 min at 0 °C. A solution of tetrahydropyranyl 6-chlorohexanyl ether (2.66 g, 12 mmol) in 10 mL dry THF was added to the reaction under nitrogen with 2 mL of catalyst (85 mg lithium chloride, 134.6 mg copper chloride in 10 mL THF) used by Descoins *et al.*³⁷ and Tamura and Kochi³⁸. The reaction was followed by gas chromatography. The mixture was then poured into 10 mL saturated aqueous ammonium chloride and the aqueous phase was extracted with 40 mL ethylacetate. The combined extracts were dried over magnesium sulfate, after removal of the solvent under vacuum. The product was deprotected by heating at 60-65 °C in 30 mL methanol and 1 mL 30 % hydrochloric acid for 2 h, and the resulting reaction mixture was concentrated under reduced pressure to remove dihydropyran. The residue was dissolved in ethylacetate and washed sequentially with water and saturated aqueous sodium hydrogen carbonate, 1 M hydrochloric acid, water and finally saturated aqueous sodium chloride; it was dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel with ether-hexane 1:1 (v/v) as eluent to give the product with a yield of 80% : mp 95 °C; IR ν (KBr) 3300-3600

cm^{-1} (OH); RMN (CDCl_3) δ 1.1-1.5 (m, 8 H), 2.5-2.6 (t, 2 H), 3.5-3.7 (t, 2 H), 7.1-7.4 (m, 15 H).

5,5,5-Triphenyl-1-pentanol (4b). The compound was synthesized using the same protocol as that described for *7,7,7-triphenyl-1-heptanol (6b)*, with 4-chloro-1-butanol as the starting material. Yield 80 %. NMR (CDCl_3) δ 1.1 (m, 2H), 1.5-1.6 (m, 2H), 2.5-2.6 (m, 2H), 3.5 (t, 2H), 7.1-7.2 (m, 15H). IR ν (KBr) 3300-3600 cm^{-1} (OH).

2-(2,2,2-Triphenylethoxy)ethanol (I). A mixture of lithium aluminum hydride (0.12 g, 3.2 mmol) in dry ether (5 mL) was stirred under nitrogen during the dropwise addition of a solution of methyl 2-(2,2,2-triphenylethoxy)acetate (**II**) (1 g, 2.9 mmol) in dry ether (5 mL). The reaction mixture was stirred at 22-25 °C for 30 min. The excess of lithium aluminum hydride was destroyed by addition of 10 mL of 1 M hydrochloric acid and removed by filtration on celite. The organic phase was then washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate, 1 M hydrochloric acid and saturated aqueous sodium chloride; it was finally dried under vacuum to give 2-(2,2,2-triphenylethoxy)ethanol with a 96 % yield: mp 104-105 °C; IR ν (KBr) 3300-3500 cm^{-1} (OH); NMR (CDCl_3) δ 4.6 (s, 2 H), 7-7.5 (m, 15 H).

Methyl 2-(2,2,2-triphenylethoxy)acetate (II). A flask was charged with 50 % sodium hydride dispersed in oil (0.72 g, 15 mmol). This dispersion was washed three times with THF. Sodium hydride was suspended under nitrogen in dry THF (5 mL), and 2,2,2-triphenyl-1-ethanol (2.74 g, 10 mmol) dissolved in 10 mL of THF was added dropwise with stirring. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. Methyl bromoacetate (1.68 g, 11 mmol) was then added dropwise. The reaction was heated at 60°C and its progress followed by thin layer chromatography with 1:1 ether-petroleum ether (v/v) as eluent. At the end of the reaction, excess sodium hydride was destroyed with water, and the aqueous phase was extracted three times with ether. The ether extracts were washed with 1.2 M hydrochloric acid once, with saturated aqueous sodium chloride, and then dried over magnesium sulfate. The solution was evaporated under vacuum, and the product was purified by flash chromatography on silica gel according to the method of Still *et al*³⁹, with ether-petroleum ether 1:4 (v/v) as eluent to lead to methyl-(2,2,2-triphenylethoxy)acetate, (60 % yield): mp 136 °C; NMR (CDCl_3) δ 3.7 (s, 3 H), 4.1 (s, 2 H), 4.6 (s, 2 H), 7.1-7.5 (m, 15 H).

Mono- and diethyleneglycol derivatives of *triphenylmethyl (III) (IV)*, *triphenylsilyl (V) (VI)*, diethyleneglycol derivatives of *tribenzylsilyl (XII)*, and *tert-butyldiphenylsilyl (XI)* were synthesized as previously described¹³.

5,5,5-Triphenylpentyl-1-sulfate (VII). 5,5,5-Triphenyl-1-pentanol (0.5 g, 1.58 mmol) was dissolved in 10 mL dry THF; pyridine sulfur trioxide (0.26 g, 1.63 mmol) was added with shaking according to the method of Duff⁴⁰, after precipitation of the product, the excess of sulfur trioxide pyridine (not soluble in chloroform) was removed by filtration in chloroform. The product was extracted three times with chloroform, and the combined extracts were successively washed with water, a solution of 1 M hydrochloric acid and with aqueous

saturated sodium chloride solution before being dried over magnesium sulfate and evaporated to give a 99 % yield: mp 139 °C; IR ν (KBr) 1150-1360 (S=O), 2500-3500 cm^{-1} (OH); NMR (CDCl_3) δ 1 (m, 2 H), 1.5 (t, 2 H), 2.5 (t, 2 H), 3.7 (t, 2 H), 7.2 (m, 15 H); mass spectrum: m/z of the molecular ion and fragments 396, 316, 298 .

N-(2,2,2-triphenylacetyl)-4-aminobutyric acid (IX). To 2,2,2-triphenylacetic acid (1.44 g, 5 mmol) dissolved in dry dichloromethane, thionylchloride (0.65 g, 5.5 mmol) was added dropwise in the presence of a catalytic amount of dimethylformamide. The thionylchloride was coevaporated with benzene; a white precipitate of 2,2,2-triphenylacetylchloride was obtained which was stored over phosphorus pentoxide. 4-Aminobutyric acid (0.52 g, 5 mmol) dissolved in THF was added to triethylamine (1.1 g, 11 mmol). The mixture was stirred in an ice-water bath and 2,2,2-triphenylacetylchloride (1.52 g, 5 mmol) dissolved in THF was added dropwise. The mixture was then stirred at room temperature for 1 h, and the solvent was evaporated. The reaction mixture was dissolved in ether and 10 % aqueous hydrochloric acid solution. The aqueous phase was extracted three times with ether and the combined ether extracts were washed three times with water and once with saturated aqueous sodium chloride and then dried with anhydrous magnesium sulfate. The solution was concentrated and the product was finally purified by flash chromatography on a silica gel column with ether-petroleum ether (3:2) as eluent to yield 57 %: mp 164 °C; IR ν (KBr) 2500-3200 (OH), 1750 cm^{-1} (C=O); NMR (CDCl_3) δ 1.6-1.9 (m, 2 H), 2.1-2.4 (q, 2H), 3.3-3.5 (q, 2 H), 5.9-6.0 (t, 1 H), 7.2-7.6 (m, 15 H).

Methyl-7,7,7-triphenylheptanoate (X). This compound was synthesized from 7,7,7-triphenylheptanoic acid as described by Fournel-Gigleux *et al.*¹².

6-(Fluorenyl)hexanoic acid (XIV). Fluorene (4 g, 24 mmol) in dry tetrahydrofuran was added to 2 M butyllithium (12 mL, 24 mmol) in hexane at 0 °C and under argon. After 30 min, 1-bromo-4-chlorobutane (4.11 g, 24 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was poured into water, and the aqueous phase was extracted with ether. The solution was concentrated and 1-chloro-4-fluorenylbutane was recrystallized from petroleum ether, and purified by flash chromatography on a silica gel column with petroleum ether-ether (1:1) as eluent, with a yield of 78 % : NMR (CDCl_3) δ 1-2 (m, 6 H), 3.4-3.5 (t, 1 H), 4 (t, 1 H), 7-8 (m, 8 H). 1-Chloro-4-fluorenylbutane (6 g, 23 mmol) was dissolved in 50 mL acetone and iodine (6.89 g, 46 mmol) was added. The mixture was heated under reflux for 24 h, poured into water, extracted with ether and dried over magnesium sulfate. The product was purified by flash chromatography on a silica gel column with petroleum ether as eluent. Sodium (0.198 g, 8.6 mmol) in 10 mL ethanol was stirred for 45 min followed by the addition of diethyl malonate (1.38 g, 8 mmol). After 60 min at room temperature, 1-iodo-4-fluorenylbutane (3 g, 8 mmol) was added to the mixture which was heated under reflux for 10 min. After cooling to room temperature, the residue was partitioned between water and ether; the ether layer was washed with water and saturated aqueous sodium

chloride and then dried with anhydrous magnesium sulfate. The solution was concentrated and the product was finally purified by flash chromatography on a silica gel column with petroleum ether as eluent leading to the ester. After saponification by potassium hydroxide and acidification by hydrochloric acid, the esters gave the malonic derivative (4-(fluorenyl)2-butyl malonic acid) which, after decarboxylation, gave 6-(fluorenyl)hexanoic acid with a 74 % yield: NMR (CDCl₃) δ 1-1.2 (m, 2 H), 1.6-1.8 (m, 2 H), 1.9-2.1 (m, 2 H), 3 (t, 2 H), 4 (t, 1 H), 7-8 (m, 8 H)

5,5,5-Triphenylpentyl-1-malonic acid (VIII) and *6-(indenyl)hexanoic acid (XV)*. These compounds were synthesized using the same protocol as that described for *6-(fluorene)hexanoic acid (XIV)*, with triphenylmethane and indene as the starting materials, respectively. (VIII): Yield 70 %. NMR (CDCl₃) δ 1.15–1.2 (m, 2H), 1.8–1.9 (m, 2H), 2.5–2.6 (m, 4H), 3.3–3.4 (t, 1H), 7.1-7.3 (m, 15H). IR ν (KBr) 2500-3200 cm⁻¹ (OH), 1750 cm⁻¹ (C=O). XV: NMR (CDCl₃) δ 1.5–1.7 (m, 2H), 2.8–2.9 (m, 2H), 2.4–2.5 (t, 1H), 3.1–3.3 (m, 2H), 6.1 (s, 1H), 7.0-7.3 (m, 6H). IR ν (KBr) 2500-3200 cm⁻¹ (OH), 1750 cm⁻¹ (C=O).

6-Hexanoyl 6,6,6-triphenylphosphonium bromide acid (XIII). A mixture of triphenylphosphine (2.62 g, 10 mmol) and 6-bromohexanoic (1.95 g, 10 mmol) acid in 20 mL of dimethylformamide was heated under reflux according to the method of Wittig and Schoellkopf⁴¹. The mixture was cooled to room temperature and the white crystalline solid was collected, washed with 100 mL ether and finally dried *in vacuo* over phosphorus pentoxide to yield 99 %: NMR (DMSO) δ 1-1.2 (t, 2 H), 1.7-1.9 (m, 2H), 2.5-2.7 (t, 2H), 3.4-3.6 (q, 2 H), 3.9-4.2 (t, 2 H), 7.5-7.9 (m, 15 H). IR ν (KBr) 2500-3200 cm⁻¹ (OH), 1750 cm⁻¹ (C=O).

Determination of the ionization constants. The method of Robinson & Bower⁴² was used for the determination of pK_a of the series of triphenylalkylcarboxylic acids (**0a** to **7a**). The absorption of the protonated bromothymol blue indicator (HI) (5 10⁻⁵ M, Merck) was measured at 634 nm in presence of the carboxylic acid (10⁻² M) in the mixture dimethyl sulfoxide-water (9:1 M/M), because of their non solubility in water, on a Uvikon Kontron-860 spectrophotometer. Since, in our experimental conditions, the ionisation constant of the colored indicator acid (HI) was known, (pK_a=10.56¹⁹), the pK_a values of the carboxylic acids were calculated from the concentration ratios (I⁻) / (HI) at several increasing pH values.

Molecular modeling. Computations of the wave functions describing the inhibitors and bilirubin were performed with the PM3 assumption⁴³. As geometric input data, experimental bond lengths and bond angles, or, when these were not known, standard data taken from Sutton⁴⁴ were used. The GEOMOS program⁴⁵ was used to find the geometry corresponding to energy minima. The self consistent field calculation gave the values of the energies of the highest occupied molecular orbital (homo), of the lowest unoccupied molecular orbital (lumo), and the

net charge on the atoms. Construction of inhibitors and bilirubin was also performed on PS 350 graphic station (Evans and Sutherland) with the molecular modeling package SYBYL (SYBYL molecular modeling system version 5.3, Tripos associates, Saint Louis, MO) with its force field⁴⁶. Structures were energy minimized using the subroutine MAXIMIN2 and the atomic charges were calculated by the Gust & Hukell method⁴⁷⁻⁴⁸⁻⁴⁹. In order to find the most stable conformation of the inhibitors and bilirubin, conformational SEARCH⁵⁰ was performed using 10° incrementation for the torsion angles in bilirubin (atoms 5-6, 9-10, 10-11 and 14-15, for propionic groups, atoms 8-30, 30-31, 31-32, 12-35, 35-36 and 36-37 and for the torsion angles of the inhibitors. Low energy conformers were minimized again using the same subroutine MAXIMIN2.

A plan for each pyrrol ring was defined, and the centroid and the normal of the plan crossing the centroid were represented on the low energy conformer of the bilirubin IX α . The same construction was done for the 3 phenyl rings of the inhibitors.

Superimposition of the inhibitors with bilirubin (template) was obtained by using the RMS-fit function of SYBYL. The hydroxyl group of the propionic moiety of bilirubin IX α was superimposed with the hydrophilic terminal moiety of the inhibitors.

Enzymatic studies. Male Wistar rats (Domaine des Oncins, St. Germain l'Abresle, France) weighing 180-200 g were housed in an environmentally controlled room (12-h light cycle, 22-24°C) and fed a rodent chow (UAR Alimentation, Villemoisson, France). Rats were treated with clofibrate (Sigma, St. Louis, MO) in order to enhance selectively the activity of bilirubin UGT⁵¹. The hypolipidemic drug was added to the chow at the concentration 0.3 % (w/w) in acetone and solvent was evaporated under a hood for 12 h at 40 °C. The rats were fed the chow for 7 days. They were then killed by decapitation, and liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation⁵². The protein content was calculated by the method of Bradford⁵³ with bovine serum albumin as standard. Bilirubin glucuronidation was measured in fully activated microsomes with digitonin (Sigma) at a detergent/protein weight ratio of 1.0, according to the method of Heirwegh et al.⁵⁴. Putative inhibitors (1.10^{-6} to 1.10^{-3} M) were dissolved in DMSO and added to the incubation medium 1 min before bilirubin. Controls without inhibitors were simultaneously run to represent 100 % enzyme activity. I_{50} (mM) value was calculated using the linear portion of the semilogarithmic plots of data. Apparent $K_{i_bilirubin}$ was calculated from secondary plots of apparent K_m/V_{max} values versus inhibitor concentrations, as described by Segel⁵⁵.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. A. F. McDonagh (San Francisco, CA) for the critical reading of the manuscript and Pr. C. Lecomte (Nancy, France) for providing the data on cartesian coordinates of bilirubin. The technical assistance of Mrs. C. Lafaurie was greatly appreciated.

REFERENCES

- (1) Siest, G.; Antoine, B.; Fournel, S.; Magdalou, J.; Thomassin, J. The glucuronosyltransferases. What progress can pharmacologists expect from molecular biology and cellular enzymology. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 983-989.
- (2) Burchell, B.; Nebert, D. W.; Nelson, D. R.; Bock, K. W.; Iyanagi, T.; Jansen, P. L. M.; Lancet, D.; Mulder, G. J.; Chowdhury, J. R.; Siest, G.; Tephly, T.; Mackenzie, P. I. The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell. Biol.* **1991**, *10*, 487-494.
- (3) Crigler, J. F.; Najjar, V. A. Congenital familial non hemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics.* **1952**, *10*, 169.
- (4) Clarke, D. J.; Keen, J. N.; Burchell, B. Isolation and characterisation of a new hepatic bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *FEBS Lett.* **1992**, *299*, 183-186.
- (5) Owens, I. S.; Ritter, J. K. The novel bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase UGT1 gene locus: implications for multiple non hemolytic familial hyperbilirubinemia phenotypes. *Pharmacogen.* **1992**, *2*, 93-108.
- (6) Ritter, J. K.; Crawford, J. M.; Owens, I. S. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *266*, 1043-1047.
- (7) Sato, H.; Koiwai, O.; Tanabe, K.; Kashiwamata, S. Isolation and sequencing of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA: Possible alternate splicing of a common primary transcript. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *169*, 260-264.
- (8) Mackenzie, P. I. Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDPglucuronosyltransferase involved in substrate selection. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 3432-3435.
- (9) Magdalou, J.; Hochman, Y.; Zakim, D. Factors modulating the catalytic specificity of a pure form of UDP-glucuronyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13624-13629
- (10) Burchell, B. Isolation and purification of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase from rat liver. *FEBS Lett.* **1980**, *111*, 131-135.

- (11) Fournel, S.; Grégoire, B.; Magdalou, J.; Carré, M. C.; Lafaurie, C.; Siest, G.; Caubère, P. Inhibition of bilirubin UDPglucuronosyltransferase activity by triphenylacetic and related compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *883*, 190-196.
- (12) Fournel-Gigleux, S.; Shepherd, S. R. P.; Carré, M. C.; Burchell, B.; Siest, G.; Caubère, P. Novel inhibitors and substrates of bilirubin: UDPglucuronosyltransferase Arylalkylcarboxylic acids. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *183*, 653-659
- (13) Pillot, T.; Battaglia E.; Said, M.; Ziegler, J. C.; Fournel-Gigleux, S.; Cartier, A.; Magdalou, J.; Siest, G. Design of inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase chemically related to arylcarboxylic acids. In *Hepatic Metabolism and Disposition of Endo-and Xenobiotics, Falk Symposium n°57* (Bock, K. W., Gerok, W., Matern, S., & Schmid, R., Eds; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London, **1991**, pp 161-167.
- (14) Said, M.; Noort, D.; Magdalou, J.; Ziegler, J. C.; van der Marel, G. A.; Mulder, G. J.; Siest, G. Selective and potent inhibition of different hepatic UDP-glucuronosyltransferase activities by ω,ω,ω -triphenylalcohols and UDP derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 140-145.
- (15) Bader, R. F. W. in *The Chemistry of the Hydroxyl Group* (Patai S. Ed.) **1971**, p. 1, London.
- (16) Ebersson, L. *The Chemistry of the Carboxylic acids and Esters* (Patai S. Ed.). **1969**, pp. 211-288, London.
- (17) Brodersen, R. Bilirubin: solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J. Biol. Chem.* **1979**, *244*, 2364-2369.
- (18) Ostrow, J. D.; Celic, L.; Mukerjee, P. Molecular and micellar associations in the pH-dependent stable and metastable dissolution of unconjugated bilirubin by bile salts. *J. Lipid Res.* **1988**, *34*, 335-348.
- (19) Livertoux, M. H.; Bessière, J. Titrage colorimétrique de composés acides d'intérêt pharmaceutique en milieu diméthylsulfoxyde. *Talanta* **1981**, *28*, 81-88.
- (20) Crawford, J. M.; Ransil B. J.; Narciso, J. P.; Gollan, J. L. Hepatic microsomal bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. The kinetics of bilirubin mono- and diglucuronide synthesis. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16943-16950.

- (21) Erikson, E. F.; Danielson, H.; Brodersen, R. Bilirubin-liposomes interaction. Binding of bilirubin dianion, protonisation and aggregation of bilirubin acid. *J. Biol. Chem.* **1981**, *10*, 4269-4274.
- (22) Yang, B.; Morris, M. D. Resonance Raman Spectroscopy of Bilirubin: band assignement and application to bilirubin/lipid complexation. *Biochemistry* **1991**, *30*, 688-694.
- (23) Tiribelli, C.; Lunazzi, G. C.; Sottocasa, G. L. Biochemical and molecular aspects of the hepatic uptake of organic anions. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1031*, 261-275.
- (24) Bonnet, R. D.; Davies, J. E.; Hursthouse, M. B.; Sheldrick, G. M. The structure of bilirubin. *Proc. R. Soc. (London)* **1978**, *202*, 249-268.
- (25) Mugnoli, A.; Manitto, P.; Monti, D. Structure of bilirubin IXa (Isopropylammonium salt)chloroform solvate $C_{33}H_{34}N_4O_6^{2-} \cdot 2C_3H_{10}N^+ \cdot 2CHCl_3$ *Acta Crystal.* **1983**, *39*, 1287-1291.
- (26) McDonagh, A. F.; Lightner, D. A. 'Like a shrivelled blood orange'-bilirubin, jaundice, and phototherapy. *Pediatrics* **1985**, *75*, 443-455.
- (27) McDonagh, A. F.; Lightner, D. A. The importance of molecular structure in bilirubin metabolism and excretion. In *Hepatic Metabolism and Disposition of Endo-and Xenobiotics, Falk Symposium n°57* (Bock, K. W., Gerok, W., Matern, S., & Schmid, R., Eds; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Boston, London, **1991**, pp 47-59.
- (28) Lester, R.; Klein, P. D. Bile pigment excretion: A comparaisn of the biliary excretion of bilirubin and bilirubin derivatives. *J. Clin. Invest.* **1966**, *45*, 1839-1846.
- (29) Lightner, D. A.; Wijekoon, W. M. D.; Zhang, M. H. Understanding bilirubin conformation and binding circular dichroisme of human serum albumin complexes with bilirubin and esters. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 16669-16676.
- (30) Blankaert, N.; Heirwegh, K. P. M.; Saman, Z. Comparaisn of the biliary excretion of the four isomers of bilirubin-IX in Wistar and homozygous Gunn rats. *Biochem. J.* **1977**, *164*, 229-236.
- (31) McDonagh, A. F.; Palma, L. A.; Lightner, D. A. Blue light and bilirubin excretion. *Science* **1980**, *208*, 145-151.

- (32) McDonagh, A. F.; Palma, L. A.; Trull, F. R.; Lightner, D. A. Phototherapie for neonatal jaundice. Configurational isomers of bilirubin. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6865-6867.
- (33) Vanstapel, F.; Blankaert, N. On the binding of bilirubin and its structural analogues to hepatic microsomal bilirubin UDP-glucuronyltransferase. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6074-6082.
- (34) Brown, H. C.; Stocky, T. P. Selective reductions. 24. Acyloxyboranes in carboxylic acids with Borane-tetrahydrofuran. Acyloxyboranes as intermediates in the fast reduction of carboxylic acids by Borane-tetrahydrofuran. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8218-8226.
- (35) Miyashita, M.; Yoshikoshi, A.; Grieco, P. A. Pyridinium p-toluenesulfonate. A mild and efficient catalyst for the tetrahydropyranylation of alcohols. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3772-3774.
- (36) Gilman, H.; Gaj, B. J. Reaction of phenyl-substituted methanes and ethanes with lithium or n-butyllithium. *J. Org. Chem.* **1963** *28*, 1725-1727.
- (37) Descoins, S.; Samain, D.; Lalanne-Cassou, B.; Gallois, M. Synthèses stéréosélectives des acétoxy-1 dodécadiènes 7E, 9E et 7E, 9Z, attractifs sexuels pour le mâle de l'eudemis de la vigne: Lobesia (polychoris) botrana Den et Schiff, lepidoptere tortricidae. *Bull. Soc. Chim.* **1977**, *9*, 941-946.
- (38) Tamura, M; Kochi, J. K. Copper-catalysed coupling of grignard reagents and alkyl halides in tetrahydrofuran solutions. *J. Organometal. Chem.* **1972**, *42*, 205-228.
- (39) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- (40) Duff, R. B. Carbohydrate sulfuric esters. Parts V. The demonstration of Walden inversion on hydrolysis of barium 1:6-anhydro-B-D-Galactose 2-sulfate. *J. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1597-1600.
- (41) Wittig, G.; Schoellkopf, U. Methylene cyclohexane in *Org. Synt.* Melvin Newman Ed., **1960**, *40*, 66-68.
- (42) Robinson, R. A.; Bower, V. E. The ionisation constant of hydroxylamine. *J. Chem. Soc.* **1961**, *65*, 1279.

- (43) Stewart, J. J. P. Optimisation of parametrs for semiempirical methods. *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 209-220.
- (44) Sutton, L. E. in *Interatomic Distance* The London Chemical Society, London, **1958**, 375.
- (45) Rinaldi, D.; Hoggan, P. E.; Cartier, A. GEOMOS: semi-empirical SCF system for dealing with solvent effects and solide surface adsorption. *Q. C. P. E. Bull.* **1989**, *9*, 128.
- (46) Clark, M.; Cramer III; R. D.; Van Opdenbosch, N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *J. Comp. Chem.* **1989**, *8*, 982-1012.
- (47) Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219-3228.
- (48) Gasteiger, J.; Marsili, M. Prediction of proton magnetic rsonnance shifts: the dependence on hydrogen charges obtained by iterative partial equalization of orbital electronegativity. *Organ. Magn. Reson.* **1981**, *15*, 353-360.
- (49) Marsili, M.; Gasteiger, J. π charge distribution from molecular topology and π orbital electronegativity. *Croat. Chem. Acta* **1980**, *53*, 601-614.
- (50) Mayer , D.; Naylor, C.B.; Motoc, I.; Marshall, G.R. A unique geometry of the active site of angiotensin-converting enzyme consistent with structure-activity studies. *J. Comp. Aided Mol Des.* **1987**, *1*, 3-16.
- (51) Fournel, S.; Magdalou, J.; Pinon, P.; Siest, G. Differential induction profile of drug-metabolizing enzymes after treatement with hypolidaemic agents. *Xenobiotica* **1987**, *17*, 445-457.
- (52) Hogeboom, G. H. Fractionation of cell components of animal tissues. General method for the isolation of liver cell components. *Methods Enzymol.* **1955**, *1*, 16-19.
- (53) 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*, 248-254.
- (54) Heirwegh, K. P. M.; Van de Vijver, M.; Fevery J. Assay and properties of digitonin-activated bilirubin uridine diphosphate glucuronosyltransferase from rat liver. *Biochem. J.* **1972**, *129*, 605-618.

(55) Segel, I. H. (1975) In *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, **1975**.

Table I: Inhibitory effect of a series of arylalkyl carboxylic acids and of corresponding alcohols on the activity of the rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase

| carboxylic acids $\text{Ph}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ | | | | alcohols $\text{Ph}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ | | |
|---|---------------------|----------------------|---------------|---|---------------------|----------------------|
| compound | $I_{50}(\text{mM})$ | $K_i(\mu\text{M})^1$ | pK_a | compound | $I_{50}(\text{mM})$ | $K_i(\mu\text{M})^1$ |
| 0a | >1.0 | 110 ^c | 9.4 | 0b | >1 | - |
| 1a | 0.90 | 75 ^c | 10.6 | 1b | 0.36 | - |
| 2a | 0.80 | 61 ^c | 10.8 | 2b | 0.18 | 75 |
| 3a | 0.33 | 47 ^c | 11.2 | 3b | 0.20 | - |
| 4a | 0.25 | 25 ^c | 11.0 | 4b | 0.19 | 90 |
| 5a | 0.21 | 12 ^c | 11.0 | 5b | 0.28 | - |
| 6a | 0.25 | 55 ^c | 11.0 | 6b | 0.34 | 112 |
| 7a | 0.27 | 77 ^c | 11.0 | 7b | 0.33 | - |
| | | | | 8b | 0.60 | 320 |

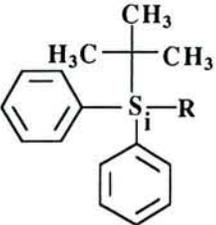
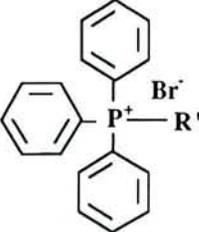
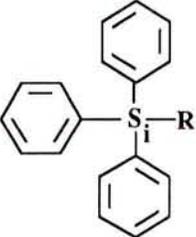
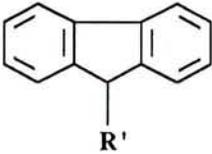
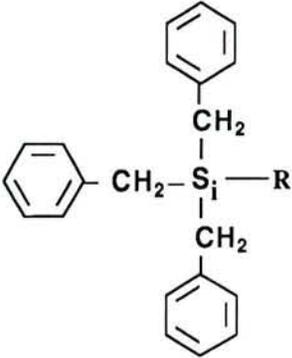
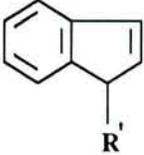
The arylalkyl carboxylic acids and the corresponding alcohols were designated by the letter a or b, respectively; the associated number states for the number of methyl group (0 to 8) in the molecule. The microsomes were optimally activated by digitonin (digitonin-protein weight ratio 1:1) and were incubated at 37 °C in 300 mM Tris-maleate buffer (pH 7.8) in the presence of 7.5 mM MgCl_2 , 2.35 mM UDP-glucuronic acid, 0.125 mM bilirubin and increasing concentrations of inhibitors ($1 \cdot 10^{-6}$ to $1 \cdot 10^{-3}$ M).¹ The inhibition was competitive for all the compounds tested, except for compounds **7a** and **8b** (non competitive inhibition). Ph corresponds to the phenyl group; -, not determined. ^c Taken from ¹².

Table II: Effect of modification of the hydrocarbon chain and of the terminal functional group on the inhibition of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase.

| structure | I_{50} (mM) | K_i (μ M) |
|--|---------------|------------------|
| I $\text{Ph}_3\text{C-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ | 0.16 | - |
| II $\text{Ph}_3\text{C-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOCH}_3$ | >1.0 | - |
| III $\text{Ph}_3\text{C-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ | 0.25 | - |
| IV $\text{Ph}_3\text{C-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$ | 0.25 | 43 |
| V $\text{Ph}_3\text{Si-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ | 0.25 | - |
| VI $\text{Ph}_3\text{Si-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$ | 0.17 | 38 |
| VII $\text{Ph}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-SO}_3\text{H}$ | >1.0 | - |
| VIII $\text{Ph}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH(COOH)}_2$ | >1.0 | - |
| IX $\text{Ph}_3\text{C-CONH-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$ | >1.0 | - |
| X $\text{Ph}_3\text{C-(CH}_2\text{)}_5\text{-COOCH}_3$ | >1.0 | - |

The experimental conditions are described in legend of Table I.

Table III: Effect of modification of the triphenylmethyl group on the inhibition of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase.

| Structure | I ₅₀ (mM) | Structure | I ₅₀ (mM) |
|---|----------------------|---|----------------------|
|  | 0.15 |  | > 1.0 |
|  | 0.17 |  | 1.0 |
|  | 0.45 |  | 1.0 |

The experimental conditions are indicated in Table I. R, $-(O-CH_2-CH_2)_2-OH$; R', $-(CH_2)_5-COOH$.

Legends to Figures

Figure 1: Tridimensional structures of bilirubin.

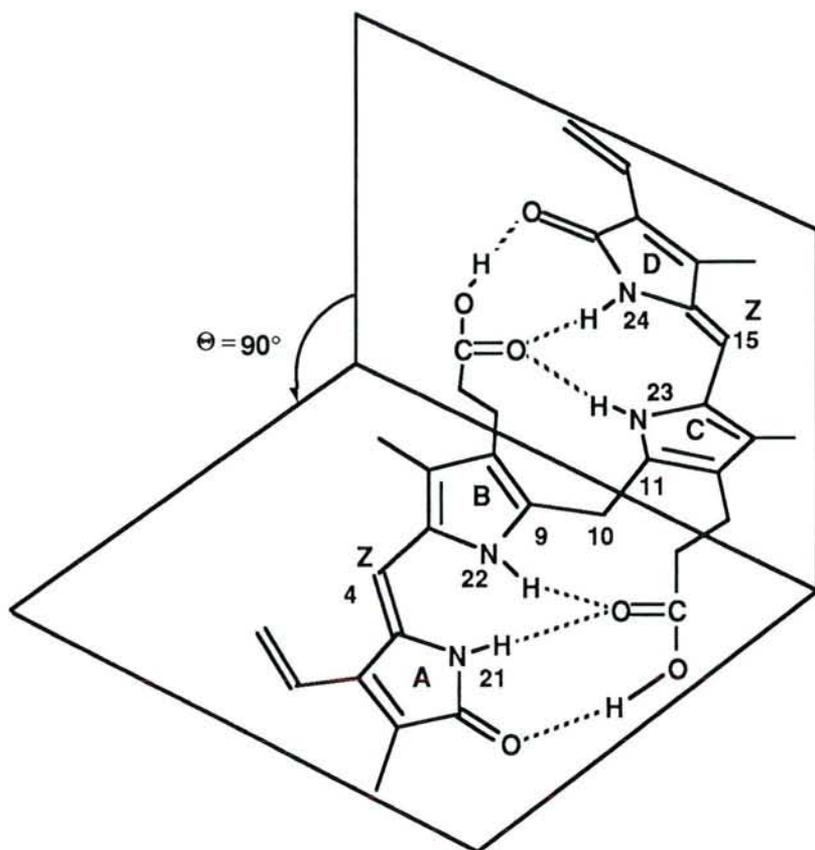
A, Structure by X-ray analysis according to Bonnet *et al.* (1978); B, structure after modelization by GEOMOS and SYBYL.

Figure 2: Superimposition of 3,3,3-triphenylpropan-1-ol (shown in green) with (4Z, 15Z)-bilirubin IX α using SYBYL. The dotted yellow lines represent the six intramolecular hydrogen bonds; The edges of the triangle drawn (pink lines) corresponding to the centers of the aromatic ring of the inhibitor superimposed with those of three pyrrole rings of bilirubin. The length of the sides of the triangle are: 6.556 Å, 4.634 and 4.444 Å (clockwise).

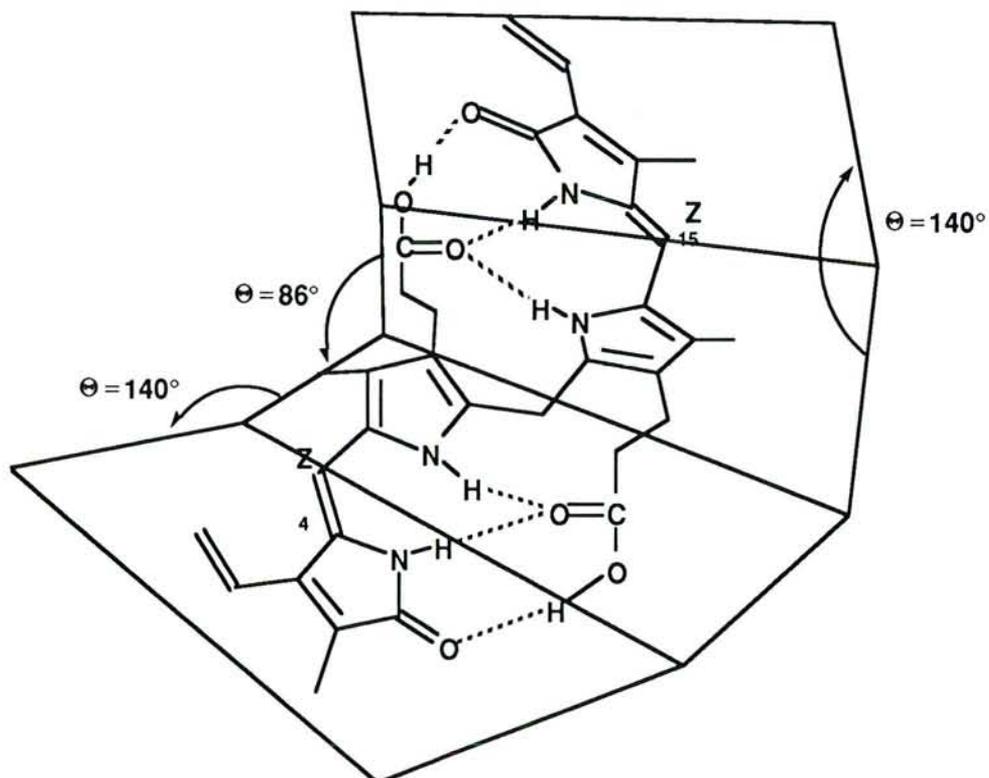
Figure 3: Schematic representation of the three regions of bilirubin.

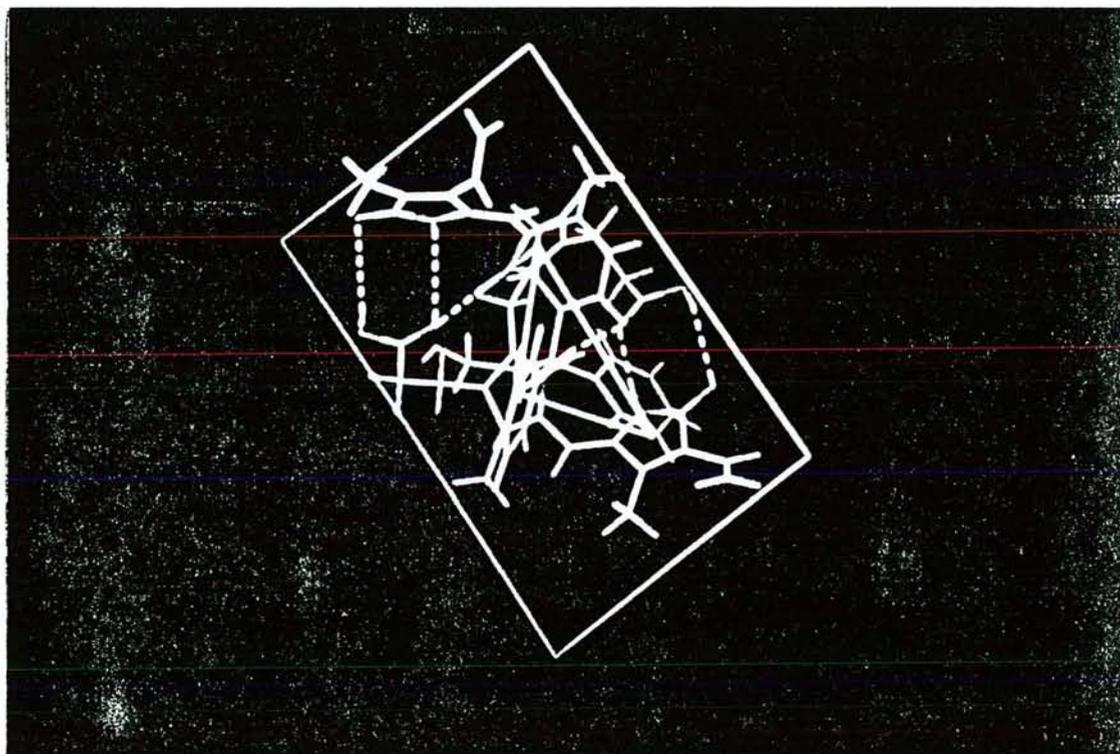
(i), hydrophilic region; (ii), hydrophobic region; (iii) steric and hydrophobic regions.

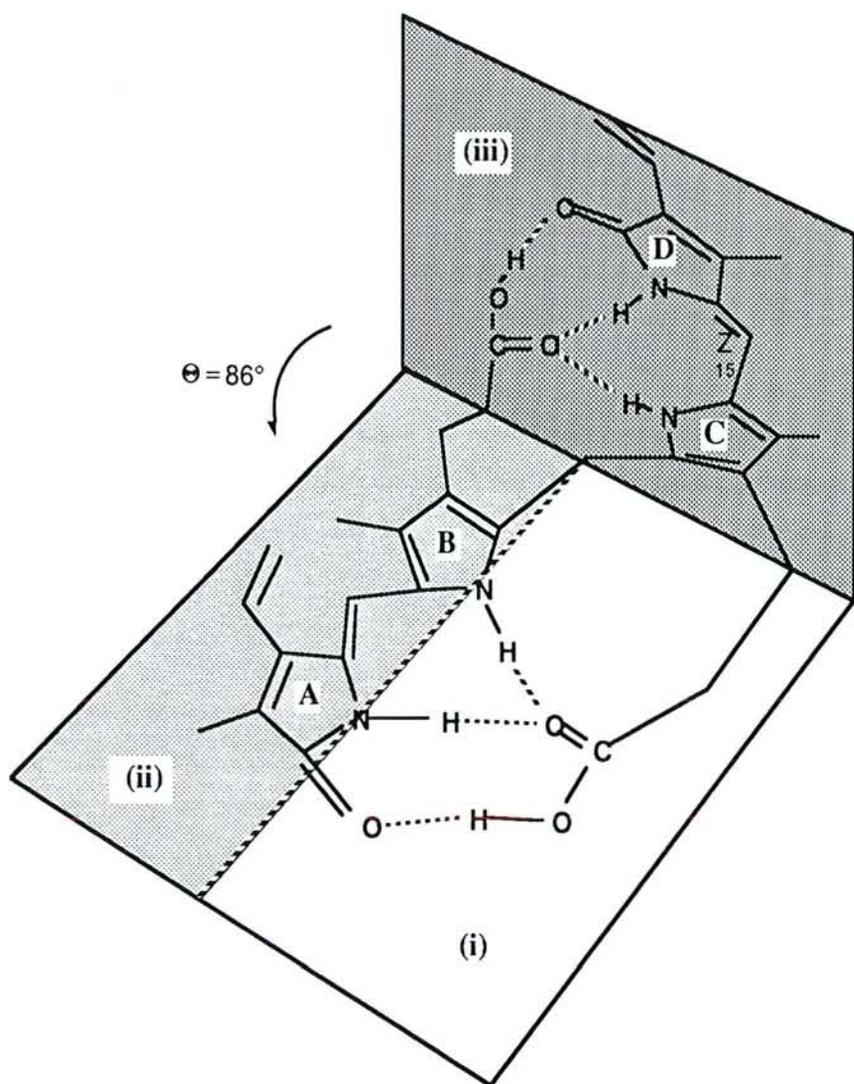
A



B







DEMANDE D'IMPRIMATUR

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I, mention Sciences du Médicament

présenté par : Eric BATTAGLIA

SUJET : *Contribution d'inhibiteurs compétitifs, de sondes électrophiles et de marqueurs de photoaffinité à l'étude du site actif de l'UDP-glucuronosyltransférase recombinante humaine UGT1*6 (conjugaison des composés phénoliques plans)*

* JURY

| | |
|---------------------|---|
| <u>Président:</u> | G. SIEST, Professeur (Nancy) |
| <u>Rapporteurs:</u> | J.H. VAN BOOM, Professeur (Leiden, Pays-Bas) |
| | G. VERGOTEN, Professeur (Villeneuve d'Ascq, France) |
| <u>Juges:</u> | G. BRANLANT, Professeur (Nancy) |
| | S. FOURNEL-GIGLEUX, Chargée de Recherche INSERM (Nancy) |
| | J. MAGDALOU, Directeur de Recherche CNRS (Nancy) |

Date de soutenance : 3 novembre 1993

AVIS

Favorable ~~Défavorable~~

Nancy, le 21 Octobre 1993

Le Président de Jury de Thèse,

AVIS

Favorable ~~Défavorable~~

Nancy, le

L'Expert,

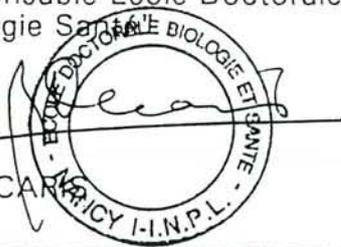
Proposition :

In favorable

Nancy, le 29/10/93

Responsable Ecole Doctorale
"Biologie Santé"

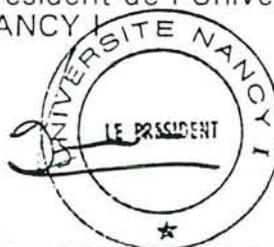
B. DECARIE



Vu et Approuvé,

Nancy, le 27 OCT. 1993

Le Président de l'Université
de NANCY I



* Indiquer les rapporteurs.

RESUME

Les UDP-glucuronosyltransférases constituent une famille d'enzymes impliquées dans le métabolisme de composés endogènes (bilirubine, acides biliaires...) et exogènes (médicaments, polluants...). Nous avons développé la caractérisation du site actif d'une de ces enzymes glucuronocouplant les composés phénoliques plans, l'UGT1*6, ceci à partir d'une lignée de cellules eucaryotes recombinantes exprimant de manière stable cette isoforme. Ce travail décrit dans un premier temps l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs pour la caractérisation du site actif et du mécanisme de la glucuronocouplage catalysée par cette enzyme recombinante. En particulier, les paramètres stériques et électrostatiques responsables de l'effet inhibiteur de cette série de composés ont été définis en établissant une relation quantitative structure-activité en trois dimensions à l'aide de la méthode comparative d'analyse des champs moléculaires. Dans un deuxième temps, nous décrivons la modification chimique de cette isoforme par le diéthyl pyrocarbonate. Nous avons ainsi mis en évidence un résidu histidyl impliqué dans le processus catalytique. Enfin, nous développons dans la dernière partie de ce manuscrit la synthèse d'une nouvelle sonde photoactivable de cette isoforme, le 8-azido-2-naphtol-beta-D-glucuronide, pour cibler son site actif.

SUMMARY

UDP-glucuronosyltransferases belong to an enzymes family involved in the metabolism of endogenous compounds (such as bilirubin or biliary acids) and exogenous compounds (such as drugs, pollutants...). We have developed the active site characterization of one of these enzymes which glucuronidate planar phenolic compounds, the UGT1*6, from a recombinant eucaryotic cell line which stably expresses this isoform. First of all, this work describes the use of competitive inhibitors for the characterization of the active site and the glucuronidation mechanism catalysed by this recombinant enzyme. In particular, the steric and electrostatic parameters responsible for the inhibitory potency of this series of compounds were defined through the determination of a tridimensional quantitative structure-activity relationship with the help of the comparative molecular field analysis method. Secondly, we describe the chemical modification of this isoform by diethyl pyrocarbonate. We thus provided evidence for the involvement of an histidyl residue in the catalytic process. Finally, we develop in the last part of this manuscript the synthesis of a new photoaffinity probe of this isoform, the 8-azido-2-naphtol-beta-D-glucuronide to probe its active site.