



**HAL**  
open science

# Modulation de l'activité de glucuroconjugaison et de l'expression de l'isoforme UGT1A6 cérébrale lors d'un stress oxydant ou d'une inflammation : rôle du statut redox intracellulaire

Tony Heurtaux

► **To cite this version:**

Tony Heurtaux. Modulation de l'activité de glucuroconjugaison et de l'expression de l'isoforme UGT1A6 cérébrale lors d'un stress oxydant ou d'une inflammation : rôle du statut redox intracellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN12505 . tel-01747418

**HAL Id: tel-01747418**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747418>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

2005

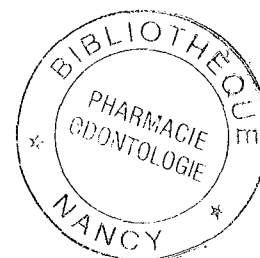
ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE - SANTE - ENVIRONNEMENT »

## THESE

Présentée et soutenue publiquement

le **2 novembre 2005**

pour obtenir le titre de



## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

- Mention Sciences du Médicament -

par

**Tony HEURTAUX**

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies  
*Métabolisme et Mécanisme d'Action des Médicaments*  
*Pharmacologie Clinique*

Sujet :

**Modulation de l'activité de glucuroconjugaison et de l'expression  
de l'isoforme UGT1A6 cérébrale lors d'un stress oxydant ou  
d'une inflammation : rôle du statut redox intracellulaire**

### Membres du jury

Juges :	J. MAGDALOU	Docteur
	A. MINN	Docteur
	F. ROUX	Docteur
Rapporteurs :	F. LASBENNES	Professeur
	E. HIRSCH	Docteur

## Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. le Professeur Patrick Netter pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement M. le Docteur Alain Minn pour m'avoir relancé dans le monde de la Recherche et m'avoir fait confiance lors de ces années nancéennes. Merci pour vos conseils et votre apport scientifique lors de cette thèse où il n'a pas été évident de travailler sur le cerveau dans un laboratoire à consonance articulaire. Alors pour tout ce que vous m'avez apporté, je tenais à vous dire un grand MERCI.

Je remercie Mme le Docteur Françoise Roux, M. le Docteur Etienne Hirsch et M. le Professeur François Lasbennes qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail. Trouvez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

J'adresse mes remerciements à M. le Docteur Jacques Magdalou pour sa disponibilité, ses conseils et sa présence dans ce jury.

Je remercie Karim Bordji pour tous les instants mémorables passés au laboratoire, à la brasserie, au gymnase, à Saint-Dizier, au Der, à Lyon, et sans oublier à Wassy. Je te remercie pour tes conseils lors de la rédaction du premier article ainsi que dans la relecture d'une partie de ce travail. T'es vraiment quelqu'un de très agréable qui s'intéresse à tout. Bon vent à toi en Normandie !!!

Je remercie Michel Thiery pour s'être occupé de mes « petits » et m'avoir tenu compagnie lors du café quotidien de 7h.

Je remercie bien évidemment Corinne Guingamp pour son agréable compagnie lors de mon passage au laboratoire. Tu as été un binôme de « brasserie » le midi au restaurant universitaire mais également une personne à l'écoute, toujours prête à donner des conseils.

Je remercie Emmanuelle Nédélec pour tous les bons moments passés sur la fac et en dehors. Après avoir trouvé une situation stable, j'espère maintenant que tu retrouveras Alex au plus vite.

Je remercie Alexandre Benani pour m'avoir permis de m'épanouir au sein du laboratoire. Après ta thèse, je me suis retrouvé orphelin d'un co-équipier modèle. Ta disponibilité, tes conseils, tes connaissances associées à tes compétences m'ont permis de mener à bien mes travaux et de me former à des techniques nouvelles. Nos parties de foot, de badminton et les soirées de Ligue des Champions resteront des moments importants, voire essentiels, dans le bon déroulement de ces 3 années de thèse. N'oublions pas les temps 12h qui resteront mémorables. Cette thèse vient donc conclure, en beauté, ces 4 années nancéennes auxquelles je t'associe pleinement. Et comme tu le sais, si Eric était là, il dirait :

« ... Ouah ! C'est de toute beauté ! C'est Marie-Joëlle qui va être contente ... ».

Je remercie David Moulin, notre John Mc Enroe local, pour ces bons moments passés ensemble. Notre entente a participé à la bonne humeur du laboratoire mais également des cours de badminton qui, d'ailleurs, se souviennent encore de ton passage (les raquettes aussi !). Je te remercie pour l'aide que tu m'as apporté dans l'apprentissage du gel retard notamment. Ta volonté d'aller de l'avant et ta ténacité sont les signes d'une carrière prometteuse.

Je tiens également à remercier tous ceux que j'ai pu côtoyer au laboratoire : Marie-Hélène Piet et Anne-Claude Humbert pour votre compagnie mais également les fou-rires lors d'un certain contrat industriel ; Arnaud Bianchi (« bianchito ») pour tes conseils ; Sandrine Boyault (« la Goyette du 5-8 »), Virginie Lattard, Sandrine Gulberti (« Allez Milan ! »), Hamed Laroui (« le bon gars »), Jean-Baptiste Vincourt (« le surfeur »), Carine Asensio, Joseph Paquet, Paul-Emile Poléni, Stéphanie Etienne, Catherine Bui, Cécile Guillaume, Sylvie Lévêque, et les secrétaires (Nadia, Hélène et Francine) pour avoir partagé mon quotidien pendant ces années.

Et sans oublier « la bande des joyeux lurons » à côté de qui les journées sont passées très (trop) vite : Meriem Koufany, Mélanie Kirchmeyer (« the Wall »), Sylvie Sebillaud, Nanrayamann Venkatesan (« the teacher »), Magali Gelinotte (« le petit renard des Balcons ») et Frédéric Lionneton (« le texan »).

A mes parents,  
sans qui je ne serais là aujourd'hui;

à Jacky, Sandra et Mattéo;

à ma belle-famille;

à mes amis;

à Karine,  
pour m'avoir supporté durant toutes ces années,  
pour ta patience et ton Amour.

à Ethane, notre « p'tit loup »,

Ce travail est le résultat de la confiance  
et du soutien dont vous m'avez accordé.

*« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison  
avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas  
plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison »*

*- Henri Poincaré -*

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé sous la responsabilité du  
Docteur Alain Minn

au

Laboratoire de « **Pharmacologie et Physiopathologie Articulaires** »

Unité Mixte de Recherche n°7561 CNRS-UHP

Faculté de Médecine

54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

dirigée par le Professeur Patrick Netter



### Publications relatives au travail présenté :

“Redox state alteration modulates astrocyte glucuronidation”

**Heurtaux T**, Benani A, Bianchi A, Moindrot A, Gradinaru D, Magdalou J, Netter P, Minn A  
*Free Radical Biology and Medicine*, 2004, **37**(7) : 1051-63

“Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes”

**Heurtaux T**, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, Minn A  
*Neuropharmacology*, sous presse

### Publications non présentées dans ce mémoire :

“Pharmacokinetics of methotrexate in the extracellular fluid of brain C6-glioma after intravenous infusion in rats”

Dukic S, **Heurtaux T**, Kaltenbach ML, Hoizey G, Lallemand A, Gourdier B, Vistelle R  
*Pharmaceutical Research*, 1999, **16**(8) : 1219-25

“Influence of schedule of administration on methotrexate penetration in brain tumours”

Dukic SF, **Heurtaux T**, Kaltenbach ML, Hoizey G, Lallemand A, Vistelle R  
*European Journal of Cancer*, 2000, **36**(12) : 1578-84

“Up-regulation of fatty acid metabolizing-enzymes mRNA in rat spinal cord during persistent peripheral local inflammation”

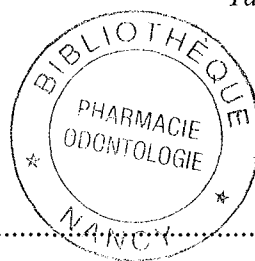
Benani A, Vol C, **Heurtaux T**, Asensio C, Dauça M, Lapticque F, Netter P, Minn A  
*European Journal of Neuroscience*, 2003, **18**(7) : 1904-14

“Influence of C6 and CNS1 brain tumors on methotrexate pharmacokinetics in plasma and brain tissue”

Dukic SF, Kaltenbach ML, **Heurtaux T**, Hoizey G, Lallemand A, Vistelle R  
*Journal of Neuro-Oncology*, 2004, **67**(1-2) : 131-8

“Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in rat spinal cord after peripheral noxious stimulation”

Benani A, **Heurtaux T**, Netter P, Minn A  
*Neuroscience Letters*, 2004, **369**(1) : 59-63



## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	7
<b>Table des illustrations</b> .....	13
<b>Liste des abréviations</b> .....	16
<b>Chapitre I - Introduction</b> .....	19
<b>Chapitre II - Etude bibliographique</b> .....	21
<b>A - Le cerveau : quartier général du système nerveux central</b> .....	21
<b>1 - Généralités</b> .....	21
<b>2 - Les cellules cérébrales</b> .....	21
2.1 - Les neurones.....	21
2.2 - Les cellules endothéliales cérébrovasculaires.....	22
2.3 - Les cellules gliales.....	22
2.3.1 - La microglie.....	22
2.3.2 - Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann.....	22
2.3.3 - Les cellules épendymaires ou épendymocytes.....	23
2.3.4 - Les astrocytes.....	23
<b>3 - Le liquide céphalorachidien (LCR)</b> .....	27
<b>4 - La barrière hémato-encéphalique (BHE)</b> .....	27
4.1 - Généralités.....	27
4.2 - La BHE : une barrière physique.....	28
4.2.1 - Composants cellulaires de la BHE.....	28
4.2.2 - Perméabilité sélective de la BHE.....	30
4.3 - La BHE : une barrière métabolique et active.....	32
4.4 - Absence de barrière dans certaines régions cérébrales.....	33
<b>B - Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques</b> .....	33
<b>1 - Généralités</b> .....	33
1.1 - La fonctionnalisation ou phase I.....	34
1.1.1 - Les cytochromes P450.....	34
1.1.2 - Les monoamines oxydases.....	36
1.1.3 - Les monooxygénases à flavine.....	37
1.1.4 - Les époxydes hydrolases.....	37
1.2 - La conjugaison ou phase II.....	37
1.2.1 - Les glutathion <i>S</i> -transférases.....	37
1.2.2 - Les méthyltransférases.....	38
1.2.2.1 - Les catéchol <i>O</i> -méthyltransférases.....	38
1.2.2.2 - Les thiol <i>S</i> -méthyltransférases.....	39
1.2.2.3 - Les <i>N</i> -méthyltransférases.....	39
1.2.3 - Les <i>N</i> -acétyltransférases.....	39
1.2.4 - Les sulfotransférases.....	39
1.2.5 - Les UDP-glucuronosyltransférases.....	40
1.3 - L'élimination ou phase III.....	40
<b>2 - Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT)</b> .....	41
2.1 - Nomenclature.....	42
2.2 - Répartition des UGT.....	45

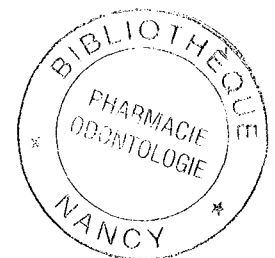
2.2.1 - Généralités .....	45
2.2.2 - Les UGT cérébrales .....	46
2.3 - Localisation des UGT .....	47
2.4 - La réaction de glucuroconjugaison .....	48
2.5 - Rôles pharmacologiques et physiologiques des UGT .....	49
2.5.1 - Conjugaison de xénobiotiques .....	49
2.5.2 - Conjugaison de composés endogènes .....	51
2.6 - L'UDP-glucuronosyltransférase 1A6 .....	51
2.7 - Régulation des UGT .....	52
2.7.1 - Induction enzymatique .....	52
2.7.1.1 - Les hydrocarbures polycycliques .....	52
2.7.1.2 - Les barbituriques .....	53
2.7.1.3 - Les proliférateurs de peroxysomes .....	53
2.7.1.4 - Implications de facteurs de transcription .....	54
2.7.2 - Inhibition enzymatique .....	55
2.7.3 - Déficiences génétiques de la glucuroconjugaison .....	56
<b>C - L'inflammation .....</b>	<b>56</b>
1 - Généralités .....	56
2 - La réaction inflammatoire .....	57
3 - Les médiateurs de l'inflammation .....	59
3.1 - Les cytokines et chémokines .....	59
3.1.1 - Les cytokines .....	59
3.1.2 - Les chémokines .....	60
3.2 - Les médiateurs lipidiques .....	60
3.2.1 - Le PAF ou « <i>platelet-activating factor</i> » .....	61
3.2.2 - L'acide arachidonique et ses dérivés .....	62
3.2.2.1 - Les prostaglandines et les thromboxanes .....	63
3.2.2.2 - Les leucotriènes .....	63
3.2.2.3 - Les lipoxines .....	64
4 - Inflammation et système nerveux central .....	65
4.1 - De l'inflammation systémique à la neuroinflammation .....	65
4.2 - Médiateurs impliqués dans la neuroinflammation .....	66
4.2.1 - Les cytokines .....	66
4.2.2 - Les chémokines .....	68
4.2.3 - COX-2 et les prostaglandines .....	68
4.2.4 - Le monoxyde d'azote (NO <sup>•</sup> ) .....	69
<b>D - Le stress oxydant .....</b>	<b>70</b>
1 - Définition .....	70
2 - Les acteurs : les espèces activées de l'oxygène .....	71
2.1 - Définition .....	71
2.2 - La chimie de l'oxygène .....	72
2.2.1 - Structure électronique et réduction monoélectronique de l'oxygène .....	72
2.2.2 - Les différentes EAO .....	72
2.2.2.1 - L'oxygène singulet ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ) .....	73
2.2.2.2 - L'anion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) .....	73
2.2.2.3 - Le monoxyde d'azote (NO <sup>•</sup> ) .....	74
2.2.2.4 - Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	74
2.2.2.5 - Le radical hydroxyle ( <sup>•</sup> OH) .....	75
2.2.2.6 - Les radicaux alkyles R <sup>•</sup> et peroxydes ROO <sup>•</sup> .....	75

2.3 - Les différentes sources d'EAO.....	75
2.3.1 - Les sources non mitochondriales.....	76
2.3.1.1 - Sources enzymatiques.....	76
2.3.1.2 - Sources non enzymatiques.....	77
2.3.2 - Les sources mitochondriales.....	79
<b>3 - Les systèmes de défenses anti-oxydantes.....</b>	<b>80</b>
3.1 - Le glutathion : pièce maîtresse de la défense anti-oxydante.....	81
3.2 - Les autres molécules anti-oxydantes.....	81
3.3 - Les principales protéines enzymatiques éliminant les EAO.....	82
3.3.1 - Les superoxyde dismutases.....	82
3.3.2 - La catalase.....	83
3.3.3 - La glutathion peroxydase.....	83
<b>4 - Les EAO : régulation des voies de signalisation et de l'expression génique.....</b>	<b>84</b>
4.1 - Oxydation des résidus cystéine.....	85
4.2 - Régulation redox des protéines kinases et phosphatases.....	85
4.3 - Régulation redox des facteurs de transcription.....	86
<b>5 - Implications physiopathologiques des EAO.....</b>	<b>87</b>
5.1 - Les maladies neurodégénératives.....	88
5.2 - La théorie du vieillissement.....	89
<b>Chapitre III - Objectifs du travail.....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre IV - Matériels et méthodes.....</b>	<b>93</b>
<b>A - Etudes <i>in vitro</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>1 - Cellules.....</b>	<b>93</b>
1.1 - Cultures primaires.....	93
1.2 - Lignées V79-1A6 et V79-2B1.....	93
<b>2 - Caractérisation de la culture d'astrocytes.....</b>	<b>94</b>
<b>3 - Traitements.....</b>	<b>94</b>
3.1 - Modèle de stress oxydant.....	94
3.1.1 - Principe.....	94
3.1.2 - Réalisation.....	95
3.1.3 - Autres traitements.....	95
3.1.3.1 - Traitements pro-oxydants.....	95
3.1.3.2 - Traitements anti-oxydants.....	95
3.2 - Modèle d'inflammation.....	96
3.2.1 - Principe.....	96
3.2.2 - Réalisation.....	96
3.2.3 - Co-traitements.....	96
<b>4 - Evaluation de la toxicité des traitements.....</b>	<b>97</b>
4.1 - Principe.....	97
4.2 - Réalisation.....	97
<b>5 - Etude des marqueurs du stress oxydant.....</b>	<b>97</b>
5.1 - Principe.....	97
5.2 - Dosage colorimétrique du taux de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire.....	98
5.3 - Mise en évidence d'EAO intracellulaires.....	98
5.4 - Mesure des EAO intracellulaires produites.....	98
5.5 - Mesure des taux de glutathion.....	99
5.6 - Mesure des taux de carbonyles.....	99
<b>6 - Etude de médiateurs pro-inflammatoires.....</b>	<b>100</b>
6.1 - Principe.....	100

6.2 - Dosage des nitrites.....	100
6.3 - Dosage des PGE <sub>2</sub> .....	101
<b>7 - Préparations des fractions membranaires .....</b>	<b>101</b>
7.1 - Principe.....	101
7.2 - Réalisation .....	102
7.2.1 - Préparation de microsomes d'astrocytes .....	102
7.2.2 - Préparation de microsomes de cellules V79 .....	103
<b>8 - Dosage des protéines.....</b>	<b>103</b>
8.1 - Principe.....	103
8.2 - Réalisation .....	104
<b>9 - Dosage des glucuronides .....</b>	<b>104</b>
9.1 - Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse .....	104
9.1.1 - Principe.....	104
9.1.2 - Réalisation .....	104
9.2 - Fluorimétrie .....	105
9.2.1 - Principe.....	105
9.2.2 - Réalisation .....	105
9.2.2.1 - Glucuronoconjugaison du 1-naphtol.....	105
9.2.2.2 - Glucuronoconjugaison de la 4-méthylombélliférone .....	106
9.3 - Chromatographie sur couche mince .....	106
9.3.1 - Principe.....	106
9.3.2 - Réalisation .....	107
<b>10 - Analyse de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel.....</b>	<b>108</b>
10.1 - Principe.....	108
10.2 - Réalisation .....	108
10.2.1 - Extraction des ARN totaux .....	108
10.2.2 - Transcription inverse ou « RT » .....	109
10.2.3 - Réaction de polymérisation en chaîne ou « PCR ».....	110
10.2.4 - Analyse de la quantité des amplicons formés.....	111
<b>11 - Analyse de l'activité des protéines nucléaires sur l'ADN .....</b>	<b>111</b>
11.1 - Transfection transitoire.....	111
11.1.1 - Principe.....	111
11.1.2 - Construction plasmidique contenant la partie promotrice du gène codant l'UGT1A6 .....	112
11.1.2.1 - Amplification de la région promotrice par PCR.....	112
11.1.2.2 - Clonage du fragment amplifié par PCR .....	112
11.1.2.3 - Sélection des clones positifs .....	113
11.1.2.4 - Extraction du plasmide .....	113
11.1.3 - Transfection des astrocytes.....	114
11.1.3.1 - Conditions de transfection .....	114
11.1.3.2 - Réalisation .....	114
11.1.4 - Evaluation de l'expression de la GFP.....	115
11.1.5 - Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase.....	115
11.2 - Retard sur gel.....	115
11.2.1 - Principe.....	115
11.2.2 - Réalisation .....	116
11.2.2.1 - Extraction des protéines nucléaires .....	116
11.2.2.2 - Préparation des sondes.....	116
11.2.2.3 - Interaction ADN-protéines et analyse du complexe sur gel .....	117
11.2.2.4 - Identification des protéines du complexe retardé .....	118

12 - Mutagenèse dirigée .....	118
12.1 - Principe .....	118
12.2 - Réalisation .....	120
13 - Analyse statistique .....	121
<b>B - Etudes <i>in vivo</i></b> .....	121
<b>1 - Animaux</b> .....	122
<b>2 - Traitement</b> .....	122
<b>3 - Prélèvement des différentes zones cérébrales</b> .....	122
<b>4 - Activités de glucuroconjugaison</b> .....	124
4.1 - Préparations des fractions membranaires .....	124
4.2 - Dosages des glucuronides .....	124
<b>5 - Analyse de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel</b> .....	124
5.1 - Extraction des ARN totaux .....	124
5.2 - Réactions de « RT-PCR » et analyse sur gel d'agarose .....	124
<b>6 - Analyse statistique</b> .....	125
<b>Chapitre V - Résultats</b> .....	126
<i>Etude in vitro</i> .....	126
<b>A - Caractérisation de la culture d'astrocytes</b> .....	126
<b>B - Influence d'un stress oxydant modéré sur la glucuroconjugaison</b> .....	127
<b>1 - Analyse de la viabilité cellulaire</b> .....	127
<b>2 - Mise en évidence et quantification de la production d'EAO</b> .....	127
<b>3 - Mesure du stress oxydant</b> .....	129
<b>4 - Production de médiateurs pro-inflammatoires</b> .....	130
<b>5 - Modulation de la glucuroconjugaison</b> .....	131
5.1 - Cultures d'astrocytes .....	132
5.2 - Lignées cellulaires V79-1A6 .....	133
5.3 - Lignées cellulaires V79-2B1 .....	134
5.4 - Effets d'autres traitements sur la glucuroconjugaison .....	135
<b>6 - Analyse de l'expression des UGT1A6 et 2B1</b> .....	136
<b>7 - Etude du promoteur de l'UGT1A6</b> .....	137
7.1 - Mise au point des conditions de transfection .....	137
7.2 - Régulation de l'expression de l'UGT1A6 après exposition à la ménadione .....	139
7.3 - Activation du facteur AP-1 dans les astrocytes exposés à la ménadione .....	140
7.4 - Implication d'éléments de réponse présents sur le promoteur de l'UGT1A6 .....	142
<b>C - Influence de conditions inflammatoires sur la glucuroconjugaison</b> .....	143
<b>1 - Analyse de la viabilité cellulaire</b> .....	143
<b>2 - Mesure de la glucuroconjugaison</b> .....	143
<b>3 - Expression des UGT1A6 et 2B1</b> .....	145
3.1 - Traitement au LPS .....	145
3.2 - Traitement aux cytokines pro-inflammatoires .....	146
3.2.1 - Exposition à l'IL-1 $\beta$ .....	146
3.2.2 - Exposition au TNF- $\alpha$ .....	147
<b>4 - Production de médiateurs pro-inflammatoires</b> .....	148
4.1 - Traitement au LPS .....	148
4.2 - Traitement aux cytokines pro-inflammatoires .....	149
<b>5 - Mesure des taux de glutathion après traitement au LPS</b> .....	150

<b>6 - Influence de différents inhibiteurs sur la surexpression de l'UGT1A6 induite par le LPS</b> .....	151
6.1 - Effets d'anti-inflammatoires .....	151
6.2 - Effets d'inhibiteurs de NO synthases .....	152
<b>7 - Tentatives d'explication du mécanisme de surexpression de l'UGT1A6 induite par le LPS</b> .....	153
7.1 - Implication d'un mécanisme transcriptionnel et/ou traductionnel ?.....	153
7.2 - Rôles des MAP kinases ?.....	153
7.3 - Régulation de l'expression de l'UGT1A6 après traitement au LPS.....	154
7.4 - Activation du facteur AP-1 dans les astrocytes exposés au LPS.....	154
7.5 - Implication des sites de fixation à AP-1 sur le promoteur de l'UGT1A6 .....	156
<b>D - Analyse du métabolisme de composés endogènes</b> .....	157
<i>Etude in vivo</i> .....	160
<b>1 - Mesure de la glucuroconjugaison</b> .....	160
<b>2 - Expression de l'UGT1A6</b> .....	160
<b>Chapitre VI - Discussion</b> .....	162
<b>A - Glucuroconjugaison et stress oxydant</b> .....	162
<b>B - Glucuroconjugaison et conditions inflammatoires</b> .....	169
<b>1 - Conditions inflammatoires <i>in vitro</i></b> .....	169
1.1 - Modification de la glucuroconjugaison et régulation de l'UGT1A6.....	169
1.2 - Glucuroconjugaison de composés endogènes .....	175
<b>2 - Conditions inflammatoires <i>in vivo</i></b> .....	177
<b>Chapitre VII - Conclusions et perspectives</b> .....	179
<b>Chapitre VIII - Références bibliographiques</b> .....	182
<b>Annexe</b> .....	195



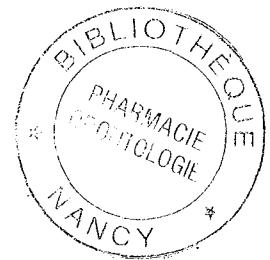
## Table des illustrations

Figure 1. Relations entre neurones, astrocytes et vaisseaux sanguins .....	24
Figure 2. Régulation des taux ioniques extracellulaires par les astrocytes.....	25
Figure 3. Astrocytes et homéostasie du SNC .....	26
Figure 4. Comparaison capillaire classique / capillaire cérébral .....	29
Figure 5. Coefficient de partage de différentes substances médicamenteuses .....	30
Figure 6. Biotransformation des xénobiotiques.....	34
Figure 7. Représentation des principaux domaines des UGT.....	44
Figure 8. Représentation de l'organisation membranaire des UGT dans le RE .....	47
Figure 9. Représentation schématique de la réaction de glucuroconjugaison .....	49
Figure 10. La réaction inflammatoire : de l'initiation à la résolution.....	58
Figure 11. Le métabolisme des phospholipides membranaires .....	61
Figure 12. Voies par lesquelles le LPS affecte la structure et les fonctions cérébrales.....	66
Figure 13. Relations cytokines / pathologies cérébrales.....	67
Figure 14. Equilibre entre les EAO et les différents systèmes de détoxification .....	70
Figure 15. Diversité et réactivité des EAO.....	71
Figure 16. Réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire.....	72
Figure 17. Transformation des EAO produites à partir de l'oxygène moléculaire.....	73
Figure 18. Structure de la ménadione.....	78
Figure 19. Schématisation de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	80
Figure 20. Mécanismes régulant l'homéostasie du glutathion .....	84
Figure 21. Pathologies associées aux EAO .....	88
Figure 22. Isolement des microsomes .....	102
Figure 23. Sites de fixation présents sur le promoteur de l'UGT1A6 .....	118
Figure 24. Les différentes étapes de la mutagenèse dirigée .....	119
Figure 25. Procédure de dissection du cerveau de rat .....	123
Figure 26. Caractérisation de la culture par détection de la GFAP .....	126
Figure 27. Mise en évidence de la production d'EAO .....	128
Figure 28. Quantification de la production astrocytaire d'EAO.....	129
Figure 29. Mesure des taux de glutathion au niveau astrocytaire.....	129
Figure 30. Mesure des taux de carbonyles au niveau astrocytaire.....	130
Figure 31. Mesure de la production de médiateurs pro-inflammatoires et analyse de l'expression de COX-2 et d'iNOS .....	131
Figure 32. Mesure des activités de glucuroconjugaison au niveau des cellules astrocytaires.....	132
Figure 33. Mesure des activités de glucuroconjugaison au niveau des cellules V79-1A6 .....	133
Figure 34. Mesure des activités de glucuroconjugaison au niveau des cellules V79-2B1 .....	134



Figure 35. Modulation de la glucuronoconjugaison astrocytaire .....	135
Figure 36. Expression des UGT1A6 et 2B1 dans les astrocytes .....	137
Figure 37. Comparaisons astrocytes non transfectés (A, B) / astrocytes transfectés (C, D) .....	139
Figure 38. Analyse de l'expression de la GFP 24h après exposition à la ménadione .....	140
Figure 39. Cinétiques de fixation de protéines nucléaires sur les sondes AP-1 (A) et NrF2 (B) .....	140
Figure 40. Activation d'AP-1 dans les astrocytes exposés à la ménadione.....	141
Figure 41. Inactivation du complexe AP-1 par un prétraitement anti-oxydant (NAC) .....	142
Figure 42. Implication des sites AP-1 présents sur le promoteur de l'UGT1A6.....	143
Figure 43. Mesure des activités astrocytaires de glucuronoconjugaison suite à une exposition au LPS .....	144
Figure 44. Mesure des activités de glucuronoconjugaison au niveau des lignées cellulaires V79 suite à une exposition au LPS (1 µg/ml).....	144
Figure 45. Mesure des activités astrocytaires de glucuronoconjugaison suite à une exposition à l'IL-1β et au TNF-α .....	145
Figure 46. Expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires lors d'une exposition au LPS.....	146
Figure 47. Expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires lors d'une exposition à l'IL-1β .....	147
Figure 48. Expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires lors d'une exposition au TNF-α.....	147
Figure 49. Induction d'iNOS, COX-2 et production des médiateurs lors d'une exposition au LPS ...	149
Figure 50. Induction d'iNOS et COX-2 lors d'une exposition à l'IL-1β et au TNF-α .....	150
Figure 51. Mesure des taux de GSH et GSSG après traitement au LPS.....	150
Figure 52. Blocage de la surexpression de l'UGT1A6 par des traitements anti-inflammatoires .....	151
Figure 53. Blocage de la surexpression de l'UGT1A6 par des inhibiteurs de NOS.....	152
Figure 54. Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'expression de l'UGT1A6 .....	153
Figure 55. Effets d'inhibiteurs de MAPK.....	154
Figure 56. Augmentation de l'expression de la GFP suite au traitement au LPS et à l'IL-1β .....	154
Figure 57. Activation d'AP-1 après traitement au LPS.....	155
Figure 58. Inactivation d'AP-1 par des co-traitements.....	156
Figure 59. Implication des sites AP-1 présents sur le promoteur de l'UGT1A6.....	157
Figure 60. Visualisation sur film autoradiographique des métabolites obtenus après CCM.....	159
Figure 61. Mesure des activités de glucuronoconjugaison dans les différentes zones cérébrales .....	160
Figure 62. Expression de l'isoforme UGT1A6 dans les différentes zones cérébrales.....	161
Figure 63. Mécanisme de surexpression de l'UGT1A6 après exposition au LPS.....	174
Figure 64. Biosynthèse des neurostéroïdes.....	175
Tableau 1. Lipophilie des principales drogues utilisées dans le traitement des tumeurs cérébrales.....	31
Tableau 2. Gènes des UGT connus à ce jour chez les mammifères .....	43
Tableau 3. Les effets des eicosanoïdes sur l'organisme .....	63

Tableau 4. Produits et molécules secrétés, par la microglie et les astrocytes, en association avec la maladie d'Alzheimer .....	67
Tableau 5. Récapitulatif des différents substrats testés en CCM.....	107
Tableau 6. Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR.....	110
Tableau 7. Optimisation des conditions de PCR .....	111
Tableau 8. Evaluation de la toxicité des traitements à la ménadione .....	127
Tableau 9. Différentes conditions de transfection .....	138
Tableau 10. Production d'EAO lors d'une exposition des cultures d'astrocytes au LPS.....	149
Tableau 11. Récapitulatif du métabolisme de composés endogènes par CCM .....	157



## Liste des abréviations

ActD	actinomycine D
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AhR	récepteur des arylhydrocarbures
AhRE	élément de réponse aux arylhydrocarbures
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AP-1	protéine activatrice-1
ARE	élément de réponse aux anti-oxydants
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BCA	acide bicinchoninique
BET	bromure d'éthidium
BHE	barrière hémato-encéphalique
BO	bulbes olfactifs
BSA	sérum albumine bovine
BSO	L-buthionine [S, R] sulfoximine
CAT	catalase
CHX	cycloheximide
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CMV	cytomégalovirus
COX	cyclooxygénase
CVO	organes circumventriculaires
CYP	cytochromes P450
Dex	dexaméthasone
DHR123	dihydrorhodamine 123
DMEM	milieu Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	diméthylsulfoxyde
2,4-DNPH	2,4 - dinitrophénylhydrazine
dNTP	désoxynucléotides triphosphates
DTNB	acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
DTT	dithiothréitol
EAO	espèces activées de l'oxygène
EDTA	éthylène-diamine-tétra-acétate
EMSA	analyse par retard sur gel
ERK	kinase régulée par des signaux extracellulaires
FITC	fluorescéine isothocyanate
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galactosidase
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -glutamylcystéine synthétase

GFAP	protéine acide fibrillaire gliale
GFP	protéine dont la fluorescence est verte
GPX	glutathion peroxydase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion S-transférase
GSx	glutathion total
4-HNE	4-hydroxynonéal
IL-1	interleukine-1
iNOS	NO synthase inductible
IP	iodure de propidium
JNK	kinase qui phosphoryle la région N-terminale de cJun
KPF	kétoprofène
LCR	liquide céphalorachidien
LO	lipoxygénase
LPS	lipopolysaccharide
LT	leucotriènes
LX	lipoxines
MAO	monoamines oxydases
MAPK	protéine kinase active par des mitogènes
4-MO	4-méthylombélliférone
MRP	protéine de multirésistance
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
L-NAME	N(O)-nitro-L-arginine méthyl ester
NFκB	facteur nucléaire kappaB
L-NMMA	N(G)-monométhyl-L-arginine
NO•	monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
1-NP	1-naphtol
NrF2	<i>“nuclear factor erythroid2-related factor 2”</i>
NS	NS398
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	anion superoxyde
ONPG	O-nitrophényl-β-D-galactopyranoside
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PEI	poly-éthylèneimine
PGE <sub>2</sub>	prostaglandine E2
P-gp	P-glycoprotéine

PKA	phosphokinase dépendante de l'AMPc
PKG	phosphokinase dépendante du GMPc
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
Poly dIdC	poly désoxy-inosine-désoxy-cytosine
RT	transcription inverse
SDS	sodium dodécyl sulfate
SNC	système nerveux central
SOD	superoxyde dismutase
SVF	sérum de veau fœtal
TAE	tris-acétate-EDTA
TBE	tris-borate-EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TNF	facteur nécrotique des tumeurs
TX	thromboxanes
UDP	uridine diphosphate
UDPGA	acide UDP-glucuronique
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
UV	ultraviolet
XRE	élément de réponse aux xénobiotiques

## Chapitre I - Introduction

L'organisme subit en permanence des agressions provenant du milieu extérieur (polluants, pesticides, additifs alimentaires, substances médicamenteuses). Pour se défendre, il a mis en place toute une batterie enzymatique, localisée principalement au niveau du foie, permettant de neutraliser et d'éliminer toutes ces substances. Toutefois, on sait maintenant que ces enzymes sont également présentes au niveau cérébral (Minn *et al.*, 1991) et participent à la protection du cerveau, organe complexe et fragile. Tous les systèmes de défense et de protection du cerveau sont essentiels afin de préserver nos facultés intellectuelles et le contrôle des fonctions vitales de notre organisme.

Le processus inflammatoire, intervenant dans de nombreuses pathologies, est déclenché suite à diverses agressions de l'organisme. Il se traduit par la production de nombreuses molécules pro-inflammatoires (cytokines, prostaglandines) et de formes actives de l'oxygène. Les conséquences au niveau du système nerveux central (SNC) sont nombreuses. Cependant, très peu de travaux ont montré l'impact de ce processus inflammatoire sur l'homéostasie du SNC et sur le métabolisme cérébral.

Le travail que nous présentons ici a consisté à étudier les conséquences d'une stimulation inflammatoire sur des enzymes du métabolisme des médicaments, les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), au niveau cérébral chez le rat. Premièrement, nous avons déterminé, à partir d'un modèle *in vitro* d'astrocytes en culture, les modifications de la glucuroconjugaison cérébrale suite à un stress oxydant ou lors de traitements pro-inflammatoires. Dans ces conditions, nous avons notamment examiné le métabolisme de neurostéroïdes et autres composés endogènes ou exogènes. Pour finir, la modulation de la glucuroconjugaison cérébrale a également été évaluée à partir d'un modèle d'inflammation *in vivo* chez le rat.

Afin de mieux comprendre le contexte général de notre étude, nous exposons dans le chapitre II les thèmes principaux de la thèse. Nous y rappelons les principales propriétés du cerveau et de la barrière hémato-encéphalique ainsi que des enzymes du métabolisme des médicaments et principalement des UGT. Par la suite, nous présentons les caractéristiques générales d'une inflammation avant d'évoquer plus particulièrement l'inflammation cérébrale ou neuroinflammation. Pour finir, nous abordons la notion de stress oxydant qui est un des paramètres rencontrés au cours de pathologies inflammatoires. Dans les chapitres III et IV, nous énonçons les objectifs de cette étude ainsi que les techniques et les principes mis en jeu.

Les résultats obtenus sont décrits au chapitre V avant d'être interprétés au chapitre VI. Enfin, le chapitre VII est consacré aux conclusions et perspectives de ce travail.

## **Chapitre II - Etude bibliographique**

### **A - Le cerveau : quartier général du système nerveux central**

#### **1 - Généralités**

Le cerveau, organe complexe, est le siège de nos émotions, nos humeurs et nos réflexions. Il est ainsi responsable de la conscience, de la mémoire, de la pensée et du contrôle de toutes les fonctions de notre organisme.

Chez l'homme, le cerveau est un organe relativement petit puisqu'il ne pèse environ que 1,5 kg et représente à peine plus de 2% de la masse corporelle totale. Cependant, ses besoins en oxygène sont considérables. Il utilise à lui seul 20% de la consommation totale d'oxygène de l'organisme ainsi que 20% de l'énergie quotidiennement produite. Il est aussi l'organe le plus vascularisé.

#### **2 - Les cellules cérébrales**

Le cerveau est composé de 200 à 500 milliards de cellules classées en 3 groupes principaux : les cellules nerveuses ou neurones, les cellules de soutien et les cellules endothéliales. Les cellules de soutien, encore appelées cellules gliales, sont divisées en 2 groupes, la microglie et la macroglie, elle-même composée de plusieurs types cellulaires (astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes).

##### **2.1 - Les neurones**

Les neurones représentent 10 à 20% des cellules cérébrales. Ces cellules très spécialisées sont les cellules excitables du SNC et sont impliquées dans la production et la transmission des signaux nerveux. Cette propriété est due à l'existence de systèmes de synthèse et de libération de neurotransmetteurs, à la présence de récepteurs, à l'ouverture de canaux ioniques et à l'activation de nombreux messagers secondaires. Les lésions cérébrales sont souvent irréversibles car les cellules nerveuses détruites ne se régénèrent généralement pas. Dans de pareils cas, les neurones du SNC sont remplacés par les astrocytes qui entrent alors en phase de prolifération.



## 2.2 - Les cellules endothéliales cérébrovasculaires

Les cellules endothéliales de la microvasculature cérébrale, qui représentent 10 à 15% des cellules cérébrales, participent à la constitution de la barrière hémato-encéphalique (ou BHE), interface entre le sang et le parenchyme cérébral. Contrairement aux cellules endothéliales périphériques, les cellules endothéliales cérébrales sont jointes par des jonctions intercellulaires serrées étanches organisées en *zonulae occludens* qui restreignent le flux paracellulaire. De plus, ces cellules ont très peu de vésicules d'endocytose limitant ainsi la quantité de flux transcellulaire. Les cellules endothéliales cérébrovasculaires forment ainsi une barrière physique qui régule et contrôle les échanges entre le sang circulant et l'espace extracellulaire. Ces cellules possèdent des propriétés sélectives et restrictives de perméabilité, des activités enzymatiques capables de métaboliser les précurseurs directs des neurotransmetteurs ainsi que des systèmes de transport actif d'efflux très efficaces, responsables de la résistance à de nombreux médicaments.

## 2.3 - Les cellules gliales

### 2.3.1 - La microglie

La microglie est constituée de petites cellules allongées qui représentent environ 10 à 15% des cellules cérébrales. La cellule microgliale au repos, ou microglie ramifiée, est une petite cellule ovoïde dotée de prolongements épineux plus ou moins longs. Au cours de différentes atteintes du SNC (ischémies, lésions, maladies auto-immunes et neurodégénératives, infections virales), la microglie est activée et subit des modifications morphologiques. Elle se transforme en microglie amiboïde : les prolongements disparaissent et le corps cellulaire s'agrandit. Les cellules microgliales participent alors à la défense du tissu cérébral et jouent notamment le rôle de phagocyte pour éliminer les débris laissés par les neurones et les cellules gliales en voie de dégénérescence.

### 2.3.2 - Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann

Ces deux types de cellules ont un rôle similaire. En effet, elles sont responsables de la myélinisation des axones dans le SNC (oligodendrocytes) et dans les nerfs périphériques (cellules de Schwann). Les oligodendrocytes constituent 20% des cellules cérébrales. Elles

forment des couches de myéline qui isolent la plupart des axones et contribuent ainsi à accélérer la propagation des impulsions nerveuses le long de l'axone. La destruction de cette gaine de myéline dans le cerveau, telle qu'on l'observe dans la sclérose en plaques, provoque une totale désorganisation de la transmission de l'influx nerveux. La disparition d'un seul oligodendrocyte altérerait le fonctionnement de 15 à 30 neurones et engendrerait de graves troubles de la motricité, du langage et de la mémoire.

### 2.3.3 - Les cellules épendymaires ou épendymocytes

Ces cellules tapissent les ventricules cérébraux et le canal central de la moelle épinière. Elles forment un épithélium continu et hétérogène. Les deux grands types de cellules épendymaires sont celles des plexus choroïdes et les cellules épendymaires extrachoroïdiennes. Elles ont en commun une polarité bien définie : un côté apical ou luminal en contact avec le liquide céphalorachidien (LCR) où se situent des cils ou des microvillosités selon le type de cellules, et un côté basal ou subépendymal qui repose sur une lame basale. Elles sont unies les unes aux autres par des complexes jonctionnels serrés au niveau de leur pôle apical. Les jonctions assurent la cohésion de l'ensemble de l'épendyme. Ces cellules épendymaires contrôlent le passage de substances du LCR dans le tissu nerveux. Elles possèdent également des systèmes de transport actif très efficaces de la famille ABC (*ATP binding cassette*), capables d'extraire nombre de molécules du LCR pour les rejeter dans la circulation générale. Elles pourraient également jouer un rôle considérable dans le contrôle du sens de la migration de certaines cellules pendant le développement cérébral.

### 2.3.4 - Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules majoritaires du cerveau car elles représentent environ 40% des cellules. Ce sont de grandes cellules, tirant leur nom de leur forme étoilée, réparties ubiquitairement dans la matière grise et la matière blanche du SNC. Ces cellules envoient de fins prolongements souvent terminés par des parties élargies, appelées pieds astrocytaires, en contact avec de nombreux éléments cellulaires dont les neurones et les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Figure 1). La principale caractéristique ultrastructurale des astrocytes est la présence de gliofilaments et de grains de glycogène dans le cytoplasme de leurs somas et de leurs prolongements. Les gliofilaments sont composés d'une protéine spécifique des

astrocytes : la protéine fibrillaire acide de la glie (GFAP). Cette protéine, marqueur spécifique des astrocytes, va permettre de les identifier par immunocytochimie ou immunohistochimie.

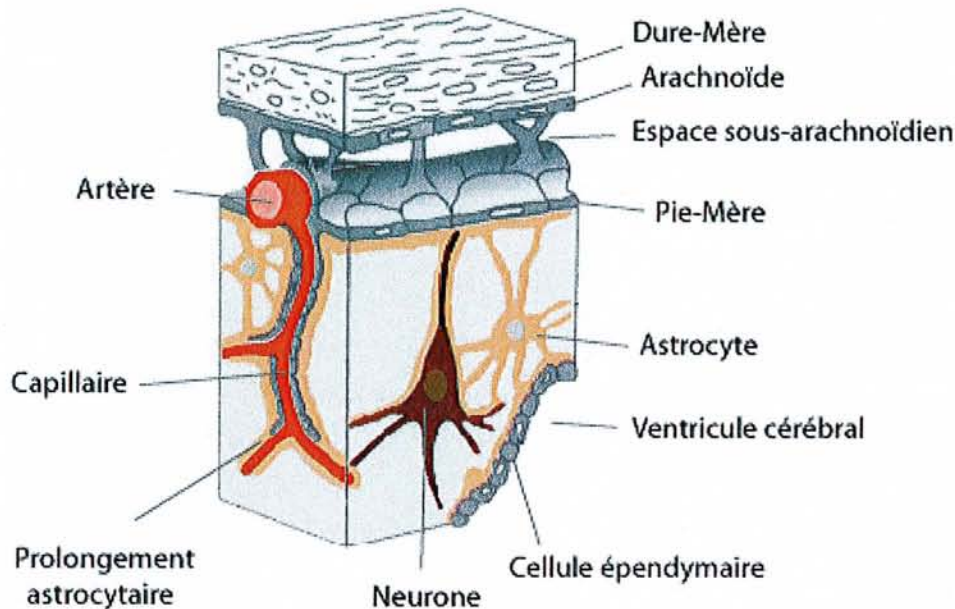


Figure 1. Relations entre neurones, astrocytes et vaisseaux sanguins

Il existe deux principaux types d'astrocytes : ceux impliqués dans les contacts du parenchyme nerveux avec le milieu extérieur (type I), et ceux jouant un rôle dans la transmission des influx nerveux (type II). Les astrocytes de type I apparaissent avant la naissance. Ils constituent la frontière entre le parenchyme nerveux et son environnement, construisant ce qu'on appelle la glie limitante (*glia limitans*) en rapport avec les méninges et entourant tous les espaces périvasculaires. A ce niveau frontière, les « pieds astrocytaires » sont jointifs et forment un étui continu entourant complètement les capillaires. De plus, les astrocytes, considérés comme des cellules « multifonctions », jouent un rôle de protection des neurones, assurent la croissance des neurites et contrôlent la différenciation des oligodendrocytes en sécrétant des facteurs de croissance (Wilkin *et al.*, 1990). Ils assurent également le développement et le maintien de plusieurs caractères phénotypiques des cellules endothéliales cérébrales en leur fournissant divers facteurs de croissance ou de différenciation (Abbruscato et Davis, 1999; Sobue *et al.*, 1999). Les astrocytes de type II apparaissent plus tardivement, à savoir 8 à 10 jours après la naissance. Ils sont en contact direct avec les

neurones, soit au niveau de la membrane somato-dendritique, soit au niveau des nœuds de Ranvier. Associés aux oligodendrocytes, ils contribuent au processus de myélinisation (Ffrench-Constant et Raff, 1986).

Les astrocytes, identifiés par Ramon Y Cajal en 1913, ont longtemps été considérés comme de simples cellules de soutien dans le système nerveux central. Des études récentes ont montré que les astrocytes étaient capables de réguler la transmission synaptique (Newman, 2003). En effet, les astrocytes sont dotés de différents canaux ioniques, pompes ATPase ou encore systèmes de co-transport qui leur permettent non seulement de contrôler l'état électrique du neurone mais également de moduler la composition ionique du milieu extracellulaire, gérant ainsi l'homéostasie du SNC (Figure 2).

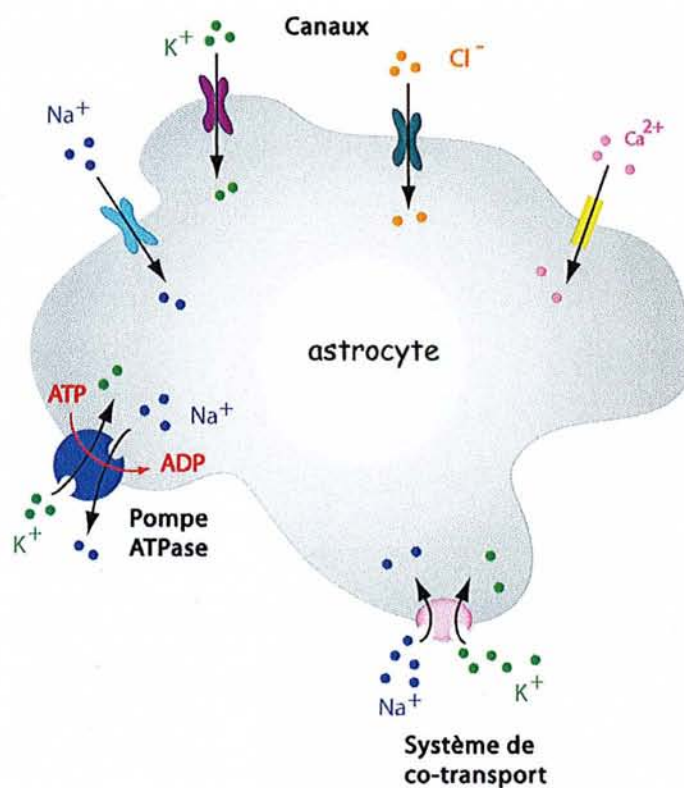


Figure 2. Régulation des taux ioniques extracellulaires par les astrocytes

Les astrocytes, en modifiant les flux extracellulaires en ions potassium, contrôlent l'excitabilité des neurones. De plus, afin d'éviter l'accumulation de substances comme l'eau, les acides aminés (glutamate, taurine, ...) et les ions potassium dans le liquide extracellulaire,

ces substances vont être transportées vers le LCR et le sang grâce à des systèmes de transport localisés dans la membrane plasmique des astrocytes (Figure 3).

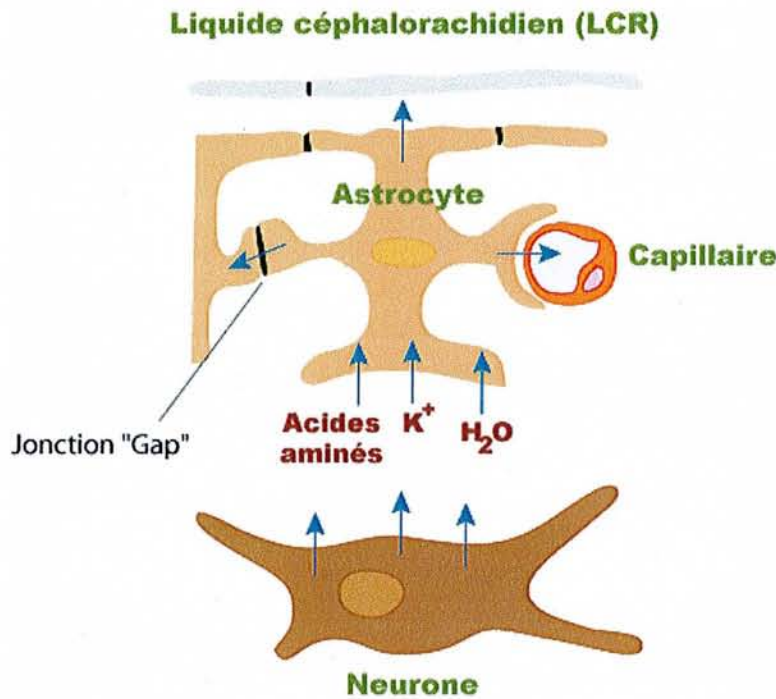


Figure 3. Astrocytes et homéostasie du SNC

Il a également été constaté que les astrocytes pouvaient absorber certains neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique, puis les recycler, régulant ainsi leur fixation sur les récepteurs de la membrane post-synaptique. La disparition des astrocytes, autour des synapses, entraîne une saturation en neurotransmetteurs non recyclés, provoquant un blocage de la transmission du signal. Les astrocytes peuvent également augmenter ou diminuer le signal. En effet, par la libération d'une molécule de signalisation dans la fente synaptique, les astrocytes, selon les besoins, peuvent augmenter le nombre de récepteurs sur la membrane post-synaptique. Le trafic des informations est alors plus fluide. De la même façon, les astrocytes sont capables de produire une molécule-leurre qui va se fixer sur les neurotransmetteurs, les empêchant ainsi de se fixer sur leurs récepteurs. La propagation de l'information en est alors réduite. Par ce biais, les astrocytes seraient donc des partenaires actifs de la transmission synaptique.

Les astrocytes ont également un rôle nourricier. En effet, les pieds astrocytaires qui entourent les capillaires sanguins cérébraux permettent de capter le glucose sanguin. Les astrocytes le stockent sous forme de glycogène pour fournir l'énergie nécessaire à l'activité des cellules nerveuses. En plus de tout cela, et en association avec les cellules endothéliales, les astrocytes participent à la formation, à la différenciation et à la maintenance de la BHE (cf. chapitre BHE).

### **3 - Le liquide céphalorachidien (LCR)**

Le LCR est un liquide clair, incolore qui remplit les cavités du cerveau et de la moelle épinière. Il les protège en agissant comme un lubrifiant et une barrière mécanique contre les chocs. Le LCR a une composition chimique légèrement alcaline. Il est composé à 99% d'eau. Il y a environ 100 à 150 ml de LCR chez un Homme adulte. Le liquide céphalorachidien baigne le cerveau et la moelle épinière et aide à supporter le poids du cerveau. En plus de maintenir la pression à l'intérieur du crâne à un niveau constant, le liquide évacue dans le sang de nombreux produits métaboliques, des anticorps, des substances chimiques anormales, des produits pathologiques de maladies du cerveau et des tissus de la moelle épinière. Plusieurs systèmes de transport ATP-dépendants assurent le maintien de l'homéostasie du LCR. Il est sécrété par les plexus choroïdes et circule dans le système ventriculaire pour atteindre l'espace sous-arachnoïdien. La formation du LCR est un processus continu. Il se remplace totalement toutes les 6 à 8 heures, soit 3 à 4 fois par jour. Il est finalement absorbé dans la circulation sanguine par l'intermédiaire de structures spécialisées appelées villosités arachnoïdiennes.

### **4 - La barrière hémato-encéphalique (BHE)**

#### **4.1 - Généralités**

Le concept de barrière hémato-encéphalique est apparu en 1885 lorsqu'Ehrlich, en injectant un colorant, la coeruleine S, par voie systémique, s'est aperçu que tous les organes étaient colorés exceptés le cerveau et la moelle épinière. Cependant, cette notion de BHE, considérée comme étant un système strict d'exclusion, a depuis longtemps été remplacée par un concept plus général de filtration sélective qui est importante pour la stabilité de l'environnement cellulaire et le bon fonctionnement du système nerveux central. En allant

dans ce sens, Fenstermacher a défini le terme de BHE comme étant associé à un « mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang vers le LCR et vers les centres nerveux cérébraux spinaux » (Fenstermacher, 1980).

La barrière cérébrale se compose en réalité de trois entités :

- la barrière hémato-liquidienne : barrière située au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes et au niveau de la paroi des vaisseaux de l'arachnoïde, permettant le passage ou non de la substance du sang vers le LCR,

- la barrière liquido-tissulaire : barrière entre le LCR et le parenchyme nerveux située au niveau de l'épendyme ou de la pie-mère. Cette interface, très perméable, mérite, en fait, peu son qualificatif de « barrière »,

- la barrière hémato-encéphalique : barrière entre le sang et le parenchyme cérébral située au niveau des capillaires cérébraux. La surface vasculaire qui constitue cette barrière est 5 000 fois plus importante que celle de la barrière hémato-liquidienne. C'est donc la voie principale d'entrée de la plupart des solutés dans le SNC.

## 4.2 - La BHE : une barrière physique

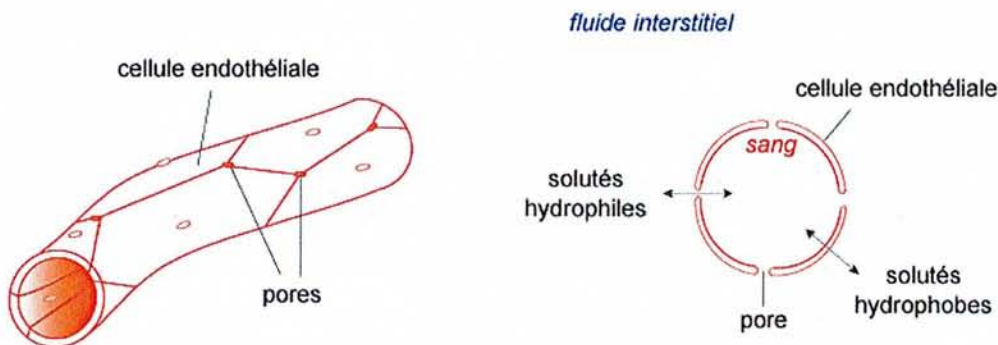
### 4.2.1 - Composants cellulaires de la BHE

La barrière hémato-encéphalique est caractérisée par les propriétés spécifiques des cellules endothéliales qui forment les capillaires cérébraux. Contrairement aux cellules endothéliales systémiques, les cellules endothéliales cérébrovasculaires sont reliées par des jonctions serrées étanches, ne présentant que très peu de vésicules de pinocytose et de fenestrations. Elles possèdent néanmoins un certain nombre de mécanismes de transport au travers de la membrane cytoplasmique endothéliale, permettant en particulier l'apport de nutriments et de précurseurs de molécules neuroactives au SNC.

Les capillaires cérébraux sont formés d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et par endroits, d'un deuxième type cellulaire plus externe : les péricytes. La lame basale de ces capillaires, sur laquelle adhèrent les cellules endothéliales, est entourée par une gaine de prolongements astrocytaires pédiculés. L'agencement des pieds astrocytaires autour de l'endothélium des capillaires cérébraux, ainsi que les contacts étroits entre les cellules endothéliales et les astrocytes, laissent supposer l'existence d'interactions privilégiées entre ces deux types cellulaires (Figure 4). De nombreux travaux, effectués *in vitro* et *in vivo*, ont suggéré une implication des astrocytes dans la formation et la maintenance de la BHE.

Janzer et Raff ont ainsi montré qu'en inoculant des cellules purifiées d'astrocytes de rat dans la chambre oculaire d'un rat adulte, cela entraînait une agrégation des cellules sur la surface de l'iris et une vascularisation de celles-ci en 48h (Janzer et Raff, 1987). Les vaisseaux présentaient même les caractéristiques d'une BHE imperméable deux semaines plus tard. Si le contact entre les cellules endothéliales cérébrovasculaires et les astrocytes permet d'augmenter la formation de jonctions étanches en culture (Tao-Cheng *et al.*, 1987), l'utilisation d'un milieu conditionné par des astrocytes permet également d'induire une résistance électrique transendothéliale élevée dans des cultures endothéliales humaines et bovines (Neuhaus *et al.*, 1991).

### Capillaire classique



### Capillaire cérébral

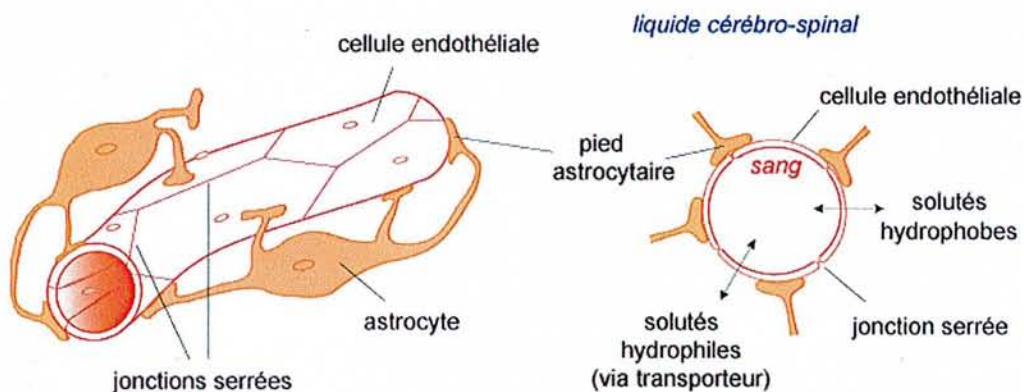


Figure 4. Comparaison capillaire classique / capillaire cérébral



4.2.2 - Perméabilité sélective de la BHE

On peut considérer que les membranes plasmiques, vu leur composition biochimique, constituent, dans la plus grande partie de leur étendue, un environnement non polaire par leur bicouche phospholipidique. Cet environnement non polaire est adjacent à l'environnement aqueux très polaire du plasma sanguin d'un côté et du cytoplasme cellulaire de l'autre. La perméabilité de la BHE à une substance donnée va donc largement dépendre de la capacité de la molécule à s'échanger entre les deux phases aqueuse et lipidique. Le passage de diverses substances au travers de la BHE a tout d'abord été évalué par la mesure de leur extraction cérébrale (rapportée à celle de l'eau) qui a été représentée en fonction du coefficient de partage *in vitro* de chaque substance entre l'huile et l'eau. Le coefficient de partage représente en fait l'affinité relative de la substance testée pour les phases lipidique et aqueuse (Figure 5).

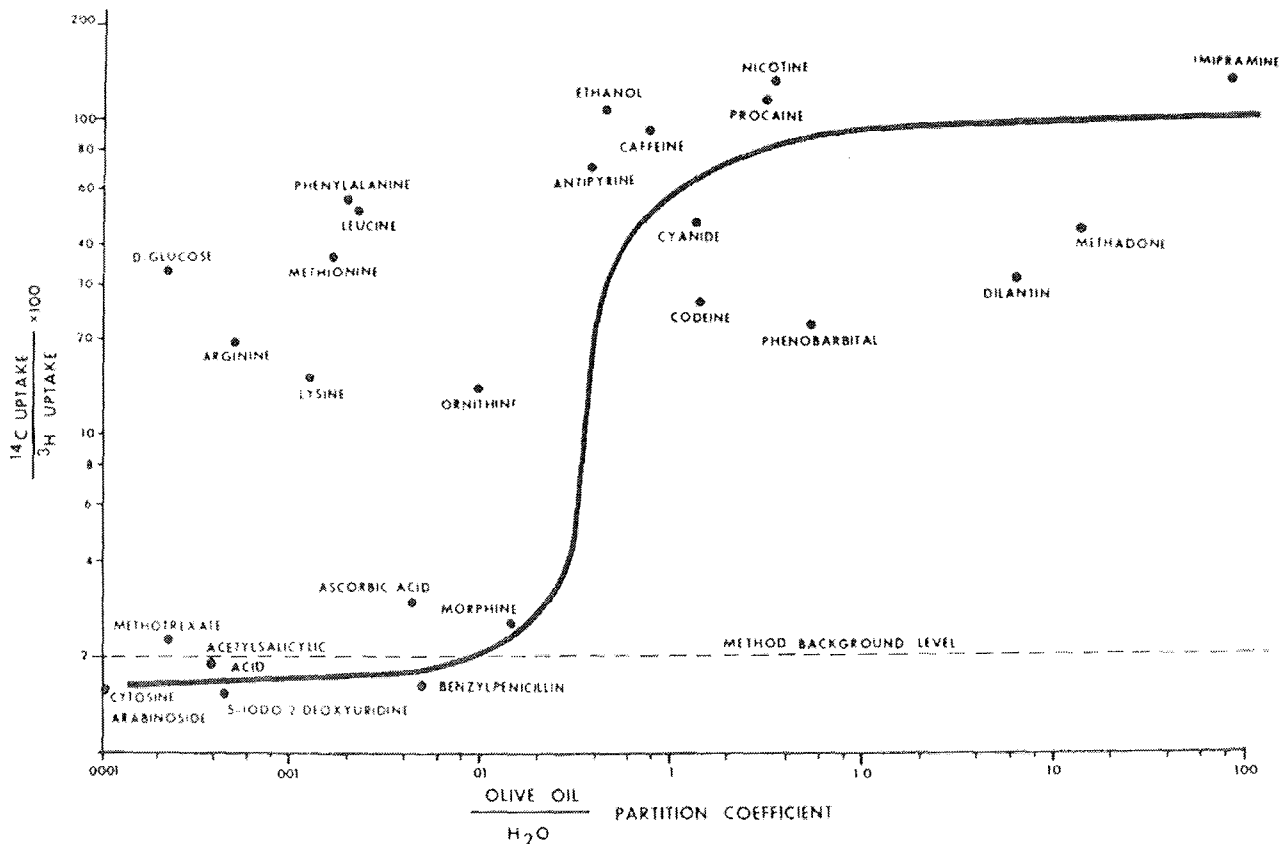


Figure 5. Coefficient de partage de différentes substances médicamenteuses (d'après Oldendorf, 1976)

De la même façon, le coefficient de partage octanol-eau (Boaziz *et al.*, 1991) est également utilisé pour évaluer le passage de composés à travers la BHE (Tableau 1).

	Molécules	Coefficient octanol/eau (log P)
Hydrophiles	Méthotrexate	- 1,85
	Melphalan	- 1,70
	5-Fluorouracile (5-FU)	- 0,95
	Aracytine	- 0,79
	Chlorambucil	- 0,67
Lipophiles	Fotémustine	1,25
	Carmustine (BCNU)	1,53
	Vinca-alkaloïdes	2,80
	Lomustine (CCNU)	2,83
	Semustine (Me-CCNU)	3,30
Lipophilie optimale	entre - 0,2 et 1,34	

**Tableau 1.** Lipophilie des principales drogues utilisées dans le traitement des tumeurs cérébrales

Actuellement, la BHE représente l'un des principaux facteurs d'échecs des chimiothérapies des tumeurs du SNC. La plupart des molécules, après une administration intraveineuse, n'atteignent pas le SNC à une concentration thérapeutique adéquate pendant un temps suffisamment long. De nombreux essais ont d'ailleurs été entrepris pour augmenter le passage des molécules normalement « filtrées » par la BHE : chimiothérapies à fortes doses, injections intrathécales ou intra-artérielles, ouverture de la barrière par hyperosmolarité. La réalisation de précurseurs lipophiles de médicaments polaires, par le greffage d'un groupe très liposoluble, a été évaluée (Prokai *et al.*, 2000). Ce système permet une augmentation significative du passage de la BHE pour de nombreux médicaments à visée neurologique, y compris les neuropeptides. D'autres systèmes font intervenir des nanoparticules (Kas, 2004; Kreuter, 2004). Ces nanoparticules, mimant les lipoprotéines de faible densité (LDL), semblent subir une endocytose par les cellules endothéliales.

Il existe différents processus de transport au travers de la BHE. Tout d'abord, la diffusion passive paracellulaire, du fait de la présence de jonctions serrées, est limitée aux molécules hydrophiles de petites tailles. Ce mécanisme correspond au passage des molécules entre les cellules endothéliales par des pores hydrophiles. La plupart des molécules liposolubles de poids moléculaire inférieur à un seuil de 400 à 600 daltons sont transportées

par diffusion passive transcellulaire. Dans ce cas, les xénobiotiques doivent franchir la membrane luminale, le cytoplasme puis la membrane abluminale des cellules endothéliales, et seul un gradient de concentration de la molécule de part et d'autre de la membrane est nécessaire. La diffusion passive transcellulaire concerne la majorité des molécules médicamenteuses et certaines hormones comme par exemple la testostérone. Les molécules peu liposolubles et de haut poids moléculaire peuvent traverser la BHE à l'aide d'un transporteur protéique. C'est le cas du transport de part et d'autre de la BHE pour le glucose, des ions, des acides aminés, des peptides et diverses protéines. On parle alors de diffusion facilitée (sans apport d'énergie) ou de transport actif (apport d'énergie nécessaire).

#### 4.3 - La BHE : une barrière métabolique et active

La barrière hémato-encéphalique est également considérée comme une barrière métabolique (Minn *et al.*, 2002). En effet, il est maintenant bien connu que le cerveau et notamment les cellules qui composent la BHE, les cellules endothéliales cérébrovasculaires et les astrocytes, possèdent une « machinerie » enzymatique capable de métaboliser les xénobiotiques afin de les éliminer. Ainsi, comme dans d'autres organes tels que le foie, les reins, les poumons, la peau, l'intestin et le cœur, on y retrouve des enzymes du métabolisme des médicaments.

Le métabolisme des médicaments et de nombreuses molécules endogènes va résulter en la production de déchets polaires (produit d'oxydation, d'hydroxylation ou de conjugaison) dont le cerveau doit se débarrasser pour maintenir son homéostasie. Parmi les systèmes responsables de l'exportation de ces produits hors de la cellule, on peut citer la glycoprotéine-P (P-gp) mais également les protéines de résistance aux médicaments (famille des MRP) et les transporteurs d'anions organiques (OAT), éléments clés de la BHE dont le rôle est de refouler activement les molécules lipophiles qui auraient pu traverser les membranes. Ce mécanisme est connu sous le nom de « *multidrug resistance* ». Ces protéines appartiennent à la famille des transporteurs membranaires ATP-dépendants, la super-famille ABC (*ATP-binding cassette*). Elles sont présentes au niveau des cellules endothéliales cérébrovasculaires mais également au niveau des pieds astrocytaires (Pardridge *et al.*, 1997; Golden et Pardridge, 1999; Decleves *et al.*, 2000; Hirrlinger *et al.*, 2002) et assurent une fonction de détoxification. Il a été identifié plus d'une centaine de molécules capables d'être transportées par la P-gp. Les caractéristiques communes à ces molécules sont leur hydrophobie et leur haut poids moléculaire (supérieur à 400 kDa) (Sharom, 1997).

Ce phénomène de « *multidrug resistance* » est un obstacle majeur pour la distribution de médicaments au niveau cérébral. De plus, beaucoup de cellules tumorales ont la capacité de surexprimer la P-gp, se débarrassant ainsi de nombreux médicaments anticancéreux comme les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine), les épipodophyllotoxines (étoposide, téniposide), les vinca-alcaloïdes (vinblastine, vindésine), le taxol, quelques intercalants (mitoxantrone, dactinomycine) et certains dérivés de la camptothécine. C'est ainsi qu'en clinique, lors de tumeurs résistantes, la bi-thérapie est utilisée en associant un agent anticancéreux avec un inhibiteur de la P-gp comme le vérapamil ou la cyclosporine.

#### 4.4 - Absence de barrière dans certaines régions cérébrales

Les capillaires du système nerveux central ne sont pas constitués uniformément par des cellules endothéliales unies par des jonctions serrées étanches. En effet, dans certaines régions bien particulières qui ne partagent pas les fonctions inhérentes à la plus grande partie du cerveau, on retrouve des capillaires fenestrés sans jonctions serrées permettant des échanges très aisés de protéines ou autres solutés. Ces régions sont constituées par des cellules différentes des neurones et pour lesquelles un contact direct avec le courant sanguin est absolument nécessaire puisqu'elles secrètent des hormones dans le sang et qu'elles présentent des chémorécepteurs. C'est ainsi qu'on ne retrouve pas de barrière hémato-encéphalique dans des régions du cerveau regroupées autour des ventricules, appelées organes circumventriculaires, comme notamment la glande pinéale, l'éminence médiane, l'aréa postrema ou encore le tuber cinereum.

## **B - Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques**

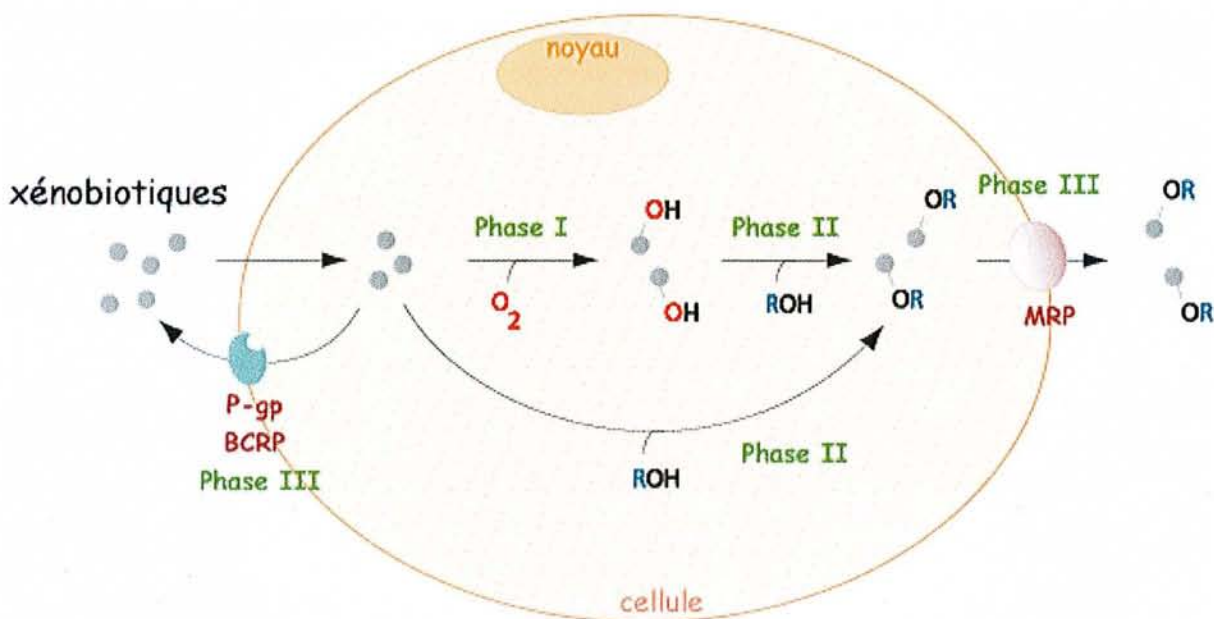
### **1 - Généralités**

L'organisme est soumis à l'agression de nombreux composés naturels ou synthétiques environnementaux souvent lipophiles comme les médicaments, les pesticides, les polluants industriels ou encore les additifs alimentaires. L'Homme, comme tous les autres organismes vivants, a développé une « batterie » de systèmes enzymatiques complexes destinés à les éliminer le plus souvent par augmentation du caractère hydrophile de la molécule, facilitant ainsi son élimination.

Si l'élimination de certaines substances hydrophiles peut se faire sans biotransformation préalable, la plupart des composés plus lipophiles seront métabolisés avant d'être excrétés dans les urines ou la bile. Le rôle de ces systèmes enzymatiques complexes ne se limite pas au métabolisme des xénobiotiques. Ils sont également responsables de la biotransformation de substances endogènes (lipides, hormones, ...).

La biotransformation et l'élimination des xénobiotiques comporte 3 étapes (Figure 6) :

- les réactions de phase I ou réactions de fonctionnalisation
- les réactions de phase II ou réactions de conjugaison
- la phase d'élimination (ou phase III) permettant l'exportation des métabolites polaires formés hors de la cellule.



**Figure 6.** Biotransformation des xénobiotiques  
(BCRP : *breast cancer resistance protein* ; MRP : *multidrug resistance-associated protein* ;  
P-gp : *P-glycoprotein*)

## 1.1 - La fonctionnalisation ou phase I

### 1.1.1 - Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) appartiennent à une superfamille d'enzymes hémiques et jouent un rôle important dans le métabolisme d'un grand nombre de composés exogènes et

endogènes comme les acides gras, les hormones stéroïdiennes ainsi que certains neurotransmetteurs (Miksys et Tyndale, 2002). Les CYP qui métabolisent les xénobiotiques sont majoritairement situés dans le réticulum endoplasmique. Cependant, un grand nombre d'études récentes ont montré la présence, l'inductibilité et l'activité de cytochromes P450 mitochondriaux vis-à-vis de divers xénobiotiques (Bhagwat *et al.*, 2000; Rosenbrock *et al.*, 2001).

A l'origine, il avait été reporté que les CYP du cerveau ne représentaient que 1% des taux de CYP hépatiques (Walther *et al.*, 1987; Warner *et al.*, 1988). Dans plusieurs de ces études, le cerveau avait été considéré, à tort, comme un organe homogène. En effet, les régions cérébrales diffèrent de manière importante dans leur composition cellulaire, leur densité cellulaire et leurs fonctions. Il est maintenant bien connu que les CYP cérébraux sont extrêmement variés (Strobel *et al.*, 2001). Il a également été montré que les taux en CYP dans des neurones spécifiques étaient identiques voire supérieurs aux taux retrouvés au niveau des hépatocytes (Miksys *et al.*, 2000). D'un point de vue général, les CYP sont distribués de manière hétérogène entre les différentes régions cérébrales (Perrin *et al.*, 1990) ; on les retrouve dans les corps cellulaires, les prolongements neuronaux et souvent dans les cellules gliales. La plupart des sous-familles de CYP, observées à l'interface sang-cerveau et dans les organes circumventriculaires, peuvent être induites par un grand nombre de composés : le phénobarbital (CYP2B1, 2B2, 3A1), la beta-naphtoflavone et le 3-méthylcholanthrène (CYP1A1), la phénytoïne (CYP2B1, 2B2), les hormones stéroïdiennes (CYP2D) et l'éthanol (CYP2E1). Dans certains cas, un composé peut avoir un effet différent d'un organe à un autre. Ainsi, l'éthanol induit le CYP2B1 dans le foie de rat mais pas dans le cerveau alors que la nicotine induit le CYP2B1 dans le cerveau de rat mais pas dans le foie.

L'activité des cytochromes P450 implique la présence de la NADPH-cytochrome P450 réductase, flavoprotéine qui va fournir les électrons nécessaires au déroulement du cycle catalytique des CYP du réticulum endoplasmique, ou d'une NADPH-adrénodoxine réductase mitochondriale qui va jouer le même rôle que la flavoprotéine. Au cours de leur activité catabolique, les CYP forment des espèces activées de l'oxygène (EAO) (Rushmore et Kong, 2002) pouvant mener à un stress oxydant en cas d'hyperactivité. Les CYP du cerveau, en plus de métaboliser un large panel de substrats (vitamine A, vitamine D, cholestérol, acides biliaires), catalysent la formation de molécules importantes dans la signalisation cérébrale comme notamment les neurostéroïdes et les eicosanoïdes. Cela leur permet de jouer un rôle important dans la neuroprotection, le contrôle du flux sanguin cérébral, la maintenance de l'homéostasie du cholestérol cérébral, le contrôle de la température, ou encore des fonctions

importantes dans la physiologie cérébrale, le développement cérébral ou encore la maladie (Liu *et al.*, 2004). De nombreuses études ont montré que l'expression des CYP pouvait être modifiée lors d'épisodes inflammatoires ou infectieux (Renton, 2004) et pouvaient ainsi altérer le métabolisme et la pharmacocinétique des médicaments dont l'élimination est CYP-dépendante.

### 1.1.2 - Les monoamines oxydases

Ces enzymes mitochondriales de phase I jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs amines bioactives (sérotonine, catécholamines). Les monoamines oxydases (MAO) catalysent la désamination oxydative des amines pour former des aldéhydes et relarguer du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac (Benedetti, 2001). Ainsi, au cours de leur activité catabolique, les MAO, tout comme les cytochromes P450, forment des EAO.

Il existe deux sous-familles de MAO : la MAO-A et la MAO-B. La première dégrade préférentiellement la sérotonine, l'adrénaline et la noradrénaline alors que la seconde montre une forte affinité pour le  $\beta$ -phényléthylamine, substance précurseur de toutes les amines sympathomimétiques. La dopamine est considérée comme un substrat de ces deux isoenzymes. Dans les tissus du système nerveux, les MAO participent à la régulation des taux en neurotransmetteurs monoaminergiques et inactivent toute trace d'amines. Dans les tissus périphériques, les MAO catalysent la désamination des monoamines ayant une action paracrine ou endocrine. Elles jouent un rôle très actif de détoxification dans le foie et l'intestin. La MAO-A est présente dans les neurones adrénérgiques, noradrénérgiques et dopaminérgiques alors que la MAO-B est retrouvée dans les neurones sérotoninérgiques, histaminérgiques, les astrocytes, les cellules épendymaires et les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. La MAO-B, au niveau des cellules endothéliales cérébrovasculaires de rat, participe à la barrière enzymatique et protège le cerveau contre les dérivés exogènes neurotoxiques de pyridine comme le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine ou MPTP (Johannessen, 1991). Actuellement, les MAO sont fortement étudiées à cause de leur implication probable lors de maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Parkinson. Des études chez l'animal ont récemment montré qu'en inhibant la MAO-A avec de la clorgyline (inhibiteur irréversible sélectif) et du mocobémide (inhibiteur réversible), il en résultait une augmentation des taux de sérotonine et de noradrénaline dans de nombreuses régions cérébrales (Youdim et Weinstock, 2004). De plus, des inhibiteurs de la MAO-B,

notamment la rasagiline, démontrent clairement une activité neuroprotectrice en inhibant l'inactivation de la dopamine (Youdim *et al.*, 2005).

### 1.1.3 - Les monooxygénases à flavine

Les monooxygénases à flavine appartiennent à un groupe d'oxygénases dépendantes du NADPH et de l'oxygène. Les molécules métabolisées par ces enzymes possèdent divers groupes fonctionnels comme un hétéroatome de phosphore, d'azote, de sélénium, ou encore de groupements sulfure, amine ou hydrazine. Elles sont présentes, au niveau cérébral, dans les neurones (Janmohamed *et al.*, 2004) ainsi que dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Mushiroda *et al.*, 2001).

### 1.1.4 - Les époxydes hydrolases

De nombreux xénobiotiques ont une structure chimique qui favorise leur oxydation en époxydes, lesquels sont généralement très réactifs et mutagènes. Les époxydes hydrolases, présentes sous forme soluble ou microsomale, métabolisent donc ces composés très réactifs en diols vicinaux peu toxiques. Elles interviennent également dans le métabolisme des lipides. Ces enzymes ont été mises en évidence dans de nombreux organes dont le cerveau (Newman *et al.*, 2005). Les époxydes hydrolases microsomales, situées au niveau cérébral, sont principalement retrouvées dans les cellules gliales. Elles possèdent des activités élevées dans les tissus formant les barrières sang-cerveau et liquide-cerveau.

## 1.2 - La conjugaison ou phase II

### 1.2.1 - Les glutathion *S*-transférases

Les glutathion *S*-transférases (GST) catalysent la conjugaison de composés électrophiles au glutathion réduit (GSH). Les GST sont principalement localisées dans le cytosol mais sont également actives dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Ces enzymes interviennent dans la détoxification de xénobiotiques électrophiles (composés carcinogènes, agents anti-tumoraux, polluants environnementaux) et d'espèces réactives de l'oxygène (radical hydroxyle  $\bullet\text{OH}$ ). Elles inactivent également des composés endogènes comme les aldéhydes insaturés, les quinones, les époxydes et les hydroperoxydes. Ces molécules



endogènes peuvent cependant avoir une action inhibitrice vis-à-vis de l'activité des GST cérébrales, c'est le cas des précurseurs et des dérivés de la sérotonine (Sawicki *et al.*, 2001).

Les GST interviennent également dans la biosynthèse des leucotriènes, des prostaglandines, de la testostérone, de la progestérone et dans la dégradation de la tyrosine (Hayes *et al.*, 2004). Elles sont regroupées en 3 classes principales ( $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$ ). Chez le rat et la souris, les GST de la classe  $\mu$  ont été localisées dans les astrocytes, les cellules épendymaires et les tanicytes ; celles de la classe  $\pi$  dans les oligodendrocytes et celles de la classe  $\alpha$  dans les astrocytes, les plexus choroïdes, les cellules endothéliales et/ou les pieds astrocytaires, les cellules de Purkinje et les neurones. Les cellules gliales du SNC, très importantes dans la défense du SNC (Peinado *et al.*, 2000), possèdent les plus forts taux en GSH et peuvent ainsi lutter contre les agressions oxydantes. En effet, dans le cerveau, le GSH participe surtout à la protection contre le stress oxydant par réduction directe des oxydants. Cependant, si les taux de GSH sont diminués, les risques de toxicité sont alors augmentés.

### 1.2.2 - Les méthyltransférases

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

#### 1.2.2.1 - Les catéchol *O*-méthyltransférases

Les catéchol *O*-méthyltransférases (COMT) sont localisées principalement dans le foie mais également dans le cerveau au niveau des cellules microgliales et épendymaires (Shirakawa *et al.*, 2004). Ces enzymes sont majoritairement cytosoliques (Bonifacio *et al.*, 2000) mais une forme membranaire a également été décrite dans le cerveau humain et de rat (Matsumoto *et al.*, 2003). Comme leur nom l'indique, les catécholamines (dopamine, norépinéphrine, épinephrine) sont les substrats physiologiques des COMT. L'activation de ces enzymes stimule, au niveau astrocytaire, la synthèse d'homocystéine qui est ensuite transformée en cystéine et participe ainsi à la formation du GSH (Huang *et al.*, 2005). La tolcapone et l'entacapone, deux inhibiteurs des COMT, sont utilisés en association avec la lévodopa pour traiter la maladie de Parkinson. L'inhibition de ces enzymes permet d'obtenir un meilleur effet de la lévodopa (Haasio *et al.*, 2001; Keating et Lyseng-Williamson, 2005).

#### 1.2.2.2 - Les thiol *S*-méthyltransférases

Ces enzymes sont situées au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Elles métabolisent la méthylation du dithiothréitol et autres composés thiols dans le cerveau de rat. Les thiol *S*-méthyltransférases sont inégalement distribuées dans les régions cérébrales. Elles présentent des activités importantes au niveau de l'hippocampe et du bulbe rachidien.

#### 1.2.2.3 - Les *N*-méthyltransférases

La phosphatidyléthanolamine *N*-méthyltransférase et l'histamine *N*-méthyltransférase sont deux méthyltransférases cérébrales dont seule l'implication dans le métabolisme endogène a été étudiée. La première catalyse la méthylation de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine, composant majeur des membranes cellulaires et de la myéline. C'est également un précurseur de l'acétylcholine (Brosnan *et al.*, 2004). L'histamine *N*-méthyltransférase est présente au niveau cérébral mais également dans d'autres organes où elle catalyse la méthylation de l'histamine et l'inactive (Yan *et al.*, 2000). L'histamine est un neurotransmetteur du SNC impliqué dans la physiopathologie de la schizophrénie.

#### 1.2.3 - Les *N*-acétyltransférases

Les *N*-acétyltransférases capturent le groupement acétyle de l'acétylcoenzyme A pour former un intermédiaire acétyl-enzyme qui va catalyser l'acétylation du substrat avec régénération de l'enzyme. Les substrats sont des amines primaires, généralement des arylalkylamines, des hydrazines et hydrazides, ainsi que des carcinogènes. Il a récemment été montré qu'un polymorphisme des *N*-acétyltransférases 1 et 2, associé à une exposition à des amines aromatiques et hétérocycliques, pouvaient augmenter les risques de cancer (Hein, 2002; Pande *et al.*, 2003).

#### 1.2.4 - Les sulfotransférases

Les sulfotransférases (ST) catalysent le transfert d'un groupement sulfate à partir d'un donneur, le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ou PAPS, sur des phénols, amines ou hydroxylamines. Il existe deux classes de ST : les ST cytosoliques ou membranaires. Les ST cytosoliques ont pour substrats des composés endogènes et exogènes comme des hormones,

des bioamines et de nombreux xénobiotiques. Les ST membranaires semblent être impliquées dans des processus biologiques cruciaux faisant intervenir diverses protéines et participent ainsi dans les voies biochimiques de signalisation.

#### 1.2.5 - Les UDP-glucuronosyltransférases

Ces enzymes seront décrites au paragraphe 2.

### 1.3 - L'élimination ou phase III

Les métabolites, formés au cours de la biotransformation de composés endogènes ou exogènes, peuvent perturber l'homéostasie cellulaire ou être toxiques pour la cellule. Ces composés vont donc devoir être exportés de la cellule ; on parle alors de la phase d'élimination.

Cette phase cruciale est caractérisée par la présence de transporteurs transmembranaires qui vont exporter les composés hors de la cellule par transport actif nécessitant par conséquent de l'énergie (ATP). La superfamille de ces transporteurs est appelée ABC (*ATP-Binding Cassette*), qui est elle-même subdivisée en 7 membres appelés MRP (*multidrug resistance-associated protein*) (Borst *et al.*, 2000).

Parmi ces MRP, la MRP-1 est capable de transporter des anions organiques, des glucuronates, des sulfates ainsi que des médicaments conjugués au glutathion (Leslie *et al.*, 2001). La MRP-1, également appelée pompe de conjugués au GSH (pompe GS-X), est ubiquitaire et est le transporteur majeur d'un médiateur de la réponse inflammatoire, le leucotriène C4 (Leier *et al.*, 1994). Elle transporte également les glucuronides de la bilirubine, de l'oestradiol, de sels biliaires di-anioniques comme l'hyodéoxycholate  $\alpha$ -glucuronosyl, le glutathion oxydé (GSSG), l'arsenite ou encore des anticancéreux (méthotrexate). De la même façon, le MRP-2 est capable de transporter des agents anticancéreux comme le méthotrexate, le cisplatine, l'étoposide, la doxorubicine, ou encore l'épirubicine. Cette résistance aux médicaments, médiée par les transporteurs MRP-1 et 2, requiert un apport continu de GSH. Il a été démontré qu'une augmentation d'expression de MRP-1 était associée à une augmentation de la  $\gamma$ -GCS (gamma-glutamylcystéine synthétase), enzyme clé de la synthèse du GSH, dans les cellules tumorales (Kuo *et al.*, 1998). De plus, les taux d'expression de ces transporteurs sont plus importants dans les cellules tumorales que dans des cellules saines (Suzuki *et al.*, 2001) ce qui diminue fortement l'activité des anticancéreux utilisés.

La P-glycoprotéine (P-gp) est également un membre de la superfamille de transporteurs ABC. Appelée aussi MDR-1 (*Multidrug resistance-1*), elle a été caractérisée, pour la première fois, dans des cellules tumorales (Ueda *et al.*, 1987). La P-gp, située sur le bord apical des cellules épithéliales intestinales, est également exprimée dans de nombreux autres tissus comme le foie, les reins et le cerveau. Ainsi, la P-gp empêche l'accumulation des xénobiotiques et de leurs métabolites dans ces différents organes. Elle est présente au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Lee *et al.*, 2001; Volk et Loscher, 2005) et joue donc un rôle dans la BHE. Elle possède un grand nombre de substrats comme des agents anticancéreux (doxorubicine, étoposide), des hormones stéroïdiennes (aldostérone, cortisol), des agents anti-microbiens (érythromycine, kétoconazole), des opioïdes (lopéramide, morphine), des médicaments (digoxine, vérapamil) ou encore des immunosuppresseurs (Mealey, 2004).

Les transporteurs polypeptidiques d'anions organiques (OATP) ou de cations organiques (OCTP) sont également des transporteurs d'efflux. Les OATP acceptent un grand nombre de substrats dont les acides biliaires, les conjugués au glutathion, le leucotriène C4 et le GSH. Les OCTP, quant à eux, transportent des substances comme la choline, le TEA (tétraéthylammonium), des zwitterions, la carnitine, ou encore le métabolite toxique du MPTP (MPP<sup>+</sup>). Au niveau cérébral, on retrouve des transporteurs d'anions et de cations organiques au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et dans les plexus choroïdes (Hagenbuch et Meier, 2003; Lockman *et al.*, 2004).

## **2 - Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT)**

Les Uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférases (EC 2.4.1.17) catalysent une voie de métabolisme majeure chez l'Homme et les animaux : la glucuronoconjugaison. Cette réaction consiste à fixer l'acide glucuronique, provenant de l'acide UDP-glucuronique (UDPGA), sur un substrat appelé aglycone généralement lipophile. Cette réaction conduit à la formation d'un glucuronide et à la libération d'UDP. Les UGT métabolisent de nombreux composés endogènes et exogènes. Les métabolites formés ne présentent généralement pas d'activité pharmacologique ; cependant, certains métabolites pourront avoir un effet pharmacologique augmenté ou présenteront une toxicité accrue.

## 2.1 - Nomenclature

De nombreuses études concernant l'induction, la spécificité de substrats et les variations au cours du développement ont permis de classer les UGT en une superfamille d'isoenzymes (Tableau 2). La comparaison des séquences primaires, déduites des ADNc des 61 UGT clonés chez des mammifères à ce jour, a permis de classer les UGT en 2 familles (UGT1 et 2) et 4 sous-familles (UGT1A, 2A, 2B et 2C).

<i>Gène</i>	<i>Nom commun</i>	<i>Espèce</i>	<i>N° d'accèsion</i>
<b>UGT1A1</b>	B1 UgtBr1 HUG-Br1	Rat Souris Homme Chat	D38065 - U20551 S64760 - L02333 M57899 - M84125 AF039137 - AB010872
<b>UGT1A01</b>		Singe	AF104339
<b>UGT1A2</b>	Bilirubin B2	Rat Rat Souris	M34007 D38066 D87866 - D50707
<b>UGT1A2P</b>	1bp	Homme	M84126
<b>UGT1A02</b>		Chat Singe	AF039138 Confidentiel
<b>UGT1A3</b>	B3 1c	Rat Homme	D38067 M84127
<b>UGT1A03</b>		Singe	Confidentiel
<b>UGT1A4P</b>	B4	Rat	D38068
<b>UGT1A04</b>	Ugt1-4c	Lapin	U09101
<b>UGT1A4</b>	HUG-Br2	Homme	M84128 - M57951
<b>UGT1A5</b>	B5 1e	Rat Homme Souris	D38069 M84129
<b>UGT1A6</b>	4NP  HlugP1 Ugt1-6	Rat Souris Homme Lapin Vache Mouton Chien Furet	J02612 - J05132 U16818 - D87867 M84130 - J04093 U09030 AB008677 AB018477 AJ290948 AF333815
<b>UGT1A06</b>		Singe	AF104337
<b>UGT1A6P</b>		Chat Léopard	AF064085 AF177922
<b>UGT1A7</b>	A2 1g	Rat Homme	D38062 U39570 - U89507
<b>UGT1A07</b>		Lapin Mouton Cochon d'Inde	AF011902 AB018478 Confidentiel
<b>UGT1A8</b>	A3 1h	Rat Homme	D38063 U42604 - AF030310
<b>UGT1A08</b>		Singe	AF104338
<b>UGT1A9P</b>	A4	Rat	D38064

UGT1A9	mUGTBr/P	Souris Homme	L27122 AF056188
UGT1A09		Singe	AF104336
UGT1A10	lj	Homme	U39550 - U89508
UGT1A11P	lk	Homme	U39551
UGT1A12P	ll	Homme	U39552
UGT2A1	Olfrat	Rat Homme Souris	X57565 AJ006054 NM 053184
UGT2A2	2C1 renamed	Lapin	L01083
UGT2A3		Cochon d'Inde	AF175221
UGT2B1	r-2	Rat	M13506 - M35202
UGT2B2	r-4	Rat	J02589 - X03478
UGT2B3	r-3 Rlug38	Rat Rat	M31109 Y00156
UGT2B4	Hlug25, h-1, h-20	Homme	Y00317 - AF064200
UGT2B5	m-1	Souris	X06358
UGT2B6	r-5	Rat	M33746
UGT2B7	h-2, Hlug6	Homme	J05428
UGT2B8		Rat	U27518
UGT2B9		Singe	U91582
UGT2B10	h-46	Homme	NM 001075
UGT2B11		Homme	AF016492
UGT2B12		Rat	U06273 - U06274
UGT2B13	Egt10	Lapin	L01081
UGT2B14	Egt12	Lapin	L01082
UGT2B15	h-3, Hlug4	Homme	U08854 - U06641
UGT2B16		Lapin	U72742
UGT2B17		Homme	U59209
UGT2B18		Singe	AF016310
UGT2B19		Singe	AF112112
UGT2B20		Singe	AF072223
UGT2B21		Cochon d'Inde	AB034987
UGT2B22		Cochon d'Inde	AB034988
UGT2B23		Singe	AF112113
UGT2B24P		Homme	AF179876
UGT2B25P		Homme	AF179877
UGT2B26P		Homme	AF179878
UGT2B27P		Homme	AF179879
UGT2B28		Homme	AF177272
UGT2B29P		Homme	AF179880
UGT2B30		Singe	AF401657
UGT2B31		Chien	Confidentiel
UGT2B32		Cochon d'Inde	Confidentiel
UGT2B33		Singe	AF294902
UGT8	rCerGT mCerGT hCerGT	Rat Souris Homme	L21698 - U07683 U48891 - X92122 U30930 - U31461

Tableau 2. Gènes des UGT connus à ce jour chez les mammifères

(d'après <http://som.flinders.edu.au/FUSA/ClinPharm/UGT>)

(P = pseudogènes : codon stop et/ou mutation du cadre de lecture dans la séquence codante)

Deux membres d'une même famille possèdent une homologie de séquence en acides aminés supérieure à 50% et moins de 50% d'homologie avec une autre famille. De plus, deux sous-familles ont 60% d'homologie entre elles. Malgré les différences de la séquence primaire en acides aminés entre les UGT1 et 2, les domaines C-terminaux de ces protéines ont une forte homologie de séquence suggérant ainsi la présence d'une région conservée correspondant probablement au site de fixation de l'acide UDP-glucuronique (Ritter *et al.*, 1992). En revanche, le domaine N-terminal, qui intervient dans la fixation de l'aglycone, est moins conservé (Figure 7).

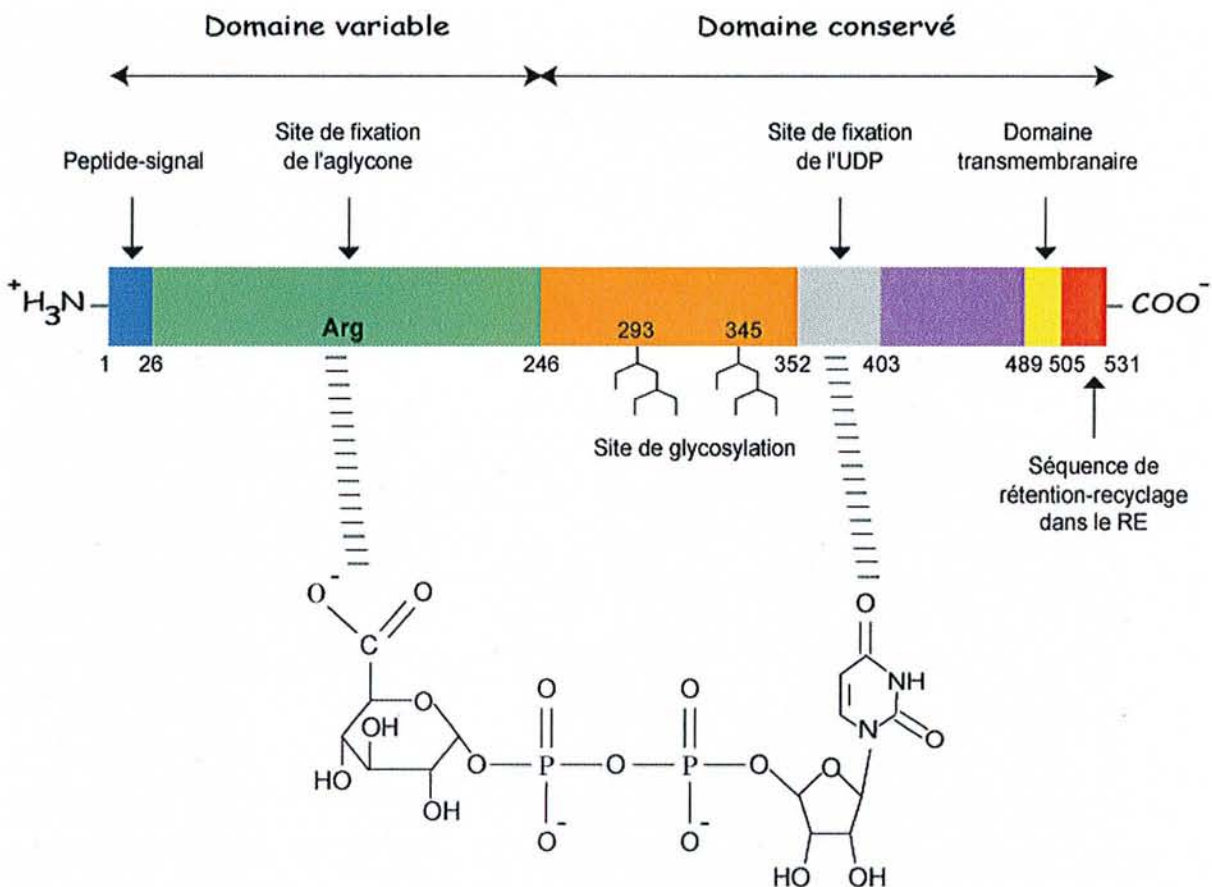


Figure 7. Représentation des principaux domaines des UGT (RE : réticulum endoplasmique)

Tous les membres de la famille 1 sont codés par un même gène formé de 17 exons et localisé dans la région q37 du chromosome 2. Ce gène est constitué de 13 exons 1, chacun étant précédé par sa région promotrice. Ainsi, le 1<sup>er</sup> exon diffère d'une isoforme à l'autre et

code pour 288 acides aminés dans la partie *N*-terminale de la protéine. Les autres exons, numérotés de 2 à 5, sont identiques entre les isoformes et codent pour les 246 acides aminés de la partie *C*-terminale de la protéine comprenant le site de fixation de l'UDPGA. Le transcrit primaire est le produit d'épissage pseudo-alternatif comprenant un des exons 1 fusionné avec les exons 2, 3, 4 et 5. Ce mécanisme d'épissage différentiel génère des UGT de la famille 1 dont les domaines *C*-terminaux sont identiques et les domaines *N*-terminaux possèdent entre 37 et 90% d'homologie (Ritter *et al.*, 1992). Les UGT1 conjuguent des composés endogènes tels que la bilirubine, les hormones thyroïdiennes, des stéroïdes et des composés exogènes comme des phénols et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (King *et al.*, 2000).

Contrairement aux UGT1, les UGT de la famille 2 sont codées par des gènes différents constitués de 6 exons et localisés dans les régions q13 et q28 du chromosome 4. Cette famille d'UGT est divisée en 3 sous-familles : A, B et C. La sous-famille 2A est responsable de la conjugaison de substances odorantes. La sous-famille 2B est constituée d'enzymes qui conjuguent les acides carboxyliques, les alcools, les amines et les thiols. Ainsi, les anti-inflammatoires non stéroïdiens de la série des profènes, les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, les acides biliaires et la morphine sont majoritairement pris en charge par cette sous-famille. La sous-famille 2C est représentée par une isoforme unique (foie de lapin), dont la séquence diverge des autres membres de la sous-famille 2B de lapin (Tukey *et al.*, 1993). La famille UGT8 est exprimée chez la souris, le rat et l'Homme sous forme de galactosyltransférases. Elles catalysent le transfert du galactose provenant de l'UDP-galactose sur des céramides cérébraux pour former des cérébrosides (Mackenzie *et al.*, 1997; Ezoë *et al.*, 2000). Les cérébrosides font parties des glycosphingolipides majeurs qui forment la membrane lipidique de la gaine de myéline synthétisée par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (Schulte et Stoffel, 1993; Schaeren-Wiemers *et al.*, 1995).

## 2.2 - Répartition des UGT

### 2.2.1 - Généralités

Le foie est généralement considéré comme l'organe majeur responsable de la glucuronoconjugaison. Cependant, d'autres organes comme le rein (Tsoutsikos *et al.*, 2004), l'intestin (Staines *et al.*, 2004), le poumon (Ren *et al.*, 2000) et la peau (Levesque *et al.*, 1997) expriment également des UGT actives. Il a aussi été montré des activités de



glucuroconjugaison au niveau cérébral (Gherzi-Egea *et al.*, 1987; Suleman *et al.*, 1993; El-Bacha *et al.*, 2000), et des activités très élevées dans la muqueuse olfactive (Heydel *et al.*, 2001). Certaines UGT sont exprimées spécifiquement dans certains tissus. C'est le cas de l'UGT2A1, absente au niveau hépatique, mais que l'on retrouve au niveau de la muqueuse olfactive et des bulbes olfactifs (Heydel *et al.*, 2001; Leclerc *et al.*, 2002). Les UGT1A7, 1A8 et 1A10 sont également exprimées dans des tissus extra-hépatiques. Les isoformes 1A8 et 1A10 sont présentes au niveau du tractus gastro-intestinal alors que l'UGT1A7 est exprimée dans l'œsophage, l'estomac et les poumons (Kiang *et al.*, 2005). En revanche, certaines UGT, telles que les isoformes 1A6 et 2B7, sont exprimées de façon ubiquitaire.

### 2.2.2 - Les UGT cérébrales

En 1987, Gherzi-Egea *et al.* ont mis en évidence une activité de glucuroconjugaison envers le 1-naphtol dans le cerveau de rat. Cette activité est très inférieure à celle trouvée au niveau hépatique. A l'opposé, la présence de très fortes activités d'UGT métabolisant le 1-naphtol a été détectée dans les plexus choroïdes (Leininger-Muller *et al.*, 1994). D'autres études ont montré que l'activité des UGT, envers le 1-naphtol et la 4-méthylombélliférone, sont supérieures au niveau astrocytaire par rapport aux neurones et supérieures dans les neurones par rapport à l'ensemble du cerveau (Suleman *et al.*, 1998). Les astrocytes participent ainsi à la protection des neurones contre une éventuelle toxicité des xénobiotiques. Les études d'activité des enzymes métabolisant les médicaments, responsables de la détoxification et de l'inactivation pharmacologique des xénobiotiques, ont mis en évidence plusieurs aspects. Tout d'abord, comme ces enzymes participent aux voies métaboliques endogènes, le métabolisme des médicaments peut interférer avec la synthèse ou le catabolisme de ces molécules. De plus, ces enzymes peuvent générer des métabolites toxiques réactifs et/ou des radicaux libres. Ceci peut altérer le fonctionnement du SNC et induire à long terme une neurotoxicité par altération des protéines ou des lipides et par inactivation d'enzymes clés du métabolisme. Enfin, elles peuvent activer des molécules lipophiles et/ou des précurseurs en métabolites réactifs (Minn *et al.*, 1991). Toutes les molécules qui franchissent la BHE et qui pénètrent dans le cerveau sont susceptibles d'être métabolisées par les UGT, présentes dans les différents types cellulaires, à condition d'avoir des groupements fonctionnels reconnus par celles-ci. Ainsi, les UGT cérébrales ont pour rôle de protéger le cerveau contre les xénobiotiques. Une isoforme d'UGT, l'UGT1A6, a été identifiée et caractérisée dans le cerveau de rat (Suleman *et al.*, 1998). Les activités des UGT1A6 et 2B7

ont été détectées chez l'Homme (King *et al.*, 1999). D'autres isoformes d'UGT spécifiques, comme la glucuronosyltransférase néolactotétraosylcéramide, ont un autre rôle, celui de métaboliser des molécules complexes impliquées dans l'adhésion cellulaire en particulier dans l'adhésion neurone-astrocyte durant le développement du SNC (Kawashima *et al.*, 1992).

### 2.3 - Localisation des UGT

Les UGT sont des protéines transmembranaires de 50 à 60 KDa (Figure 8) principalement localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans la membrane périnucléaire des cellules (Mulder, 1992).

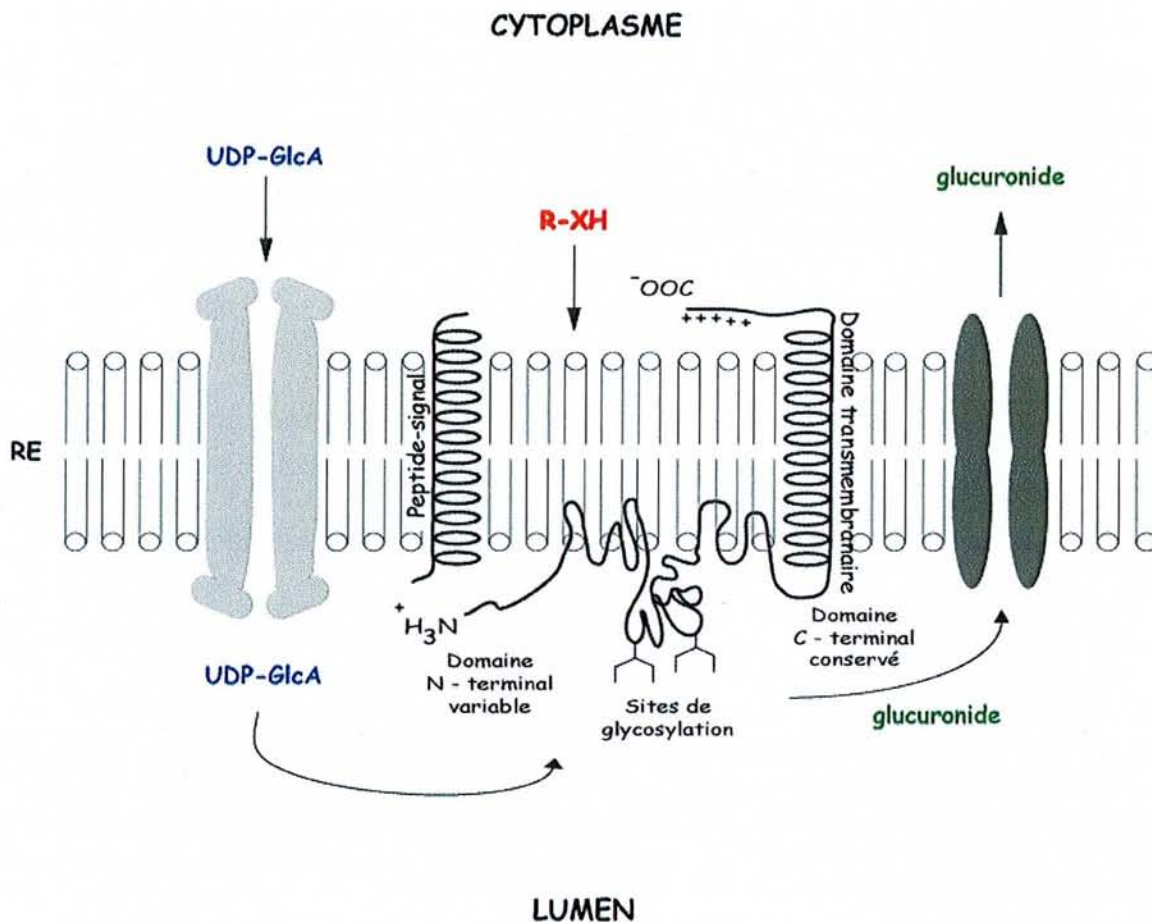


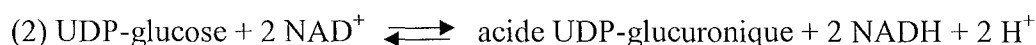
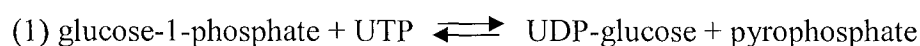
Figure 8. Représentation de l'organisation membranaire des UGT dans le RE (d'après Burchell et Coughtrie, 1989 ; R-XH = aglycone)

Ces enzymes sont composés de 528 à 531 acides aminés qui peuvent être divisées en 2 régions, un domaine *N*-terminal et un domaine *C*-terminal. La partie *N*-terminale est la moins conservée d'une isoenzyme à l'autre. Cette portion variable semble conférer leur spécificité aux UGT. Cette région protéique contient une séquence signal qui dirige la protéine dans le réticulum endoplasmique (Kinosaki *et al.*, 1993). Ce peptide signal sera clivé ultérieurement et la protéine pourra être glycosylée. La très grande homologie de séquence dans la région *C*-terminale des UGT conduit à l'hypothèse que cette région est responsable de la liaison avec le cofacteur UDPGA. L'analyse de la structure primaire de l'enzyme révèle un signal d'ancrage au réticulum endoplasmique composés d'acides aminés chargés positivement dans la région *C*-terminale. Il semblerait que les UGT soient actives sous la forme d'homodimères ou hétérodimères composés de 2 chaînes polypeptidiques d'UGT (Radomska-Pandya *et al.*, 1999).

#### 2.4 - La réaction de glucuroconjugaison

La glucuroconjugaison est une réaction faisant intervenir une molécule hydrophobe, appelée aglycone, et le co-substrat de la réaction : l'acide UDP-glucuronique (UDPGA). Les UGT vont donc catalyser le transfert de l'UDPGA sur des structures chimiques possédant une fonction R-OH, R-COOH, R-CO, R-NH<sub>2</sub> ou encore R-SH et former ainsi des *O*-glucuronides, *C*-glucuronides, *N*-glucuronides ou *S*-glucuronides.

Le co-substrat de la réaction, l'UDPGA, est synthétisé dans la cellule en 2 étapes. La 1<sup>ère</sup> étape (1) est catalysée par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) qui, à partir de glucose-1-phosphate et d'uridine triphosphate (UTP), va former de l'UDP-glucose et du pyrophosphate. Lors de la 2<sup>e</sup> étape (2), l'UDP-glucose va être oxydé en UDPGA par une UDP-glucose déshydrogénase (EC 1.1.1.22). L'activité de cette enzyme est contrôlée par le rapport NAD<sup>+</sup>/NADH (Ge *et al.*, 2004).



Le mécanisme réactionnel de la conjugaison catalysée par les UGT consiste en une attaque nucléophile de l'aglycone sur le carbone C1 de l'acide glucuronique selon un mécanisme de

substitution nucléophile d'ordre 2 avec inversion de configuration (inversion de Walden). Elle conduit à la formation de 1- $\beta$ -D-glucuronide (Figure 9).

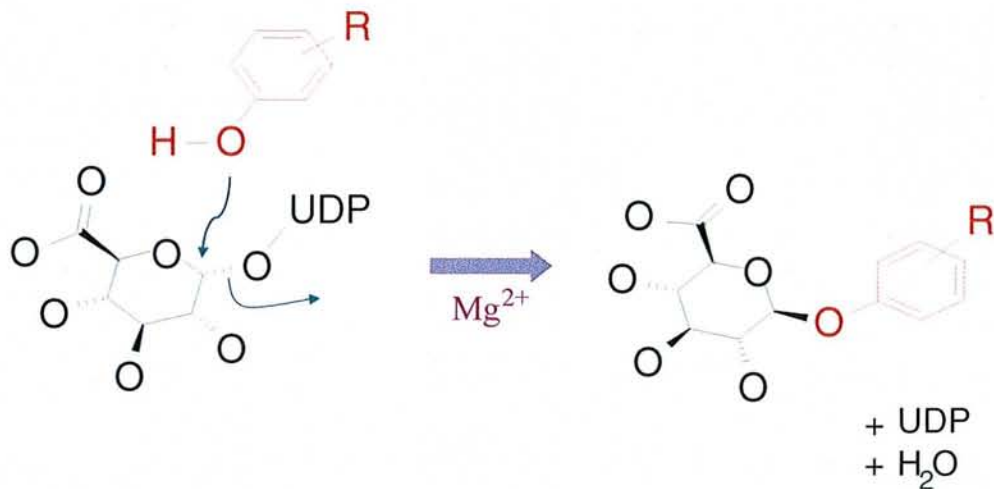


Figure 9. Représentation schématique de la réaction de glucuroconjugaison

## 2.5 - Rôles pharmacologiques et physiologiques des UGT

### 2.5.1 - Conjugaison de xénobiotiques

La glucuroconjugaison des médicaments lipophiles, quelle que soit leur classe thérapeutique, reste une voie d'élimination majoritaire de l'organisme avec ou sans fonctionnalisation préalable par les enzymes de phase I. La glucuroconjugaison de certains médicaments est énantiosélective et stéréosélective. C'est le cas, par exemple, du naproxène (el Mouelhi *et al.*, 1987; el Mouelhi *et al.*, 1993) dont la forme R, chez le rat, est 17 fois plus rapidement glucuroconjuguée que son énantiomère. La glucuroconjugaison des médicaments diminue généralement leur durée d'activité pharmacologique. Ainsi, la pharmacocinétique d'un médicament dépend, en partie, de sa vitesse de glucuroconjugaison. Celle-ci varie d'une molécule à une autre en fonction de l'activité catalytique des isoformes d'UGT responsables de sa conjugaison et des facteurs qui affectent leur expression. De plus, l'administration d'un médicament peut modifier la vitesse de glucuroconjugaison d'un autre médicament. Ceci a notamment été montré par des études *in vitro* (Le Guellec *et al.*, 1995) portant sur les interactions possibles entre le propofol et une dizaine d'autres composés susceptibles d'être co-administrés en période pré- ou post-

opérateur (acide acétylsalicylique, kétoprofène, oxazépam, ...). L'inhibition de la glucuroconjugaison du propofol par ces substances conduit à un risque de toxicité par surdosage. De telles interactions médicamenteuses liées à la glucuroconjugaison sont également observées entre l'AZT et d'autres composés co-administrés aux malades atteints du SIDA (Haumont *et al.*, 1990). Elles peuvent s'avérer intéressantes, le but étant de ralentir le catabolisme de l'AZT et ainsi d'augmenter sa durée de vie dans l'organisme.

Les glucuronides ont parfois une activité pharmacologique propre. La morphine, les stéroïdes, les acides biliaires et les rétinoïdes sont, par exemple, tous transformés en métabolites pharmacologiquement plus actifs (Vore *et al.*, 1983; Abbott et Palmour, 1988; Olson *et al.*, 1992; Mercadante, 1999; Radomska-Pandya *et al.*, 1999). La glucuroconjugaison peut également conduire à la formation de glucuronides réactifs. Les glucuronides formés à partir de médicaments à structure carboxylique peuvent se fixer de manière covalente sur des protéines tissulaires ou plasmatiques pour former des adduits. Le glucuronide de kétoprofène se fixe de manière covalente sur les UGT provoquant une inhibition irréversible de la glucuroconjugaison (Terrier *et al.*, 1999). Les adduits peuvent générer des effets toxiques et/ou immunoallergiques après administration de ces médicaments (Spahn-Langguth et Benet, 1992).

La glucuroconjugaison est impliquée en psychiatrie (De Leon, 2003). En effet, il a été montré que divers psychotropes (oxazépam, lorazépam) et anti-épileptiques étaient métabolisés par les UGT. La glucuroconjugaison joue également un rôle majeur dans la détoxification de molécules carcinogènes et autres polluants qui peuvent être ingérés ou inhalés par l'organisme. A ce niveau, deux mécanismes opposés peuvent être observés. Des travaux ont montré que la glucuroconjugaison des métabolites du benzo(a)pyrène protège les fibroblastes de peau de rat en culture contre la formation d'adduits protéiques et l'alkylation de l'ADN (Vienneau *et al.*, 1995). Ainsi, une déficience de glucuroconjugaison augmenterait les risques de cancérogenèse par processus chimique. Au contraire, les *N*-hydroxy-glucuronides d'arylamines sont des métabolites réactifs qui peuvent initier des cancers de la vessie ou du colon chez l'Homme. Dans ce cas, la glucuroconjugaison permet d'excréter les métabolites hydroxylamines et phénoliques de la bile vers l'intestin. Les  $\beta$ -glucuronidases du colon libèrent alors des composés électrophiles carcinogènes.

### 2.5.2 - Conjugaison de composés endogènes

La bilirubine est issue du catabolisme des hémoprotéines et est produite à raison de 300 mg/jour chez l'Homme. C'est un métabolite toxique dont la seule voie d'élimination est la glucuronoconjugaison. La bilirubine est excrétée sous forme de mono- ou de diglucuronides biliaires. Chez l'Homme, les premiers glucuronides d'hormones thyroïdiennes ont été mis en évidence en 1958 dans le plasma et la bile (Fauvert et Benhamou, 1958). La glucuronoconjugaison de la thyroxine réduit la capacité de l'hormone à fixer les protéines plasmatiques (Hays *et al.*, 1992) et maintient une hormonémie thyroïdienne physiologique. Dans le même sens, une diminution de la glucuronoconjugaison de la dihydrotestostérone conduit à l'accumulation de celle-ci au niveau de la prostate, ce qui a pour conséquence de déclencher une hyperplasie prostatique (Rizner *et al.*, 2003). Il a également été montré que la glucuronoconjugaison de l'acide rétinoïque empêche la fixation du composé parent aux récepteurs de l'acide rétinoïque (Howell *et al.*, 1998). Les UGT participent donc à la régulation de l'activité transcriptionnelle sous le contrôle de petits ligands non protéiques tels que les hormones et les neurotransmetteurs (Nebert, 1994). Par ailleurs, les UGT sont également connues pour métaboliser des composés endogènes tels que la sérotonine, des acides biliaires ou encore des catéchols oestrogènes (De Leon, 2003).

### 2.6 - L'UDP-glucuronosyltransférase 1A6

L'UGT1A6 humaine est une isoforme de 55 KDa codée par le gène UGT1. Elle est présente dans de nombreux organes comme le foie, les reins, les poumons, l'estomac, les intestins et le cerveau (Shelby *et al.*, 2003). Au niveau cérébral, la glucuronoconjugaison est principalement observée dans les astrocytes. Ainsi, ces cellules gliales présentent une activité et une expression de l'UGT1A6 les plus élevées de toutes les cellules cérébrales (Suleman *et al.*, 1998).

Cette isoforme est inductible par les hydrocarbures polycycliques aromatiques chez le rat (Bock *et al.*, 1999) et conjugue essentiellement des phénols plans tels que le 4-nitrophénol, le 1-naphtol, la 4-méthylombelliférone, des quinols et des amines aromatiques carcinogènes (Burchell *et al.*, 1995). Cette UGT est également impliquée dans la conjugaison de médicaments (paracétamol, naftazone, AINS, ...). La sérotonine est un des rares composés endogènes métabolisés par cette isoforme (Krishnaswamy *et al.*, 2004; Kohle *et al.*, 2005).

## 2.7 - Régulation des UGT

### 2.7.1 - Induction enzymatique

L'activité de glucuroconjugaison est modulée par de nombreux facteurs endogènes tel que l'âge et le sexe. Les UGT sont des enzymes inductibles, leur synthèse *de novo* peut être augmentée par différentes substances exogènes et endogènes. Les hormones thyroïdiennes peuvent influencer l'expression des UGT1A1 et 1A6 au niveau transcriptionnel (Haberhorn *et al.*, 2001). La L-triiodothyronine (T3) augmente l'expression de l'UGT1A6 et diminue celle de l'UGT1A1 (Li *et al.*, 1999). La vitamine A prolongerait cet effet. Chez l'animal, un nombre important de xénobiotiques se révèlent être capables de moduler l'activité des UGT. Cette modulation est souvent le résultat soit d'une activation soit d'une inhibition enzymatique touchant parfois spécifiquement une isoforme particulière. Au niveau du gène, la transcription des UGT peut être sensible à des facteurs exogènes. De nombreuses substances décrites comme inductrices de la transcription des gènes des CYP sont également inductrices de l'expression des UGT.

#### 2.7.1.1 - Les hydrocarbures polycycliques

Il est clairement démontré que des substances comme la dioxine ou le 3-méthylcholanthrène peuvent induire l'expression de l'UGT1A6. Les hydrocarbures, après leur entrée dans la cellule, vont se fixer sur leur récepteur AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*). Ce récepteur situé dans le cytosol forme un complexe avec deux protéines de choc thermique (Hsp90). La liaison entre le récepteur et le ligand conduit à la libération des protéines Hsp90 et à la liaison avec le translocateur nucléaire des hydrocarbures polycycliques (ARNt, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear translocator*). Le complexe ainsi formé est transloqué vers le noyau où il interagit avec un élément de réponse aux hydrocarbures polycycliques (AhRE, *Aryl hydrocarbon Response Element*) présent dans la région promotrice du gène et favorise ainsi l'action de l'ARN polymérase et par conséquent la transcription des gènes cibles (Munzel *et al.*, 1999; Miller et Ramos, 2001). L'hétérodimère AhR/ARNt est notamment connu pour induire l'isoforme UGT1A6 (Auyeung *et al.*, 2003). De plus, les séquences des promoteurs d'UGT1A6 de rat et d'Homme ont montré la présence d'un élément de réponse aux xénobiotiques (XRE, *Xenobiotic Response Element*) en amont de ces gènes (Munzel *et al.*, 2003). Des souris knock-out vis-à-vis du récepteur AhR ont été générées (Fernandez-Salguero

*et al.*, 1995). Chez ces souris dépourvues de récepteurs AhR, les ARN messagers de l'UGT1A6 sont indétectables dans le foie. Ceci suggère que ce récepteur soit également impliqué dans l'expression constitutive de l'UGT1A6.

#### 2.7.1.2 - Les barbituriques

Des agents anti-convulsivants comme le phénobarbital, la phénytoïne et la carbamazépine augmentent la glucuroconjugaison de certains médicaments *in vivo*. Par exemple, la glucuroconjugaison du paracétamol (utilisé comme un marqueur chez l'homme pour tester la capacité de glucuroconjugaison) est augmentée par un traitement au phénobarbital (Miners *et al.*, 1984; Bock et Bock-Hennig, 1987; Qatanani *et al.*, 2005). La conjugaison de médicaments tel que le valproate (Panesar *et al.*, 1989) et le chloramphénicol (Powell *et al.*, 1981) est également augmentée. Des études au niveau transcriptionnel ont permis de mettre en évidence des isoformes inductibles par le phénobarbital, comme par exemple l'UGT2B1 de rat (Ishii *et al.*, 1997). Cependant, le mécanisme d'induction n'est pas encore connu mais est supposé opérer au niveau transcriptionnel. En thérapeutique, l'induction par le phénobarbital est utilisée pour augmenter la conjugaison et l'excrétion de la bilirubine chez des patients souffrant d'une maladie génétique héréditaire (Criggler-Najjar de type II) liée à une absence complète ou partielle du gène de l'UGT1A1.

#### 2.7.1.3 - Les proliférateurs de peroxysomes

Les proliférateurs de peroxysomes sont également connus pour induire des UGT. Classiquement, ces composés initient la prolifération des peroxysomes quand ils sont administrés chez le rongeur. Cette catégorie de molécules comprend des fibrates synthétiques tels que le clofibrate, le ciprofibrate ou le fénofibrate mais également des analogues d'acides gras comme l'acide perfluorodécanoïque. Ce sont des médicaments hypolipémiants. Plusieurs d'entre eux sont connus pour se lier spécifiquement aux récepteurs activateurs des proliférateurs de peroxysomes (PPAR) afin d'activer des gènes cibles. Les UGT, comme les cytochromes P450, interviennent dans l'élimination des acides gras. Les fibrates peuvent augmenter l'activité enzymatique des UGT en modifiant l'environnement lipidique dans lequel elles se trouvent ou alors en augmentant l'expression de celles-ci. En modifiant la composition lipidique des membranes du réticulum endoplasmique, les hypolipémiants de type fibrate peuvent avoir une action sur l'activité de l'enzyme. En effet, le clofibrate



augmente la teneur en lysophosphatidylcholines microsomaux qui ont des propriétés détergentes, ce qui en fait de puissants agents d'activation des UGT. Par ailleurs, d'autres substances telles que des alcools ont été décrites comme pouvant réguler l'ARN messager de certaines isoformes d'UGT. Chez le rat, l'éthanol et le pentanol peuvent augmenter significativement les ARN messagers des UGT1A1, 1A5, 2B1 et 2B3 (Li *et al.*, 2000).

#### 2.7.1.4 - Implications de facteurs de transcription

Comme on a pu le voir ci-dessus, les UGT sont sensibles à de nombreux composés (endogènes ou exogènes). Il a ainsi été identifié de nombreux facteurs de transcription intervenant dans la régulation des UGT. Après un stimulus, ces facteurs de transcription sont activés et peuvent agir sur le gène d'une UGT donnée à condition que celui-ci possède, sur son promoteur, un élément de réponse du facteur de transcription en question. Les différences de régulation entre les UGT peuvent s'expliquer par la présence ou non d'un élément de réponse donné.

Les facteurs de transcription hépatiques HNF (*Hepatic Nuclear Factor*) interviennent dans la régulation de plusieurs UGT hépatiques. Les UGT1A8 et 1A10 sont régulées par HNF1 alors que l'UGT1A9 est régulée par HNF4 (Gregory *et al.*, 2004; Barbier *et al.*, 2005). D'autres facteurs, incluant C/EBP (*CAAT/Enhancer Binding Protein*), AP-1 (*Activator Protein-1*) ou NFκB (*Nuclear Factor kappa B*), sont connus pour réguler les UGT intervenant dans le métabolisme des stéroïdes, les UGT2B15 et 2B17 (Turgeon *et al.*, 2000). De plus, l'isoforme métabolisant la bilirubine, l'UGT1A1, est également régulée par NFκB (Svehlikova *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription NrF2 (*Nuclear factor E2 p45-related Factor 2*) joue un rôle central dans la régulation des enzymes de phase II telles que la NAD(P)H :quinone réductase, la glutathion *S*-transférase, la gamma-glutamylcystéine synthétase, l'époxyde hydrolase ou encore les UDP-glucuronosyltransférases. Ce facteur se fixe sur un élément de réponse aux anti-oxydants ou ARE (*Antioxidant Response Element*) situé sur le promoteur (Cho *et al.*, 2002; Thimmulappa *et al.*, 2002) et active la transcription du gène en question. Ce facteur de transcription joue donc un rôle important de protection contre les carcinogènes mais également contre les phénomènes de stress oxydant générés par une production accrue d'espèces activées de l'oxygène.

### 2.7.2 - Inhibition enzymatique

Les UDP-glucuronosyltransférases peuvent être inhibées par de nombreux composés endogènes, des médicaments ou des contaminants environnementaux (Grancharov *et al.*, 2001).

Parmi les composés endogènes, il a été montré que des acides biliaires (acide cholique, acide déoxycholique), des hormones (testostérone, T3, T4), des acyl-coenzymes A (Palmitoyl-CoA, Oléoyl-CoA) et des nucléotides (UDP, UTP, CDP) pouvaient inhiber ou réguler négativement l'activité des UGT. Il a été démontré que des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) entraînent une inhibition concentration-dépendante de la glucuronoconjugaison de la dihydrotestostérone (DHT) dans une lignée cancéreuse prostatique humaine (Levesque *et al.*, 1998a). Une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine-1 $\alpha$ , présente les mêmes effets sur la glucuronoconjugaison de la DHT avec un maximum d'inhibition pouvant atteindre 70%. Ainsi, la régulation, par les cytokines, de l'expression des UGT métabolisant les stéroïdes est une voie importante par laquelle certains facteurs pourraient altérer le niveau de DHT et par conséquent pourraient influencer le développement des cancers hormono-dépendants (Levesque *et al.*, 1998b).

Certains médicaments peuvent modifier la glucuronoconjugaison de composés endogènes. Ainsi, l'administration chez le rat d'un anti-inflammatoire, le piroprofène, résulte en une diminution temps-dépendante de la glucuronoconjugaison de la bilirubine. Cette inhibition peut atteindre jusqu'à 59% 5 jours après administration (Magdalou *et al.*, 1990). Des antidépresseurs (amitriptyline, imipramine), des neuroleptiques (chlorpromazine) et des antihistaminiques (prométhazine, cyproheptadine) sont de puissants inhibiteurs de la glucuronoconjugaison de la testostérone, de l'androstérone, de l'estradiol et du 1-naphtol (Sharp *et al.*, 1992). On peut utiliser l'inhibition de la glucuronoconjugaison pour augmenter la durée d'action de la molécule mère. C'est le cas de l'AZT utilisé chez les patients atteints du VIH. L'AZT, qui est métabolisé spécifiquement par l'UGT2B7, présente une demi-vie plasmatique d'une heure. L'administration simultanée d'AZT et d'éthinylestradiol ou de flurbiprofène augmente fortement sa demi-vie plasmatique (Herber *et al.*, 1992).

Des polluants industriels (2,4,6-trichlorophénol, pentachlorophénol), des métaux lourds (cadmium, mercure, nickel, plomb), ou des pesticides sont autant de substances pouvant diminuer l'activité des UGT.

### 2.7.3 - Déficiences génétiques de la glucuroconjugaison

Les activités des UGT sont différentes d'un individu à un autre. Ces variations peuvent être liées à l'âge, à l'état physiologique, au sexe ou à des modifications génétiques. Des déficiences d'origine génétique ont été démontrées pour la conjugaison de la bilirubine par l'UGT1A1 chez des patients atteints des syndromes de Crigler-Najjar ou de Gilbert (Burchell et Coughtrie, 1989; Kadakol *et al.*, 2000). Ces patients présentent des hyperbilirubinémies plus ou moins sévères. Le syndrome de Crigler-Najjar de type I est une déficience grave puisque les malades ne survivent pas plus de 15 ans, alors que les malades souffrant du syndrome de type II présentent une plus faible déficience. Au niveau cérébral, l'accumulation de bilirubine, qui peut apparaître chez l'enfant lorsque la BHE n'est pas totalement fonctionnelle, entraîne des séquelles neurologiques importantes et un retard mental.

Mackenzie *et al.* ont décrit les isoformes d'UGT humaines pour lesquelles un polymorphisme génétique avait été identifié (Mackenzie *et al.*, 2000). Parmi les 24 gènes d'UGT humaines, seuls les polymorphismes des UGT1A1, 1A6, 1A7, 2B4, 2B7 et 2B15 ont été observés. L'étude du polymorphisme des UGT est cruciale dans la mesure où la glucuroconjugaison est une voie de détoxification de nombreux composés. Un polymorphisme de ces gènes pourrait avoir un impact important dans notre capacité à détoxifier et éliminer les médicaments et les produits toxiques de l'organisme.

## C - L'inflammation

### 1 - Généralités

L'inflammation est une réponse normale, immédiate et transitoire aux agressions extérieures compromettant l'intégrité de l'organisme. Elle est définie depuis Cornelus Celsus par les signes cardinaux rougeur, douleur, chaleur, œdème. L'inflammation est déclenchée par les agents infectieux, les métaux toxiques, les cellules ou particules étrangères. Elle engage le recrutement de cellules régulatrices et/ou effectrices dont les rôles consistent à limiter la propagation des agents infectieux ou lésant au site de l'inflammation, c'est-à-dire de les éliminer, de stimuler la réponse immunitaire adaptative et de permettre « le retour à la normale » par la réparation tissulaire ou cicatrisation.

## **2 - La réaction inflammatoire**

La réaction inflammatoire fait intervenir la sécrétion de médiateurs (chémokines, cytokines, ...) par les différentes cellules participant à la réponse inflammatoire.

Dans les premières secondes, la principale manifestation est une phase de congestion active auto-amplifiée. Elle correspond à une vasodilatation massive et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui induisent l'exsudation des protéines plasmatiques, la libération d'amines vasoactives (histamine, sérotonine) et l'activation du système du complément. Ces phénomènes s'auto-entretiennent, initient et/ou entretiennent l'opsonisation (processus facilitant la phagocytose) par l'intermédiaire de récepteurs présents à la surface des phagocytes, la libération d'histamine par les mastocytes, l'accroissement de la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses et la libération de molécules chimiotactiques (cytokines et chémokines). Les cellules présentes au site de l'agression (mastocytes, histiocytes, fibroblastes et plaquettes) produisent des médiateurs pro-inflammatoires qui vont activer l'endothélium vasculaire. Enfin, l'expression de molécules d'adhésion va permettre l'adhérence des leucocytes sanguins aux parois des vaisseaux.

Les cellules effectrices recrutées au niveau du foyer inflammatoire, comme les leucocytes et les neutrophiles, marginent puis pénètrent dans le tissu conjonctif par diapédèse, en réponse aux signaux chimiotactiques ; on parle alors de « réponse cellulaire aiguë ». Ces signaux sont activés sous l'action de stimuli locaux (cytokines pro-inflammatoires, ...) et participent à l'entretien du processus inflammatoire notamment par la libération de nombreux médiateurs solubles (Figure 10). Ces médiateurs sont structurellement, fonctionnellement et temporellement hétérogènes. Au cours de la réponse inflammatoire aiguë, une série d'étapes basées sur l'intervention des cytokines, des chémokines, et des différentes classes d'eicosanoïdes se succèdent : les cytokines pro-inflammatoires, prostaglandines, thromboxanes, et leucotriènes, de par leurs nombreuses fonctions biologiques, entretiennent la réaction inflammatoire et participent à la mise en place de la réaction immunitaire spécifique.

Enfin, survient la libération retardée des cytokines et lipoxines anti-inflammatoires, la réduction du trafic des leucocytes et finalement la phase de résolution de l'inflammation. Cependant si l'agent infectieux n'a pas pu être éliminé complètement ou si les dommages infligés au tissu sont suffisamment sévères, la réponse cellulaire peut devenir chronique.

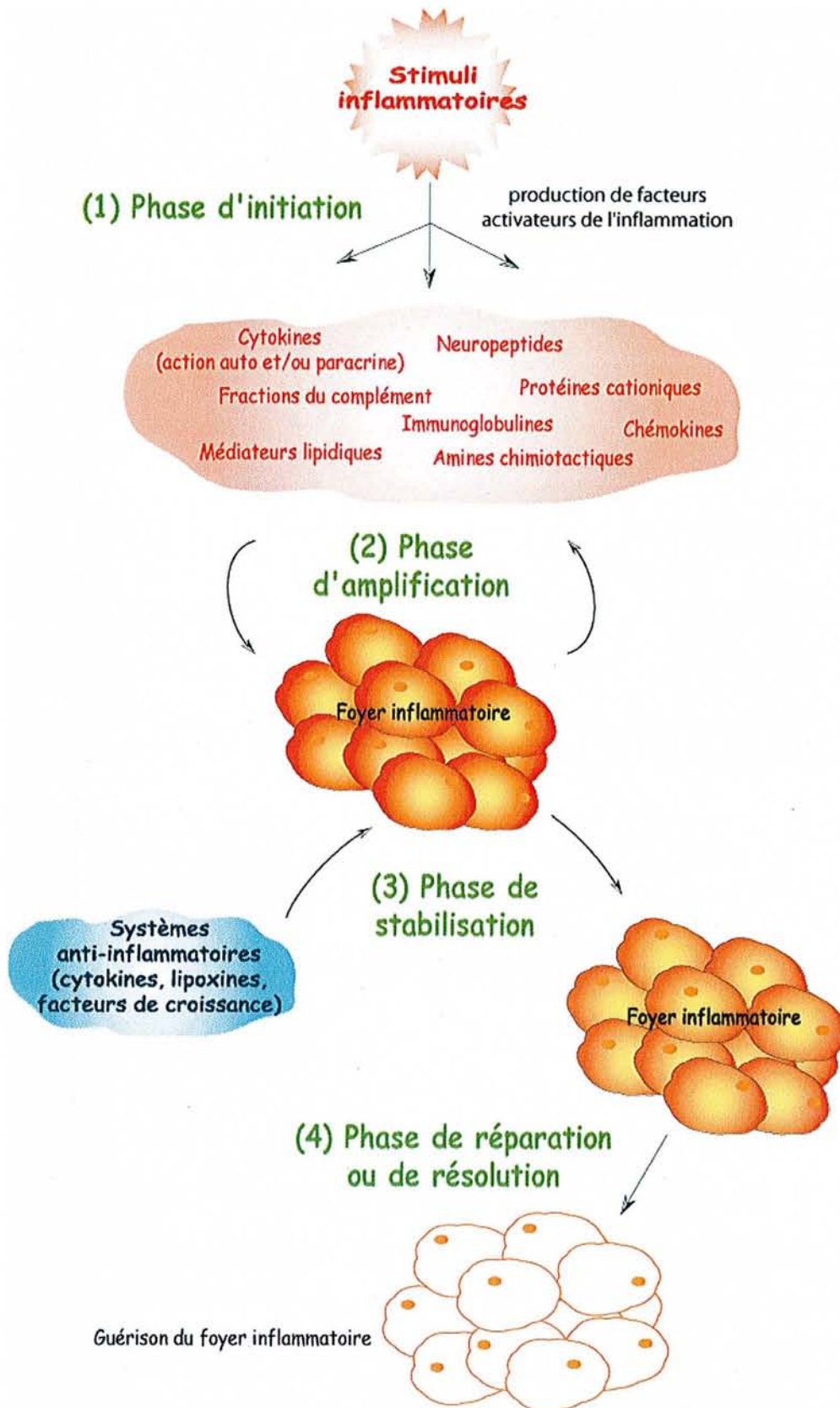


Figure 10. La réaction inflammatoire : de l'initiation à la résolution

### 3 - Les médiateurs de l'inflammation

#### 3.1 - Les cytokines et chémokines

L'inflammation fait intervenir de nombreux signaux et médiateurs, dont leur but est de rétablir l'homéostasie de l'hôte suite à l'agression.

##### 3.1.1 - Les cytokines

Les activités des cytokines sont complexes. Leurs cibles sont nombreuses, et selon le contexte, la nature de la cellule cible, la chronologie d'action, la nature de l'activateur ou encore le compartiment tissulaire où elles agissent, leur fonction est modifiée.

Parmi les premières cytokines pro-inflammatoires synthétisées, l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur nécrotique des tumeurs (TNF) jouent un rôle critique dans l'inflammation (Yoshimura *et al.*, 2003). De nombreuses cellules stimulées par ces cytokines sont capables de produire, à leur tour, des médiateurs lipidiques de l'inflammation, des enzymes protéolytiques, des espèces activées de l'oxygène ou de l'azote, et des chémokines. Elles entretiennent ainsi le processus inflammatoire. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  peuvent agir localement ou être responsables d'effets systémiques comme la fièvre. L'IL-1 exerce également de nombreux effets indirects en favorisant la synthèse d'IL-2, 3, 4, 6 et 8. Le TNF- $\alpha$  peut être produit sous l'action d'un stress oxydant par différents types cellulaires, notamment par les phagocytes mononucléés, et en particulier les macrophages alvéolaires. La plupart des fonctions pléiotropes du TNF- $\alpha$  seraient dues à des effets précoces comme l'activation de facteurs de transcription (Flora *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002), ainsi qu'à des effets plus tardifs comme l'activation de la caspase 3 (Filippatos *et al.*, 2004) et une réponse anti-proliférative. Le TNF- $\alpha$  régule l'inflammation en recrutant et en activant les cellules inflammatoires par la production de médiateurs : IL-1, IL-6, PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor- $\alpha$* ), prostaglandines E<sub>2</sub> et prostacyclines. Il induit la transcription de gènes impliqués dans la défense de l'hôte, l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, la surproduction d'espèces activées de l'oxygène et de l'azote par les leucocytes (Driscoll, 2000). La production d'IL-1 et de TNF par les macrophages peut être augmentée par d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-3, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , ...) inhibent la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. Elles exercent un rétrocontrôle négatif indispensable pour la résolution de l'inflammation. Ces cytokines, en particulier le TGF- $\beta$ , diminuent la production des espèces activées de l'oxygène et de l'azote et participent à la réparation tissulaire en stimulant la prolifération et la différenciation des fibroblastes, ainsi que la production de matrice extracellulaire. Ainsi, différents systèmes vont permettre de limiter l'induction, l'entretien ou l'amplification d'une réponse inflammatoire :

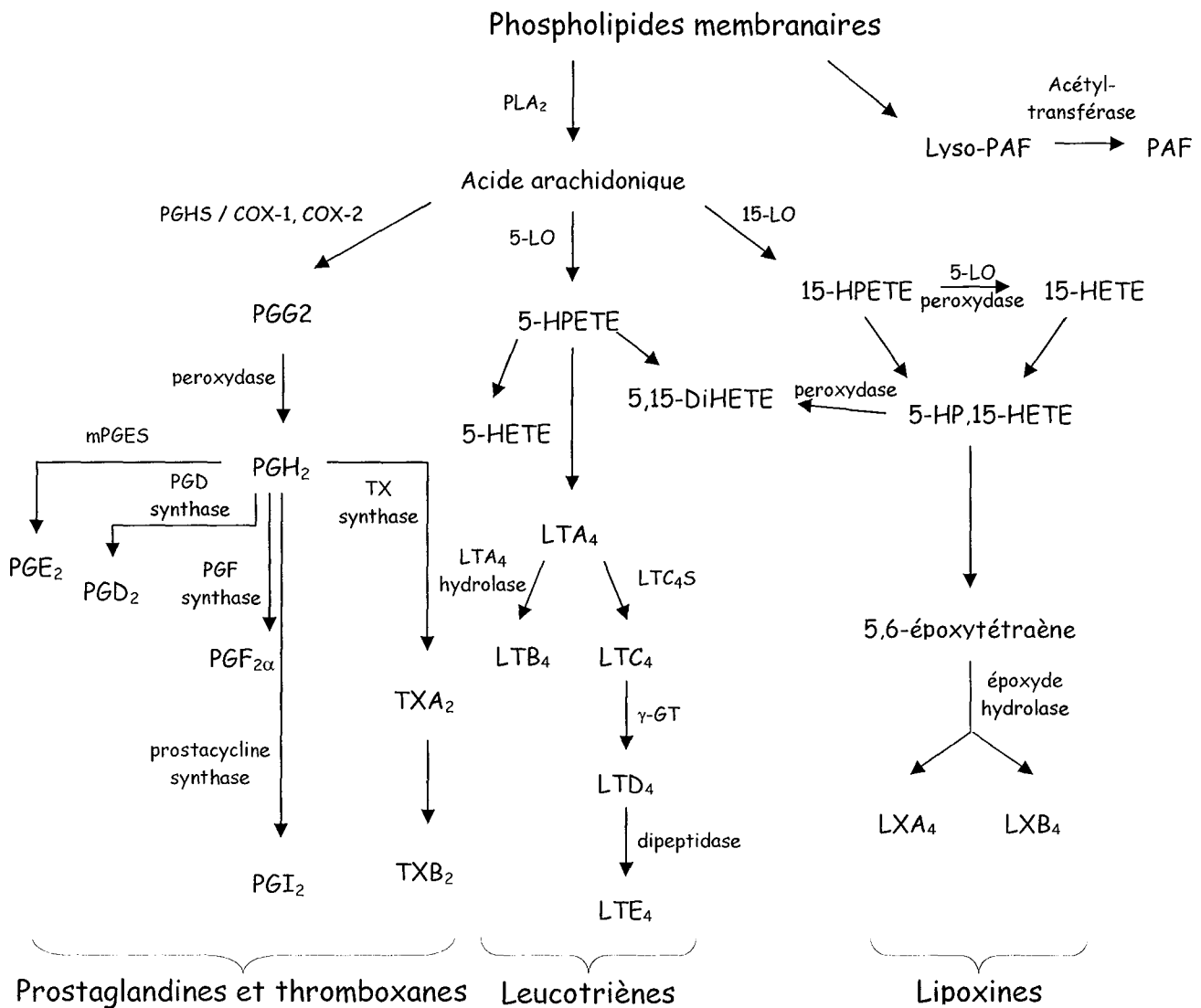
- cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ , IL-10)
- cytokines « compétitrices » qui vont bloquer le récepteur de cytokines pro-inflammatoires (IL-1Ra)
- récepteurs solubles de cytokines qui vont fixer la cytokine avant que celle-ci ne se lie à son récepteur membranaire (récepteur soluble du TNF)
- anticorps anti-cytokine pro-inflammatoire (anticorps anti-TNF)

### 3.1.2 - Les chémokines

Le terme de chémokines provient de la contraction des mots chémoattractant et cytokines. Ce sont de petites protéines de 8 à 10 KDa qui ont initialement été identifiées comme étant des attracteurs de leucocytes. Elles jouent un rôle clef dans le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires. Les chémokines possèdent un motif structural hautement conservé et « basé » autour de 4 résidus cystéine. Cette superfamille de cytokines chémotactiques est divisée en 4 familles en fonction du nombre et de l'espace entre les cystéines conservées à leur extrémité *N*-terminale : CXC ou  $\alpha$ , CC ou  $\beta$ , CX<sub>3</sub>C ou  $\delta$ , C ou  $\gamma$ .

### 3.2 - Les médiateurs lipidiques

Le PAF (*platelet-activating factor*) et les eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) sont synthétisés à partir des phospholipides membranaires sous l'action d'enzymes (Figure 11). Ces médiateurs sont actifs sur un grand nombre de cellules impliquées dans la réponse inflammatoire. Ils agissent également comme des facteurs chémotactiques capables de recruter et de pré-activer les cellules afin de les rendre plus sensibles à l'action d'autres médiateurs.



**Figure 11.** Le métabolisme des phospholipides membranaires

(COX : cyclooxygénases, γ-GT : γ-glutamyl-transférase, HETE : acide hydroxyéicosatétraénoïque, HPETE : acide hydroperoxyéicosatétraénoïque, LO : lipoxygénases, LT : leucotriènes, LX : lipoxines, PAF : *platelet-activating factor*, PG : prostaglandines, PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>, TX : thromboxanes)

### 3.2.1 - Le PAF ou « *platelet-activating factor* »

*In vivo*, le PAF est un médiateur phospholipidique biologiquement actif. Il est produit par les monocytes, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes, lymphocytes, plaquettes, cellules endothéliales ou encore les fibroblastes. Il agit sur la plupart des cellules, notamment celles des muscles lisses et les neurones. Le PAF exerce de nombreux effets physiopathologiques en agissant à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Il reste à la



surface des cellules endothéliales qui le produisent, où il sert de co-stimulateur des neutrophiles adhérant à la paroi endothéliale. Il peut induire la bronchoconstriction, augmenter la perméabilité vasculaire en synergie avec les prostaglandines, diminuer le volume de plasma, activer les plaquettes, diminuer le rythme cardiaque, induire l'infiltration de cellules, occasionner des dégâts vasculaires et une nécrose tissulaire, et entretenir la réaction inflammatoire. Sa durée de vie est très courte mais ses effets biologiques sont prolongés par la production de médiateurs secondaires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) et le PAF lui-même. Il active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire par l'activation des protéines à activité tyrosine kinase ainsi que l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> et, augmente par conséquent, la libération d'acide arachidonique et la synthèse des eicosanoïdes.

### 3.2.2 - L'acide arachidonique et ses dérivés

Au cours des processus inflammatoires, les leucocytes libèrent des médiateurs dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique (AA), acide gras insaturé : les eicosanoïdes. Leur structure générale de base est à 20 atomes de carbone avec 2 chaînes latérales leur donnant une forme en épingle à cheveux. Les eicosanoïdes sont synthétisés dans tous les organes et tous les tissus où ils exercent des fonctions de régulation et des rôles de médiateur dans de nombreux processus (Tableau 3).

<u>Organes</u>	<u>Effets</u>	<u>Eicosanoïdes</u>
Vaisseaux	Vasoconstriction (hypertension) Vasodilatation (hypotension)	PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>4</sub>
Plaquettes	Anti-agrégant Pro-agrégant	PGE, PGI <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub>
Bronches	Bronchoconstriction Bronchodilatation	PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> PGE, PGI <sub>2</sub>
Intestin	Nausées, diarrhées Motilité	PGE, PGF PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>
Estomac	Inhibition de la sécrétion gastrique Motilité	PGE, PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>
Utérus	Contraction	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub>

Rein	Augmentation de la filtration rénale par augmentation du débit sanguin	PGH <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub> , PGI <sub>2</sub>
Hypothalamus et Hypophyse	Augmentation hypothalamique et hypophysaire (ACTH, GHRH)	PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub>

**Tableau 3.** Les effets des eicosanoïdes sur l'organisme  
(ACTH : *adrenocorticotropic hormone*, GHRH : *growth hormone releasing hormone*)

### 3.2.2.1 - Les prostaglandines et les thromboxanes

Les prostaglandines sont d'importants médiateurs de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre. Elles peuvent être synthétisées par la plupart des cellules de l'organisme et agissent en médiateurs lipidiques auto et paracrines. Les deux premières étapes de biosynthèse (Figure 11) sont catalysées par les prostaglandine endoperoxyde H synthases-1 et -2 (PGHS-1 et -2) également appelées cyclooxygénases-1 et -2 (COX-1 et -2). COX-1 est l'isoforme responsable de la synthèse constitutive des prostaglandines (Chandrasekharan et Simmons, 2004), elle est quasiment exprimée dans tous les tissus. Son expression n'est pas affectée par les stimuli inflammatoires (Miyachi *et al.*, 2004; Mohammed *et al.*, 2004). En revanche COX-2, qui est induite par de nombreux stimuli inflammatoires, est absente de la plupart des tissus à l'exception notamment du SNC. Ainsi, pour le traitement des symptômes associés à la douleur et à l'inflammation, les médicaments principalement utilisés sont des inhibiteurs de la COX-2 : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Le thromboxane A<sub>2</sub> (vasoconstriction, bronchoconstriction, agrégation plaquettaire) est synthétisé par la thromboxane synthase à partir de PGH<sub>2</sub>. Le thromboxane B<sub>2</sub>, impliqué également dans l'agrégation plaquettaire, provient de l'hydratation du TXA<sub>2</sub>. Les thromboxanes et les prostaglandines possèdent une durée de vie très courte, de l'ordre de la seconde voire de la minute. Ils doivent donc agir à proximité de leur lieu de synthèse.

### 3.2.2.2 - Les leucotriènes

Les leucotriènes sont des lipides insaturés à trois doubles liaisons. Ils sont synthétisés à partir de l'oxydation, catalysée par la 5-lipoxygénase (5-LO), de l'acide arachidonique, libéré par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), en acide 5-hydroperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE). Dans les cellules au repos, la 5-LO, comme la PLA<sub>2</sub>, est localisée dans le cytoplasme et le noyau.

Lorsque les cellules sont activées pour produire des leucotriènes, la PLA<sub>2</sub> et la 5-LO sont transloquées à proximité de la membrane nucléaire et du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire de la *5-lipoxygenase-activating protein*.

Les leucotriènes sont de puissants médiateurs des réponses inflammatoires. Ils sont impliqués dans la physiopathologie des maladies inflammatoires aiguës et chroniques incluant notamment l'asthme, l'arthrite, le psoriasis et les maladies inflammatoires intestinales (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique). Contrairement aux prostaglandines, la synthèse des leucotriènes est restreinte aux cellules inflammatoires comme les neutrophiles, mastocytes, monocytes / macrophages. Les leucotriènes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub> sont majoritairement synthétisés par les éosinophiles, mastocytes, basophiles et macrophages. Ils sont impliqués dans la réaction anaphylactique grâce à leur capacité à contracter lentement et de façon entretenue les cellules des muscles lisses. Ils sont particulièrement impliqués dans les réactions aiguës de bronchoconstriction, dans la vasodilatation et l'accroissement de la perméabilité vasculaire des veinules post-capillaires. Le LTB<sub>4</sub> est un des agents chimotactiques les plus puissants en particulier pour les neutrophiles, éosinophiles et monocytes. Il stimule la libération d'enzymes, les flux de cations, l'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca<sup>2+</sup> et induit la génération d'anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) par les neutrophiles.

### 3.2.2.3 - Les lipoxines

Contrairement aux dérivés de l'acide arachidonique cités précédemment, les lipoxines possèdent des propriétés anti-inflammatoires dont l'action spécifique porte sur les leucocytes. Une analyse temporelle au cours d'une réaction inflammatoire aiguë montre que la synthèse des lipoxines est décalée dans le temps. Les lipoxines, en particulier le LXA<sub>4</sub>, interagissent de façon autocrine avec leurs récepteurs spécifiques exprimés par les leucocytes. Ils agissent comme de puissants contre-régulateurs des médiateurs inflammatoires lipidiques ou cytokiniens, entraînant ainsi l'inhibition de l'inflammation (Serhan et Chiang, 2002; Nascimento-Silva *et al.*, 2005). Par la suite, les lipoxines sont rapidement converties en composés inactifs par les cellules myéloïdes.

## 4 - Inflammation et système nerveux central

### 4.1 - De l'inflammation systémique à la neuroinflammation

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme un site « immuno-privilégié » échappant à la surveillance du système immunitaire, du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral. Cependant lors de pathologies cérébrales présentant un caractère inflammatoire, les cellules immunocompétentes gagnent l'encéphale et permettent, en coopération avec les cellules du SNC, l'initiation et la propagation de la réaction inflammatoire; on parle alors de neuroinflammation. L'une des lésions cérébrales les plus fréquemment rencontrées est ce que les cliniciens qualifient de « rupture de la BHE ». Elle a pour conséquence une augmentation de la perméabilité de cette barrière, l'apparition d'œdème, l'invasion de cellules immunitaires, l'activation de la glie (notamment la microglie), et l'expression de la plupart des médiateurs immunitaires et inflammatoires classiques (protéines du complément, protéines de la phase aiguë, cytokines).

Une réponse inflammatoire systémique, provoquée par exemple par l'inoculation de parois de bactéries (lipopolysaccharide), se traduit par la production de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF, ...). Ceux-ci vont circuler dans le sang et communiquer avec les neurones sensoriels du nerf vague qui innervent les organes de la cavité abdominale (Konsman *et al.*, 2002). En effet, il existe 4 voies par lesquelles une réponse inflammatoire systémique peut communiquer avec le SNC (Figure 12). La première de ces voies fait intervenir les organes circumventriculaires (région dépourvue de BHE). Les médiateurs pro-inflammatoires diffusent du sang vers le parenchyme cérébral où ils vont pouvoir alors interagir avec les populations macrophagiques (microglie). La seconde voie majeure est le passage au travers de la BHE. Les cytokines activent les cellules endothéliales cérébrales qui vont activer les macrophages périvasculaires qui, à leur tour, vont activer les macrophages présents à l'intérieur du parenchyme cérébral. La troisième voie identifiée fait intervenir les afférences sensorielles du nerf vague qui communique avec les populations neuronales. Finalement, la quatrième et dernière voie correspond à un transport actif des cytokines, via leurs récepteurs, au travers de la BHE.

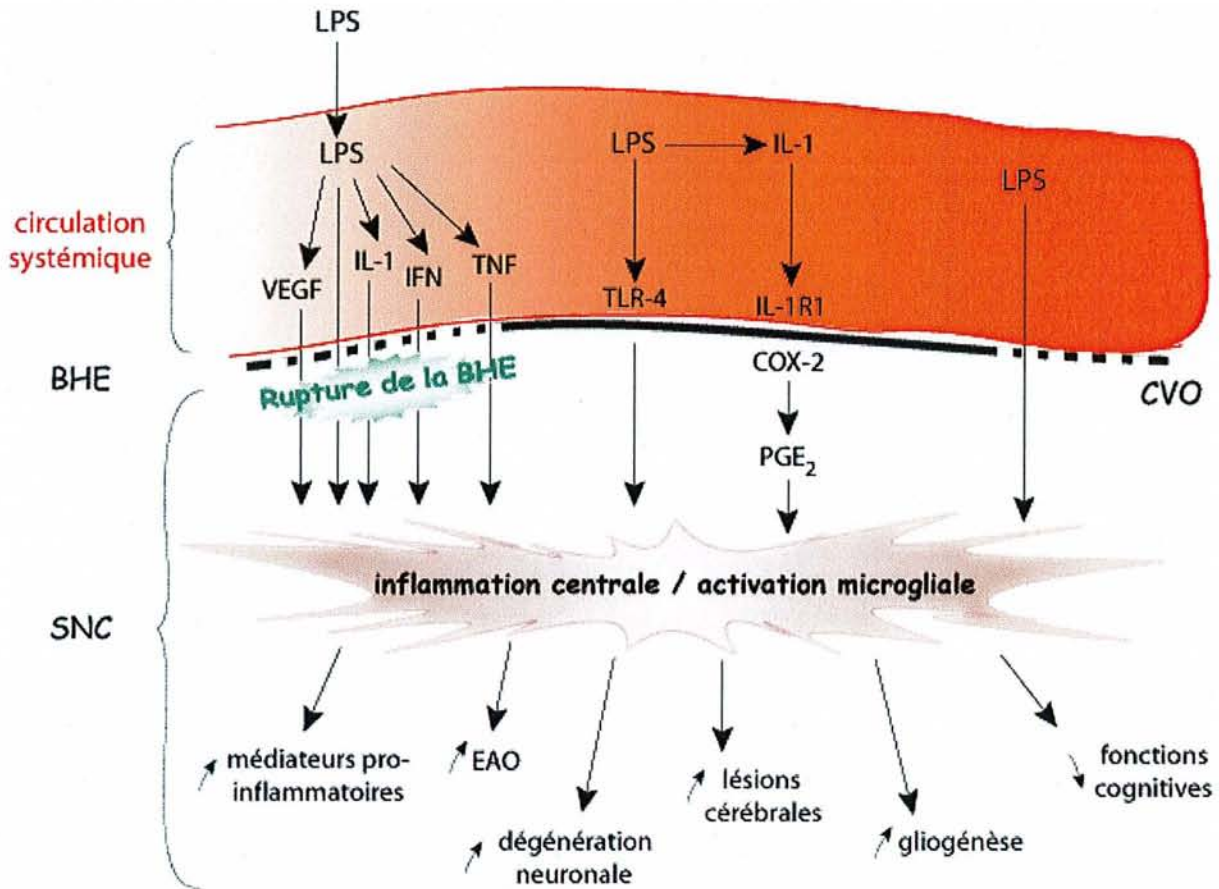


Figure 12. Voies par lesquelles le LPS affecte la structure et les fonctions cérébrales (CVO : organes circumventriculaires ; EAO : espèces activées de l'oxygène ; LPS : lipopolysaccharide ; VEGF : vascular endothelial growth factor)

## 4.2 - Médiateurs impliqués dans la neuroinflammation

### 4.2.1 - Les cytokines

Tous les membres de la famille des interleukines 1 (IL-1) sont exprimés par les cellules cérébrales mais à des taux faibles dans le SNC sain. L'expression d'IL-1, en terme d'ARN messagers et de protéines, est rapidement augmentée lors d'agressions cérébrales comme lors d'ischémie, ou de stimuli neurotoxiques ou inflammatoires (Figure 13). Les premières cellules à exprimer l'IL-1 sont les cellules microgliales mais d'autres cellules comme les astrocytes, les cellules endothéliales et probablement les neurones, peuvent produire de l'IL-1. Cette interleukine pourrait être directement impliquée dans les phénomènes de neurodégénération.

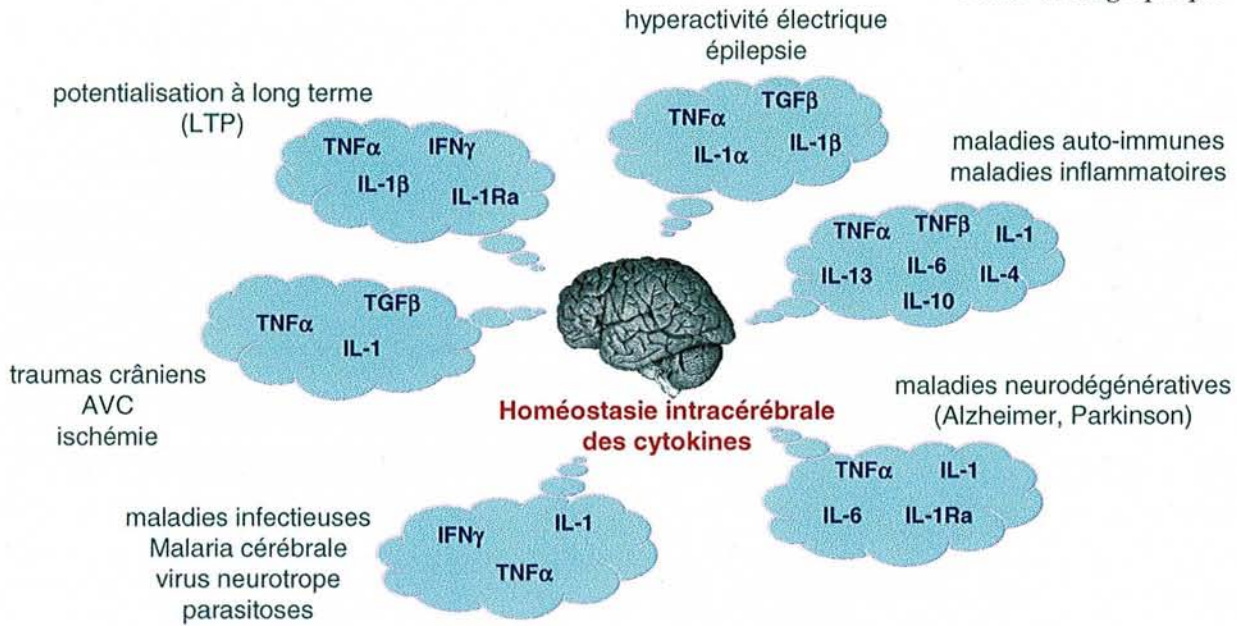


Figure 13. Relations cytokines / pathologies cérébrales

L'expression et la libération de cytokines pro-inflammatoires par la microglie et les astrocytes sont des phénomènes typiques de la neuroinflammation (Stoll *et al.*, 1998; Akiyama *et al.*, 2000; Becher *et al.*, 2000). En plus de l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  sont également présents lors de maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer (Tableau 4) (McGeer et McGeer, 1995; McGeer et McGeer, 2001; Cacquevel *et al.*, 2004), de multiples scléroses, la démence associée au SIDA, les ischémies cérébrales ou encore les traumatismes cérébraux (Minagar *et al.*, 2002).

Microglie	Astrocytes
IL-1	IL-1
IL-6	IL-6
IL-8	IL-8
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$
MIP-1	COX-2
EAO	S100
MHC II	Peptide A $\beta$
Peptide A $\beta$	Protéines du complément
Protéines du complément	Inhibiteurs du complément
Inhibiteurs du complément	

Tableau 4. Produits et molécules secrétés, par la microglie et les astrocytes, en association avec la maladie d'Alzheimer

L'IL-1 $\beta$  est extrêmement lié aux maladies neurodégénératives, cependant des études récentes ont démontré que cette cytokine entraînait une remyélinisation dans le SNC chez l'adulte (Mason *et al.*, 2001).

#### 4.2.2 - Les chémokines

Elles sont libérées par de nombreuses cellules du SNC (microglie, astrocytes, cellules endothéliales, neurones) en réponse à une agression (Cartier *et al.*, 2005). Les chémokines jouent un rôle essentiel au cours de la neuroinflammation en tant que médiateurs de l'infiltration leucocytaire. Leur surexpression a été mise en évidence dans plusieurs pathologies telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et la démence associée au SIDA.

En effet, des analyses immunohistochimiques de tissus cérébraux provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont révélé l'expression du récepteur CXCR2 dans les neurites dystrophiques des plaques séniles (dépôts de peptide  $\beta$ -amyloïde et de dégénérescences neurofibrillaires), ainsi qu'une augmentation de l'expression de CCR-3 et -5 dans les astrocytes et la microglie (Xia et Hyman, 1999). Les processus inflammatoires sont fortement impliqués dans les lésions cérébrales consécutives à un AVC. L'ischémie cérébrale semble induire une augmentation de l'expression de certaines chémokines (IP-10, MCP-1, MCP-3) liées à l'accumulation leucocytaire au niveau des tissus lésés. Il a ainsi été montré une régulation positive du gène codant pour la MCP-3 à la suite de l'occlusion temporaire ou permanente de l'artère cérébrale moyenne (Wang *et al.*, 1999). La démence associée au SIDA fait l'objet de recherches intenses. Les cellules cérébrales généralement infectées par HIV-1 sont des cellules microgliales et des astrocytes. De nombreuses études ont montré que les récepteurs aux chémokines (CXCR4, CCR3, CCR5) sont des co-récepteurs fonctionnels, avec CD4, et permettent à HIV-1 d'entrer dans les cellules cibles et de transmettre un signal délétère (Gabuzda *et al.*, 1998).

#### 4.2.3 - COX-2 et les prostaglandines

Les cyclooxygénases, comme on a pu le voir précédemment (Figure 11), catalysent la synthèse des prostaglandines. Elles sont constituées de 2 isoformes : une isoforme constitutive (COX-1) et une isoforme inductible (COX-2). Cependant dans les reins, la prostate et le cerveau, COX-2 est constitutive. Elle est ainsi exprimée dans des conditions normales et

contribue à des fonctions cérébrales fondamentales comme l'activité synaptique, la consolidation de la mémoire et l'hyperhémie fonctionnelle.

Lors d'états inflammatoires, l'expression de COX-2 est augmentée au niveau des cellules endothéliales, des astrocytes et de la microglie par de nombreux facteurs (facteurs de croissance, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS, esters de phorbol, concentrations élevées en Ca<sup>2+</sup>) ce qui entraîne une élévation des taux cérébraux en PGE<sub>2</sub>. Il est montré que COX-2 est exprimée de manière importante chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Hoozemans *et al.*, 2001). De plus, l'expression de la PLA<sub>2</sub> est également augmentée au cours de pathologies neurodégénératives (Bazan *et al.*, 2002) permettant ainsi d'augmenter le substrat des cyclooxygénases, l'acide arachidonique. Le même constat peut-être fait chez des patients atteints de sclérose amyotrophique latérale (Almer *et al.*, 2001) pour lesquels les taux de COX-2 et de PGE<sub>2</sub> sont fortement élevés. C'est ainsi qu'on a pu voir apparaître sur le marché les anti-inflammatoires non stéroïdiens, dont leur rôle est de bloquer l'inflammation en diminuant au préalable l'activité des cyclooxygénases.

#### 4.2.4 - Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>)

Pour conserver des fonctions cérébrales normales, le métabolisme du NO<sup>•</sup> apparaît nécessaire. La surproduction de NO<sup>•</sup> a été montrée dans de nombreuses pathologies cérébrales comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de nombreuses scléroses (Heales *et al.*, 1997; Heales *et al.*, 1999). La neuroinflammation semble être responsable d'un cycle vicieux dans lequel l'inflammation gliale entraîne la génération de NO<sup>•</sup> (Hunot et Hirsch, 2003). Cette production de NO<sup>•</sup> provoque le relargage d'un neurotransmetteur excitateur, le glutamate, qui entraîne une augmentation des taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires suite à l'activation de récepteurs NMDA (Stewart *et al.*, 2002). Cela aura pour conséquence d'activer les NO synthases qui vont dégrader l'arginine en citrulline et NO<sup>•</sup>. Le monoxyde d'azote, mais également son métabolite toxique, le peroxynitrite, pourront entraîner des dommages à l'ADN (Bentz *et al.*, 2004) ou diminuer l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Bolanos *et al.*, 1997). Il faut également noter que la susceptibilité des cellules cérébrales au NO<sup>•</sup> et au peroxynitrite est dépendante des taux de glutathion réduit (GSH) intracellulaires et des voies de signalisation de résistance au stress oxydant. Les neurones, contrairement aux astrocytes qui possèdent des taux élevés en glutathion intracellulaire, semblent particulièrement vulnérables. Cela expliquerait l'implication du NO<sup>•</sup> dans les nombreux désordres neurologiques.



## D - Le stress oxydant

### 1 - Définition

Le stress oxydant cellulaire est classiquement défini comme étant l'altération de la balance redox intracellulaire en faveur de conditions oxydantes. Cette rupture d'équilibre (Figure 14) peut avoir de multiples origines dont les principaux acteurs sont les espèces activées de l'oxygène (EAO). En effet, l'organisme peut avoir à faire face à une production d'EAO trop forte pour être maîtrisée, observée lors d'intoxication aux métaux lourds, d'irradiation (UV), d'ischémies / reperfusion suivant les thromboses. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou d'une carence en un ou plusieurs des anti-oxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments. Enfin, la mauvaise adaptation peut résulter d'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage soit d'une protéine enzymatiquement anti-oxydante, soit d'une protéine synthétisant ou régénérant un anti-oxydant ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase) ou alors d'un promoteur de ces mêmes gènes que la mutation rendra incapable de réagir à un excès d'EAO. Généralement, le stress oxydant se produit dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance.

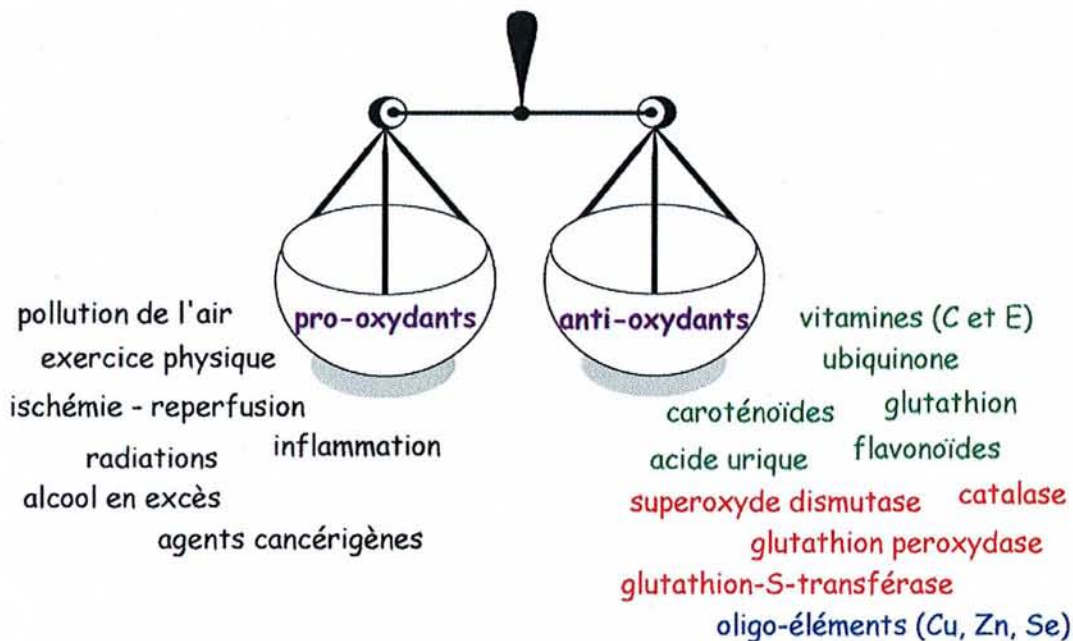


Figure 14. Equilibre entre les EAO et les différents systèmes de détoxification

## 2 - Les acteurs : les espèces activées de l'oxygène

### 2.1 - Définition

Les espèces activées de l'oxygène, ou EAO, dérivent de l'oxygène moléculaire. Ce sont soit des radicaux libres, soit des molécules. Un radical libre est un atome ou une molécule, neutre ou chargé, qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe. Les radicaux libres sont généralement instables et peuvent réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes du fait de leur électron célibataire. Ils peuvent soit arracher un électron (et sont des oxydants) soit en céder un (et sont des réducteurs). Ces réactions radicalaires conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical et le phénomène peut se propager par des réactions en chaîne (Figure 15).

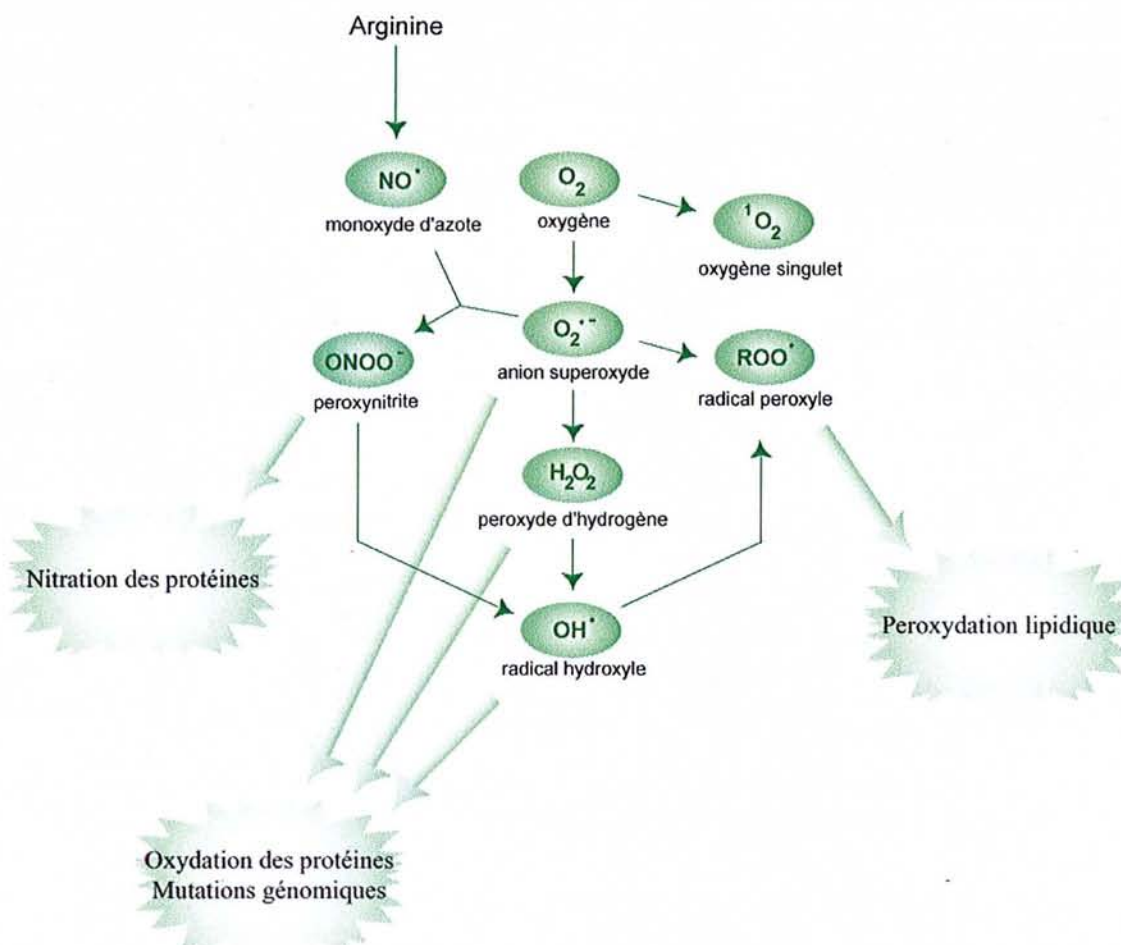
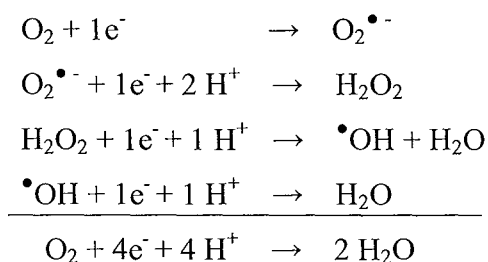


Figure 15. Diversité et réactivité des EAO

## 2.2 - La chimie de l'oxygène

### 2.2.1 - Structure électronique et réduction monoélectronique de l'oxygène

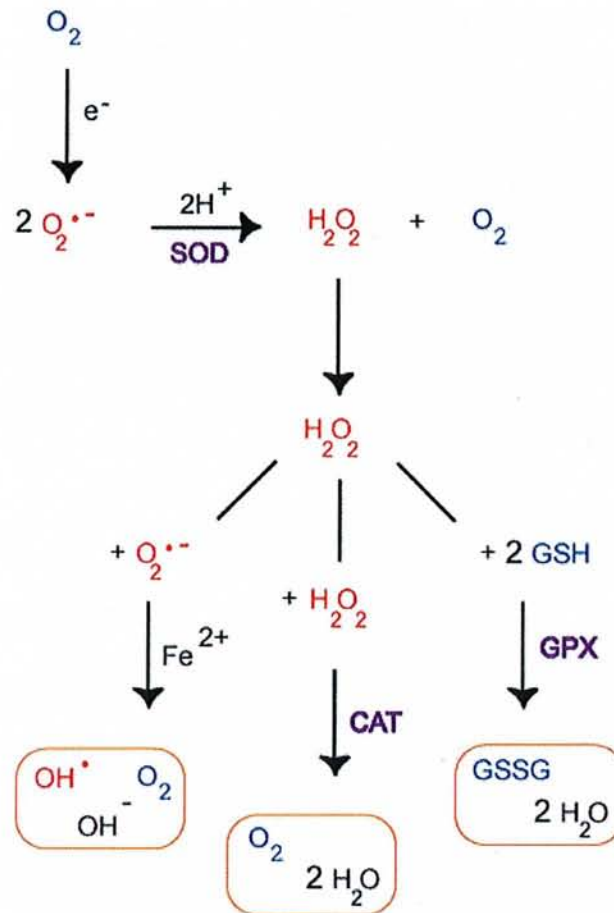
La molécule d'oxygène est un bi-radical. Il possède deux électrons non appariés sur des orbitales externes différentes avec des spins parallèles. L'oxygène cherche à capter des électrons pour réappairier ses électrons célibataires et peut être ainsi un bon agent oxydant. Cependant, selon la mécanique quantique, il ne peut y avoir réaction spontanée de l'oxygène avec les molécules organiques ce qui nous évite ainsi de brûler. De ce fait, l'oxygène moléculaire a une réactivité limitée. En revanche, il a tendance à accepter les électrons un par un. La Figure 16 montre les produits successifs de la réduction monoélectronique de l'oxygène (Calderon et Roberfroid, 1988).



**Figure 16.** Réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire

### 2.2.2 - Les différentes EAO

Dans les conditions quotidiennes normales, des espèces activées de l'oxygène sont produites en permanence en faible quantité (Figure 17). Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau d'EAO présentes.



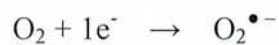
**Figure 17.** Transformation des EAO produites à partir de l'oxygène moléculaire (CAT : catalase, GPX : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, SOD : superoxyde dismutase)

### 2.2.2.1 - L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )

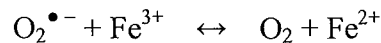
Un gain d'énergie par activation photochimique de l'oxygène entraîne le déplacement d'un des électrons célibataires et donne une forme beaucoup plus réactive appelée oxygène singulet. Cette espèce n'est pas un radical libre mais possède un fort pouvoir oxydant.

### 2.2.2.2 - L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ )

Il provient de la réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire :



Cet anion superoxyde est relativement réactif. Il a cependant une demi-vie très courte ( $10^{-6}$  s) et est peu diffusible. Il est le précurseur d'autres EAO. En solution aqueuse, il peut se comporter comme un réducteur. Il réduit notamment les formes oxydées de divers métaux de transition, le fer en particulier :



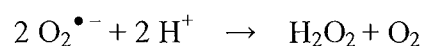
Ce fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) est très dangereux car il intervient dans la réaction de Fenton (décrite par la suite). Cependant, cette réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  par l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  est considérée comme peu importante *in vivo* (Liochev et Fridovich, 1994). Toute réaction engendrée par l'anion superoxyde est en compétition avec la réaction de dismutation de cet anion.

#### 2.2.2.3 - Le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\bullet}$ )

Le radical  $\text{NO}^{\bullet}$  est synthétisé à partir de l'arginine, en présence d'oxygène, par l'action d'au moins trois isoformes de NO synthases (NOS) : la NOS neuronale (nNOS ou NOS I), la NOS inductible (iNOS ou NOS II) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III). Le  $\text{NO}^{\bullet}$ , qui diffuse à travers les membranes, a une demi-vie de l'ordre de la seconde. Il joue le rôle de second messager, comme neurotransmetteur dans les neurones (Jacintho et Kovacic, 2003) ou dans la régulation de la vasodilatation et de l'agrégation plaquettaire (Wallis, 2005). A pH physiologique, il peut réagir avec l'anion superoxyde et former des peroxy-nitrites, composés fortement oxydants pouvant produire des radicaux hydroxyles. Il peut également inactiver diverses enzymes anti-oxydantes, telles que la catalase, la glutathion peroxydase et les superoxyde dismutases (Lawler et Song, 2002).

#### 2.2.2.4 - Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

L'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  peut disparaître par dismutation spontanée ou sous l'action de superoxyde dismutases :



Dans cette réaction, l'un des  $\text{O}_2^{\bullet-}$  est oxydé en  $\text{O}_2$  et l'autre réduit en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le peroxyde d'hydrogène est plus stable que l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ . De par sa diffusion dans les milieux aqueux et

lipidiques, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est une vraie « bombe » mobile. Ce n'est pas un radical mais, par réduction monoélectronique, il donne naissance à un des radicaux les plus réactifs, le radical hydroxyle.

#### 2.2.2.5 - Le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ )

Ce radical a une durée de vie de l'ordre de  $10^{-11}$  s et possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques. Il oxyde pratiquement toutes les macromolécules voisines telles que les acides nucléiques, les protéines, les acides gras polyinsaturés et les glucides.

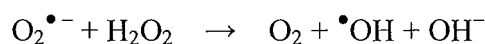
Le radical hydroxyle peut être formé par plusieurs réactions :

- la scission homolytique (par radiolyse, photolyse, ...) de la liaison -O-O- de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  conduit à la formation de 2  $\bullet\text{OH}$ .

- la réaction de Fenton se produit en présence de métaux de transition et en particulier d'ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Le fer étant naturellement présent sous la forme d'ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ), divers réducteurs de  $\text{Fe}^{3+}$  (dont l'anion superoxyde) fournissent les ions  $\text{Fe}^{2+}$ .



- la réaction d'Haber Weiss donne naissance au radical  $\bullet\text{OH}$  en présence d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  et d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (elle se produit en présence de fer comme catalyseur) :



- la réaction entre le monoxyde d'azote produit par certaines cellules (cellules endothéliales, macrophages et cellules nerveuses) et l'anion superoxyde peut être une autre source de production du radical hydroxyle.

#### 2.2.2.6 - Les radicaux alkyles $\text{R}\bullet$ et peroxydes $\text{ROO}\bullet$

A titre d'exemple, les radicaux  $\text{R}\bullet$  et  $\text{ROO}\bullet$  sont générés suite à l'action oxydante de  $\bullet\text{OH}$  sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés (RH).  $\text{R}\bullet$  et  $\text{ROO}\bullet$  sont à l'origine des processus radicalaires en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique.

### 2.3 - Les différentes sources d'EAO

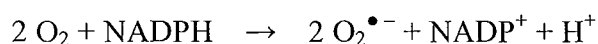
Au sein de la cellule, tous les processus qui utilisent de l'oxygène sont susceptibles de produire des EAO.

### 2.3.1 - Les sources non mitochondriales

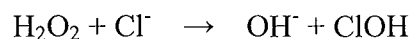
#### 2.3.1.1 - Sources enzymatiques

##### ~ Les NAD(P)H oxydases

Les cellules phagocytaires activées produisent de larges quantités d'anions superoxyde et dérivés via l'isoforme phagocytaire de la NADPH oxydase (Babior, 1999) selon la réaction :



L' $\text{O}_2^{\bullet -}$  est rapidement dismuté en  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui donnera, par la réaction de Fenton, de  $\text{H}^{\bullet}\text{OH}$ . De plus, l'activité de la myéloperoxydase dans les phagocytes catalyse la réaction conduisant à l'acide hypochloreux ( $\text{ClOH}$ ), un puissant agent oxydant antimicrobien :



Dans un contexte inflammatoire, cette production massive d'EAO, consommatrice d'oxygène, est appelée la flambée oxydante ou « *oxidative burst* », et joue un rôle clé dans la défense contre les organismes pathogènes.

Il existe également une NAD(P)H oxydase non phagocytaire (qui utilise le NADPH et le NADH) qui présente un certain nombre de différences par rapport à la NADPH phagocytaire. Elle joue un rôle dans la régulation des voies de signalisation intracellulaire dans plusieurs types de cellules non phagocytaires telles que les cellules du système cardiovasculaire (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, cardiomyocytes) (Griendling *et al.*, 2000).

##### ~ Les oxydases

Les oxydases utilisent l'oxygène moléculaire pour effectuer des réactions cataboliques. La xanthine oxydase (catabolisme des purines) est impliquée dans l'oxydation de la xanthine en acide urique avec production d'anions superoxyde. Le rôle de cette production d'EAO dépendante de la xanthine oxydase a ainsi été démontré dans la physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion mais aussi dans la réponse inflammatoire (Meneshian et Bulkley, 2002). Les monoamines oxydases (MAO) sont impliquées dans le catabolisme des monoamines (dopamine, noradrénaline). Le peroxyde d'hydrogène généré peut pénétrer à l'intérieur de la mitochondrie et causer des dommages par oxydation, notamment de l'ADN mitochondrial (Hauptmann *et al.*, 1996). Il a également été montré que les amines oxydases, en particulier celles localisées au niveau de la membrane plasmique, pouvaient avoir une action insulino-mimétique dans les adipocytes (Fontana *et al.*, 2001).

~ Les cytochromes P450 monooxygénases

Comme on a pu le voir précédemment, les cytochromes P450 sont impliqués dans la détoxification de nombreux composés. Le substrat se fixe sur l'enzyme et est oxydé par fixation d'un groupe hydroxyle. Cependant, la fixation de substrat peu ou pas oxydable (pour des raisons stériques ou chimiques) au cytochrome P450 favorise la production d' $O_2^{\bullet-}$  (Cross et Jones, 1991).

~ Les lipoxygénases / cyclooxygénases

Certaines étapes de la biosynthèse des eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes et leucotriènes), formés par l'action de la lipoxygénase ou de la cyclooxygénase, produisent des radicaux  $ROO^{\bullet}$  et  $^{\bullet}OH$ .

2.3.1.2 - Sources non enzymatiques

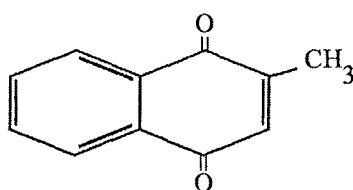
~ Cycle redox de certains xénobiotiques

Le cycle redox de certains xénobiotiques nécessite, dans une première étape, la réduction monoélectronique par une enzyme (NADPH cytochrome P450 réductase dans le réticulum endoplasmique ou NADH déshydrogénase dans la mitochondrie par exemple). La



molécule réduite réagit avec l'oxygène pour redonner la molécule oxydée et de l' $O_2^{\bullet -}$ . Le cycle peut continuer tant qu'il y a de l'oxygène et du NAD(P)H. C'est le cas pour des polluants (paraquat) ou des médicaments (adriamycine, agent anticancéreux).

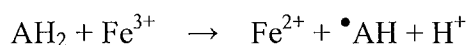
La ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone ou vitamine K3 ; Figure 18) est souvent utilisée comme outil expérimental d'étude du stress oxydant (Livertoux *et al.*, 1996; Chiou et Tzeng, 2000). En effet, la semiquinone, produite par réduction monoélectronique de la ménadione, interagit avec des molécules d'oxygène et engendre la production stoechiométrique d' $O_2^{\bullet -}$ .



**Figure 18.** Structure de la ménadione

~ Oxydo-réduction du fer

Dans l'organisme, le fer existe sous deux formes : le fer héminique et non héminique. Le fer non héminique est présent dans de nombreuses enzymes et correspond aux formes de transport du fer (par la transferrine) et de réserve (par la ferritine). La ferritine maintient le fer sous la forme ferrique  $Fe^{3+}$ . Une production d'anions superoxyde dans l'environnement très proche de la ferritine, peut entraîner la réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  et sa mobilisation, celui-ci permettant la réaction de Fenton (en présence de  $H_2O_2$ ) et donc la production d' $\bullet OH$  (Samokyszyn *et al.*, 1988). Tout comme l' $O_2^{\bullet -}$ , l'acide ascorbique (ou vitamine C réduite,  $AH_2$ ) est capable de réduire le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ .



L'administration de vitamine C chez des patients ayant une surcharge en fer a provoqué de sévères problèmes, certainement dus à la production d' $\bullet OH$  *in vivo*.

### 2.3.2 - Les sources mitochondriales

Une proportion significative d'oxygène (2 à 6%) échappe à la réduction complète en molécule d'eau et subit une réduction monoélectronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Turrens, 1997; Turrens, 2003), ceci donnant naissance à l'anion superoxyde. Sachant que 70 à 80% de l' $O_2^{\bullet-}$  cellulaire est produit au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, cette dernière est donc le site majeur de production d' $O_2^{\bullet-}$  dans la cellule.

La contribution relative des différents complexes de la chaîne respiratoire (Figure 19) à la production totale d' $O_2^{\bullet-}$  mitochondrial dépend fortement du tissu examiné (Kwong et Sohal, 1998). Il a longtemps été considéré que le complexe III était le site prépondérant de génération d'anions superoxyde. En effet, il était proposé que la production d' $O_2^{\bullet-}$  par le complexe I soit équivalente à 50% de celle produite par l'ubisemiquinone (Turrens et Boveris, 1980). Mais ces dernières années, le rôle majeur joué par le complexe I, notamment dans les cellules du cerveau, a été clairement mis en évidence (Barja, 1999; Liu *et al.*, 2002). De plus, le complexe I est le site majeur de production dans plusieurs situations physiopathologiques (vieillesse, maladies neurodégénératives) (Robinson, 1998; Schapira, 1998).

Il a été montré sur mitochondries isolées, et en absence d'ADP, que la production d' $O_2^{\bullet-}$  par la chaîne respiratoire est élevée lorsque le substrat oxydé est le succinate (donneur de  $FADH_2$ , substrat du complexe II). Or cette production d' $O_2^{\bullet-}$ , dépendante du succinate, est bloquée par la roténone (insecticide naturel), révélant ainsi que la production d' $O_2^{\bullet-}$  est due essentiellement au complexe I et non au complexe III (Turrens et Boveris, 1980; Liu *et al.*, 2002). Ces résultats ont également démontré que la production d' $O_2^{\bullet-}$  par le complexe I se faisait majoritairement lors du transfert inverse des électrons du succinate vers le  $NAD^+$ , la production d' $O_2^{\bullet-}$  au cours du transit des électrons du complexe I vers le coenzyme Q jouant un rôle minime. Ce transport inverse des électrons ne se fait qu'en cas de potentiel de membrane élevé. En effet, la production d' $O_2^{\bullet-}$  par le succinate est bloquée par l'addition d'ADP ou de découplant (Liu *et al.*, 2002). Lorsque la chaîne respiratoire fonctionne intensément et que le potentiel de membrane est faible, les électrons ne remontent pas du complexe II au complexe I mais vont dans le sens classique vers le complexe III. Deux théories se confrontent quant au véritable site de production de l' $O_2^{\bullet-}$  au sein du complexe I. Une première hypothèse (Genova *et al.*, 2003) énonce qu'un centre Fe-S, parmi les 7 présents dans le complexe I, serait la source de l'addition directe d'un électron à l'oxygène ou indirecte via la réduction de quinones exogènes hydrophiles. Ces quinones sont alors sous

forme semiquinone instable et peuvent réduire l'oxygène en  $O_2^{\bullet-}$ . D'autres travaux proposent que ce soit le groupement FMN qui soit responsable de la production d'anions superoxyde (Liu *et al.*, 2002).

Plusieurs expériences ont permis de démontrer que le coenzyme Q, sous sa forme ubisemiquinone QH, est responsable de la production d' $O_2^{\bullet-}$  (Turrens *et al.*, 1985).

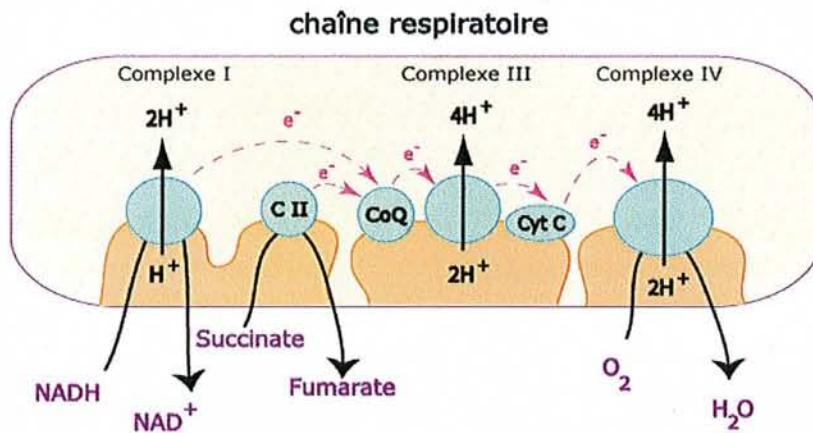
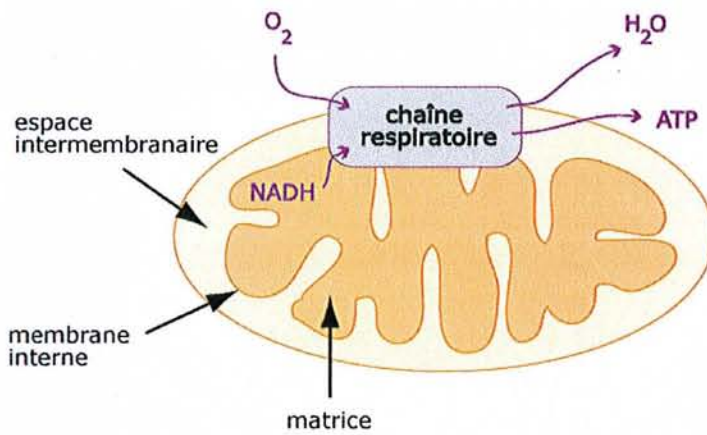


Figure 19. Schématisation de la chaîne respiratoire mitochondriale

### 3 - Les systèmes de défenses anti-oxydantes

Notre organisme a développé des défenses anti-oxydantes pouvant nous protéger contre les effets potentiellement destructeurs des EAO. Ainsi, il existe un équilibre entre la production et l'élimination des EAO.

### 3.1 - Le glutathion : pièce maîtresse de la défense anti-oxydante

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cystéinyl-Glycine). Il joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. C'est un tripeptide ubiquitaire retrouvé chez les mammifères, la plupart des plantes et les microorganismes. Dans les conditions physiologiques, le GSH est maintenu en équilibre dans le cytosol avec sa forme oxydée disulfure (GSSG). Sa concentration cytosolique, de l'ordre du millimolaire, en fait le thiol non-protéique prédominant.

De façon générale, le GSH :

- assure le maintien de l'équilibre redox intracellulaire
- assure le maintien des anti-oxydants non enzymatiques (thiols, vitamines) sous leur forme réduite biologiquement active
- régule l'expression et/ou l'activation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydation et nécessaires au fonctionnement de la réponse anti-oxydante
- exerce un effet cytoprotecteur en neutralisant les métabolites du stress oxydant à l'aide de ses propriétés réductrices
- sert de forme de stockage et de transport permettant l'approvisionnement cellulaire en L-cystéine
- sert de cofacteur à plusieurs enzymes (glyoxylases, formaldéhyde déshydrogénases, ...)
- module des processus neuro-immuno-endocrines, la synthèse d'ADN, le métabolisme des microtubules, la prolifération cellulaire et la réduction des leucotriènes.

Le GSH est synthétisé dans la cellule par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS), dont l'expression est induite lors d'un stress oxydant. L'addition de *N*-acétylcystéine (NAC), un précurseur du glutathion, protège les cellules du stress oxydant en stimulant la synthèse de glutathion (Dringen et Hamprecht, 1999; Dringen, 2000).

### 3.2 - Les autres molécules anti-oxydantes

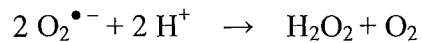
Certains composés anti-oxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), le coenzyme Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Krinsky, 1989). La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est

elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (Packer, 1991). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates (Bors *et al.*, 1990).

### 3.3 - Les principales protéines enzymatiques éliminant les EAO

#### 3.3.1 - Les superoxyde dismutases

Les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène :



Il existe 4 formes différentes de SOD selon la nature du métal cofacteur présent au niveau de leur site réactif : la SOD Cu/Zn, la SOD Mn, la SOD Fe et la SOD Ni.

Chez les mammifères, la SOD Cu/Zn intracellulaire est surtout localisée dans le cytosol. Elle est présente en faible quantité dans les peroxysomes et le noyau. Il existe également une SOD Cu/Zn extracellulaire localisée au niveau des espaces extracellulaires des tissus mais aussi dans le plasma. L'activité de cette SOD Cu/Zn représente 80% de l'activité SOD totale de la cellule. Elle est inhibée par le cyanure. L'activité de la SOD Mn représente 20% de l'activité totale cellulaire. Elle est insensible au cyanure mais est inhibée par le peroxyde nitrite. Cette SOD est localisée essentiellement dans la mitochondrie.

La SOD Fe est présente chez les procaryotes, chez des eucaryotes inférieurs comme les protozoaires et dans les chloroplastes. La SOD Ni, quant à elle, a été découverte dans le cytosol de différentes espèces de *Streptomyces*.

Ces superoxyde dismutases, en éliminant les premières EAO formées ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), représentent la première ligne de défense de la cellule. Les localisations de la SOD Cu/Zn et de la SOD Mn sont complémentaires, ce qui assure la protection de tous les compartiments intracellulaires. L'action des SOD est couplée à celle d'enzymes décomposant le peroxyde d'hydrogène (catalase, glutathion peroxydase).

### 3.3.2 - La catalase

Dans la cellule, la catalase est présente dans les hématies et les peroxysomes. Elle transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau. C'est une enzyme efficace qui est active même lorsque la teneur en  $H_2O_2$  est élevée (Lledias *et al.*, 1998).

### 3.3.3 - La glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases (GPX 1 à 4) sont des enzymes qui décomposent l' $H_2O_2$  et les hydroperoxydes (ROOH) en eau et alcool respectivement et ce en présence de GSH et de sélénium. La GPX1 joue un rôle majeur dans la plupart des tissus et est présente dans le cytosol mais également dans la matrice mitochondriale. L'isoforme GPX2, cytoplasmique, a une expression tissulaire très faible excepté dans le tractus gastro-intestinal. L'isoforme GPX3 est essentiellement présente dans le plasma. La GPX4, appelée aussi hydroperoxyde glutathion peroxydase, exerce son action spécifiquement au niveau des membranes en réduisant les hydroperoxydes du cholestérol et des phospholipides présents dans les membranes.

Le maintien de l'activité de la GPX implique le recyclage du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) par l'activité de la glutathion réductase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Figure 20).

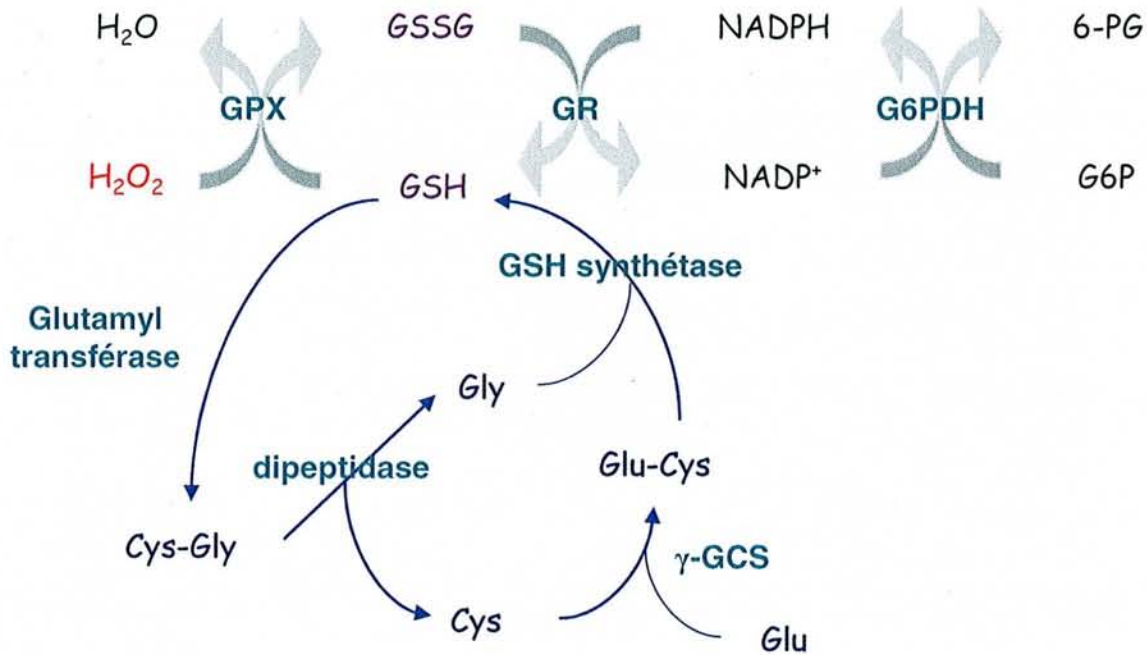


Figure 20. Mécanismes régulant l'homéostasie du glutathion

(6-PG : 6-phosphogluconate, G6P : glucose-6-phosphate, G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, GPX : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, γ-GCS : γ-glutamylcystéine synthétase)

#### 4 - Les EAO : régulation des voies de signalisation et de l'expression génique

Les EAO et l'état redox intracellulaire influencent l'activité de protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires. Certaines d'entre elles sont impliquées dans la régulation du métabolisme : l'aconitase par exemple qui fait partie du cycle de Krebs ou encore la glycogène synthase kinase qui intervient dans le métabolisme du glucose (Nemoto *et al.*, 2000). D'autres protéines appartiennent à des voies de signalisation qui contrôlent les processus de prolifération cellulaire ou de différenciation. Les EAO contrôlent aussi l'activité de certains facteurs de transcription.

La modification d'activité de ces protéines est la conséquence, la plupart du temps, de l'oxydation d'une cystéine critique pour la fonction de la protéine. Le degré de sensibilité des protéines à cette régulation redox dépend de leur structure et de leur aptitude à être modifiées par oxydation.

#### 4.1 - Oxydation des résidus cystéine

Certains acides aminés comme la cystéine sont particulièrement sensibles à l'oxydation via leur groupement thiol. L'oxydation peut se faire directement par les EAO ( $O_2^{\bullet -}$  ou  $H_2O_2$ ) ou par des modifications du potentiel redox d'un couple prépondérant comme celui du glutathion. Un environnement oxydant favorise la formation de ponts disulfures (-S-S-) au niveau des cystéines. De plus, le groupement thiol (-SH) peut être oxydé en groupe sulfénique (-SOH), sulfonique (-SO<sub>2</sub>H) voire sulfonique (-SO<sub>3</sub>H). Sous l'action de réducteurs recyclables (thiorédoxine, glutathion), ces oxydations sont réversibles.

Ces cystéines peuvent se trouver dans des domaines particulièrement importants pour l'activité de la protéine (Morel et Barouki, 1999). Leur oxydation peut donc modifier le comportement de la protéine. Ces cystéines critiques peuvent se situer :

- dans des domaines essentiels pour la conformation tridimensionnelle de la protéine ; l'oxydation anormale peut alors modifier la structure globale et donc la fonction de la protéine;

- dans les domaines catalytiques d'enzymes, l'oxydation peut donc créer un changement d'activité de la protéine ;

- dans le domaine d'interaction d'un facteur de transcription avec sa séquence consensus d'ADN, l'oxydation peut alors modifier sa capacité de liaison à l'ADN ;

- dans des domaines de dimérisation de certains facteurs de transcription, c'est le cas des protéines « à doigt de zinc » (des cystéines participent en effet à la coordination de cations métalliques comme le  $Zn^{2+}$ ). Ainsi, la dimérisation d'un facteur de transcription peut être affectée.

#### 4.2 - Régulation redox des protéines kinases et phosphatases

Les EAO et l'état redox peuvent modifier l'activité de protéines kinases ou phosphatases (Chiarugi et Cirri, 2003). Par exemple, un traitement avec le peroxyde d'hydrogène provoque une augmentation massive de la phosphorylation des résidus tyrosine, et ce sur de nombreuses protéines (Kamata et Hirata, 1999; Allen et Tresini, 2000). La plupart du temps cet effet passe par une inactivation des protéines phosphatases plutôt qu'une activation directe des protéines kinases. En effet, il a été démontré que l' $H_2O_2$  et l' $O_2^{\bullet -}$  sont à l'origine de l'oxydation spécifique (et réversible) d'un résidu cystéine localisé dans le site



catalytique des tyrosine phosphatases les rendant inactives (Denu et Tanner, 1998; Barrett *et al.*, 1999).

Les MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) sont des sérine thréonine kinases qui servent de relais dans la signalisation intracellulaire déclenchée par des facteurs extracellulaires (facteurs de croissance, cytokines inflammatoires, UV, stress oxydant ...), et transmettent les signaux de la membrane plasmique jusqu'au noyau via la phosphorylation de certains facteurs de transcription. Les trois membres de cette famille, ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*), JNK (*cJun N-terminal Kinase*) et p38 MAPK sont phosphorylés et donc activés suite à une administration extracellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce phénomène étant bloqué par un prétraitement avec des anti-oxydants (Guyton *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996). Ce mécanisme est mis en jeu par exemple lors de la régulation redox du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*). Le peroxyde d'hydrogène entraînerait l'activation oxydative de MAPK, qui phosphorylerait cJun ; cette phosphorylation étant nécessaire à l'activité du complexe AP-1 (Schulze-Osthoff *et al.*, 1995).

#### 4.3 - Régulation redox des facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription (NFκB, AP-1, p53, ...) sont régulés par l'état redox de la cellule. Cette régulation redox peut se faire soit directement via l'oxydation de cystéines critiques au sein même du facteur de transcription soit indirectement via la modification oxydative de l'activité de protéines kinases / phosphatases en amont des facteurs de transcription.

L'activation du facteur de transcription NFκB par divers stimuli (UV, LPS ou TNF-α) est bloquée par l'addition d'anti-oxydants, comme la NAC, le PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) ou la vitamine E, mais aussi par la surexpression d'enzymes anti-oxydantes (Meyer *et al.*, 1994; Schulze-Osthoff *et al.*, 1995; Manna *et al.*, 1998). Le peroxyde d'hydrogène, second messenger commun aux divers activateurs de NFκB, stimule la phosphorylation d'IκB (soit via l'inactivation de phosphatases soit via l'activation de kinases (IKK, IκB Kinase) en amont d'IκB). Le peroxyde d'hydrogène, en activant la dégradation d'IκB, entraîne la translocation nucléaire de NFκB et donc son activation. Cependant, un article récent propose que la NAC et le PDTC, bloqueraient l'activation de NFκB par le TNF-α par des propriétés autres que leur activité anti-oxydante (Hayakawa *et al.*, 2003). La NAC empêcherait la liaison du TNF-α à son récepteur tandis que le PDTC inhiberait l'activité

ubiquitine ligase dirigée contre I $\kappa$ B phosphorylée, indépendamment de leur activité anti-oxydante. Cet article remet ainsi en cause les études (nombreuses) démontrant la régulation redox de NF $\kappa$ B.

AP-1 est un dimère composé de deux protooncogènes cFos et cJun. Différents agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, rayonnements UV) activent AP-1 d'au moins deux manières différentes (Schulze-Osthoff *et al.*, 1995) : augmentation des ARNm codant pour cFos et cJun et augmentation de l'activité d'AP-1 par la phosphorylation dépendante de MAPK. Il est à noter que, comme NF $\kappa$ B, activation et liaison à l'ADN sont deux étapes différemment sensibles à l'état redox de la cellule. En effet, cJun possède une cystéine critique dans le domaine de liaison à l'ADN qui doit être sous forme réduite pour permettre l'interaction avec l'ADN.

Ces deux exemples de régulation redox de NF $\kappa$ B et AP-1 montrent que le site subcellulaire de production d'EAO a une importance fondamentale : des taux relativement élevés d'EAO dans le cytoplasme ou dans le noyau ont des répercussions totalement opposées sur l'activité de ces facteurs de transcription. Ainsi, ces régulations sont rapides, réversibles et ne nécessitent pas la synthèse protéique *de novo*. D'après ces caractéristiques, la biologie des EAO pourrait être comparée à celle de l'AMPc, second messenger fondamental dans la cellule.

## 5 - Implications physiopathologiques des EAO

Les EAO et le stress oxydant sont impliqués dans de nombreuses pathologies (cancer, diabète, athérosclérose, maladies neurodégénératives...) (Figure 21). Cependant, on ne sait pas toujours s'ils en sont la cause ou la conséquence. L'importance des EAO et du stress oxydant dans le développement normal et pathologique a été (et est) particulièrement démontrée grâce à la création de souris transgéniques dont les gènes codant pour les enzymes anti-oxydantes ont été invalidés (Wallace, 2001).

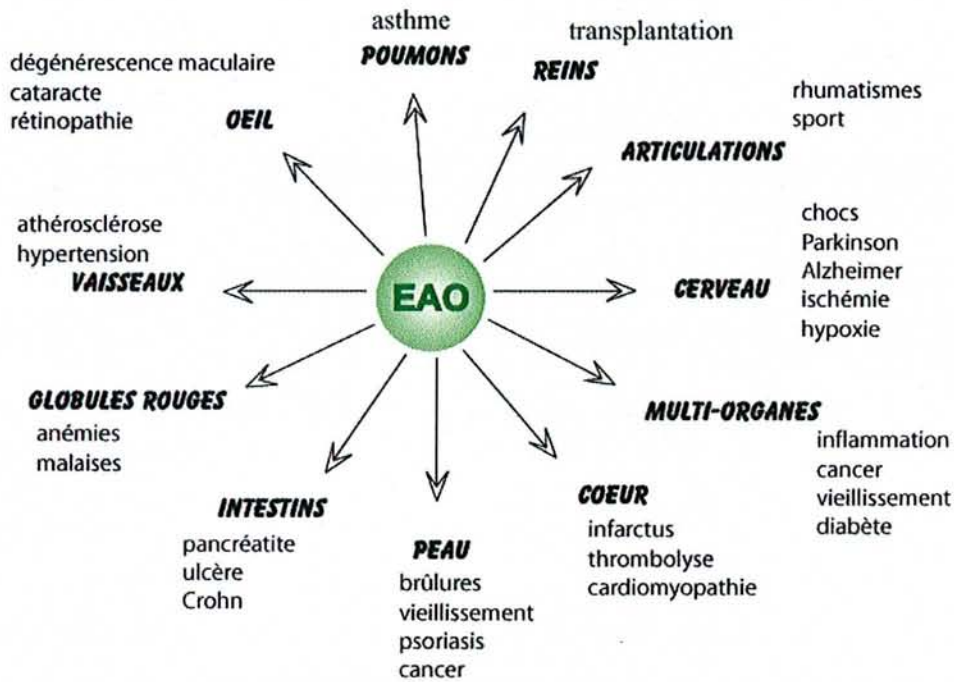


Figure 21. Pathologies associées aux EAO (Favier, 1997)

### 5.1 - Les maladies neurodégénératives

La trisomie 21 (ou syndrome de Down) est la cause la plus fréquente de retard mental et est communément associée au développement de la maladie d'Alzheimer chez l'adulte. Des neurones corticaux fœtaux, issus de sujets atteints de la trisomie 21, montrent des taux d'EAO 3 à 4 fois supérieurs aux cellules cérébrales normales. La dégénération de ces neurones corticaux peut être stoppée par des traitements avec des piègeurs de radicaux libres ou de la catalase (Busciglio et Yankner, 1995). La SOD Cu/Zn présente une expression élevée dans une grande variété de types cellulaires et organes comme les érythrocytes, les plaquettes, les fibroblastes, les lymphocytes et le cerveau de fœtus. Cette augmentation d'expression de la SOD semble être la cause de l'élévation des taux d' $H_2O_2$  et du déplacement de l'équilibre de la balance EAO / systèmes anti-oxydants. Par ailleurs, la transfection stable de cellules, afin de surexprimer la SOD Cu/Zn, accroît la peroxydation lipidique. Les cellules exhibant une augmentation du rapport SOD Cu/Zn / glutathion peroxydase et une augmentation de l'activité catalase présentent des taux intracellulaires élevés de peroxyde d'hydrogène et des aspects typiques de sénescence cellulaire (croissance faible, morphologie altérée) (de Haan *et*

*al.*, 1996). Un phénotype similaire de sénescence est observé chez des enfants atteints du syndrome de Down et sur des cellules directement exposées à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (de Haan *et al.*, 1996; Bladier *et al.*, 1997). Des souris transgéniques SOD Cu/Zn montrent des signes de vieillissement prématuré et un dysfonctionnement neuromusculaire (Avraham *et al.*, 1991). En effet, les jonctions neuromusculaires des muscles des pattes de ces souris présentent des changements pathologiques similaires à ce que l'on rencontre au niveau des muscles de rats et souris âgés et au niveau des muscles de la langue chez des individus atteints du syndrome de Down (Yarom *et al.*, 1986; Yarom *et al.*, 1987).

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif caractérisé par une diminution progressive des fonctions cognitives et une perte neuronale importante. Le cerveau de patients atteints présente de nombreuses plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Il a été montré, dans le liquide cébrospinal de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, que la production d'EAO dans le cerveau pouvait entraîner une augmentation d'un produit de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Cecchi *et al.*, 2002) et entraîner des modifications de la protéine amyloïde  $\beta$  (Multhaup *et al.*, 1997).

La sclérose amyotrophique latérale est une maladie neurodégénérative qui affecte essentiellement les neurones moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral. Approximativement 10% des cas sont liés à une transmission héréditaire. 1/5<sup>e</sup> des familles touchées par cette pathologie présente des mutations du gène codant pour la SOD Cu/Zn, suggérant ainsi l'implication des EAO dans cette maladie neurodégénérative (Stathopoulos *et al.*, 2003). Plusieurs lignées de souris transgéniques, portant une mutation sur le gène de la SOD, ont développé des phénotypes pathologiques et cliniques identiques à ceux rencontrés chez les patients atteints par la sclérose amyotrophique latérale (Tu *et al.*, 1997). La mutation du gène de la SOD Cu/Zn entraîne une mort neuronale par apoptose par l'activation des caspases 1 et 3 (Pasinelli *et al.*, 2000).

## 5.2 - La théorie du vieillissement

Selon la théorie de Harman (1956), les dommages oxydatifs causés par les EAO seraient la cause majeure du vieillissement. Ceci est basé sur de nombreuses observations expérimentales et cliniques, y compris le fait que plusieurs maladies liées au vieillissement sont le résultat de lésions oxydatives aux macromolécules. Il y aurait une corrélation inverse entre la durée de vie et les dommages oxydatifs. Comme la mitochondrie est le site majeur de

la production d'EAO intracellulaires, elle est fortement impliquée dans le vieillissement (Sastre *et al.*, 2003). Le nématode *C. elegans* est un modèle de choix pour étudier les mécanismes moléculaires du vieillissement. Plusieurs mutants ayant une durée de vie augmentée ont été isolés et caractérisés. Des diminutions de la production d'EAO ou des augmentations des systèmes anti-oxydants semblent être un des dénominateurs communs de ces mutants. En effet, les mutants perte de fonction *daf-2* (*daf-2* code pour le récepteur insuline/IGF) vivent deux fois plus longtemps que les vers sauvages (Kenyon *et al.*, 1993) et ceci grâce à une augmentation de SOD2 (Honda et Honda, 1999). De plus, les mutants perte de fonction *isp-1* (ISP, composant du complexe III de la chaîne respiratoire) ont également un vieillissement ralenti et une durée de vie augmentée (Feng *et al.*, 2001) ceci étant dû à une faible production d'EAO mitochondriales. Par ailleurs, les composés ayant des activités « SOD et catalase like » augmentent la durée de vie des vers sauvages de 44% (Melov *et al.*, 2000).

Sachant que le taux de production d'EAO mitochondriales dépend en partie de la disponibilité de substrats énergétiques et de la quantité d'équivalents réducteurs NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>, la restriction calorique a été fortement étudiée comme stratégie pour augmenter la durée de vie (Hekimi et Guarente, 2003; Lin *et al.*, 2004).

### Chapitre III - Objectifs du travail

Différents systèmes enzymatiques interviennent dans le métabolisme basal de l'organisme. Cependant, au cours du vieillissement ou de réactions inflammatoires, ce métabolisme est susceptible de varier. On note ainsi l'altération des fonctions sensorielles comme le goût et des fonctions cérébrales chez les personnes âgées, et une sensibilité accrue lors d'une exposition à des toxines.

Le cerveau est un important consommateur d'oxygène, et contient beaucoup de substrats facilement oxydables, ce qui en fait une cible privilégiée des réactions radicalaires agressives. Ainsi un stress oxydant important peut se produire. Il peut altérer la structure et la fonction cérébrale, entraînant des perturbations neurologiques, et très probablement des modifications du métabolisme cérébral des médicaments. De plus, des stimuli pro-inflammatoires peuvent interférer dans le métabolisme cellulaire en modifiant notamment l'efficacité de systèmes de transport (Kielian et Esen, 2004) ou les activités d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques comme notamment les cytochromes P450 (Kelicen et Tindberg, 2004). La capacité du cerveau à métaboliser les médicaments a été clairement démontrée, et des modifications importantes de l'activité des enzymes impliquées peuvent avoir des répercussions sur la pharmacocinétique et l'activité thérapeutique de ces molécules.

C'est pourquoi, la connaissance du métabolisme cérébral des xénobiotiques et des mécanismes qui le contrôlent est indispensable pour pouvoir intervenir efficacement lors d'intoxication par des xénobiotiques responsables de stress oxydant, ou encore lors d'épisodes inflammatoires.

Nous nous sommes donc proposés dans ce travail de mettre au point deux modèles d'étude mimant des conditions inflammatoires ou encore de vieillissement, afin d'examiner les modifications engendrées sur la glucuroconjugaison (voie de métabolisme majeure chez l'Homme et les animaux) :

- un modèle *in vitro* de stress oxydant cérébral modéré faisant intervenir une molécule génératrice de radicaux libres, la ménadione, sur des cultures primaires d'astrocytes de rats nouveaux-nés. Après avoir confirmé la production d'EAO et la présence d'un stress oxydant, nous avons évalué les conséquences d'un tel traitement sur les activités enzymatiques de glucuroconjugaison et sur l'expression de deux membres de la famille des

UGT : l'UGT1A6 et l'UGT2B1. Cette première étude a fait l'objet d'une publication (Heurtaux *et al.*, 2004).

- un modèle *in vitro* d'inflammation cérébrale par l'utilisation de molécules pro-inflammatoires (LPS, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) sur des cultures primaires d'astrocytes de rats nouveaux-nés. Nous avons alors évalué les modifications engendrées par ces traitements pro-inflammatoires sur la glucuronoconjugaison (activités, expression). Cette étude fait actuellement l'objet d'un deuxième article (soumis pour publication). Parallèlement à cette étude *in vitro*, nous avons essayé de voir si les modifications observées étaient vérifiables chez l'animal. Pour se faire, nous avons établi un modèle d'inflammation *in vivo* chez le rat en administrant une dose de LPS par voie intrapéritonéale. La glucuronoconjugaison est ensuite estimée au niveau de différentes zones cérébrales : les bulbes olfactifs, le cervelet, le tronc cérébral, le cortex, l'hypothalamus + le thalamus, le striatum, l'hippocampe et le mésencéphale.

## Chapitre IV - Matériels et méthodes

### A - Etudes *in vitro*

#### 1 - Cellules

##### 1.1 - Cultures primaires

Les cellules utilisées sont issues de rats Wistar (Laboratoires Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France) nouveaux-nés. Les cultures primaires d'astrocytes sont préparées comme décrit dans la littérature (Booher et Sensenbrenner, 1972). Les rats nouveaux-nés sont sacrifiés par décapitation 1 jour après la naissance. Le cerveau est rapidement prélevé en conditions stériles et plongé dans du milieu de culture DMEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) additionné de SVF (10%), de pénicilline (100 unités/ml), de streptomycine (0,1 mg/ml) et de glutamine (2 mM). Les méninges sont soigneusement enlevées. Les cellules sont dissociées mécaniquement par passages lents et successifs à travers une aiguille hypodermique (21G ; 0,8 × 25 mm) dans 10 à 20 ml de milieu de culture. Elles sont ensuiteensemencées dans des boîtes de Pétri et mises à incuber à 37°C, en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine.

##### 1.2 - Lignées V79-1A6 et V79-2B1

Les lignées cellulaires V79 (fibroblastes de poumon de hamster chinois), transfectées de manière stable par l'isoforme UGT1A6 et l'isoforme UGT2B1 de rat, ont été établies dans notre laboratoire (Fournel-Gigleux *et al.*, 1991; Pritchard *et al.*, 1994). Les cellules recombinantes sont cultivées en monocouche dans du milieu DMEM complet supplémenté par 5% (V79-2B1) ou 8% (V79-1A6) de Nu-Sérum<sup>®</sup>, des antibiotiques (0,1 mg/ml de streptomycine et 100 unités/ml de pénicilline), 2 mM de glutamine et 1 mM de pyruvate de sodium. L'expression des UGT recombinantes est augmentée par traitement des cellules pendant 24 heures avec 2 mM d'acide *n*-butyrique avant traitement et récolte.



## 2 - Caractérisation de la culture d'astrocytes

Les cultures sont caractérisées par détection de l'expression de la *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), marqueur spécifique des astrocytes, par immunocytochimie comme suit. La culture est faite en plaques 24 puits, sur des lamelles préalablement stérilisées, à raison de 30 000 cellules par puits dans 1 ml de milieu. La confluence est atteinte 2-3 jours plus tard. Les lamelles sont alors rincées une fois dans du DMEM puis deux fois dans du PBS (Invitrogen) à température ambiante. Les cellules sont fixées pendant 15 min avec du paraformaldéhyde 4% (p/v) préparé dans du PBS, puis rincées dans du PBS (3 × 10 min). Les cellules sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit avec 100 µl de premier anticorps anti-GFAP (*polyclonal Rabbit anti-GFAP*, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) préparé dans du PBSTB (Triton X100 0,05% ; BSA 3% dans du PBS, p/v) dilué au 1/100<sup>e</sup>. Les cellules sont rincées 2 fois dans du PBS pendant 10 min puis incubées à température ambiante avec 100 µl de 2<sup>e</sup> anticorps couplé au FITC (*Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)* ; ZYMED, CliniSciences, Montrouge, France) préparé dans du PBSB (BSA 3% dans du PBS, p/v) et dilué au 1/100<sup>e</sup>. L'incubation est maintenue pendant 1h30 à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées deux fois pendant 10 min dans du PBS additionné de 0,05% de Tween 20 (v/v), puis lavées 10 min dans du PBS et dans de l'eau. Les noyaux sont contre-colorés à l'iodure de propidium (4 µM), dilué dans du PBS, pendant 30 min. Les lamelles sont lavées au PBS avant d'être montées sur des lames avec du liquide de montage. La fluorescence est observée à 580 nm.

## 3 - Traitements

### 3.1 - Modèle de stress oxydant

#### 3.1.1 - Principe

Ce modèle consiste à traiter nos cellules par de la ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone ou vitamine K3 ; Sigma). La réduction monoélectronique de la ménadione produit une semiquinone, qui va interagir avec des molécules d'oxygène et engendrer la production de radical superoxyde (Livertoux *et al.*, 1996).

### 3.1.2 - Réalisation

Les trois types cellulaires sont cultivés jusqu'à confluence dans des boîtes de 10 cm. Elles sont incubées avec de la ménadione dissoute dans du DMSO (0,1% final). La ménadione est préparée dans du PBS à différentes concentrations (5, 20 et 80  $\mu\text{M}$ ), et les cellules sont incubées pendant différents temps (15 min, 1h et 4h). Les témoins de l'expérience correspondent à des cellules ne recevant que 0,1% de DMSO.

### 3.1.3 - Autres traitements

#### 3.1.3.1 - Traitements pro-oxydants

Ce modèle à la ménadione a été comparé à un autre modèle pro-oxydant au peroxyde d'hydrogène. Nos cellules sont ainsi traitées par 50  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Carlo Erba, Val de Reuil, France) pendant 15 min afin de vérifier l'action de cette EAO sur la glucuronoconjugaison. De plus, afin d'évaluer l'importance du glutathion intracellulaire, les cellules sont prétraitées pendant 24h par 20  $\mu\text{M}$  de L-buthionine [S,R] sulfoximine (BSO, Sigma), qui est un inhibiteur d'une enzyme clé de la synthèse du glutathion, la gamma-glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS). La BSO permet ainsi de diminuer les défenses anti-oxydantes cellulaires.

#### 3.1.3.2 - Traitements anti-oxydants

Afin d'étudier le rôle et la nature des EAO dans ce modèle, nous avons évalué la glucuronoconjugaison suite à différents traitements anti-oxydants.

Deux traitements ont ainsi été réalisés. Le premier consiste à prétraiter nos cellules pendant 15 min par 500  $\mu\text{M}$  de *N*-acétyl-L-cystéine (NAC, Sigma) préparée dans du PBS. La NAC est un précurseur de la synthèse du glutathion et augmente, par conséquent, les capacités de défense anti-oxydante. Le second est un co-traitement ménadione / superoxyde dismutase (SOD, Sigma). La SOD est une enzyme capable de transformer les anions superoxyde en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ainsi, les cellules sont co-traitées par 30  $\mu\text{g/ml}$  de SOD et 5  $\mu\text{M}$  de ménadione pendant 15 min.

## 3.2 - Modèle d'inflammation

### 3.2.1 - Principe

Les trois types cellulaires (astrocytes, V79-1A6 et 2B1) sont soumis à un traitement au lipopolysaccharide (LPS ; E.Coli, 0111:B4 ; Sigma). Le LPS, souvent utilisé pour mimer des conditions inflammatoires, est un constituant majeur de la paroi de la plupart des bactéries gram (-). Les conséquences sur la glucuronoconjugaison de 2 cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  (Interleukine-1 $\beta$ , Sigma) et le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor- $\alpha$* , R&D systems, Lille, France), sont également évaluées au niveau astrocytaire.

### 3.2.2 - Réalisation

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 10 cm. Elles sont incubées avec du LPS, de l'IL-1 $\beta$  ou du TNF- $\alpha$ , tous solubilisés dans du PBS et ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont ainsi mises en contact pendant 12, 24 et 48h avec 0,1, 1 et 10  $\mu$ g/ml de LPS ou 10 ng/ml d'IL-1 $\beta$  ou de TNF- $\alpha$ .

### 3.2.3 - Co-traitements

Dans le cadre de l'étude du mécanisme d'induction de l'UGT1A6 par le LPS, les cellules sont co-traitées par un anti-inflammatoire stéroïdien, la dexaméthasone (10  $\mu$ M, Sigma) ou non-stéroïdien, le NS398 (100 nM, Sigma). De plus, pour étudier le rôle de l'oxyde nitrique (NO) dans la modulation de la glucuronoconjugaison, les cellules sont co-traitées par 1 mM de L-NAME (*N(O)-nitro-L-arginine methyl ester*, Sigma) ou de L-NMMA (*N(G)-monomethyl-L-arginine acetate salt*, Sigma) qui sont des inhibiteurs de la NO synthase. Pour déterminer la nature des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinase* ; MAPK) impliquées dans la voie de transduction du signal conduisant à l'induction de l'UGT1A6 par le LPS, les cellules sont co-traitées par différents inhibiteurs de MAPK (Calbiochem, Nottingham, Angleterre) : le SB203580 (10  $\mu$ M), inhibiteur de la p38 MAPK, et le PD98059 (30  $\mu$ M), inhibiteur de ERK (*Extracellular signal-regulated protein kinase*).

Enfin, nous avons vérifié si l'induction de l'isoforme UGT1A6 par le LPS était due à une régulation transcriptionnelle ou traductionnelle. Pour cela, les cellules sont prétraitées pendant

4h par 3  $\mu$ M d'actinomycine D, bloquant ainsi la synthèse d'ARNm et permettant de vérifier s'il y avait ou non une stabilisation de ces ARNm, ou par 30  $\mu$ M de cycloheximide qui bloque la traduction.

#### **4 - Evaluation de la toxicité des traitements**

##### 4.1 - Principe

La toxicité des traitements est évaluée par le test au MTT qui repose sur une différence d'activité cellulaire entre des cellules saines et des cellules traitées. En effet, les cellules saines présentent une activité optimale des déshydrogénases mitochondriales, contrairement à des cellules ayant subi divers traitements toxiques. La réduction de sels de tétrazolium en cristaux de formazan représente un indicateur de la viabilité cellulaire. En ajoutant sur les cellules le substrat soluble jaune pâle MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma), celui-ci pénètre à l'intérieur des cellules avant d'être converti, par les déshydrogénases présentes, en produit insoluble pourpre (cristaux de formazan), absorbant à 540 nm. Cette coloration pourpre est proportionnelle à l'activité des déshydrogénases mitochondriales et en conséquence à la viabilité cellulaire.

##### 4.2 - Réalisation

La solution de MTT (5 mg/ml) est diluée dans du PBS avant d'être filtrée stérilement. Le test est réalisé sur des cellulesensemencées en plaque 24 puits. Au terme des traitements dans 1 ml de milieu de culture, les cellules sont incubées en ajoutant directement 100  $\mu$ l de la solution de MTT dans chaque puits pendant 3h à 37°C. Le milieu est éliminé en renversant délicatement les plaques de culture sur du papier absorbant. Les cellules sont ensuite lysées pendant 1h à 37°C avec 100  $\mu$ l de DMSO pur afin de solubiliser les cristaux de formazan formés. Les lysats sont récupérés et placés dans une plaque 96 puits. L'absorbance est lue à 540 nm sur un lecteur de microplaque.

#### **5 - Etude des marqueurs du stress oxydant**

##### 5.1 - Principe

Dans notre modèle de stress oxydant induit par la ménadione, il nous a été nécessaire de caractériser ce modèle en évaluant la production d'EAO. De plus, les conséquences de cette production d'EAO sont évaluées en mesurant les taux de glutathion intracellulaire ainsi que les taux de groupes carbonyles formés.

### 5.2 - Dosage colorimétrique du taux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire

La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit lors du traitement des astrocytes par la ménadione est déterminée selon la méthode de Wolff (Jiang *et al.*, 1991).

Après deux rinçages au PBS, les cellules sont grattées puis lysées dans de l'eau par 3 congélations / décongélations successives. Le dosage est réalisé avec 50 µl de lysat cellulaire auxquels sont ajoutés 950 µl de réactif FOX-1 contenant 100 µM de xylénol orange (Sigma), 250 µM de sulfate ferreux d'ammonium, 100 mM de sorbitol et 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'incubation est maintenue pendant 30 min à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 1 min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 560 nm. La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contenue dans l'échantillon, déduite d'une courbe étalon, est exprimée en nmol.mg<sup>-1</sup> de protéines.

### 5.3 - Mise en évidence d'EAO intracellulaires

La dihydrorhodamine 123 (Sigma) ou DHR123 est une substance incolore, capable de pénétrer dans les cellules. Elle est oxydée par les EAO produisant ainsi la rhodamine 123, qui émet une fluorescence à 530 nm lorsqu'elle est excitée à 488 nm (Newton et Vaddi, 1997). Les cellules sont rincées deux fois par du PBS et sont ensuite incubées avec la DHR123 (5 µM) en présence ou non de ménadione (5 et 20 µM) pendant 15 min à 37°C. La fluorescence est alors observée sous microscope à 530 nm.

### 5.4 - Mesure des EAO intracellulaires produites

Les cellules,ensemencées en plaque 6 puits, sont co-incubées pendant 15 min avec la DHR123 (5 µM) et le traitement correspondant (ménadione ou LPS). Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS avant d'être lysées avec 1 ml de tampon Tris-HCl (10 mM) / Tween 20 (0,5%), pH 7,4, pendant 10 min. Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 10 000 g. Le surnageant est prélevé et dosé à 535 nm après excitation à 500 nm. La mesure est rapportée à

la quantité protéique de chaque échantillon et est exprimée en intensité de fluorescence par mg de protéines.

### 5.5 - Mesure des taux de glutathion

Les taux de glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) sont déterminés comme décrit dans la littérature (Baker *et al.*, 1990). Les cellules sont cultivées en boîte de culture de 10 cm. Après traitement, les cellules sont grattées dans 1 ml de tampon phosphate (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). L'ajout d'un volume égal de TCA (5%) permet de précipiter les protéines. L'ensemble est centrifugé à 2 600 g pendant 5 min. Un aliquot de 130 µl de surnageant est neutralisé par 55 µl d'un tampon Hépès (20 mM) contenant 0,3 M de KOH. Ensuite, 50 µl de cet extrait neutralisé sont additionnés de 100 µl de tampon phosphate comprenant 225 µM de DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque, Sigma), 300 µM de NADPH (Sigma) et 23 unités de glutathion réductase (Sigma). La glutathion réductase va permettre de réduire le GSSG en GSH. L'analyse spectrophotométrique à 405 nm de ce mélange va déterminer le taux de glutathion total (GSx) de l'échantillon. Afin de mesurer le taux de glutathion réduit, 50 µl de l'extrait neutralisé initialement sont additionnés de 100 µl de tampon phosphate comprenant 225 µM de DTNB et 300 µM NADPH mais sans glutathion réductase. Les taux de glutathion oxydé sont calculés comme suit :  $2GSSG = GSx - GSH$ . Les taux de glutathion sont évalués par l'intermédiaire d'une gamme d'étalonnage de GSH (Sigma) de 0 à 20 nmoles.

### 5.6 - Mesure des taux de carbonyles

Les groupements carbonyles représentent un marqueur de l'oxydation des protéines. Cette méthode de dosage spectrophotométrique fait intervenir la 2,4 - dinitrophénylhydrazine (2,4 - DNPH) (Levine *et al.*, 1990). Le dosage est basé sur la détection de complexes hydrazones formés par la fixation de la DNPH sur les carbonyles. Les cellules sont cultivées en boîtes de 10 cm. Après traitement, les cellules sont grattées dans 1 ml de PBS. L'homogénat cellulaire est ensuite additionné de 4 ml d'une solution de DNPH (10 mM) solubilisé dans de l'HCl (2 M). L'incubation est maintenue pendant 1h à l'obscurité en agitant toutes les 10 min. Un volume identique de TCA (20%, p/v) est ajouté, puis les échantillons sont placés dans la glace pendant 10 min avant d'être centrifugés à 11 000 g pendant 3 min. Les culots sont lavés à 5 reprises par 1,5 ml d'une solution éthanol - acétate d'éthyle (1:1, v/v)

afin d'éliminer le DNPH n'ayant pas réagi ainsi que le TCA résiduel. Les échantillons sont alors centrifugés à 11 000 g pendant 3 min. Le surnageant est éliminé, et le culot est repris dans 0,6 ml de guanidine (Sigma) à 37°C pendant 15 min sous agitation. Le contenu en carbonyles est mesuré au maximum d'absorbance à 360 nm en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 22 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en nmoles de carbonyles par mg de protéines.

## **6 - Etude de médiateurs pro-inflammatoires**

### 6.1 - Principe

Dans notre modèle d'inflammation cérébrale induite par des traitements au LPS, nous avons évalué la production de deux médiateurs pro-inflammatoires : la production de nitrite, qui est un métabolite stable du NO provenant de la dégradation de l'arginine par une NO synthase en NO et citrulline, ainsi que la production de prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), produits de la dégradation de phospholipides par des cyclooxygénases. Ces deux médiateurs pro-inflammatoires sont relargués dans le milieu de culture par les cellules.

### 6.2 - Dosage des nitrites

Les concentrations en nitrites sont déterminées selon la méthode de Griess (décrite par Kiemer et Vollmar, 1997). Les cellules sont cultivées en plaque 24 puits. Après traitement, 100 µl du milieu de culture sont prélevés et additionnés de 100 µl d'une solution C. Cette solution C est un mélange, à volume égal, d'une solution A composée de 0,1% de dichlorhydrate de naphthyléthylène diamine dilué dans de l'eau et d'une solution B comprenant 1% de sulfanilamide (v/v) dans de l'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 5%. Les échantillons sont ensuite placés dans une plaque 96 puits et l'absorbance est lue à 550 nm. La concentration des échantillons, rapportée à la concentration protéique de l'échantillon, est déterminée par l'intermédiaire d'une gamme d'étalonnage de nitrites de 0 à 50 µM. Les résultats sont exprimés en µM par mg de protéines.

### 6.3 - Dosage des PGE<sub>2</sub>

La production de PGE<sub>2</sub>, par les cellules en plaque 24 puits, est mesurée dans le milieu de culture par l'intermédiaire d'un kit EIA (*Enzyme immunoassay*, Assay Designs, Mundolsheim, France). Ce test se fait en plaque 96 puits. 50 µl d'échantillons additionnés de 50 µl de « *PGE enzyme conjugate* » sont déposés par puits. La plaque est recouverte d'un film et mise à incuber, pendant 1h à température ambiante, sous agitation en évitant tout courant d'air et fluctuations de température. Après incubation, le contenu est enlevé et la plaque est égouttée en tapant contre un tissu sec et propre. Chaque puits est rincé 4 fois avec 300 µl de solution de lavage puis 150 µl de substrat sont ajoutés par puits. La plaque est homogénéisée et incubée 30 min à température ambiante. Après incubation, la réaction est arrêtée par 50 µl de solution stop. L'absorbance est mesurée à 650 nm et rapportée à une gamme étalon de PGE<sub>2</sub> (0 à 5 ng/ml). Les résultats sont exprimés en ng de PGE<sub>2</sub> par ml.

## 7 - Préparations des fractions membranaires

### 7.1 - Principe

L'UGT est localisée dans les membranes du réticulum endoplasmique. L'étude de la glucuronoconjugaison est donc réalisée sur des microsomes préparés par centrifugations différentielles (Walther *et al.*, 1987) (Figure 22).



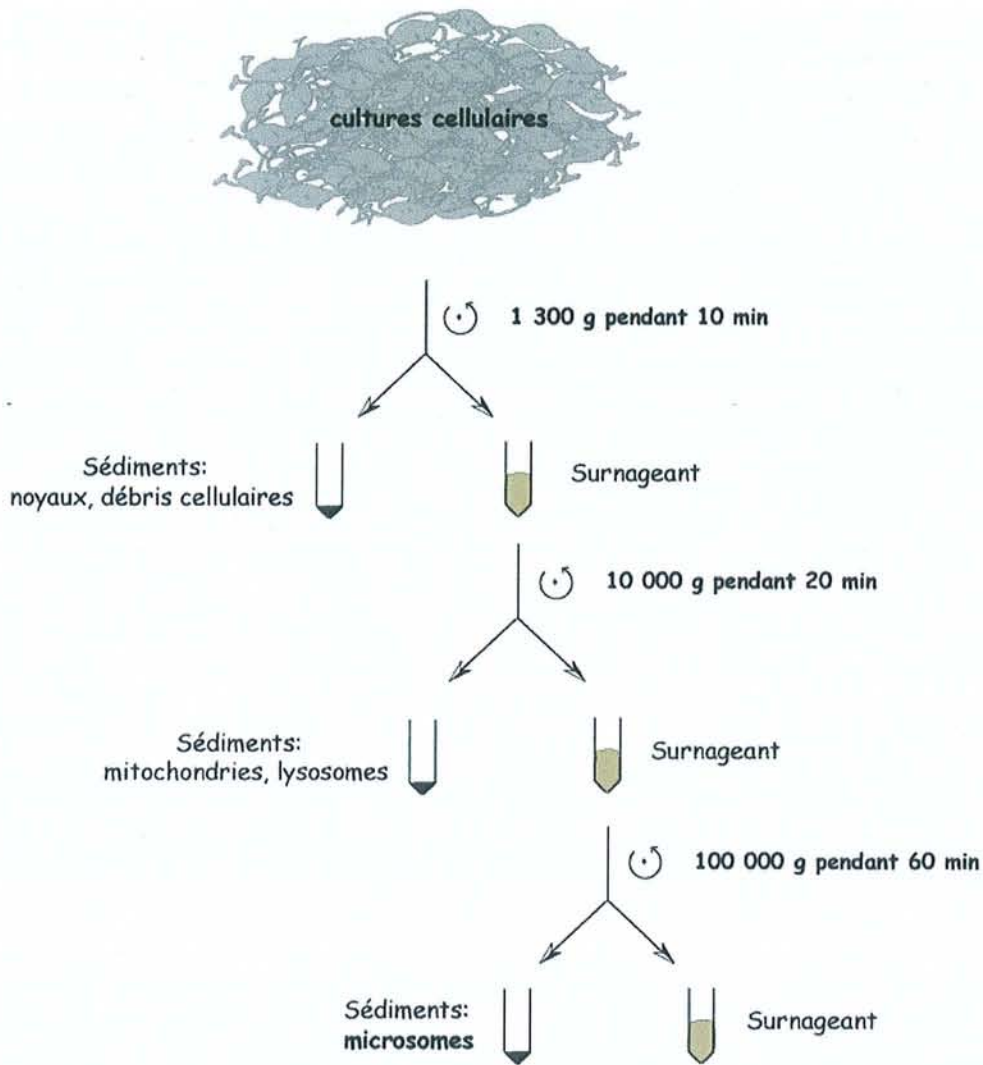


Figure 22. Isolement des microsomes

## 7.2 - Réalisation

### 7.2.1 - Préparation de microsomes d'astrocytes

Après traitement, les cellules astrocytaires sont récupérées par grattage dans du tampon phosphate A (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4), 1 mM EDTA et 0,1 mM DTT). Une première centrifugation à 2 000 g pendant 10 min permet la récupération du culot cellulaire qui est ensuite remis en suspension dans du tampon phosphate A. Les cellules sont ensuite soniquées à une intensité de 60 W pendant 50 secondes à 4°C. Une deuxième

centrifugation à 1 300 g pendant 10 min permet de sédimenter les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 10 000 g pendant 20 min afin de sédimenter les mitochondries et les lysosomes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 100 000 g pendant 1h. Le culot correspondant à la fraction microsomale est remis en suspension dans du tampon phosphate B (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, et 20% glycérol (v/v)). Les microsomes sont conservés à - 80°C avant utilisation. Pour optimiser la réaction de glucuroconjugaison, les microsomes seront préalablement activés par du Triton X-100 (rapport optimal Triton/protéine de 0,15) pendant 15 min dans la glace (Suleman *et al.*, 1993). L'UGT étant ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique, l'action de détergents va faciliter l'accès du cofacteur au site actif de l'enzyme.

### 7.2.2 - Préparation de microsomes de cellules V79

Les fractions membranaires sont préparées à partir d'homogénats cellulaires par ultracentrifugations différentielles (Battaglia *et al.*, 1994). Les cellules V79-1A6 et V79-2B1 sont grattées dans du PBS avant d'être centrifugées à 2 000 g pendant 10 min. Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans du tampon 5 mM Hépès (pH 7,4), 0,25 M saccharose puis soniqué trois fois 10 secondes à 60 W. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 10 000 g pendant 10 min. Les fractions membranaires sont obtenues par ultracentrifugation du surnageant à 100 000 g pendant 1h et conservées à - 80°C avant utilisation.

## 8 - Dosage des protéines

### 8.1 - Principe

Le dosage des protéines est réalisé selon la technique BCA (*Bicinchoninic acid protein assay kit*, Sigma). La méthode BCA, plus tolérante que celle de Lowry ou de Bradford vis-à-vis de nombreux réactifs utilisés pour extraire les protéines, est compatible avec les détergents. Elle combine le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin et la capacité de l'acide bicinchoninique à former un complexe coloré avec les ions cuivreux. La structure macromoléculaire de la protéine, le nombre de liaisons peptidiques, et la présence de 4 acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) sont responsables de la réduction des ions

cuvriques  $\text{Cu}^{2+}$ . Le produit pourpre de la réaction est formé par l'interaction de 2 molécules de BCA avec un ion  $\text{Cu}^{2+}$ . Le complexe est hydrosoluble et présente une forte absorbance à 560 nm permettant ainsi le dosage colorimétrique des protéines.

## 8.2 - Réalisation

Une solution de travail est préparée en mélangeant 50 parts de réactif A (BCA) et 1 part de réactif B ( $\text{CuSO}_4$ ). Une gamme d'étalonnage, de 0,1 à 0,8 mg/ml, est réalisée à partir d'une solution d'albumine sérique bovine (1 mg/ml, Sigma), et additionnée de 10% (v/v) de tampon d'extraction protéique. La solution étalon et les échantillons dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration à raison de 10  $\mu\text{l}$ /puits. La solution de travail C (A+B) est ajoutée (200  $\mu\text{l}$ /puits). La plaque est ensuite recouverte d'un film et incubée 1h à 37°C. L'absorbance est lue à 560 nm avec un lecteur de microplaque.

## 9 - Dosage des glucuronides

### 9.1 - Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

#### 9.1.1 - Principe

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une technique qui permet la séparation de composés issus d'un mélange selon leur polarité. En phase inverse, les molécules éliminées les premières sont les plus polaires. Cette technique nous a permis d'identifier le glucuronide de kétoprofène (KPF).

Le système chromatographique couplé à un détecteur UV est composé d'une pompe Waters 510, d'une colonne Novapak C-18 (100 mm  $\times$  8 mm ; 4  $\mu\text{m}$  ; Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) insérée dans un module de compression Radial-Pak (Waters). Le détecteur UV (Waters 996) permet de repérer et de tracer les spectres de substances absorbant dans l'ultraviolet.

#### 9.1.2 - Réalisation

Les microsomes activés de cellules astrocytaires, de V79-1A6 et V79-2B1 (100  $\mu\text{g}$ ) sont repris dans un tampon acétate de sodium 0,1 M (pH 5,4) /  $\text{MgCl}_2$  10 mM. Ils sont incubés

pendant 1h à 37°C avec le KPF (1 mM, solubilisé dans du DMSO à 5% final ; Rhône-Poulenc) et de l'acide uridine 5'-diphospho- $\alpha$ ,D-glucuronique (UDPGA ; 3 mM solubilisé dans de l'eau ; Sigma) en présence de saccharonolactone (5 mM, solubilisé dans le tampon ; Sigma), inhibiteur des  $\beta$ -glucuronidases actives à pH acide. Le volume réactionnel final est alors de 100  $\mu$ l. La réaction est arrêtée par addition de 10  $\mu$ l d'HCl 6N et les protéines sont précipitées par centrifugation à 3 000 g pendant 10 min.

Les surnageants sont alors injectés dans le système chromatographique. La phase mobile est constituée d'un mélange acétonitrile / eau / acide trifluoroacétique (35 / 65 / 0,04, v/v), dont le débit est de 1 ml/min. La détection est réalisée à 256 nm. Les quantités de glucuronides de KPF sont directement évaluées par comparaison avec une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes en KPF. Il a été vérifié que l'addition du résidu glucuronique, qui n'absorbe pas dans l'UV, ne modifie pas le spectre UV du KPF (coefficient d'extinction molaire et  $\lambda_{\text{max}}$  inchangés). Le KPF et ses glucuronides ont le même spectre UV mais des temps de rétention différents dus à leurs propriétés d'hydrophobicité différentes. Les activités spécifiques sont exprimées en  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de protéines.

## 9.2 - Fluorimétrie

### 9.2.1 - Principe

Les mesures d'activité de glucuroconjugaison du 1-naphtol (1-NP) et de la 4-méthylombélliférone (4-MO), réalisées par fluorescence, sont basées sur la fluorescence spécifique des glucuronides de 1-NP et de 4-MO.

### 9.2.2 - Réalisation

Les mesures sont réalisées à partir de microsomes activés de cellules astrocytaires, de V79-1A6 et de V79-2B1.

#### 9.2.2.1 - Glucuroconjugaison du 1-naphtol

Les microsomes activés (100  $\mu$ g) sont repris dans du tampon Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) /  $\text{MgCl}_2$  10 mM, et sont incubés pendant 1h à 37°C avec le 1-NP (1 mM, solubilisé dans du DMSO à 5% final ; Sigma), et l'UDPGA (2 mM, solubilisé dans de l'eau). Après arrêt de la

réaction par addition de tampon d'acide trichloroacétique 0,4 M / glycine 0,6 M (pH 2,2), une extraction par 4 ml de chloroforme est réalisée. Après centrifugation, 1 000 g pendant 10 min, un aliquot de la phase aqueuse (200 µl) est récupéré. La lecture au spectrofluorimètre, aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission, respectivement 290 et 330 nm, se fait directement après ajout de 1,8 ml de NaOH 0,1 M. Les quantités de glucuronides de 1-NP, présentes dans le milieu réactionnel, sont évaluées par comparaison avec une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes de 1-β-D-glucuronide de 1-NP (Sigma). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines.

#### 9.2.2.2 - Glucuroconjugaison de la 4-méthylombélliférone

Les microsomes activés (100 µg) sont repris dans un tampon Tris-HCl 0,15 M (pH 7,6) / MgCl<sub>2</sub> 50 mM, et sont incubés pendant 1h à 37°C avec la 4-MO (1 mM, solubilisée dans du DMSO à 5% final ; Sigma), et l'UDPGA (2 mM, solubilisé dans de l'eau). Après arrêt de la réaction par addition d'eau glacée, 4 ml d'acétate d'éthyle sont ajoutés puis les échantillons sont centrifugés à 1 000 g pendant 10 min. La phase supérieure d'acétate d'éthyle est éliminée et un aliquot de 200 µl de la phase aqueuse est récupéré. La lecture au spectrofluorimètre, aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission, respectivement 320 et 380 nm, se fait directement après ajout de 1,8 ml de glycine 0,25 M (pH 10,3). Les quantités de glucuronides de 4-MO, présentes dans le milieu réactionnel, sont évaluées par comparaison avec une gamme étalon réalisée au moyen de quantités croissantes en 1-β-D-glucuronide de 4-MO (Sigma). Les activités spécifiques sont exprimées en nmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines.

### 9.3 - Chromatographie sur couche mince

#### 9.3.1 - Principe

La quantification des glucuronides de stéroïdes est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à la radiodétection (Bansal et Gessner, 1980). Cette technique permet de séparer les glucuronides formés du substrat et de l'UDPGA non utilisé grâce à leur différence de polarité, par CCM suivie d'une autoradiographie. La phase stationnaire est composée d'un gel de silice. Ainsi, l'UDPGA, de part son caractère polaire, se fixe à la silice et migre peu alors que l'aglycone, apolaire, migre avec la phase mobile. Le glucuronide formé, de polarité intermédiaire, migre à une distance entre celle de l'UDPGA et celle de

l'aglycone. Cette technique, impliquant l'utilisation de [ $^{14}\text{C}$ ]-UDPGA, est à la fois qualitative par la mise en évidence d'un signal sur le film d'autoradiographie et quantitative puisque le [ $^{14}\text{C}$ ]-glucuronide peut être récupéré, par grattage, et compté. Pour chaque expérience, un témoin positif est réalisé avec de la 4-méthylombélliférone ainsi qu'un témoin négatif sans substrat.

Par cette technique, nous avons évalué la glucuroconjugaison de stéroïdes (C18, C19 et C21) ainsi que 3 autres composés endogènes (Tableau 5). Tous ces substrats proviennent de chez Sigma et sont solubilisés dans du DMSO.

C18	C19	C21	Autres substrats
estrone	testostérone	progestérone	sérotonine
16 $\alpha$ -hydroxyestrone	dihydrotestostérone	17- hydroxyprogestérone	triiodo-L- thyronine (T3)
estradiol	androstérone	prégnénolone	tétraiodo-L-thyronine (T4)
estriol	épiandrostérone	17-hydroxyprégnénolone	
	déhydroépiandrostérone		

**Tableau 5.** Récapitulatif des différents substrats testés en CCM

### 9.3.2 - Réalisation

Les microsomes d'astrocytes (50  $\mu\text{g}$ ) et de V79-1A6 (200  $\mu\text{g}$ ), préparés après traitement, sont incubés dans du tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) /  $\text{MgCl}_2$  10 mM pendant 1h à 37°C en présence d'UDPGA (0,05 mM, solubilisé dans de l'eau), de [ $^{14}\text{C}$ ]-UDPGA (entre 200 000 et 250 000 dpm ; PerkinElmer, Courtaboeuf, France) et de substrat (1 mM, solubilisé dans du DMSO) dans un volume final de 40  $\mu\text{l}$ . La réaction est arrêtée dans la glace en ajoutant 40  $\mu\text{l}$  d'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite agités puis centrifugés à 3 000 g pendant 10 min. Le surnageant (60  $\mu\text{l}$ ) est alors déposé sur une plaque de CCM (CCM

Whatman à zone de concentration ; Saint-Quentin, France) qui est mise à sécher une nuit sous une hotte ventilée. La plaque est ensuite déposée verticalement dans une cuve contenant une phase mobile composée de *n*-butanol, d'acétone, d'acide acétique, d'ammoniaque 28% et d'eau (35/25/9/1/30 ; v/v) qui va entraîner la séparation des différents produits de réaction. Après migration, la plaque est séchée pendant 2h puis exposée contre un écran de révélation (Kodak Phosphor Screen ; Amersham, Saclay, France) pendant au minimum 1h. L'image de la plaque est révélée en disposant l'écran dans un scanner laser à haute résolution (Typhoon<sup>®</sup>, Amersham).

## 10 - Analyse de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel

### 10.1 - Principe

L'étude de l'expression de gènes est réalisée par RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) semi-quantitative afin de détecter l'accumulation des ARNm, molécules issues de la transcription des gènes, précurseurs de la biosynthèse des protéines. Le principe de cette technique consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier *in vitro* en ADNc simple brin par l'action de la transcriptase inverse. Cette étape est fondamentale avant la réaction de polymérisation en chaîne qui fait intervenir une ADN polymérase. Les molécules d'ADNc obtenues servent alors de matrice pour cette réaction et un fragment de l'ADNc cible est multiplié en utilisant un couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence de l'ARN d'intérêt. Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus : (i) la dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C pendant 45 sec, (ii) l'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN monocaténaire à une température d'hybridation spécifique ( $T_m$ ) pendant 45 sec, et (iii) la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la *Taq* polymérase), à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C pendant 45 sec. Les fragments obtenus, après les cycles de PCR, sont alors suffisamment nombreux pour être visualisés sur gel d'agarose après électrophorèse.

### 10.2 - Réalisation

#### 10.2.1 - Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits en une étape (Chomczynski et Sacchi, 1987). Les ARN totaux sont isolés avec le kit d'extraction Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Cette solution de Trizol<sup>®</sup> est composée d'isothiocyanate de guanidium qui a pour rôle de dénaturer les protéines afin de séparer les protéines chaperonnes des ARN, mais également de phénol pour isoler les protéines.

Après traitement, les cellules astrocytaires (en plaque 6 puits) sont rincées au PBS. Les cellules sont ensuite lysées avec la solution de Trizol<sup>®</sup>, à raison de 1 ml par puits, à température ambiante pendant 5 min. Les lysats cellulaires sont placés dans des tubes « *Rnase free* » dans lesquels sont ajoutés 0,2 ml de chloroforme afin de séparer parfaitement la phase aqueuse, contenant les ARN, de la phase organique contenant les protéines. Après homogénéisation et 15 min de repos dans la glace, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et 500 µl d'isopropanol y sont ajoutés afin de précipiter les ARN totaux. Après homogénéisation, les échantillons sont placés à -20°C pendant 3h puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. Le culot est ensuite lavé à l'éthanol 75% et centrifugé à 7 500 g pendant 5 min à 4°C. Le culot d'ARN totaux obtenu est séché à l'air avant d'être dissous dans 20 µl d'eau stérile. La concentration en ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg/ml d'ARN. Une double mesure à 280 nm permet d'estimer la contamination des ARN par des protéines résiduelles. Les expériences sont entreprises sur des échantillons ayant un rapport d'absorbance 260 nm / 280 nm supérieur à 1,7. Tous les échantillons sont ensuite ramenés à une dilution de 0,29 µg/µl. L'intégrité des ARN est finalement estimée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (p/v) préparé dans du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE ; Sigma) et additionné de bromure d'éthidium (BET ; Invitrogen) à 1% (v/v). Les échantillons sont stockés à -80°C.

#### 10.2.2 - Transcription inverse ou « RT »

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux dénaturés à 70°C pendant 10 min, en utilisant des amorces poly-dT (0,5 µM, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) et 200 unités de *MMLV Reverse Transcriptase* (Eurobio, Les Ulis, France) dans un volume final de 20 µl de solution tamponnée fournie avec l'enzyme et complétée avec des dNTP (0,5 mM, Eurobio). Le mélange réactionnel est incubé 1h à 37°C, puis la réaction est stoppée en chauffant le mélange à 70°C pendant 15 min. Les solutions d'ADNc obtenues sont diluées au ½ avant d'être stockées à -20°C.



## 10.2.3 - Réaction de polymérisation en chaîne ou « PCR »

La réaction de PCR est réalisée à partir de 2 µl d'ADNc, précédemment préparés par RT, et en utilisant un couple d'amorces oligonucléotidiques (amorces sens et antisens) reconnaissant spécifiquement une séquence d'intérêt (Tableau 6). Ces amorces sont synthétisées dans le commerce (MWG-Biotech AG, Courtaboeuf, France).

Gène étudié	Amorce sens (5' → 3')	Amorce antisens (5' → 3')	N° d'accession
<b>UGT1A6</b>	GGACTCAGTTCTAGGTGACAAGC	GCCGTTGACATAGGCTTCAAATTCC	U16818
<b>UGT2B1</b>	TGCTACTTTAGACCTGGAGCCT	GTCATGCGGTCACTTAATTCTG	M13506
<b>iNOS</b>	AGCAGAATGTGACCATCATGGACC	ATGCAGACAACCTTGGTGTGAAGG	L09210
<b>COX-2</b>	TCCAGATCACATTTGATTGACAG	TGTGGGAGGATACATCTCTCC	M90100
<b>L27</b>	GCTGTCGAAATGGGCAAGTT	CAAACCTTGACCTTGGCCTCC	NM-022514

**Tableau 6.** Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR

La synthèse des amplicons (fragments de PCR) est effectuée avec 2,5 unités de *Taq DNA polymerase* (Eurobio), complétée par 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl d'une solution tamponnée fournie avec l'enzyme. Le mélange réactionnel est ensuite placé dans un thermocycleur (Mastercycler™, Eppendorf, Le Pecq, France) et est soumis à un nombre variable de cycles chauffage-refroidissement en fonction du gène étudié. Chaque cycle comprend 3 étapes : une phase de dénaturation à 94°C pendant 45 sec, une phase d'hybridation à une température spécifique du couple d'amorce (T<sub>m</sub>) utilisé pendant 45 sec, et une phase d'élongation enzymatique à 72°C pendant 45 sec. Les conditions de PCR sont optimisées au niveau du nombre de cycles à réaliser permettant une amplification linéaire de la quantité d'amplicons (Tableau 7).

Gène étudié	T° d'hybridation (T <sub>m</sub> )	Nombre de cycles	Taille des amplicons (pbs)
<b>UGT1A6</b>	62°C	33	822
<b>UGT2B1</b>	59°C	38	575
<b>iNOS</b>	62°C	28	433
<b>COX-2</b>	59°C	28	443
<b>L27</b>	62°C	27	364

**Tableau 7.** Optimisation des conditions de PCR

#### 10.2.4 - Analyse de la quantité des amplicons formés

L'analyse des fragments amplifiés est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (p/v) préparé dans du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE ; Sigma) additionné de bromure d'éthidium 1% (v/v) (Invitrogen). Les échantillons sont dilués au 1/6<sup>ème</sup> dans une solution de bleu de dépôt (*Loading gel buffer* ; Sigma) puis 15 µl sont déposés dans le gel. La séparation électrophorétique s'opère à voltage constant (80 V) pendant 45 min. Les amplicons sont visualisés sous UV. Leur taille (en paire de base) est estimée par comparaison avec un marqueur de taille connu (*Ready<sup>®</sup> 100 bp ladder* ; Sigma). Le gel est scanné avec un système d'acquisition et d'analyse d'image (Geldoc 2000<sup>TM</sup> ; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) en préservant la linéarité du rapport quantité d'ADN / signal. L'intensité du signal de chaque bande est finalement mesurée.

## 11 - Analyse de l'activité des protéines nucléaires sur l'ADN

### 11.1 - Transfection transitoire

#### 11.1.1 - Principe

L'expression transitoire d'un gène permet une analyse rapide de la régulation de ce gène en fonction de son promoteur. Des gènes dits rapporteurs sont utilisés car leur expression peut être facilement mise en évidence. Le produit d'un gène rapporteur doit être absent des cellules soumises à la transformation afin d'évaluer uniquement la composante inductible de cette

régulation. C'est pour cette raison que les gènes rapporteurs sont souvent d'origine bactérienne. Pour étudier le promoteur de l'UGT1A6, nous avons utilisé le gène de la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Ainsi, après avoir introduit ce gène dans les cellules par transfection, la détection de la fluorescence émise par la GFP est réalisée à la longueur d'onde d'émission de 510 nm après excitation à 485 nm.

### 11.1.2 - Construction plasmidique contenant la partie promotrice du gène codant l'UGT1A6

#### 11.1.2.1 - Amplification de la région promotrice par PCR

Les amorces, synthétisées par la société MWG-Biotech AG, sont choisies d'après la séquence nucléotidique du gène codant l'UGT1A6 (N° d'accèsion : AF359280).

Amorce sens : 5'-CAG CTT CTG ATA ATT CTG GCT CTA C-3'

Amorce antisens : 5'-AGC TCT CTC TCC CTG ACT CTA A-3'

L'amplification par PCR est réalisée dans les conditions décrites précédemment (paragraphe 10.2.3) à l'aide de 200 ng d'ADN génomique (Interchim, Montluçon, France). Le mélange réactionnel est placé dans un thermocycleur et est soumis à 40 cycles chauffage-refroidissement. Chaque cycle comprend 3 étapes : une phase de dénaturation à 94°C pendant 45 sec, une phase d'hybridation à 55°C pendant 45 sec, et une phase d'élongation enzymatique à 72°C pendant 3 min. En fin de programme, une étape supplémentaire d'élongation est réalisée à 72°C durant 10 min. La taille attendue du fragment amplifié est de 887 pbs.

#### 11.1.2.2 - Clonage du fragment amplifié par PCR

L'analyse du produit de PCR précédemment obtenu est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,9% (p/v) préparé dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE ; Euromedex, Mundolsheim, France) additionné de bromure d'éthidium 1% (v/v). Après avoir vérifié la taille du fragment, la bande d'ADN est découpée puis purifiée à l'aide d'un kit commercialisé (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le fragment amplifié est cloné dans le plasmide pGlow-

TOPO-GFP (Invitrogen), présentant le gène de résistance à l'ampicilline, pendant 30 min à température ambiante. Les bactéries compétentes *E.Coli* (One Shot<sup>®</sup>TOP10, Invitrogen) sont ensuite transformées par choc thermique à 42°C pendant 30 sec, puis incubées sous agitation pendant 1h à 37°C dans 250 µl de milieu SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose). Les bactéries sont ensuite étalées en boîte de Pétri sur un milieu LB agar (10 g/l tryptone, 5 g/l extrait de levure, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar ; Gibco) contenant 50 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Seules les bactéries ayant été transformées sont capables de pousser sur les boîtes de Pétri.

#### 11.1.2.3 - Sélection des clones positifs

L'insertion du promoteur de l'UGT1A6 dans le plasmide est vérifiée en réalisant une PCR classique (paragraphe 10.2.3) à partir des colonies présentes sur la boîte de Pétri. Pour cela, nous avons utilisé l'amorce antisens qui nous a servi à amplifier la région promotrice par PCR (5'-AGC TCT CTC TCC CTG ACT CTA A-3') et une amorce T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') fournie avec le plasmide. Les amplicons sont visualisés sous UV après migration sur gel d'agarose à 1% (p/v) préparé dans TBE additionné de bromure d'éthidium 1% (v/v). Les clones positifs sélectionnés sont remis en culture dans 250 ml de milieu LB-ampicilline (50 µg/ml).

#### 11.1.2.4 - Extraction du plasmide

Après 48h d'agitation à 37°C, le plasmide contenant l'insert est extrait de la culture bactérienne à l'aide d'un kit commercialisé par Qiagen (*Endofree Plasmid Maxi Kit*). Le culot final d'ADN est remis en suspension dans 200 µl de tampon contenant 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) et 1 mM EDTA puis conservé à -20°C. La concentration en ADN double brin est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm sachant qu'une unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. La construction plasmidique contenant le promoteur de l'UGT1A6 a été vérifiée par séquençage (Centre INRA, service de séquençage, Nancy).

### 11.1.3 - Transfection des astrocytes

#### 11.1.3.1 - Conditions de transfection

Les conditions de transfection sont établies en modulant différents paramètres afin d'obtenir une toxicité cellulaire minimale ainsi qu'une efficacité de transfection la plus importante possible. Nous avons pour cela fait varier trois paramètres : la quantité plasmidique déposée au contact des cellules, le pourcentage de sérum de veau foetal (SVF) présent dans le milieu de culture, ainsi que le temps de transfection. La toxicité est évaluée sur nos cultures sous microscope en lumière visible. L'efficacité de transfection est visualisée par marquage à l'iodure de propidium (4  $\mu$ M, solubilisé dans du PBS) qui a la propriété de s'insérer dans l'ADN.

Les astrocytes, cultivés en plaque 6 puits, sont transfectés transitoirement par la méthode de lipofection avec le plasmide pGlow-Topo-GFP dont le gène de la GFP est sous contrôle du promoteur du gène de l'UGT1A6. De plus, les cellules sont co-transfectées avec un plasmide CMV- $\beta$ Gal, codant pour le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur faible non inductible. Ce 2<sup>ème</sup> plasmide servira de témoin de transfection.

#### 11.1.3.2 - Réalisation

Après optimisation des conditions de transfection, les cultures astrocytaires sont co-transfectées avec 2  $\mu$ g de pGlow-Topo-UGT1A6-GFP, et 0,5  $\mu$ g de plasmide CMV- $\beta$ Gal. Les cellules sont transfectées par lipofection avec le poly-éthylèneimine linéaire (PEI, Exgen 500 ; Euromedex) en présence de 150 mM de NaCl afin de saturer les sites électrostatiques présents sur les tubes. L'ADN plasmidique est dilué dans une solution de NaCl 150 mM ainsi que le PEI (dilution au 1/5<sup>ème</sup>). Le PEI est ensuite ajouté à l'ADN plasmidique, agité immédiatement puis incubé 15 min à température ambiante. Le mélange réactionnel (100  $\mu$ l) ainsi que 900  $\mu$ l de milieu de culture contenant 10% de SVF sont ajoutés aux cellules préalablement lavées au PBS. Après 2h d'incubation à 37°C sous atmosphère humide, 2 ml de milieu de culture sont ajoutés aux cellules. Les différents traitements ne seront appliqués sur les cellules que 48h après la transfection.

#### 11.1.4 - Evaluation de l'expression de la GFP

Les cellules sont rincées deux fois par du PBS, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , 24h après traitement. Les cellules sont ensuite grattées dans 1 ml de PBS puis centrifugées à 1 500 g pendant 5 min. Le culot est alors repris dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) / NaCl 150 mM / 1% Igepal CA-630 (v/v). La suspension cellulaire est incubée à température ambiante pendant 10 min puis centrifugée à 10 000 g pendant 10 min pour culoter les noyaux. Le surnageant (100  $\mu\text{l}$ ) est alors prélevé et placé dans un autre tube. Des aliquots de chaque échantillon (50  $\mu\text{l}$ ) sont prélevés puis placés dans une microplaque de 96 puits. La mesure de l'expression de la GFP est réalisée par spectrofluorimétrie à 510 nm après excitation des échantillons à 485 nm. Un contrôle négatif est préparé dans les mêmes conditions mais sur des surnageants de cellules n'ayant pas été transfectées, ou transfectées par un seul des deux plasmides.

#### 11.1.5 - Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase

Le dosage est réalisé avec 50  $\mu\text{l}$  de surnageant dilué par 50  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse utilisé pour le dosage de la GFP et 150  $\mu\text{l}$  de tampon d'essai (tampon phosphate de sodium 200 mM, pH 7,8 additionné de  $\text{MgCl}_2$  2 mM, de  $\beta$ -mercaptoéthanol 100 mM et 1,33 mg/ml d'ONPG (*O*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Sigma) ajouté extemporanément). L'incubation est maintenue pendant 1h30 à 37°C puis est stoppée par l'addition de 500  $\mu\text{l}$  de Tris base 1 M. La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 420 nm.

### 11.2 - Retard sur gel

#### 11.2.1 - Principe

L'expression de gènes cibles est régulée par la fixation de facteurs de transcription sur l'ADN. La technique de gel-retard (« *Electro-Mobility Shift Assay* » ou EMSA) permet de mettre en évidence la fixation de protéines, dites de régulation, sur la région promotrice de gènes. Le principe de cette technique consiste à extraire les noyaux cellulaires des tissus à étudier, à incuber ces extraits nucléaires avec le fragment d'ADN radiomarqué portant la séquence promotrice d'intérêt. L'ensemble est ensuite déposé sur gel non dénaturant pour séparer les fragments d'ADN par électrophorèse. Si une protéine nucléaire s'est hybridée avec

le fragment d'ADN, la migration du complexe formé sera alors retardée par rapport au fragment seul. Le gel est autoradiographié et la mobilité électrophorétique des fragments d'ADN complexés ou non est révélée.

Si, par l'utilisation d'un anticorps, une reconnaissance spécifique a permis la formation d'un complexe immun s'accrochant sur la sonde marquée, la migration sur gel du complexe fragment-protéine-anticorps est alors encore plus retardée, on parle de "super-retard".

## 11.2.2 - Réalisation

### 11.2.2.1 - Extraction des protéines nucléaires

Après deux lavages avec du PBS froid, les cellules traitées sont mises en suspension par grattage dans 5 ml de PBS, puis centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de tampon A hypotonique froid (Hépès 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM et anti-protéases), puis laissé dans la glace pendant 15 min. Les cellules sont lysées en ajoutant 0,6% (v/v) d'Igepal<sup>®</sup> (Sigma). L'homogénat est centrifugé à 200 g pendant 5 min à 4°C pour sédimenter les noyaux. Après élimination du surnageant, les noyaux sont repris dans 60 µl de tampon de lyse B hypertonique froid (Hépès 20 mM pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Igepal 0,25% (v/v), DTT 1 mM et anti-protéases). Les lysats sont laissés dans la glace pendant 30 min, agités régulièrement, puis centrifugés 10 min à 12 000 g à 4°C. Les extraits nucléaires sont alors dosés selon la méthode BCA (paragraphe 8) avant d'être aliquotés et stockés à - 80°C.

### 11.2.2.2 - Préparation des sondes

Les éléments de réponse à AP-1 (*Activator Protein-1*, 21 pbs) et NrF2 (*Nuclear factor E2 p45-related Factor 2*, 23 pbs) correspondent aux séquences des sites de fixation des protéines nucléaires AP-1 et NrF2. Ces séquences, présentes dans le promoteur de l'UGT1A6 de rat, sont synthétisées sur commande (MWG-Biotech AG). Le site de fixation des protéines nucléaires apparaît en gras sur la séquence. Afin d'évaluer la spécificité de ces sondes, des séquences comprenant plusieurs mutations ont été synthétisées.

**Sonde AP-1** (région - 467 à - 448 du promoteur de l'UGT1A6, N° d'accension : AF359280)

5' - CAG AAG GTG ACT CT - 3'  
3' - CAC TGA GAC TCC TC - 5'

**Sonde AP-1 mutée**

5' - CAG AAG GTA ATT TG - 3'  
3' - GAT TAA ACC TCC TC - 5'

**Sonde NrF2** (région - 942 à - 920 du promoteur de l'UGT1A6, N° d'accension : AF359280)

5' - AAA GAT TAC TGA CTA AGC - 3'  
3' - ATG ACT CAG TCG TTC AC - 5'

**Sonde NrF2 mutée**

5' - AAA GAT TAC TGC GTG AAC - 3'  
3' - ATG ACG CAC TTG TTC AC - 5'

Les brins sens et antisens sont stockés à -20°C à la concentration de 1 µg/µl. Les brins sont dilués à 10 ng/µl dans de l'eau puis hybridés par incubation d'un mélange 1:1 pendant 10 min à température ambiante. Le marquage de la sonde est réalisé par extension des brins en 3' selon la séquence du brin complémentaire par l'activité polymérase du fragment de Klenow (DNA polymérase sans activité exonucléasique). La sonde hybridée est incubée pendant 1h à 30°C en présence d'un tampon d'incubation fourni, additionné de 0,5 mM de dATP, de dGTP et de dTTP, de 4 unités d'enzyme de Klenow (Promega, Madison, USA) et de 0,5 mM de [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (Amersham). La sonde radiomarquée est purifiée par centrifugation à 1 200 g pendant 4 min sur une colonne Tris Bio-Spin 30 (Bio-Rad). La sonde marquée est alors conservée pendant 1 semaine à -20°C.

#### 11.2.2.3 - Interaction ADN-protéines et analyse du complexe sur gel

Les protéines nucléaires (10 µg) sont incubées pendant 30 min à 4°C dans un tampon de fixation (Tris/HCl 100 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 5 mM, Glycérol 50% (v/v), NaCl 500 mM, DTT 5 mM) additionné de 1 µg de poly-dIdC (Promega) et 1 µl de sonde radiomarquée purifiée. Le volume final est complété à 10 µl avec de l'eau. Après incubation,



1  $\mu$ l d'une solution de dépôt (constituée de bleu de bromophénol dilué dans du tampon de fixation) est ajouté au mélange réactionnel.

Le complexe ADN-protéine est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5% préparé dans du tampon TBE 0,5X. Les échantillons sont déposés dans le gel puis soumis à un voltage constant de 150 V pendant 1h45 dans du tampon TBE 0,5X. Le gel est alors placé sur un papier Whatman recouvert d'un film de Saran<sup>®</sup>. Le gel est ensuite séché sous vide pendant 20 min à 80°C puis exposé contre un écran de révélation (Kodak Phosphor Screen) pendant 1h au minimum. L'image du gel est révélée en disposant l'écran dans un scanner laser à haute résolution (Typhoon<sup>®</sup>).

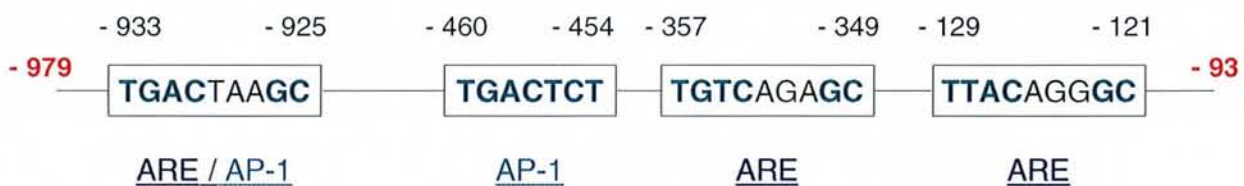
#### 11.2.2.4 - Identification des protéines du complexe retardé

La technique est la même que celle décrite précédemment. Un anticorps, spécifique d'une protéine susceptible de se fixer sur l'élément de réponse, est ajouté après incubation des protéines nucléaires avec la sonde radiomarquée. Ainsi, 1  $\mu$ l d'anticorps, soit anti-cFos ou anti-cJun (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France) pour le complexe AP-1, ou anti-NrF2 (Tebu) pour le facteur de transcription NrF2, est ajouté pendant 30 min à 4°C. Le complexe super-retardé est ensuite analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (5%) comme précédemment.

## 12 - Mutagenèse dirigée

### 12.1 - Principe

Afin de vérifier la fonctionnalité des deux sites de fixation de type AP-1 présents sur le promoteur de l'UGT1A6 (Figure 23), nous avons utilisé la technique de mutagenèse dirigée.



**Figure 23.** Sites de fixation présents sur le promoteur de l'UGT1A6 (AP-1 : *Activator Protein-1*; ARE : *Antioxidant Response Element*)

En effet, par cette technique (Figure 24), il est possible d'effectuer des modifications (insertions, délétions ou substitutions) d'une séquence donnée et ainsi de bloquer l'action de cette dernière.

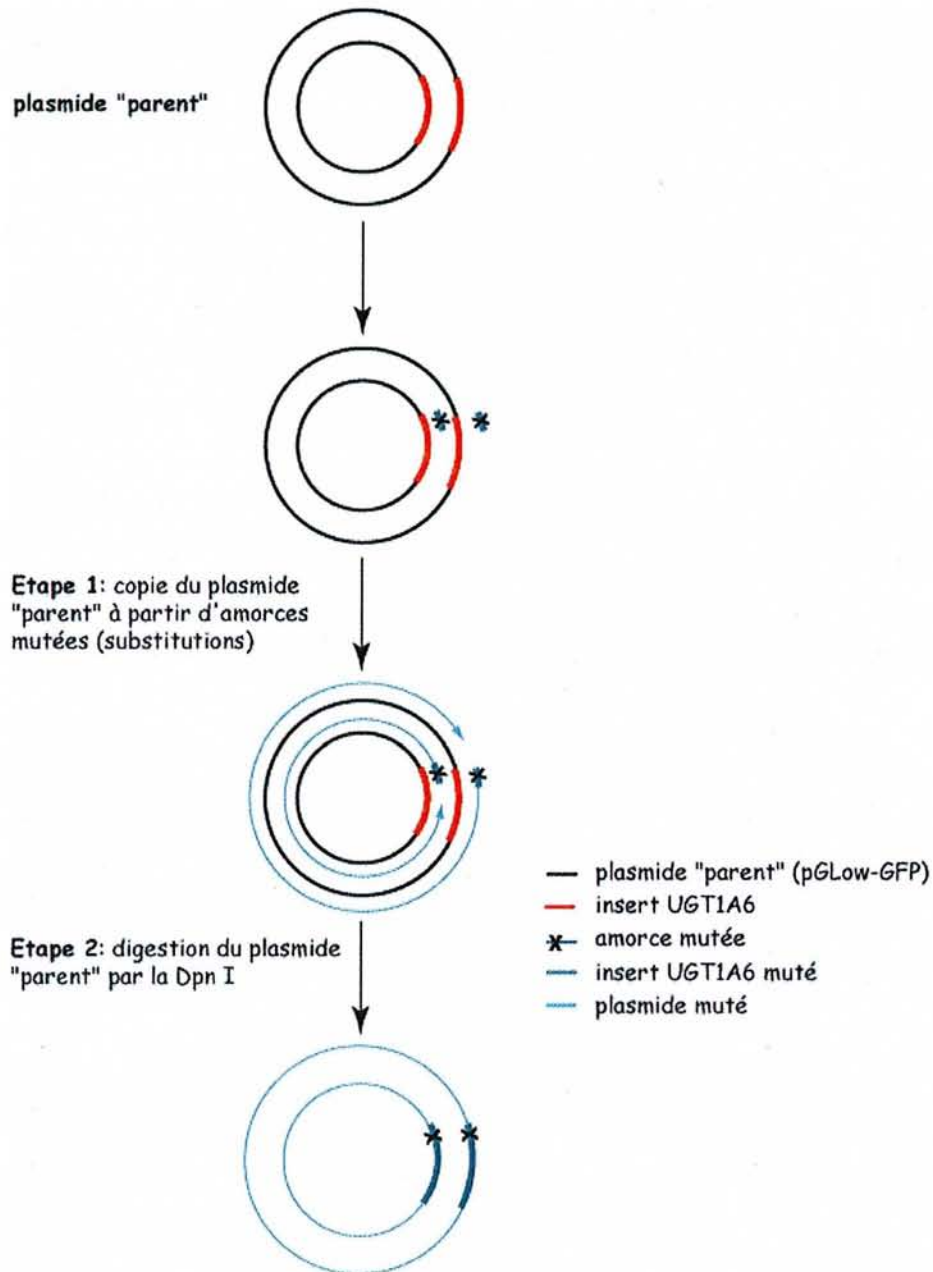


Figure 24. Les différentes étapes de la mutagenèse dirigée

## 12.2 - Réalisation

Il s'agit, à partir de la construction plasmidique pGlow-TOPO-UGT1A6-GFP, ou plasmide « parent », réalisé précédemment (paragraphe 11.1.2), d'effectuer une copie de ce plasmide avec des amorces (MWG-Biotech AG) contenant plusieurs mutations (substitutions).

La mutation 1 correspond à la mutation du site de fixation à AP-1 le plus en amont du promoteur de l'UGT1A6 (- 933 à - 927) et la mutation 2 à celle de l'autre site de fixation à AP-1 (- 460 à - 454). La mutation 3 correspond à la mutation de ces 2 sites.

- Séquence non mutée (- 944 à - 914) contenant la séquence AP-1 (- 933 à - 927):

Sens: 5' - GCA AAG ATT ACT **GAC TAA** GCA AGT GTT CTA C - 3'

Antisens: 3' - CGT TTC TAA TGA **CTG ATT** CGT TCA CAA GAT G - 5'

- Amorces utilisées pour la Mutation 1:

Sens: 5' - GCA AAG ATT **ACG CAG** TAA GCA AGT GTT CTA C - 3'

Antisens: 3' - CGT TTC TAA **TGC GTC** ATT CGT TCA CAA GAT G - 5'

- Séquence non mutée (- 472 à - 442) contenant la séquence AP-1 (- 460 à - 454):

Sens: 5' - CAT AGC AGA AGG **TGA CTC** TGA GGA GGA GAC G - 3'

Antisens: 3' - GTA TCG TCT TCC **ACT GAG** ACT CCT CCT CTG C - 5'

- Amorces utilisées pour la Mutation 2:

Sens: 5' - CAT AGC AGA AGG **ACA CAC** TGA GGA GGA GAC G - 3'

Antisens: 3' - GTA TCG TCT TCC **TGT GTG** ACT CCT CCT CTG C - 5'

- Mutation 3 = double mutation (mutation 1 + 2)

Les copies sont réalisées par l'intermédiaire d'un kit de mutagenèse (Stratagène, La Jolla, USA). Brièvement, la réaction est effectuée avec 2,5 unités de *Pfu Turbo DNA polymerase*, 10 ng de plasmide « parent », 125 ng de chaque amorce (sens et antisens), 0,5 mM de chaque dNTP, et le tampon de réaction (10X) dans un volume final de 50 µl. Le mélange réactionnel est ensuite placé dans un thermocycleur et est soumis à 18 cycles chauffage-refroidissement. Chaque cycle comprend 3 étapes : une phase de dénaturation à

95°C pendant 30 sec, une phase d'hybridation à 55°C pendant 1 min, et une phase d'élongation enzymatique à 68°C pendant 6 min. Le plasmide « parent » est ensuite digéré par action de la Dpn I (10 unités) pendant 2h à 37°C. En effet, cette endonucléase agit spécifiquement sur l'ADN méthylé.

Les produits obtenus (2 µl), correspondant aux différentes mutations, sont ensuite clonés dans des bactéries compétentes *E.Coli* (One Shot<sup>®</sup>TOP10, Invitrogen) transformées par choc thermique à 42°C pendant 30 sec, puis incubées sous agitation pendant 1h à 37°C dans 250 µl de milieu SOC. Les bactéries sont ensuite étalées en boîte de Pétri sur un milieu LB agar contenant 50 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Seules les bactéries ayant été transformés sont capables de pousser sur les boîtes de Pétri. Quelques colonies sélectionnées sont ensuite remises en culture dans 250 ml de milieu LB-ampicilline (50 µg/ml) pendant 48h. Les plasmides sont alors extraits (paragraphe 11.1.2.4) et envoyés à séquencer afin de vérifier les mutations réalisées.

Une fois le séquençage vérifié, les astrocytes sont transfectés par les différents plasmides comme décrit précédemment (paragraphe 11.1.3.2). L'expression de la GFP ainsi que l'activité β-galactosidase sont évaluées après traitement (respectivement paragraphe 11.1.4 et 11.1.5).

### 13 - Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les comparaisons des moyennes entre les groupes non appariés ont été réalisées selon 2 tests : test *t* de Student ou U de Mann Whitney après analyse de la variance. Le niveau de significativité a été choisi pour  $p < 0,05$ . Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel StatView<sup>®</sup> 4.5 (Abacus Concepts).

### B - Etudes *in vivo*

L'activité de glucuronocouplage ainsi que l'expression de l'isoforme UGT1A6 sont évaluées en fonction de la zone cérébrale chez des rats traités au LPS.

## 1 - Animaux

L'étude est réalisée chez des rats mâles Wistar (Laboratoires Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France) de 250 à 300 g. Les animaux sont stabulés dans une salle thermorégulée ( $22 \pm 2$  °C) soumise à des cycles obscurité / lumière de 12h / 12h. Après réception, les rats sont laissés au repos pendant 5 jours. Une alimentation standardisée et de l'eau sont données *ad libitum*. Toutes les expériences et les soins sont conformes à la réglementation et les normes éthiques en vigueur. Cette étude a été approuvée par le Comité Local d'Ethique de l'Expérimentation Animale.

## 2 - Traitement

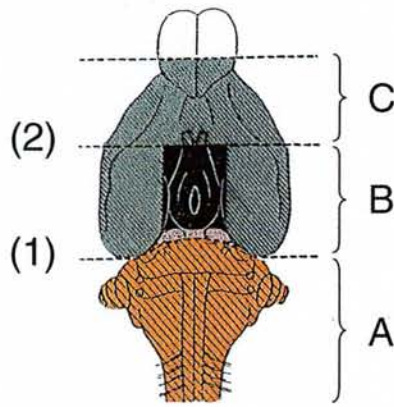
Le traitement consiste à administrer du lipopolysaccharide (E.Coli, 0111:B4, Sigma) chez des rats vigiles par voie intrapéritonéale. L'injection de LPS (2 mg/kg) solubilisé dans du NaCl (0,9%) est réalisée dans la période de lumière. Les témoins négatifs de l'expérience n'ont reçu aucun traitement.

## 3 - Prélèvement des différentes zones cérébrales

Le cerveau est découpé en zones cérébrales selon la procédure de dissection représentée Figure 25 (Glowinski et Iversen, 1966). La glucuronoconjugaison ainsi que l'expression de l'isoforme UGT1A6 sont évaluées au niveau des régions suivantes :

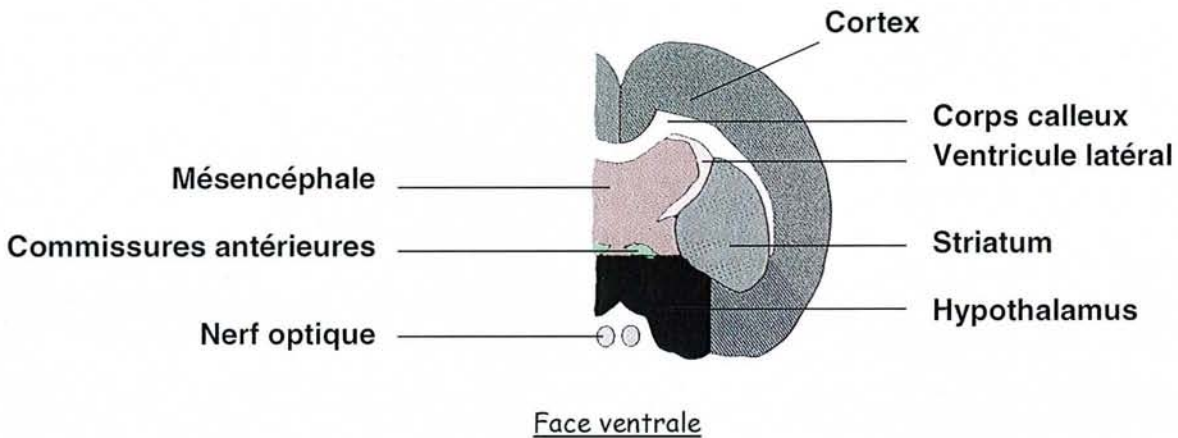
- bulbes olfactifs
- cervelet
- tronc cérébral
- cortex
- hypothalamus + thalamus
- striatum
- hippocampe
- mésencéphale

$\alpha$  - Coupe transversale -  
(face ventrale)



$\beta$  - Plan de section en (2)

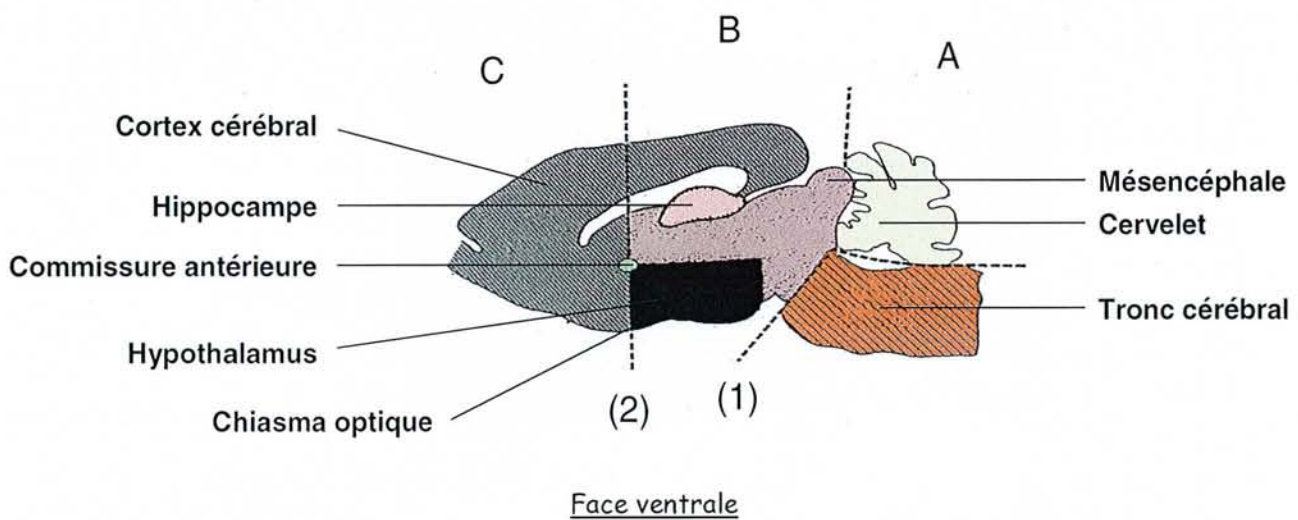
Face dorsale



Face ventrale

$\gamma$  - Coupe longitudinale

Face dorsale



Face ventrale

Figure 25. Procédure de dissection du cerveau de rat  
(Les lignes en pointillés représentent les sections initiales)

## 4 - Activités de glucuroconjugaison

### 4.1 - Préparations des fractions membranaires

Les différentes zones cérébrales sont prélevées 48h après l'administration de LPS (2 mg/kg). Les tissus sont tout d'abord broyés dans du tampon phosphate A (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4), 1 mM EDTA et 0,1 mM DTT) à l'aide d'un ultraturax. La préparation des fractions membranaires est identique à celle réalisée à partir de cultures d'astrocytes (paragraphe 7). Le dosage protéique des échantillons est réalisé selon la technique BCA (paragraphe 8).

### 4.2 - Dosages des glucuronides

L'activité de glucuroconjugaison des différents échantillons, vis-à-vis de la 4-méthylombélliférone (4-MO), est évaluée par fluorimétrie comme décrit précédemment (paragraphe 9.2.2.2).

## 5 - Analyse de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel

### 5.1 - Extraction des ARN totaux

Les différentes zones cérébrales sont prélevées 24h après l'administration de LPS (2 mg/kg). Les ARN totaux des différents tissus prélevés sont extraits selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). Après broyage des échantillons, par l'ultraturax, dans le Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen), le protocole suivi est semblable à celui utilisé au paragraphe 10.

### 5.2 - Réactions de « RT-PCR » et analyse sur gel d'agarose

Après extraction des ARN totaux, les réactions de « RT-PCR » ainsi que l'analyse des amplicons formés sont réalisées comme indiqué au paragraphe 10 de la partie « Etude in vitro ». La seule modification réside dans l'utilisation d'une *HotStar Taq DNA polymerase* (2,5 unités ; Qiagen) comme enzyme de PCR à la place de la *Taq DNA polymerase* (Eurobio).

## **6 - Analyse statistique**

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les comparaisons des moyennes entre les groupes non appariés ont été réalisées selon 2 tests : test *t* de Student ou U de Mann Whitney après analyse de la variance. Le niveau de significativité a été choisi pour  $p < 0,05$ . Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel StatView<sup>®</sup> 4.5 (Abacus Concepts).



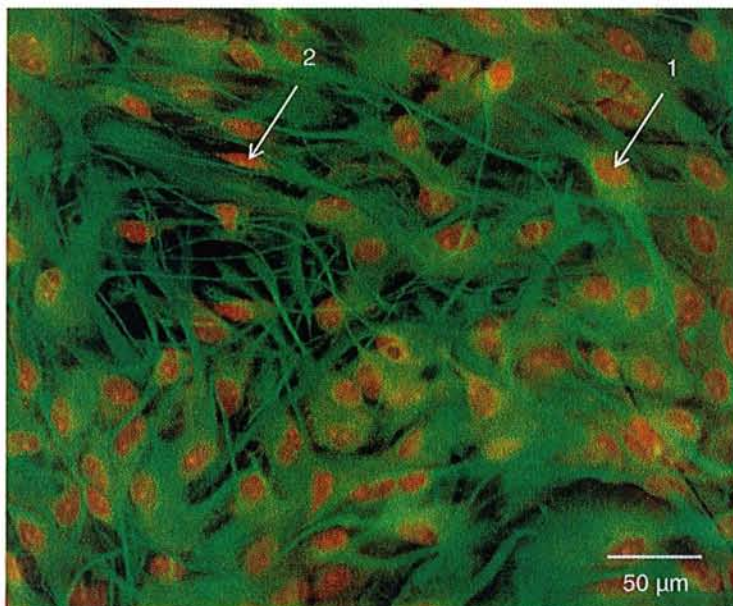
## Chapitre V - Résultats

### *Etude in vitro*

#### A - Caractérisation de la culture d'astrocytes

Ce travail a été réalisé, en grande partie, sur des cultures primaires d'astrocytes de rats nouveaux-nés. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la pureté de la culture en détectant les cellules à phénotype astrocytaire parmi toutes les cellules en culture.

Pour se faire, la détection de la GFAP, marqueur spécifique des astrocytes, a été effectuée par immunocytochimie (Figure 26). Ainsi, la présence de la GFAP se traduit par une coloration verte, exclusivement cytoplasmique, dans de nombreuses cellules correspondant aux astrocytes. La contre-coloration rouge des noyaux va nous permettre de distinguer les cellules astrocytaires des autres cellules. Nous avons alors estimé, par comptage, le nombre de cellules astrocytaires (marquage vert et rouge) sur le nombre de cellules totales (marquage rouge). Ainsi, nous obtenons en moyenne 95% de cellules à caractère GFAP positif, indiquant une culture fortement enrichie en astrocytes.



**Figure 26.** Caractérisation de la culture par détection de la GFAP  
Les astrocytes apparaissent colorés en vert et rouge (1 : cellule GFAP positive) alors que les autres cellules présentent uniquement un noyau coloré en rouge (2 : cellule GFAP négative).

## B - Influence d'un stress oxydant modéré sur la glucuroconjugaison

### 1 - Analyse de la viabilité cellulaire

La viabilité de nos cultures (astrocytes, V79-1A6 et V79-2B1), suite à différentes conditions de traitement à la ménadione, est évaluée par la méthode au MTT (Tableau 8).

ménadione ( $\mu\text{M}$ )	incubation (h)	Viabilité cellulaire (% du témoin)		
		astrocytes	V79-1A6	V79-2B1
5	0,25	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 9	100 $\pm$ 6
	1	97 $\pm$ 21	100 $\pm$ 15	98 $\pm$ 8
	4	95 $\pm$ 12	83 $\pm$ 5*	85 $\pm$ 10*
20	0,25	98 $\pm$ 7	93 $\pm$ 2*	95 $\pm$ 2*
	1	92 $\pm$ 7*	91 $\pm$ 3*	91 $\pm$ 6*
	4	44 $\pm$ 8*	71 $\pm$ 5*	51 $\pm$ 9*
80	0,25	94 $\pm$ 2*	62 $\pm$ 4*	69 $\pm$ 10*
	1	44 $\pm$ 8*	54 $\pm$ 8*	60 $\pm$ 7*
	4	26 $\pm$ 5*	34 $\pm$ 2*	22 $\pm$ 2*

**Tableau 8.** Evaluation de la toxicité des traitements à la ménadione

Au niveau astrocytaire, la ménadione n'entraîne pas de diminution de la viabilité cellulaire pour une dose de 5  $\mu\text{M}$  et ceci quelque soit le temps d'incubation. Pour des doses plus importantes, on s'aperçoit que la viabilité cellulaire peut diminuer fortement. Les lignées cellulaires V79-1A6 et V79-2B1 apparaissent plus sensibles au traitement que les astrocytes. En effet, les deux lignées V79 présentent une viabilité cellulaire diminuée dès 4h d'exposition à la dose de 5 $\mu\text{M}$ .

La viabilité cellulaire a également été évaluée suite aux différents autres traitements (pro- ou anti-oxydants), et aucune modification n'a été relevée aux doses et temps d'incubation utilisés.

### 2 - Mise en évidence et quantification de la production d'EAO

Nous avons vérifié que la ménadione entraînait bien la production d'espèces activées de l'oxygène. Ainsi, l'utilisation de la DHR123 a permis de mettre en évidence cette production d'EAO dans les 3 types cellulaires (Figure 27).

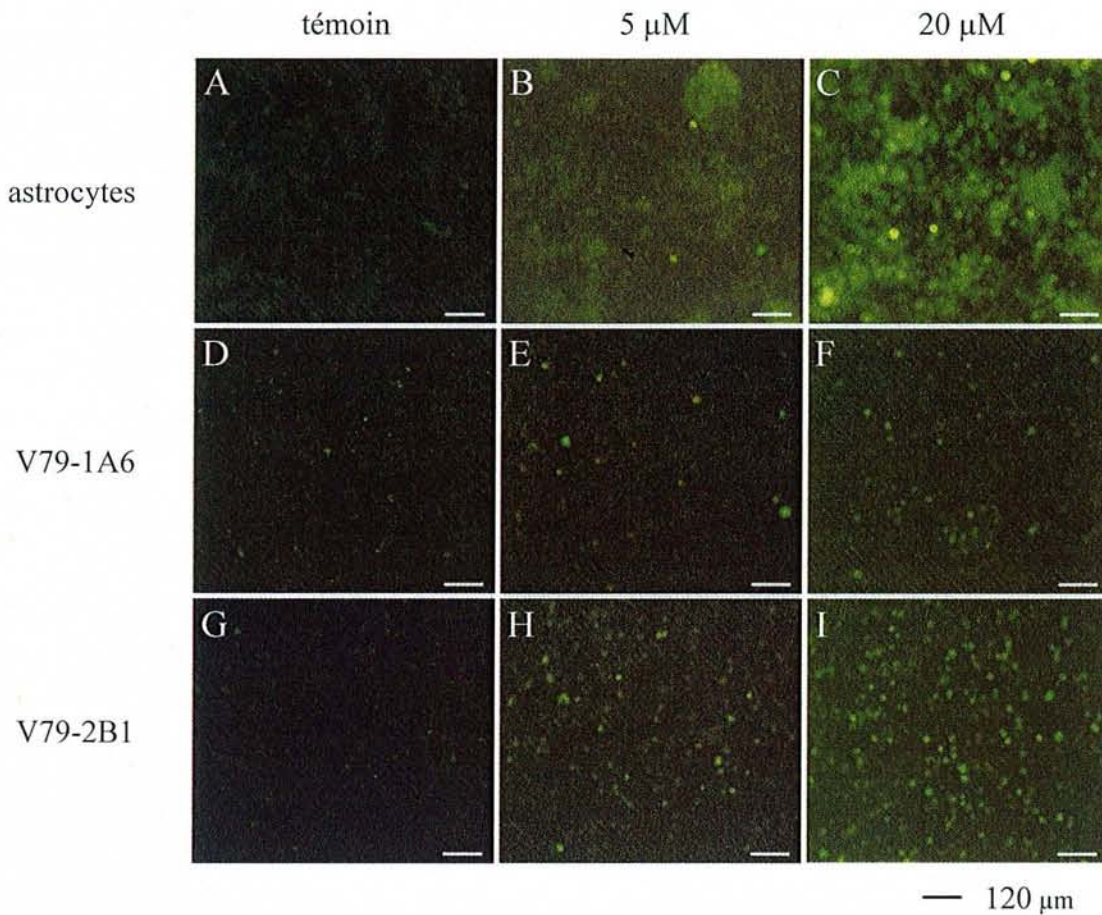
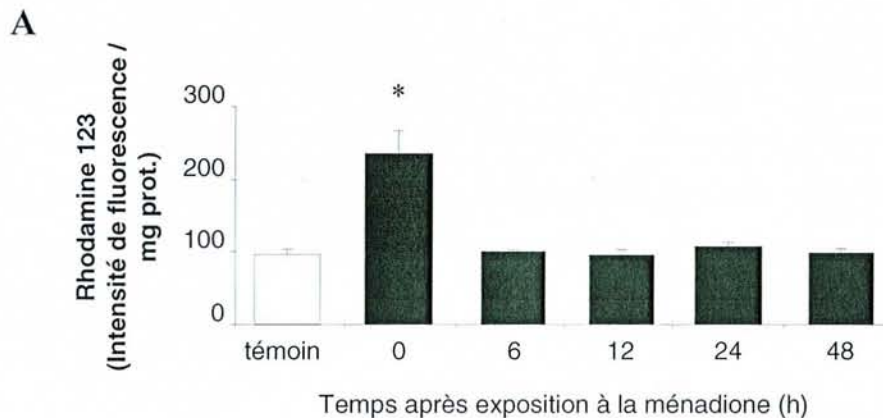
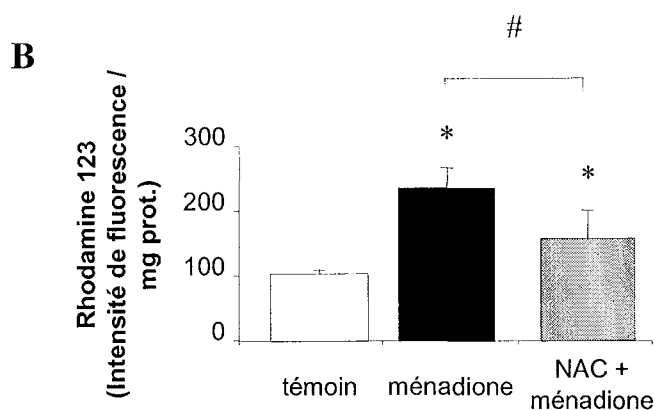


Figure 27. Mise en évidence de la production d'EAO

Après 15 min d'incubation, la production d'EAO est visible dans les 3 types cellulaires dès la dose de 5 μM. Cette production est d'autant plus importante avec une dose plus forte en ménadione (20 μM). Par cette technique, il est également possible de quantifier la production d'EAO. Ainsi, après avoir traité nos cultures astrocytaires avec 5 μM de ménadione pendant 15 minutes, nous avons mesuré la quantité d'EAO produites au cours du temps (Figure 28).





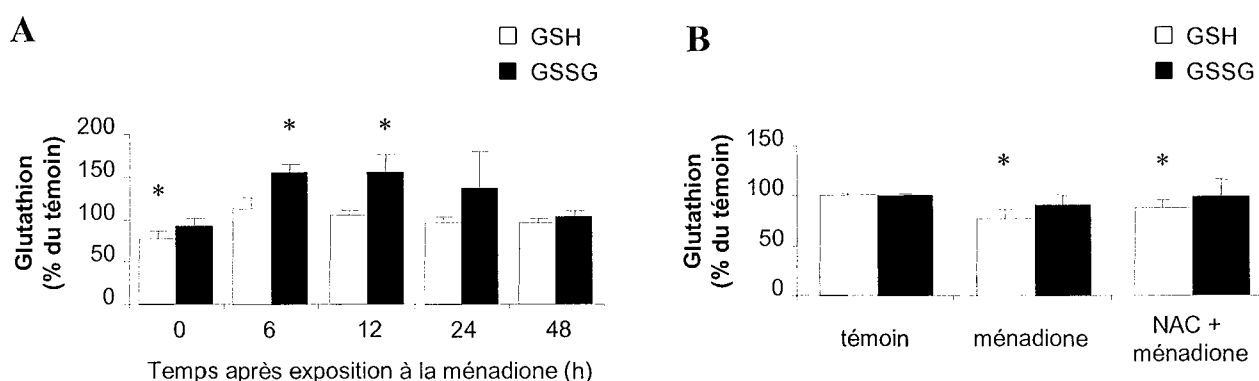
**Figure 28.** Quantification de la production astrocytaire d'EAO

On observe une augmentation significative de la production d'EAO (+ 119%) dès la fin du traitement ( $t = 0$ ). De plus, cette surproduction d'EAO disparaît dès 6h après traitement (Figure 28A) et se maintient à un niveau basal jusqu'à 48h après traitement. Un prétraitement anti-oxydant (Figure 28B), avec un précurseur de la synthèse du glutathion (NAC ; 500  $\mu$ M, 15 min), empêche partiellement, à  $t = 0$ , l'augmentation d'EAO (+ 46%) engendrée par le traitement à la ménadione.

Il faut également noter que, suite au traitement à la ménadione (5  $\mu$ M, 15 min), nous n'avons pu mettre en évidence une surproduction d' $H_2O_2$  au cours du temps.

### 3 - Mesure du stress oxydant

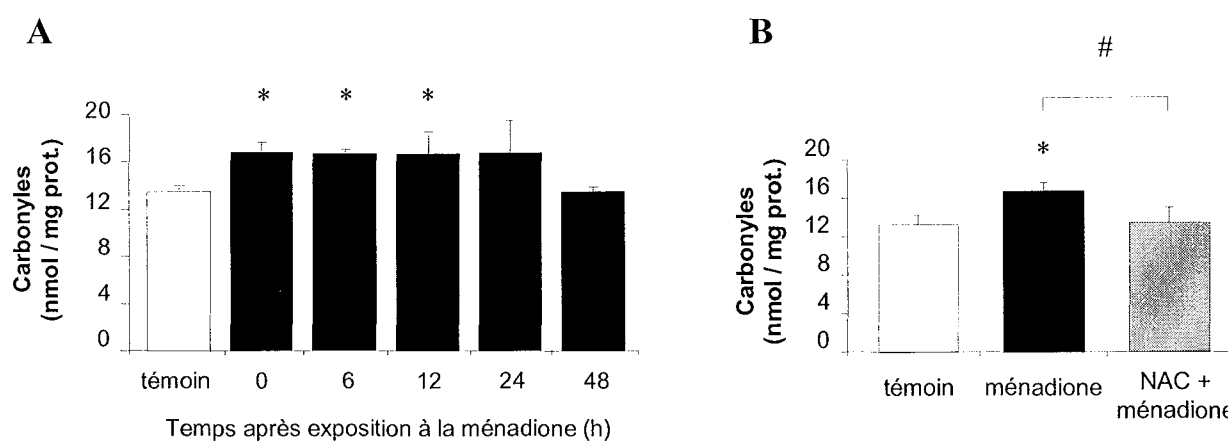
Nous avons ensuite vérifié que cette production d'EAO entraînait un stress oxydant. Pour se faire, nous avons évalué les conséquences de cette production d'EAO sur les taux de glutathion intracellulaire (Figure 29) et sur les taux de carbonyles formés (marqueur de l'oxydation des protéines ; Figure 30) au niveau astrocytaire.



**Figure 29.** Mesure des taux de glutathion au niveau astrocytaire

Dès la fin du traitement à la ménadione (5  $\mu$ M, 15 min) (Figure 29A), à t = 0, une diminution significative des taux de GSH est observée (- 24%) alors que les taux de GSSG sont identiques à ceux que l'on retrouve dans les cellules non traitées. Les taux de GSH retrouvent des valeurs basales 6h après traitement et ceci jusqu'à 48h après traitement. Les taux de GSSG, quant à eux, sont augmentés de + 55% et + 50%, respectivement à 6 et 12h après traitement. A partir de 24h, les taux observés de GSSG reviennent à des taux basaux. Un prétraitement anti-oxydant (Figure 29B) empêche partiellement la diminution des taux de GSH (- 10%) dès la fin du traitement (t = 0), alors que les taux de GSSG restent inchangés.

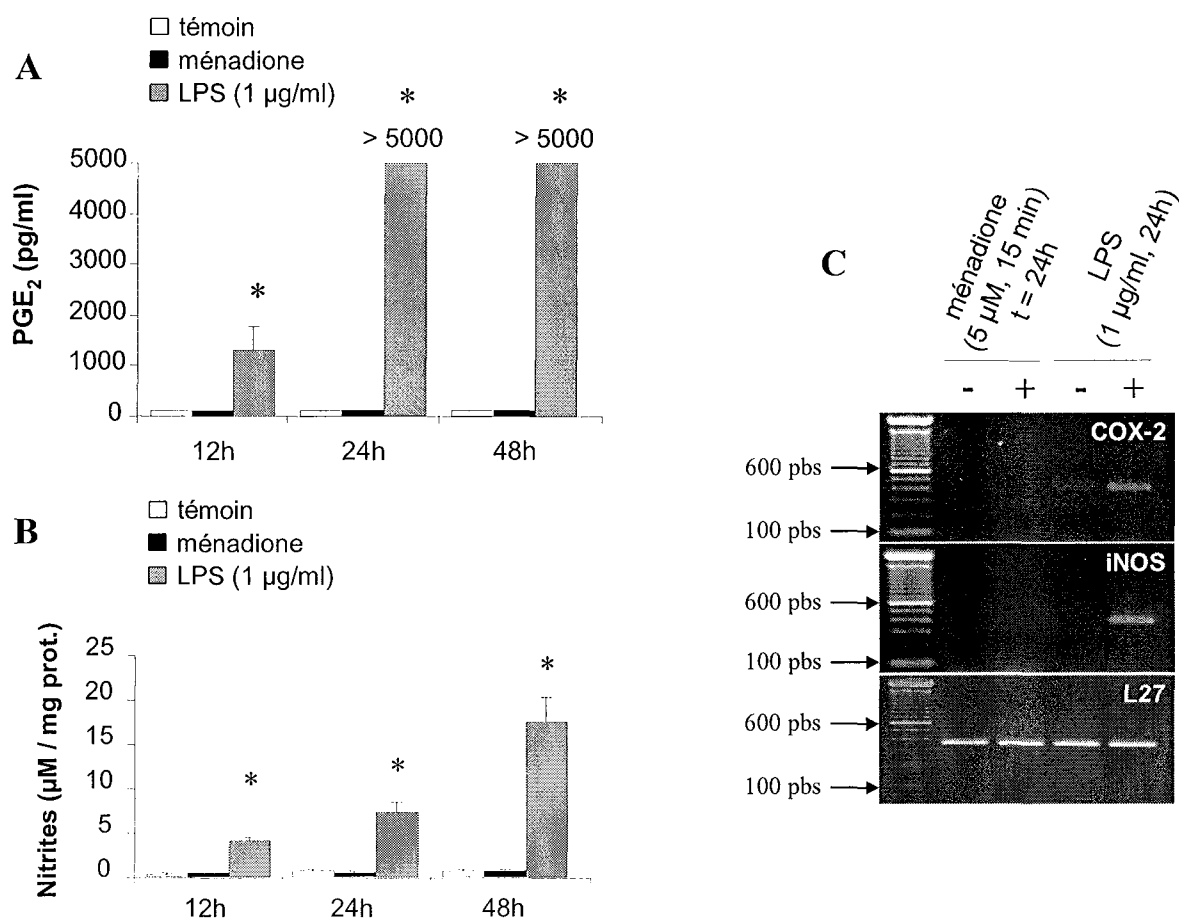
En ce qui concerne les taux de carbonyles, une augmentation significative (+ 26%) est observée dès la fin du traitement (Figure 30A). Cette augmentation est également visible jusqu'à 12h après traitement. C'est seulement à partir de 24h que les taux de carbonyles mesurés sont identiques à ceux des témoins. Un prétraitement avec la NAC empêche totalement cette augmentation des taux de carbonyles, observée à t = 0, au niveau astrocytaire (Figure 30B).



**Figure 30.** Mesure des taux de carbonyles au niveau astrocytaire

#### 4 - Production de médiateurs pro-inflammatoires

Nous avons cherché à évaluer si la ménadione, en plus d'induire un stress oxydant, était capable de produire des médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines E<sub>2</sub> et le monoxyde d'azote (Figure 31).



**Figure 31.** Mesure de la production de médiateurs pro-inflammatoires et analyse de l'expression de COX-2 et d'iNOS

Contrairement à un traitement pro-inflammatoire (LPS), la ménadione (5 µM, 15 min) n'entraîne pas de production de PGE<sub>2</sub> (Figure 31A) ou de monoxyde d'azote (Figure 31B) à 12, 24 ou encore 48h après traitement. De plus, par RT-PCR semi-quantitative, nous n'observons pas, 24h après traitement, d'induction d'iNOS ou de COX-2 (Figure 31C).

### 5 - Modulation de la glucuroconjugaison

La glucuroconjugaison est évaluée, au cours du temps après exposition à la ménadione (5 µM, 15 min), à partir de microsomes d'astrocytes, de V79-1A6 et de V79-2B1. Différents substrats sont utilisés tels que le 1-naphtol (1-NP) et la 4-méthylombélliférone (4-MO), substrats des UGT de la famille 1A et le kétoprofène (KPF), substrat des UGT de la famille 2B.

Les activités mesurées au niveau astrocytaire, de par l'action simultanée de plusieurs UGT, représentent une activité globale de glucuroconjugaison. En revanche, au niveau des

lignées cellulaires V79, on mesure l'activité spécifique de l'isoforme présente soit l'UGT1A6 pour les V79-1A6 et l'UGT2B1 pour les V79-2B1.

### 5.1 - Cultures d'astrocytes

Au niveau astrocytaire, on observe des activités de glucuroconjugaison importantes vis-à-vis du 1-NP (Figure 32A) et de la 4-MO (Figure 32B). Les activités de glucuroconjugaison vis-à-vis du KPF (Figure 32C) sont environ 6 à 7 fois inférieures à celles déterminées pour les deux autres substrats.

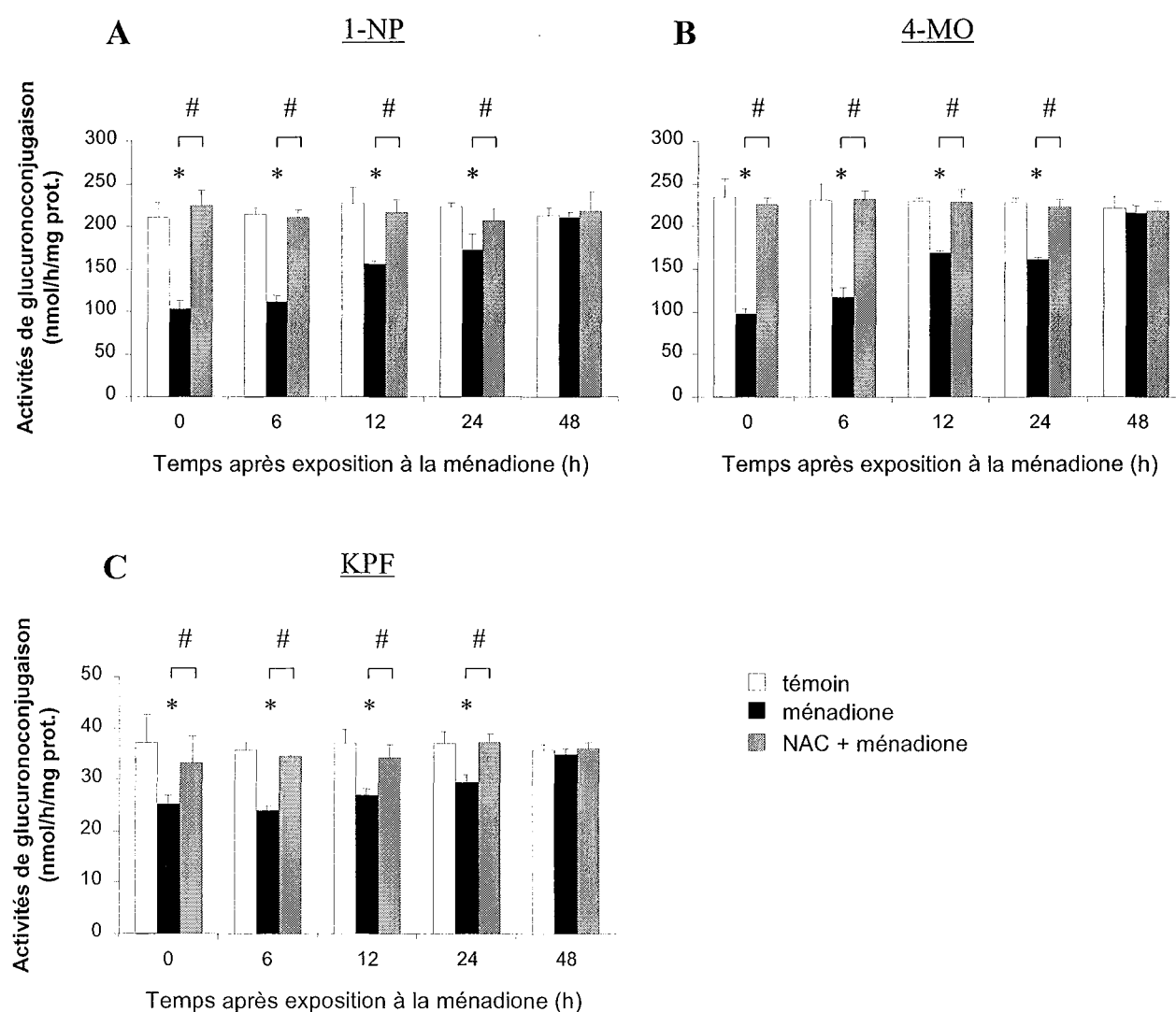


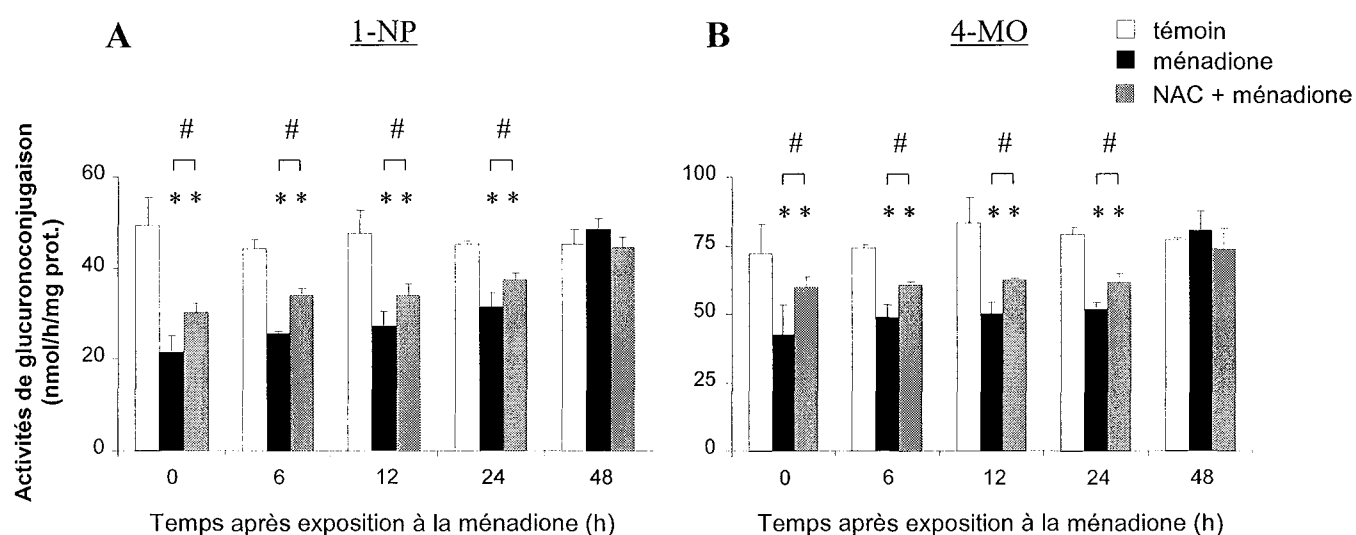
Figure 32. Mesure des activités de glucuroconjugaison au niveau des cellules astrocytaires

Dès la fin du traitement ( $t = 0$ ), les activités de glucuroconjugaison sont diminuées de 50% pour le 1-NP, de 58% pour la 4-MO et de 32% pour le KPF. Pour ces 3 substrats, le profil des activités mesurées au cours du temps est sensiblement le même. En effet, à 6h, 12h et 24h après traitement, les activités de glucuroconjugaison mesurées sont toujours significativement inférieures à celles mesurées chez les témoins mais supérieures à celles observées à  $t = 0$ . Ainsi, plus le temps après traitement est important, plus la diminution de l'activité enzymatique est faible. Ce n'est qu'à partir de 48h après traitement qu'on retrouve des activités de glucuroconjugaison basales.

Un prétraitement anti-oxydant empêche totalement la diminution des activités de glucuroconjugaison, dès  $t = 0$ , et cela quelque soit le substrat et le temps d'étude.

## 5.2 - Lignées cellulaires V79-1A6

Les activités mesurées au niveau des V79-1A6 (Figure 33) sont moins importantes que celles mesurées au niveau astrocytaire. De plus, les V79-1A6 sont incapables de métaboliser le KPF.



**Figure 33.** Mesure des activités de glucuroconjugaison au niveau des cellules V79-1A6

Dès la fin du traitement, les activités de glucuroconjugaison sont diminuées de 55% pour le 1-NP (Figure 33A) et de 41% pour la 4-MO (Figure 33B). Au cours du temps, le profil des activités mesurées est visiblement le même quelque soit le substrat. Les activités de glucuroconjugaison, mesurées à 6, 12 et 24h après traitement, sont inférieures à celles obtenues chez les témoins mais supérieures à celles observées à  $t = 0$ . Ainsi, au cours du



temps, on observe un retour progressif des activités de glucuroconjugaison vers des conditions basales qui ne seront atteintes qu'à partir de 48h.

Un prétraitement anti-oxydant n'est pas suffisant pour éviter cette baisse d'activité enzymatique. En effet, dès t = 0, les activités de glucuroconjugaison vis-à-vis du 1-NP et de la 4-MO sont diminuées respectivement de 39% et de 18%. Ce n'est qu'à 48h après traitement qu'on observe un retour à des conditions basales.

### 5.3 - Lignées cellulaires V79-2B1

Dans ce type cellulaire, les activités mesurées sont beaucoup plus faibles que dans les astrocytes et les V79-1A6 pour le 1-NP et la 4-MO (respectivement Figure 34A et 34B). En revanche, les V79-2B1 présentent des activités de glucuroconjugaison, vis-à-vis du KPF (Figure 34C), supérieures à celles observées dans les astrocytes.

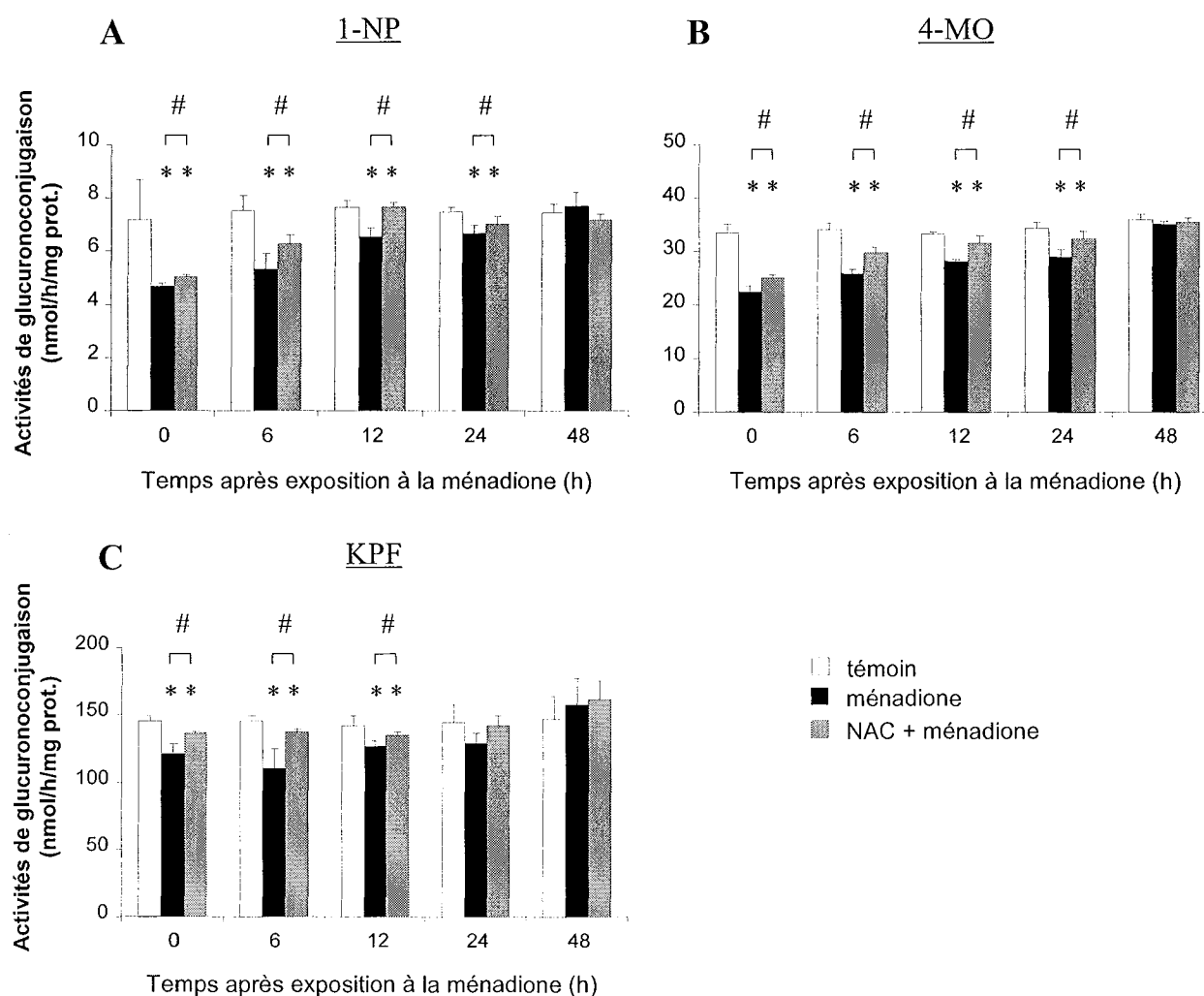


Figure 34. Mesure des activités de glucuroconjugaison au niveau des cellules V79-2B1

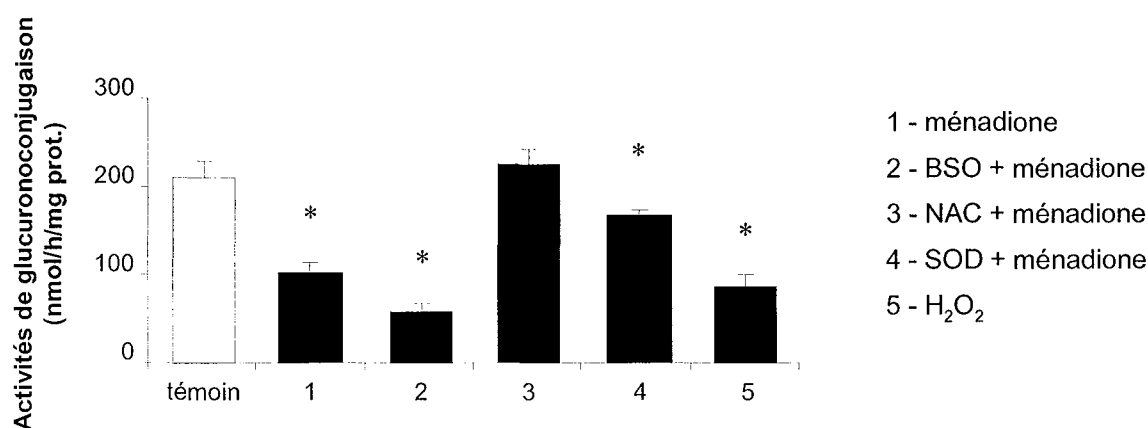
Comme dans les 2 autres types cellulaires, l'exposition à la ménadione diminue, dès  $t = 0$ , les activités de glucuroconjugaison de l'ordre de 35% pour le 1-NP, 33% pour la 4-MO et 17% pour le KPF. Ces diminutions sont cependant moins importantes que celles observées dans les astrocytes et les V79-1A6.

Une fois encore, on observe, au cours du temps, un retour progressif des activités de glucuroconjugaison. Pour le 1-NP et la 4-MO, le retour à une activité enzymatique basale est observé 48h après traitement alors que pour le KPF, il se situe à 24h.

Comme dans les V79-1A6, un prétraitement anti-oxydant n'est pas suffisant pour éviter cette baisse d'activité enzymatique. En effet, dès  $t = 0$ , les activités de glucuroconjugaison vis-à-vis du 1-NP, de la 4-MO et du KPF sont diminuées respectivement de 30%, 25% et 6%. Ce n'est qu'à 24h (KPF) et 48h (1-NP, 4-MO) après traitement qu'on observe un retour à des activités enzymatiques identiques à celles des témoins.

#### 5.4 - Effets d'autres traitements sur la glucuroconjugaison

Les activités de glucuroconjugaison ont également été évaluées à la suite d'autres traitements pro-oxydants (BSO,  $H_2O_2$ ) ou anti-oxydants (NAC, SOD) sur des cultures d'astrocytes (Figure 35) en utilisant le 1-naphtol comme substrat.



**Figure 35.** Modulation de la glucuroconjugaison astrocytaire

Lorsque l'on fait un prétraitement avec de la BSO (20  $\mu$ M, 24h) puis un traitement à la ménadione (5  $\mu$ M, 15 min), on observe une diminution plus importante de l'activité enzymatique comparativement à un traitement à la ménadione seule (-72% *versus* -50%). De plus, un traitement pro-oxydant avec du peroxyde d'hydrogène (50  $\mu$ M, 15 min) a un effet sur

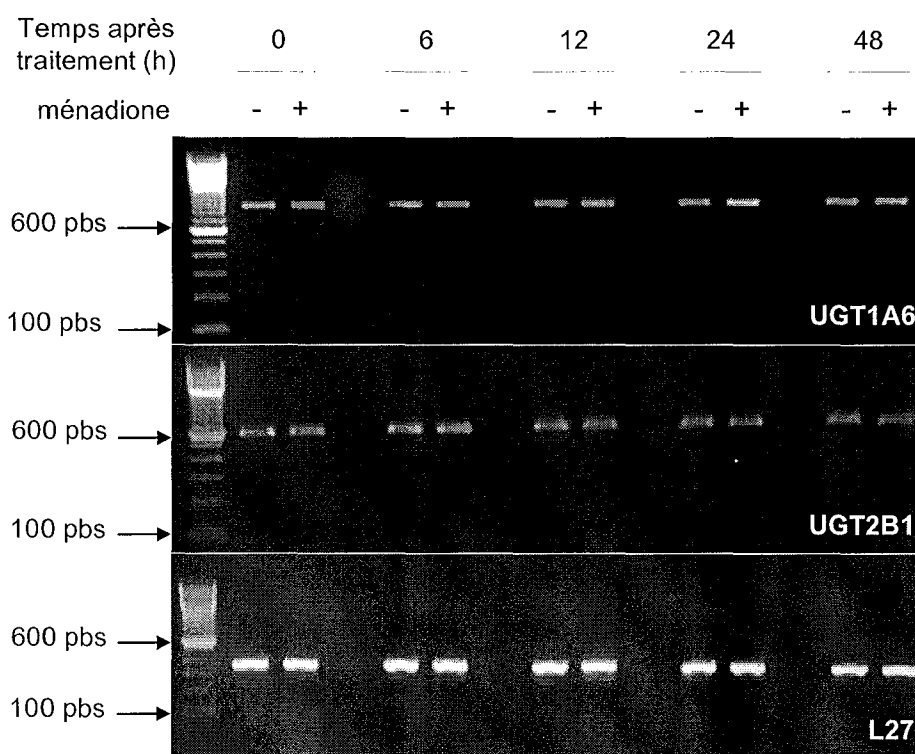
la glucuroconjugaison comparable à celui de la ménadione. En effet, l'activité enzymatique est diminuée de 57%.

Comme on a pu le voir précédemment un prétraitement anti-oxydant avec la NAC empêche totalement cette diminution d'activité provoquée par le traitement à la ménadione. Un co-traitement SOD (30 µg/ml) et ménadione pendant 15 min n'empêche que partiellement cette baisse de glucuroconjugaison (-17%).

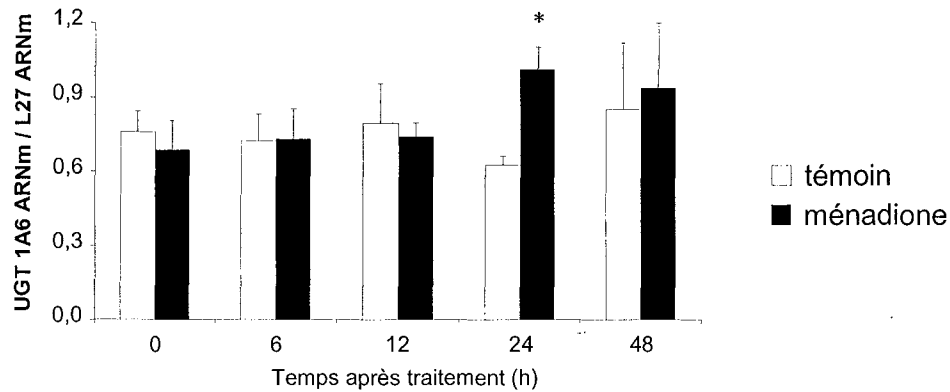
### 6 - Analyse de l'expression des UGT1A6 et 2B1

L'expression des isoformes UGT1A6 et UGT2B1 est analysée par RT-PCR semi-quantitative et migration sur gel d'agarose (Figure 36). Comme on peut le voir après migration (Figure 36A), un traitement à la ménadione augmente significativement, 24h après traitement, l'expression de l'UGT1A6. Aucune modification de l'expression de cette isoforme n'est visible à t = 0 ou à un autre temps après traitement. En revanche, l'expression de l'isoforme UGT2B1 n'est pas modifiée suite au traitement à la ménadione. Pour l'étude de ces 2 isoformes d'UGT, nous avons rapporté leur expression à celle de la L27 (gène de référence). Ainsi, on s'aperçoit que le rapport des expressions UGT1A6/L27 (Figure 36B), à t = 24h, est augmenté de 70% alors que le rapport UGT2B1/L27 (Figure 36C) reste inchangé au cours du temps.

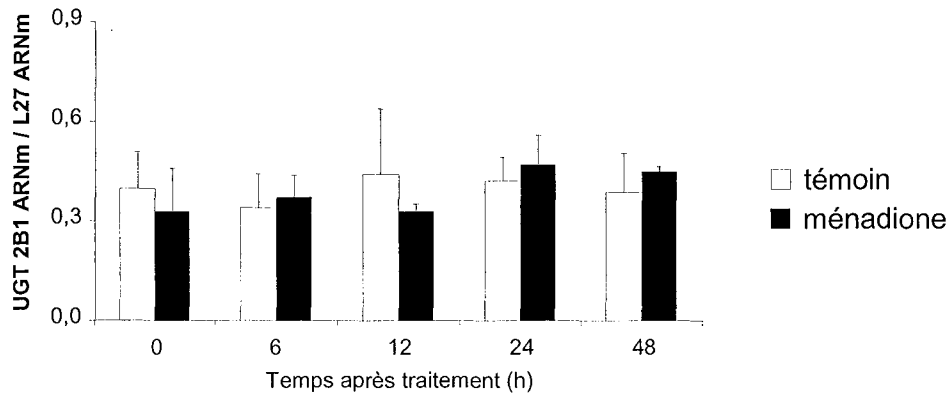
**A**



**B**



**C**



**Figure 36.** Expression des UGT1A6 et 2B1 dans les astrocytes

## 7 - Etude du promoteur de l'UGT1A6

### 7.1 - Mise au point des conditions de transfection

Afin de transfecter nos cultures astrocytaires dans les meilleures conditions, en terme de viabilité cellulaire et de transfection, nous avons établi les conditions optimales en fonction du pourcentage de sérum de veau fœtal (SVF) présent dans le milieu de culture (1, 5 ou 10%), le temps de transfection (1, 2 ou 4h) ainsi que la quantité de plasmide pGlow-GFP utilisé (1, 1,5 ou 2 µg) ; la quantité de plasmide CMV-βGalactosidase étant fixée à 0,5 µg.

Le marquage au iodure de propidium colore en rouge l'ADN présent dans la cellule (noyau + plasmide) et nous permet ainsi « d'évaluer » le degré de transfection.

En faisant varier les différents paramètres (Tableau 9), on observe une toxicité cellulaire ainsi qu'une transfection plus ou moins importante. Nous avons choisi les conditions de telle

sorte que la viabilité cellulaire ne soit pas modifiée et que la transfection soit plus ou moins importante.

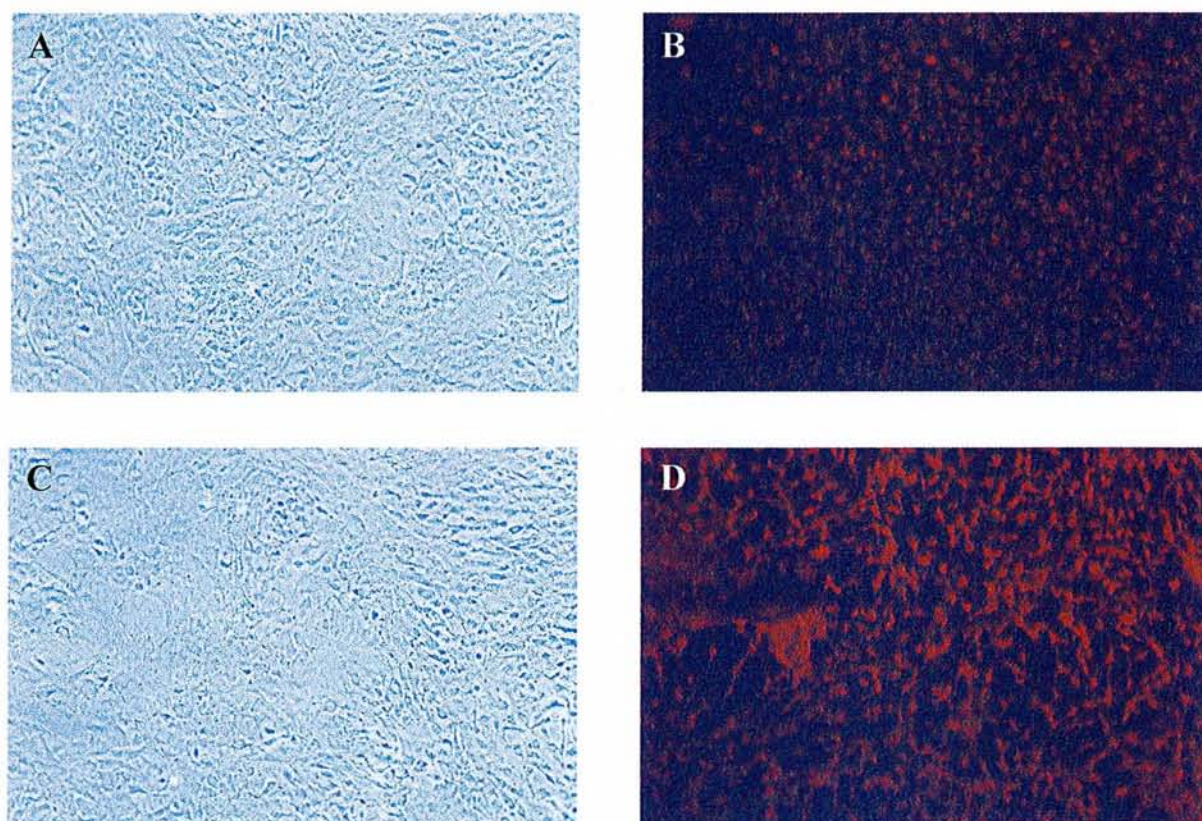
Quantité (µg)	Temps d'exposition (h)	SVF (%)	Viabilité cellulaire	Marquage IP
1	1	1	-	+/-
		5	T	+/-
		10	T	+/-
	2	1	--	+
		5	-	+
		10	T	+/-
	4	1	--	+
		5	-	+
		10	T	+
1,5	1	1	-	+
		5	T	+
		10	T	+/-
	2	1	--	+
		5	-	+
		10	T	+
	4	1	--	+/-
		5	--	+/-
		10	-	++
2	1	1	--	+/-
		5	T	+/-
		10	T	+
	2	1	--	+
		5	-	++
		10	T	++
	4	1	---	+
		5	--	++
		10	-	++

**Tableau 9.** Différentes conditions de transfection  
(IP : iodure de propidium ; T : aspect identique au témoin)

En conclusion, pour la suite de l'étude, nous avons transfecté les astrocytes avec 2 µg de plasmide GFP contenant le promoteur de l'UGT1A6 et 0,5 µg de plasmide CMV-βGalactosidase pendant 2h dans un milieu de culture « classique » contenant 10% de SVF.

Dans ces conditions, comme on peut le voir ci-dessous, les cultures d'astrocytes, transfectées ou non, ont le même aspect morphologique (Figure 37A et 37C). De plus, le

marquage au iodure de propidium apparaît plus important après transfection (Figure 37B et 37D).

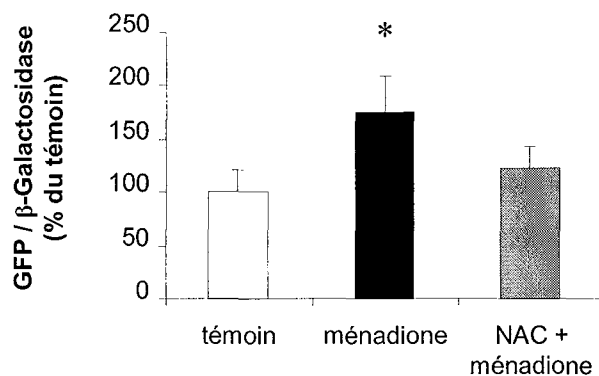


**Figure 37.** Comparaisons astrocytes non transfectés (A, B) / astrocytes transfectés (C, D)  
(A et C : lumière visible ; B et D : marquage au iodure de propidium)

Dans ces conditions et jusqu'à 72h après transfection, aucune modification du tapis cellulaire n'est observée sous microscope.

## 7.2 - Régulation de l'expression de l'UGT1A6 après exposition à la ménadione

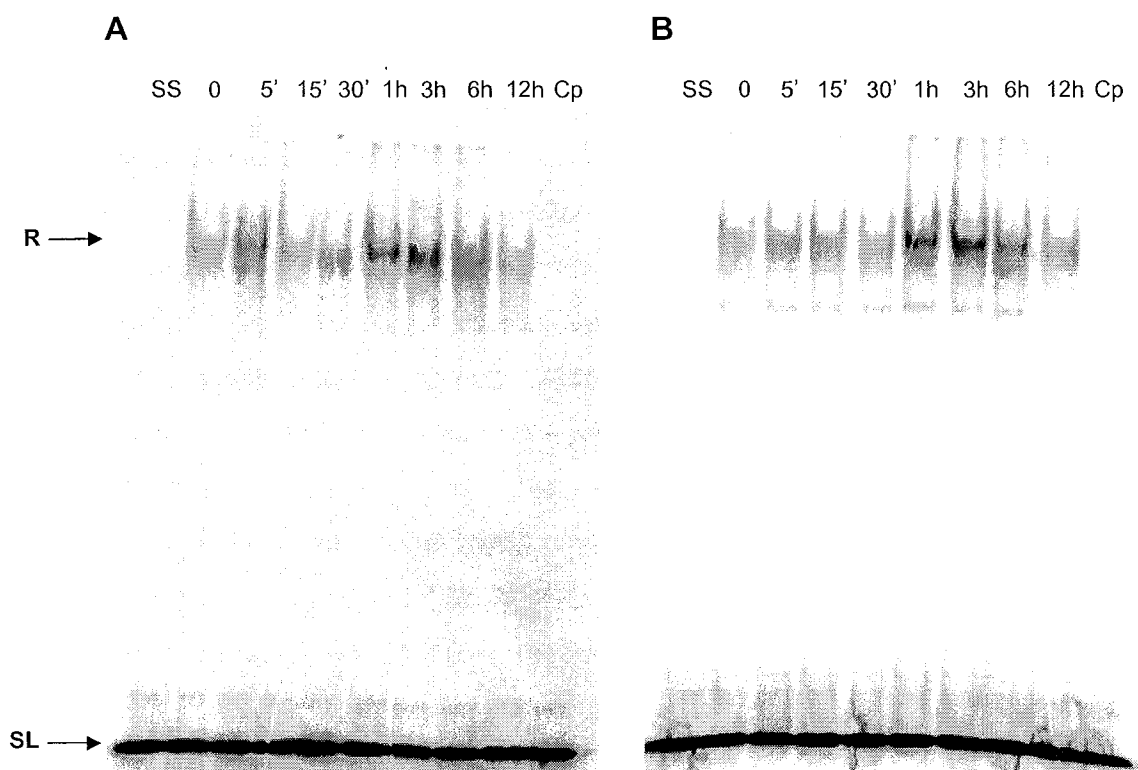
Les astrocytes sont traités, 48h après transfection, pendant 15 min avec 5  $\mu$ M de ménadione avec ou sans prétraitement à la NAC (500  $\mu$ M, 15 min). Le rapport GFP/ $\beta$ -galactosidase est mesuré 24h après traitement (Figure 38). Une augmentation de l'expression de la GFP (+80%) est alors observée. De plus, un prétraitement anti-oxydant est suffisant pour empêcher l'augmentation de l'expression de la GFP.



**Figure 38.** Analyse de l'expression de la GFP 24h après exposition à la ménadione

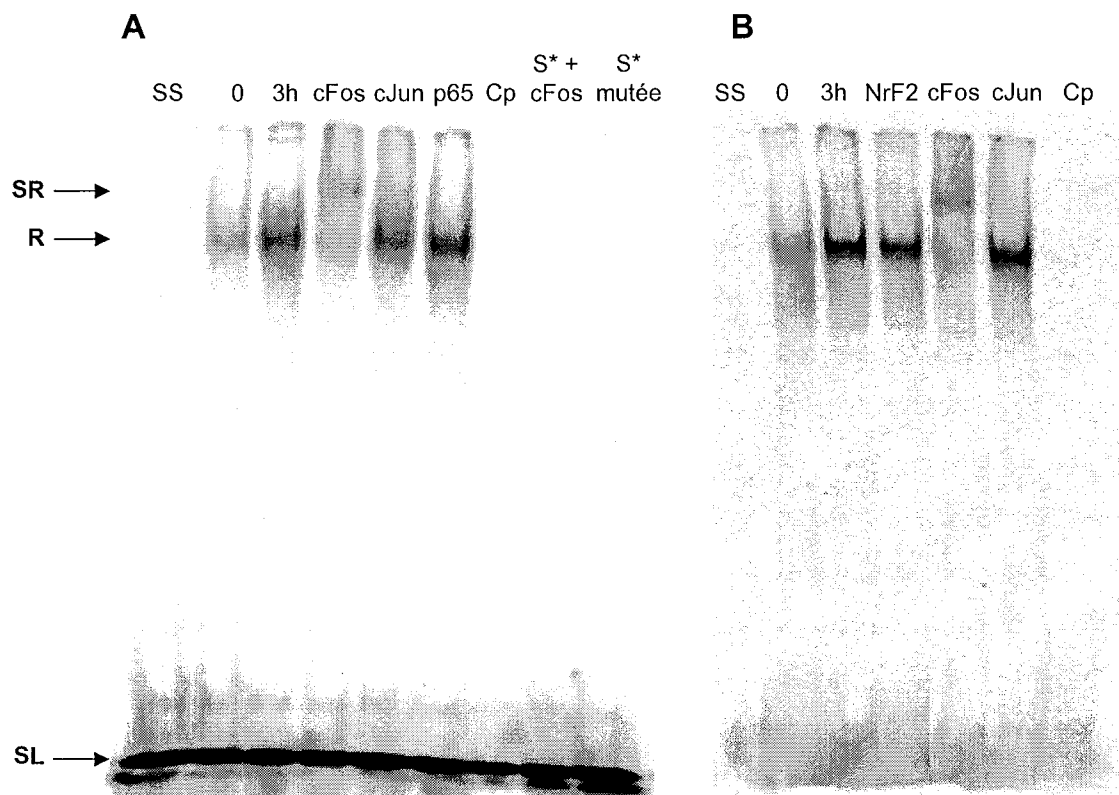
### 7.3 - Activation du facteur AP-1 dans les astrocytes exposés à la ménadione

Par la technique de gel retard, nous avons montré la fixation de protéines nucléaires, extraites en fonction du temps après traitement à la ménadione, sur les sondes AP-1 et NrF2 (Figure 39).



**Figure 39.** Cinétiques de fixation de protéines nucléaires sur les sondes AP-1 (A) et NrF2 (B) (Cp : compétition avec 100 fois plus de sonde non radiomarquée ; R : retard ; SL : sonde libre ; SS : sonde seule)

Les résultats montrent une fixation de protéines nucléaires astrocytaires sur les 2 sondes dès 5 min après exposition à la ménadione. La fixation maximale est observée à 3h après traitement puis diminue avec le temps. Ces protéines ont ensuite été identifiées par l'utilisation d'anticorps (Figure 40).



**Figure 40.** Activation d'AP-1 dans les astrocytes exposés à la ménadione (A : sonde AP-1, B : sonde Nrf2) - (Cp : compétition avec 100 fois plus de sonde non radiomarquée ; R : retard ; S\* : sonde radiomarquée ; SL : sonde libre ; SR : super-retard ; SS : sonde seule)

L'anticorps anti-cFos, contrairement à l'anti-cJun, se fixe sur le complexe protéine-sonde AP-1 (Figure 40A) et le retarde. L'essai faisant intervenir la sonde radiomarquée (S\*) et l'anticorps anti-cFos permet de confirmer que le super-retard observé avec l'anticorps est spécifique de la fixation de ce dernier sur le complexe protéine-sonde. De plus, la mutation de la sonde empêche la fixation de protéines nucléaires sur celle-ci. L'anticorps anti-Nrf2 (Figure 40B) ne retarde pas le complexe protéine-sonde Nrf2. En revanche, l'utilisation de l'anticorps anti-cFos se fixe sur ce complexe et le retarde.



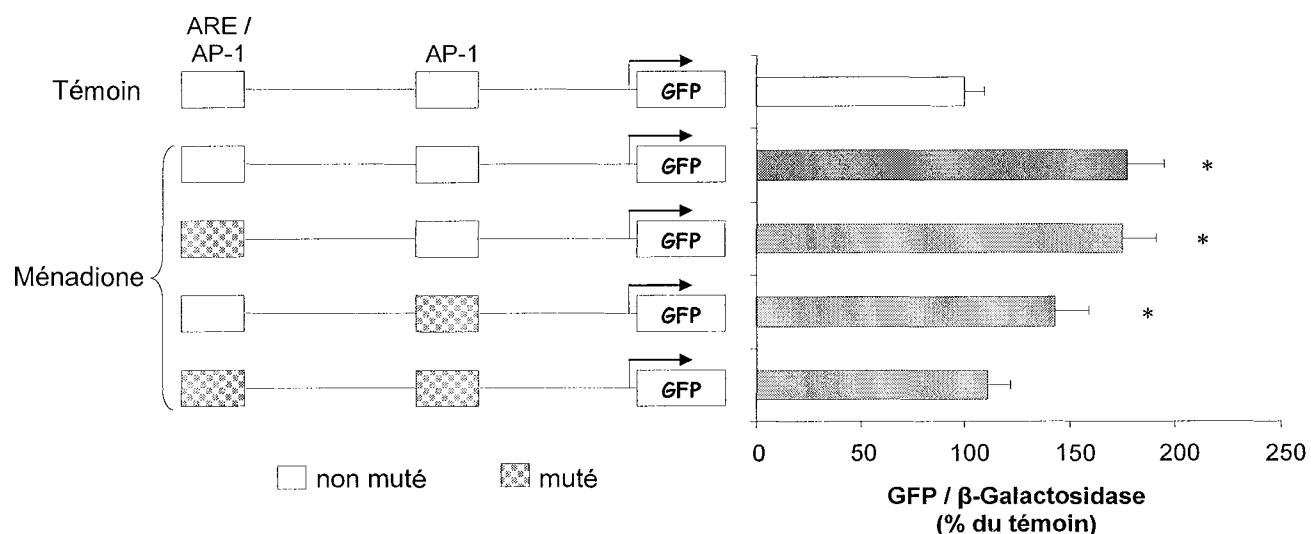
Un prétraitement anti-oxydant avec la NAC, avant exposition à la ménadione, permet d'inhiber l'activation du facteur de transcription AP-1 dans nos cultures astrocytaires et empêche sa fixation sur la sonde AP-1 (Figure 41).



**Figure 41.** Inactivation du complexe AP-1 par un prétraitement anti-oxydant (NAC) (Cp : compétition avec 100 fois plus de sonde non radiomarquée ; R : retard ; SL : sonde libre ; SS : sonde seule)

#### 7.4 - Implication d'éléments de réponse présents sur le promoteur de l'UGT1A6

Les astrocytes sont traités, 48h après transfection avec les différents plasmides, pendant 15 min avec 5  $\mu$ M de ménadione. Le rapport GFP/ $\beta$ -galactosidase est mesuré 24h après traitement (Figure 42). La mutation du site ARE, qui est également un site AP-1, correspondant à la région - 933 à - 925 du promoteur, n'entraîne pas de diminution de l'expression de la GFP (+ 80%). En revanche, une mutation du site AP-1, correspondant à la région - 460 à - 454 du promoteur, diminue de moitié l'expression de la GFP (+ 40%). Une double mutation bloque totalement l'augmentation de l'expression de la GFP induite par le traitement à la ménadione.



**Figure 42.** Implication des sites AP-1 présents sur le promoteur de l'UGT1A6 (AP-1 : *Activator Protein-1*; ARE : *Antioxidant Response Element*)

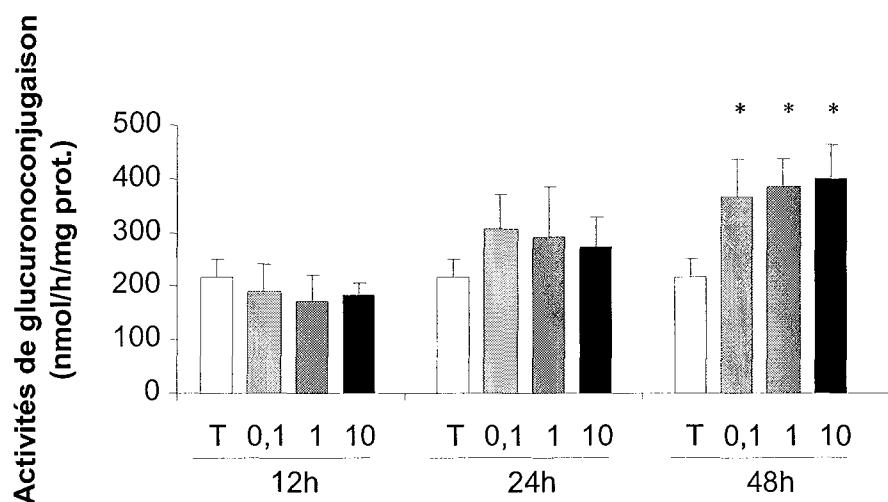
## C - Influence de conditions inflammatoires sur la glucuroconjugaison

### 1 - Analyse de la viabilité cellulaire

Les traitements pro-inflammatoires (LPS, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ), réalisés dans cette étude, n'entraînent pas de modification de la viabilité cellulaire sur nos cultures astrocytaires ou sur les lignées cellulaires V79. De plus, dans nos conditions, les co-traitements appliqués sur les cellules ne sont également pas toxiques.

### 2 - Mesure de la glucuroconjugaison

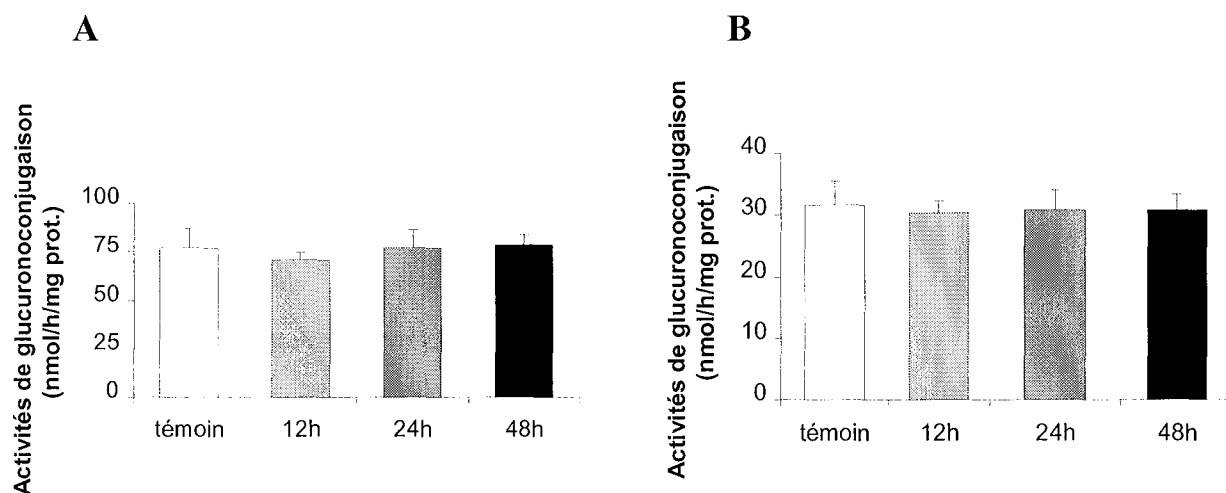
La glucuroconjugaison est mesurée, au niveau astrocytaire, après 12h, 24h et 48h de traitement au LPS (0,1, 1 et 10  $\mu$ g/ml) (Figure 43). La 4-méthylombélliférone est utilisée comme substrat de la réaction.



**Figure 43.** Mesure des activités astrocytaires de glucuronoconjugaison suite à une exposition au LPS

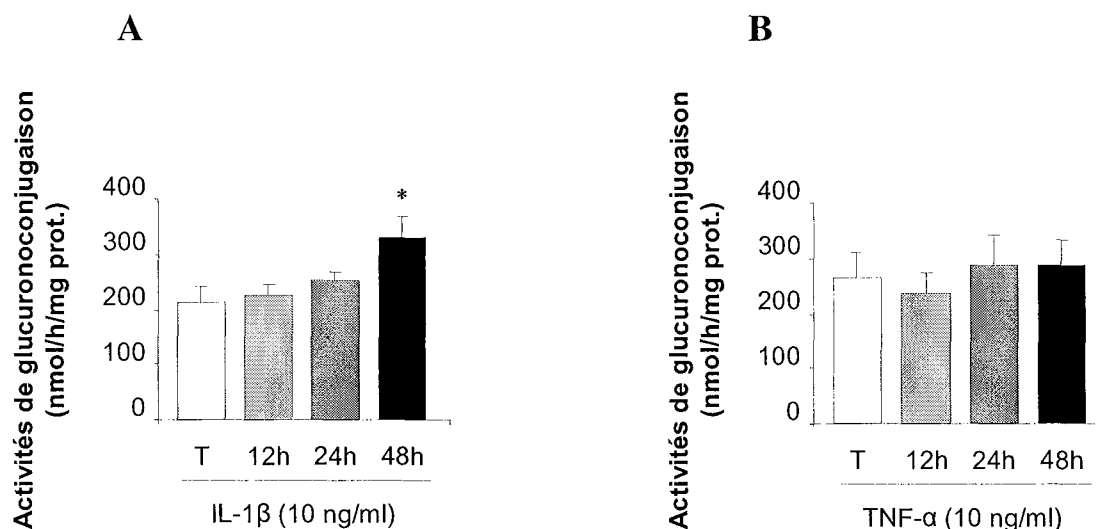
La glucuronoconjugaison astrocytaire n'est pas modifiée à 12h et 24h de traitement au LPS et ceci quelle que soit la dose utilisée. Cependant à 48h de traitement, le LPS augmente significativement la glucuronoconjugaison (+ 84%) dès la dose de 0,1 µg/ml. Une réponse identique est observée pour les doses de 1 et 10 µg/ml.

Nous avons ensuite vérifié les conséquences d'un traitement au LPS (1 µg/ml) sur la glucuronoconjugaison de la 4-MO au niveau des lignées cellulaires V79-1A6 et V79-2B1 (Figure 44). Ainsi, un traitement à la dose de 1 µg/ml de LPS pendant 12, 24 ou 48h ne modifie pas l'activité enzymatique mesurée dans les V79-1A6 (Figure 44A) et les V79-2B1 (Figure 44B).



**Figure 44.** Mesure des activités de glucuronoconjugaison au niveau des lignées cellulaires V79 suite à une exposition au LPS (1 µg/ml)

L'action de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) a également été évaluée à 12h, 24h et 48h d'exposition, sur nos cultures astrocytaires à la dose unique de 10 ng/ml (Figure 45).



**Figure 45.** Mesure des activités astrocytaires de glucuroconjugaison suite à une exposition à l'IL-1 $\beta$  et au TNF- $\alpha$

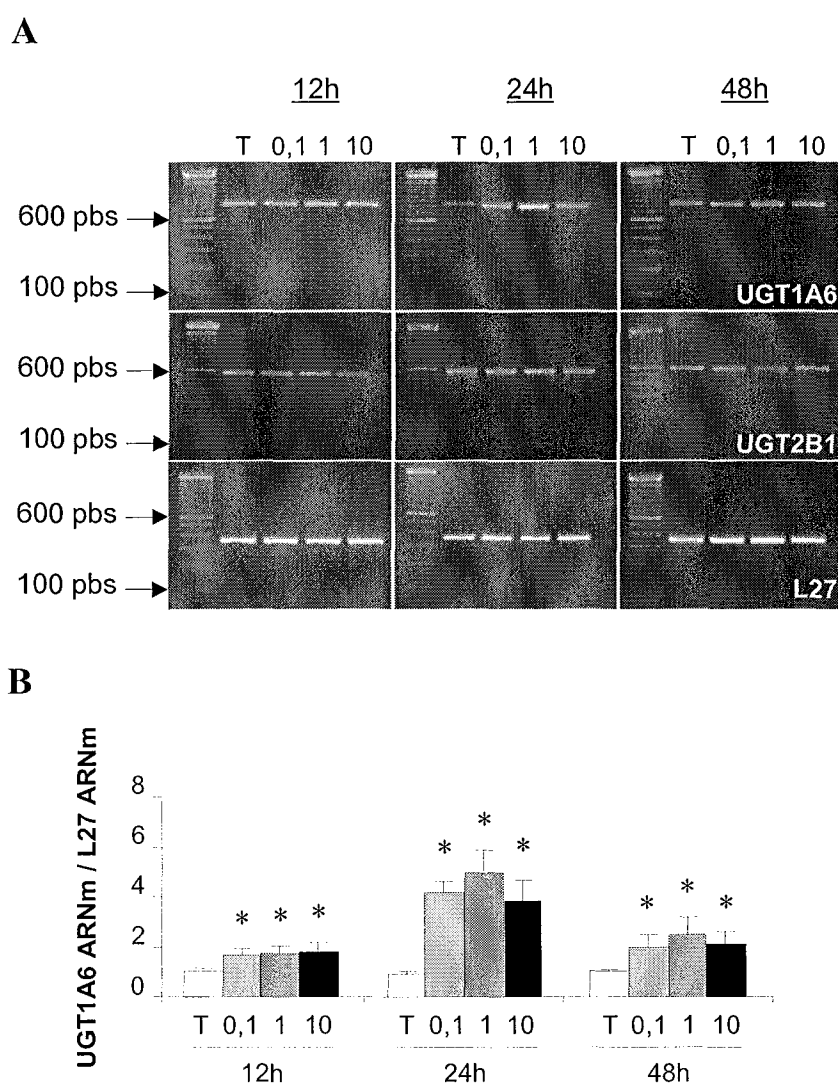
Un traitement avec de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) ne modifie pas les activités de glucuroconjugaison à 12h et 24h de traitement (Figure 45A). Ce n'est qu'à 48h d'exposition que l'on observe une augmentation de l'activité enzymatique (+ 41%). De plus, dans nos conditions, le TNF- $\alpha$  ne modifie pas la glucuroconjugaison (Figure 45B).

### 3 - Expression des UGT1A6 et 2B1

#### 3.1 - Traitement au LPS

L'expression des isoformes UGT1A6 et 2B1, en fonction du temps de traitement au LPS sur nos cultures astrocytaires, est représentée en Figure 46. A partir de 12h de traitement, on observe une augmentation significative de l'expression de l'UGT1A6 (x 1,6) ; la plus forte augmentation d'expression de cette isoforme étant visible au temps 24h (x 3,8). A un degré moindre, on visualise toujours cette augmentation d'expression à 48h de traitement (x 2,2). De plus, pour un même temps de traitement, aucun effet dose n'est observé.

Pour l'UGT2B1, aucune modification de son expression n'a pu être mise en évidence dans ces conditions de traitement.

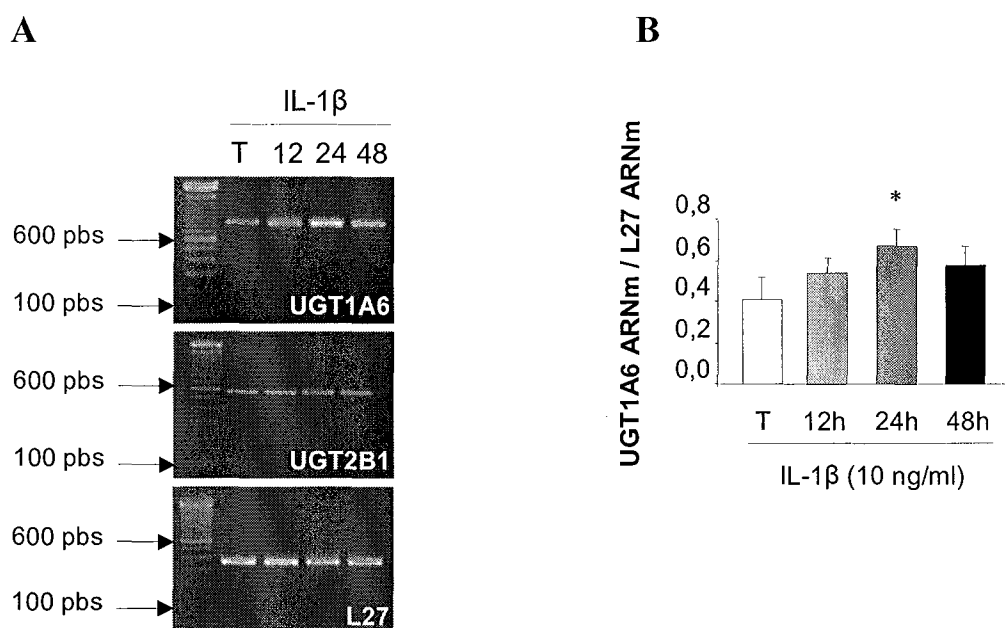


**Figure 46.** Expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires lors d'une exposition au LPS

### 3.2 - Traitement aux cytokines pro-inflammatoires

#### 3.2.1 - Exposition à l'IL-1 $\beta$

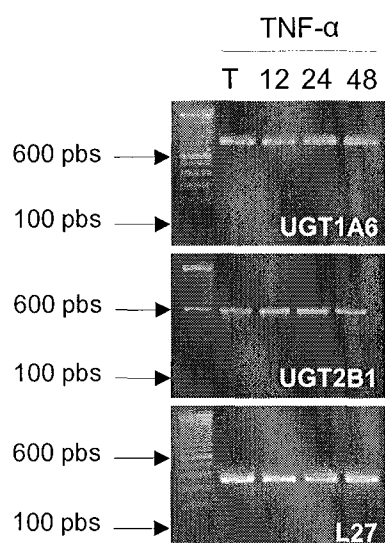
Un traitement de 24h à l'IL-1 $\beta$  (Figure 47) augmente l'expression de l'UGT1A6 (x 1,6). Cependant, après 12h ou 48h d'exposition, aucune modification significative de l'expression de l'UGT1A6 n'est observée. Comme précédemment avec un traitement au LPS, l'expression de l'UGT2B1 n'est pas modifiée par l'IL-1 $\beta$ .



**Figure 47.** Expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires lors d'une exposition à l'IL-1 $\beta$

### 3.2.2 - Exposition au TNF- $\alpha$

Dans nos conditions expérimentales, le TNF- $\alpha$  ne provoque aucune modification de l'expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires (Figure 48) à 12, 24 et 48h d'exposition.



**Figure 48.** Expression des UGT1A6 et 2B1 astrocytaires lors d'une exposition au TNF- $\alpha$

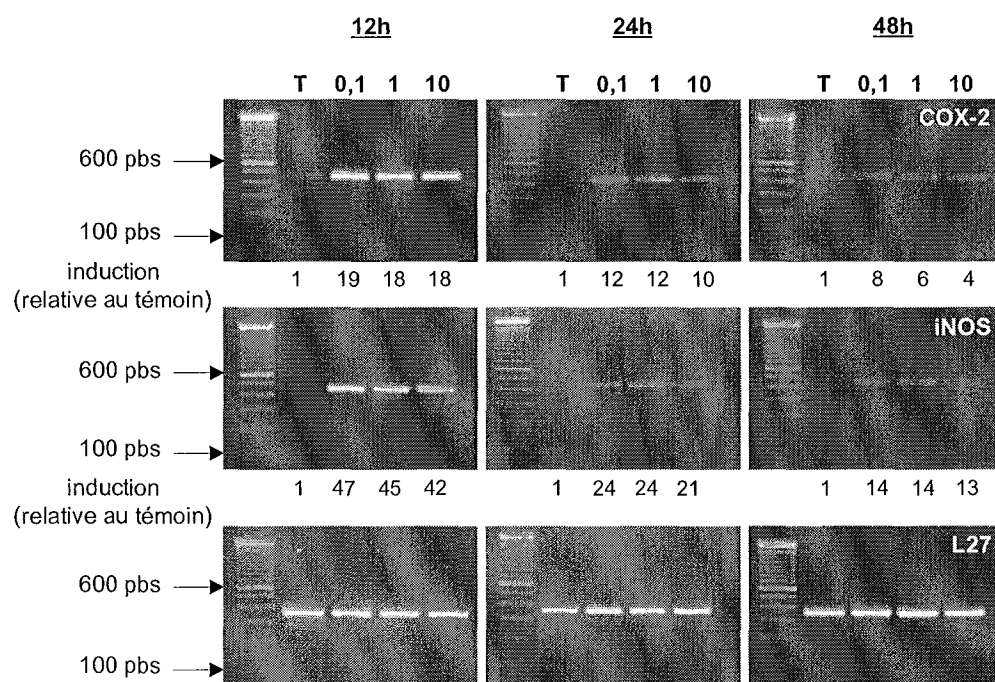
#### 4 - Production de médiateurs pro-inflammatoires

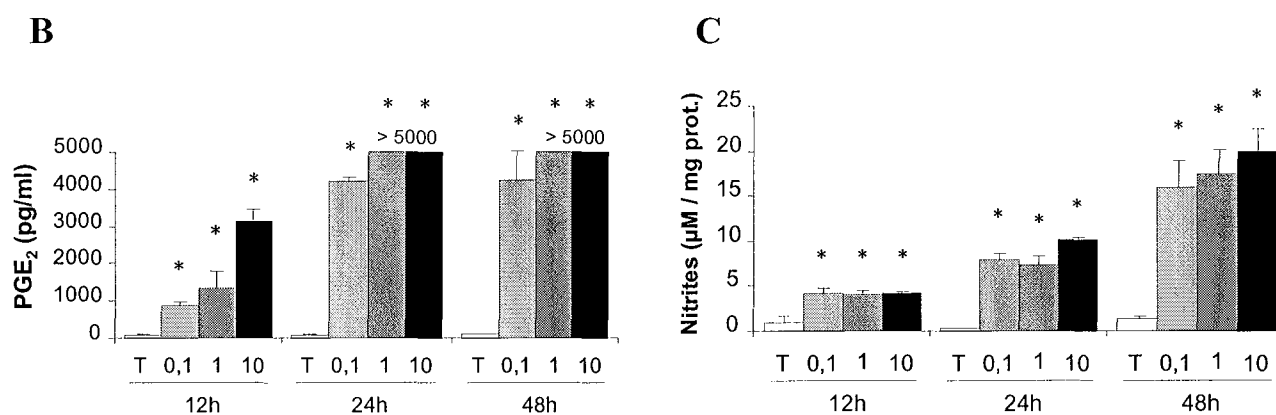
Dans les trois modèles pro-inflammatoires (LPS, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ), nous avons évalué l'expression de 2 gènes pro-inflammatoires que sont COX-2 et iNOS ainsi que la production de leurs médiateurs respectifs, les PGE<sub>2</sub> et le monoxyde d'azote.

##### 4.1 - Traitement au LPS

Après migration sur gel d'agarose, on note qu'un traitement au LPS induit fortement COX-2 mais également iNOS (Figure 49A) dès la plus faible dose (0,1  $\mu$ g/ml). Plus le temps de traitement augmente plus l'induction de ces 2 gènes diminue. Néanmoins, l'induction de COX-2 et d'iNOS est toujours visualisable après 48h d'exposition. De plus, aucun effet dose n'est observé au cours du temps. Parallèlement à l'induction de ces 2 gènes, les productions de PGE<sub>2</sub> (Figure 49B) et de monoxyde d'azote (Figure 49C) augmentent au cours du temps. Dès 12h de traitement, on observe une augmentation de la production de ces 2 médiateurs. Cette production est maximale à partir de 48h de traitement.

A





**Figure 49.** Induction d'iNOS, COX-2 et production des médiateurs lors d'une exposition au LPS

Au cours des traitements au LPS, on observe également une augmentation de la production d'EAO dans nos cultures astrocytaires (Tableau 10). Cette production est dose-indépendante et uniquement observable après 12h d'exposition au LPS. En effet, pour des traitements plus longs, la quantité d'EAO produite est identique à ce que l'on retrouve chez les témoins.

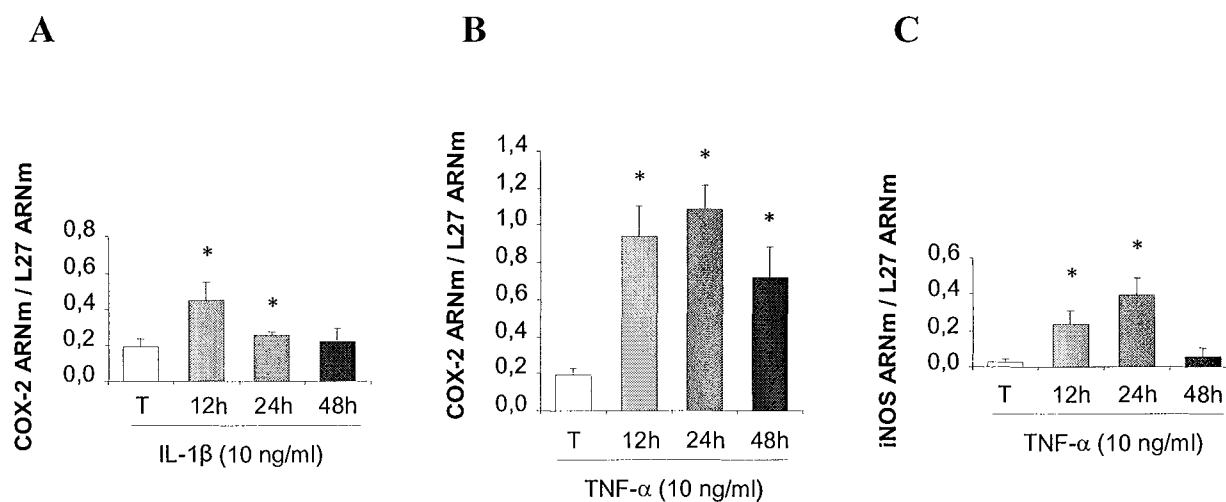
	12h	24h	48h
témoin (%)	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5
0,1 µg/ml	125 ± 7*	103 ± 6	101 ± 3
1 µg/ml	131 ± 7*	98 ± 5	103 ± 5
10 µg/ml	135 ± 6*	103 ± 8	99 ± 6

**Tableau 10.** Production d'EAO lors d'une exposition des cultures d'astrocytes au LPS

#### 4.2 - Traitement aux cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires induisent les gènes COX-2 et/ou iNOS (Figure 50). L'IL-1β induit COX-2 dès 12h de traitement (Figure 50A). Cette induction diminue au cours du temps et disparaît à 48h. En revanche, aucune induction d'iNOS n'a été observée suite à un traitement par cette cytokine. Quant au traitement au TNF-α, COX-2 mais également iNOS (respectivement Figure 50B et 50C) sont induits par cette cytokine dès 12h. L'induction, observée pour ces 2 gènes, est toujours présente à 24h de traitement ; les intensités sont identiques à celles observées à 12h. A 48h, l'induction de COX-2 est plus faible que celle observée à 24h, alors que l'expression d'iNOS retourne au niveau d'expression des témoins.

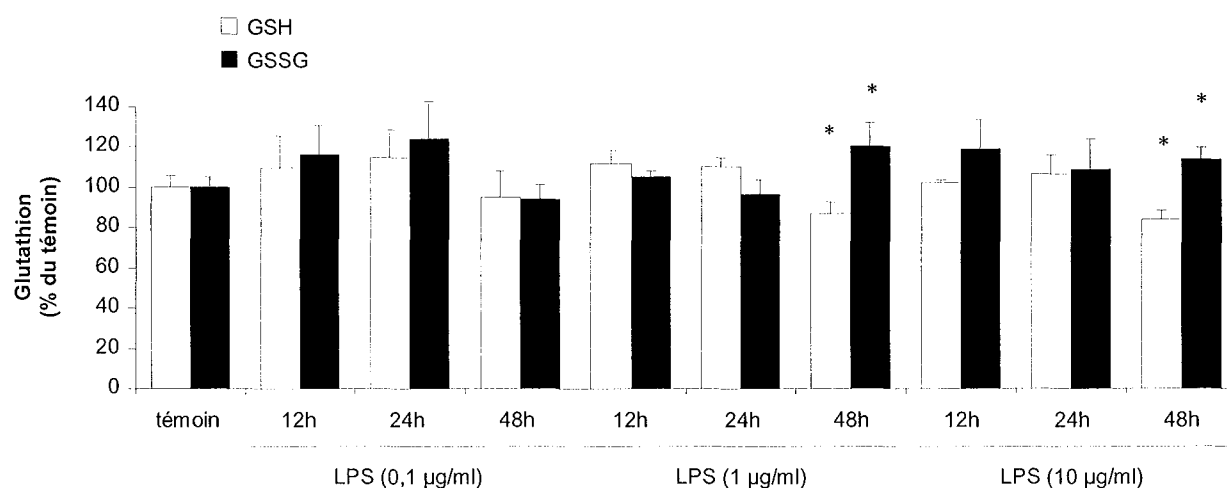




**Figure 50.** Induction d'iNOS et COX-2 lors d'une exposition à l'IL-1β et au TNF-α

### 5 - Mesure des taux de glutathion après traitement au LPS

Les taux de glutathion sont évalués à la suite des différents traitements en LPS. Comme le montre la Figure 51, aucune modification des taux intracellulaires en GSH et GSSG n'est observée pour une dose de LPS de 0,1 µg/ml. Pour les doses de 1 et 10 µg/ml, des variations sont visibles uniquement pour un temps d'exposition de 48h. Ainsi, les taux de GSH diminuent de 13% et 17% pour respectivement des traitements de 1 et 10 µg/ml. De plus, on observe une augmentation des taux de GSSG de l'ordre de 20% pour la dose de 1 µg/ml et 14% pour la dose de 10 µg/ml.

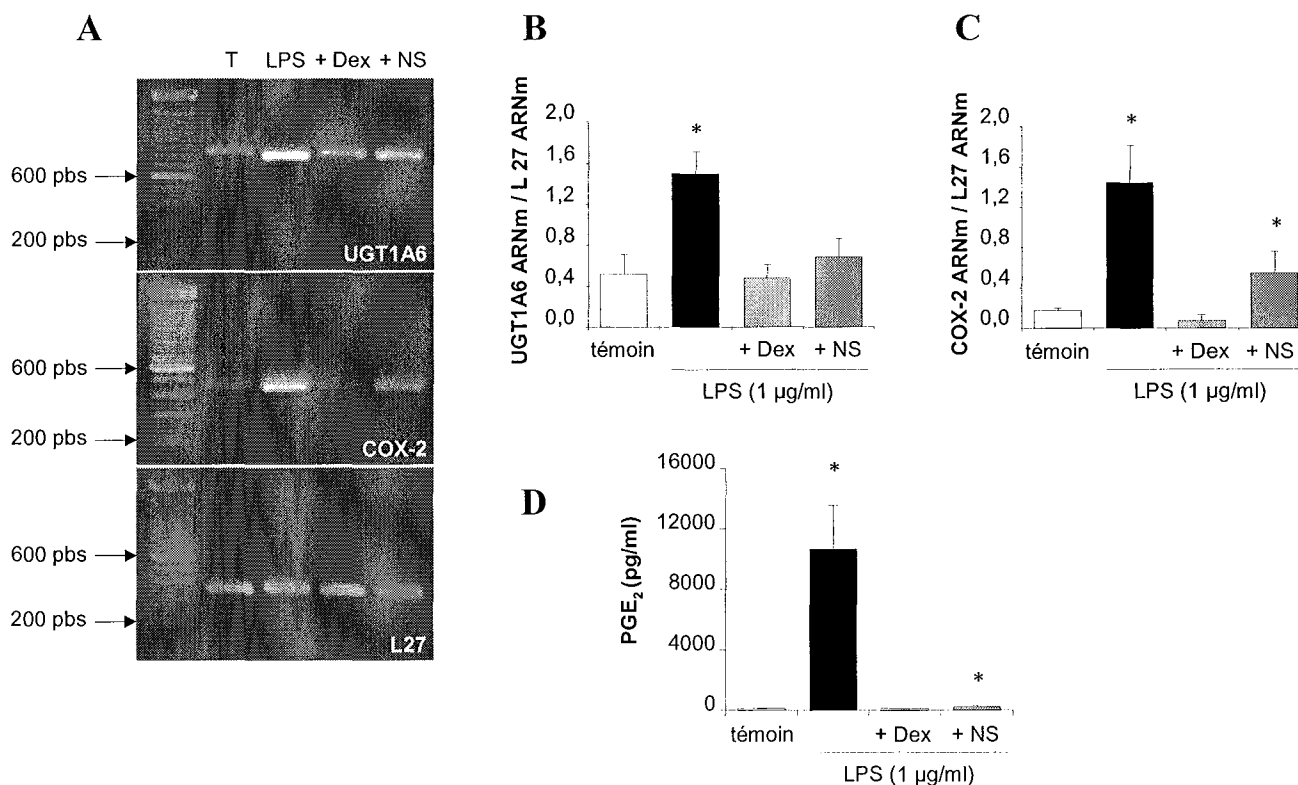


**Figure 51.** Mesure des taux de GSH et GSSG après traitement au LPS

## 6 - Influence de différents inhibiteurs sur la surexpression de l'UGT1A6 induite par le LPS

### 6.1 - Effets d'anti-inflammatoires

Pour le reste de l'étude, nous nous sommes placés dans des conditions de traitement en LPS pour lesquelles nous observons une surexpression maximale de l'UGT1A6 soit une dose de 1 µg/ml pendant 24h (Figure 46). Dans ces conditions, la dexaméthasone (anti-inflammatoire stéroïdien) et le NS398 (AINS) sont capables d'inhiber totalement l'augmentation d'expression induite par ce traitement au LPS (Figure 52A et 52B). La dexaméthasone inhibe totalement l'induction de COX-2 (Figure 52C) ce qui a pour conséquence de bloquer la production de PGE<sub>2</sub> (Figure 52D). Le NS398 diminue partiellement l'induction de COX-2 (induction divisée par 3) et très fortement la production de PGE<sub>2</sub>.



**Figure 52.** Blocage de la surexpression de l'UGT1A6 par des traitements anti-inflammatoires (Dex : dexaméthasone ; NS : NS398)

6.2 - Effets d'inhibiteurs de NO synthases

L'utilisation d'analogues de l'arginine empêche la surexpression de l'isoforme UGT1A6 suite à un traitement LPS (1 µg/ml, 24h) (Figure 53A et 53B). Ces deux analogues, le L-NAME et le L-NMMA, diminuent la production de NO respectivement d'un facteur 4,5 et 4 (Figure 53C) mais également l'induction d'iNOS (Figure 53D) respectivement d'un facteur 3,6 et 2,4.

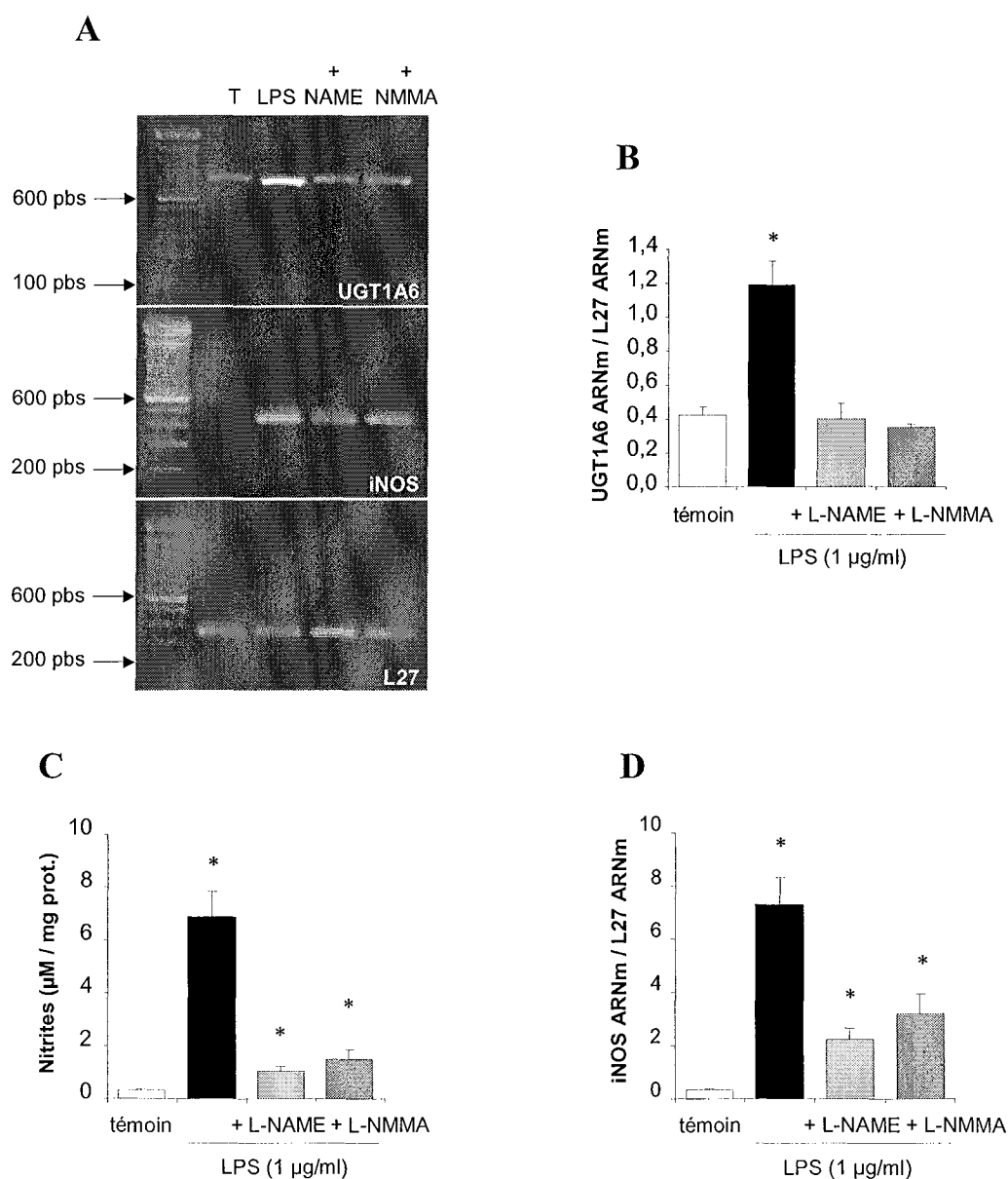
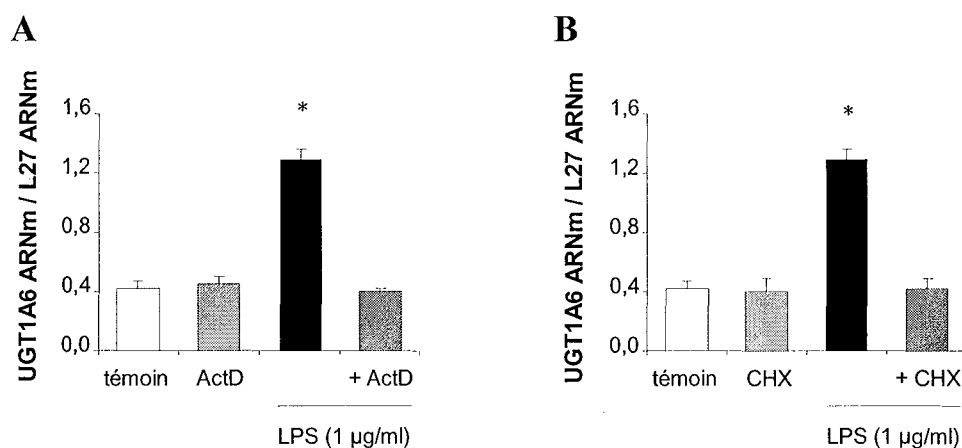


Figure 53. Blocage de la surexpression de l'UGT1A6 par des inhibiteurs de NOS

## 7 - Tentatives d'explication du mécanisme de surexpression de l'UGT1A6 induite par le LPS

### 7.1 - Implication d'un mécanisme transcriptionnel et/ou traductionnel ?

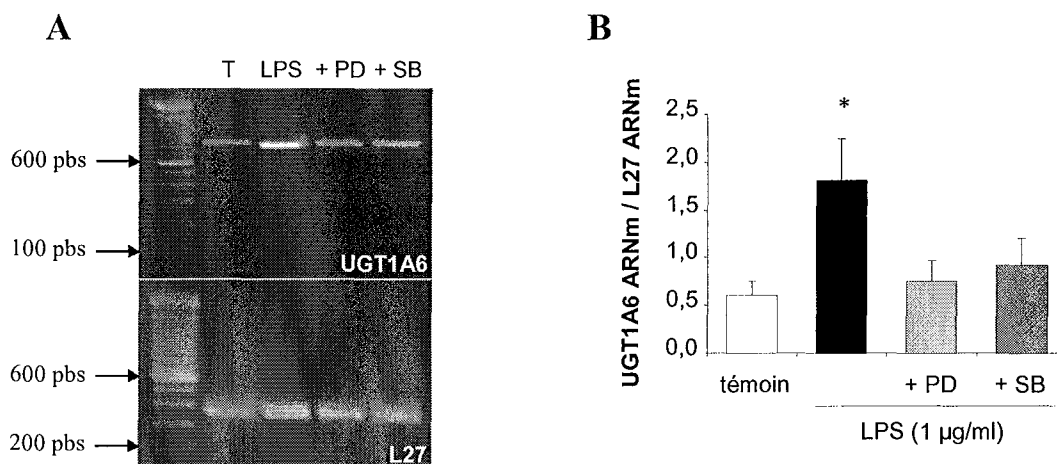


**Figure 54.** Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'expression de l'UGT1A6 (ActD : actinomycine D ; CHX : cycloheximide)

Un prétraitement de nos cultures astrocytaires avec de l'actinomycine D (inhibiteur de la synthèse d'ARN ; Figure 54A), ou de la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique ; Figure 54B) n'affecte pas l'expression basale de l'UGT1A6 alors qu'il supprime, dans les deux cas, la surexpression de cette isoforme engendrée par le LPS.

### 7.2 - Rôles des MAP kinases ?

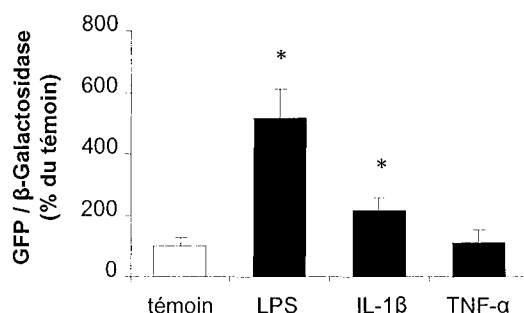
Des inhibiteurs spécifiques de MAP kinases ont été utilisés lors de co-traitement des cultures astrocytaires avec le LPS (1 µg/ml, 24h). Les résultats obtenus par RT-PCR montrent que le PD98059 (inhibiteur de ERK, 30 µM) et le SB203580 (inhibiteur de p38, 10 µM) suppriment totalement l'effet du LPS sur l'expression de l'UGT1A6 (Figure 55).



**Figure 55.** Effets d'inhibiteurs de MAPK (PD : PD98059 ; SB : SB203580)

### 7.3 - Régulation de l'expression de l'UGT1A6 après traitement au LPS

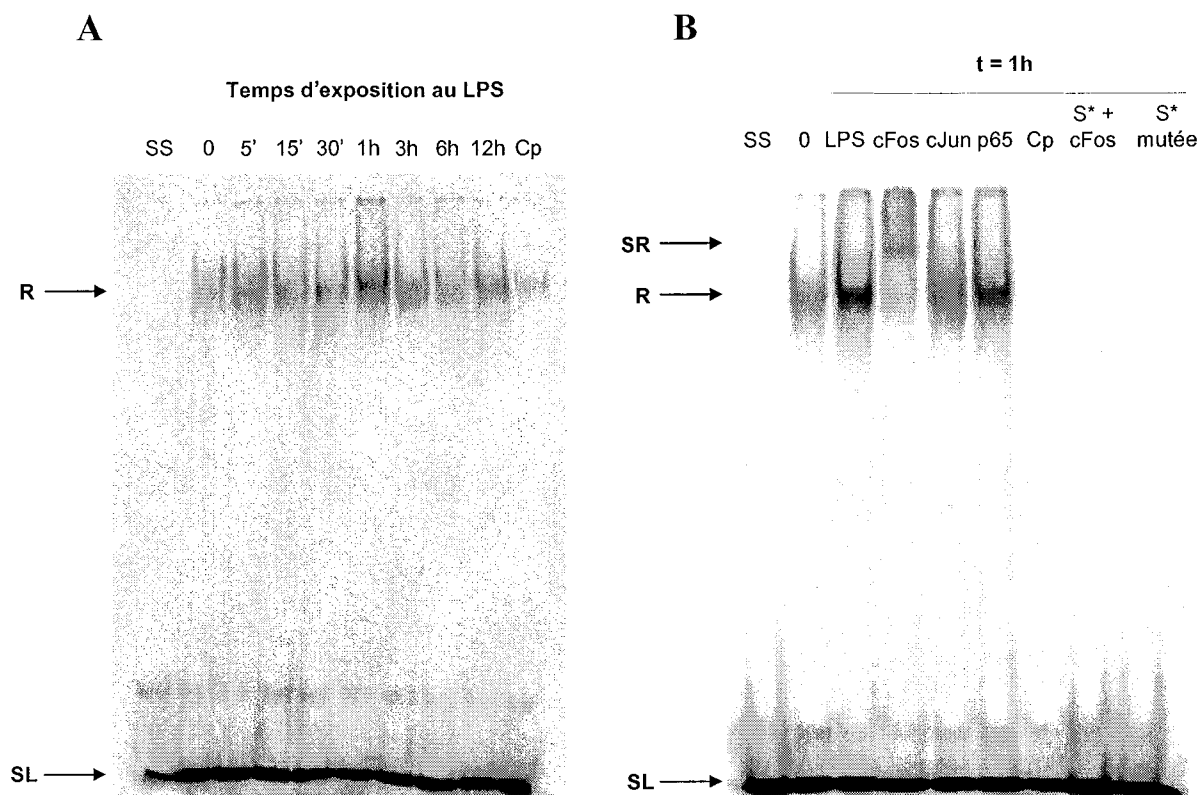
Le rapport GFP/ $\beta$ -Galactosidase (Figure 56) a été établi, par transfection transitoire de nos cultures astrocytaires, après traitement au LPS (1  $\mu$ g/ml, 24h), à l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24h) ou au TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 24h). Les résultats montrent que l'expression de la GFP, mesurée dans ces conditions, est augmentée suite à l'exposition au LPS (x 5,2) ou à l'IL-1 $\beta$  (x 2). L'expression de la GFP reste inchangée après une exposition au TNF- $\alpha$ .



**Figure 56.** Augmentation de l'expression de la GFP suite au traitement au LPS et à l'IL-1 $\beta$

### 7.4 - Activation du facteur AP-1 dans les astrocytes exposés au LPS

Les résultats obtenus par gel retard révèlent la fixation de protéines nucléaires sur la sonde AP-1 après une exposition au LPS (Figure 57).

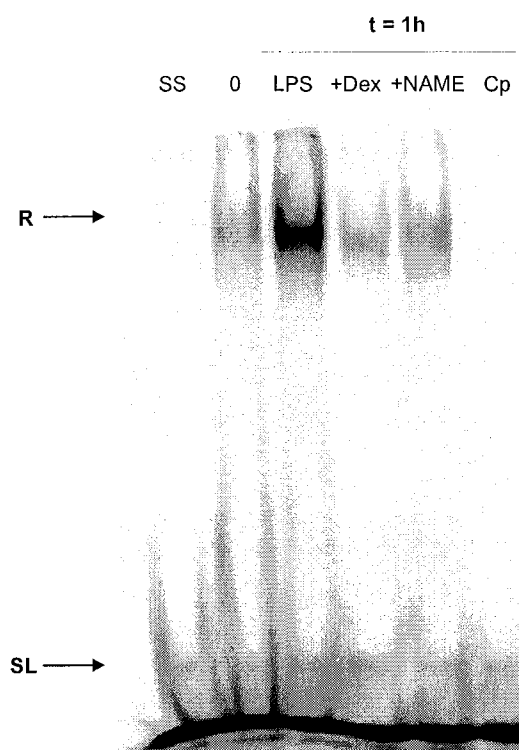


**Figure 57.** Activation d'AP-1 après traitement au LPS

(Cp : compétition avec 100 fois plus de sonde non radiomarquée, R : retard, S\* : sonde radiomarquée, SL : sonde libre, SR : super-retard, SS : sonde seule)

Ainsi, on observe une fixation de protéines nucléaires sur la sonde AP-1 dès 5 min de traitement (Figure 57A). Cette fixation augmente jusqu'à 1h d'exposition, temps pour lequel la fixation est maximale, puis diminue jusqu'à 6h et augmente à nouveau à 12h.

Par la suite, l'utilisation d'anticorps a permis d'identifier ces protéines (Figure 57B). L'anticorps anti-cFos se fixe sur le complexe protéine-sonde et le retarde davantage. Une bande de super-retard apparaît sur le gel. L'essai réalisé en incubant uniquement la sonde (S\*) et l'anticorps anti-cFos confirme la spécificité de fixation de l'anticorps sur le complexe protéine-sonde. En revanche, l'anticorps anti-cJun n'est pas capable de retarder ce complexe mais on peut cependant observer que la bande correspondante au retard est moins intense. L'utilisation d'une sonde mutée ne permet plus de visualiser la fixation de protéines nucléaires sur cette sonde.



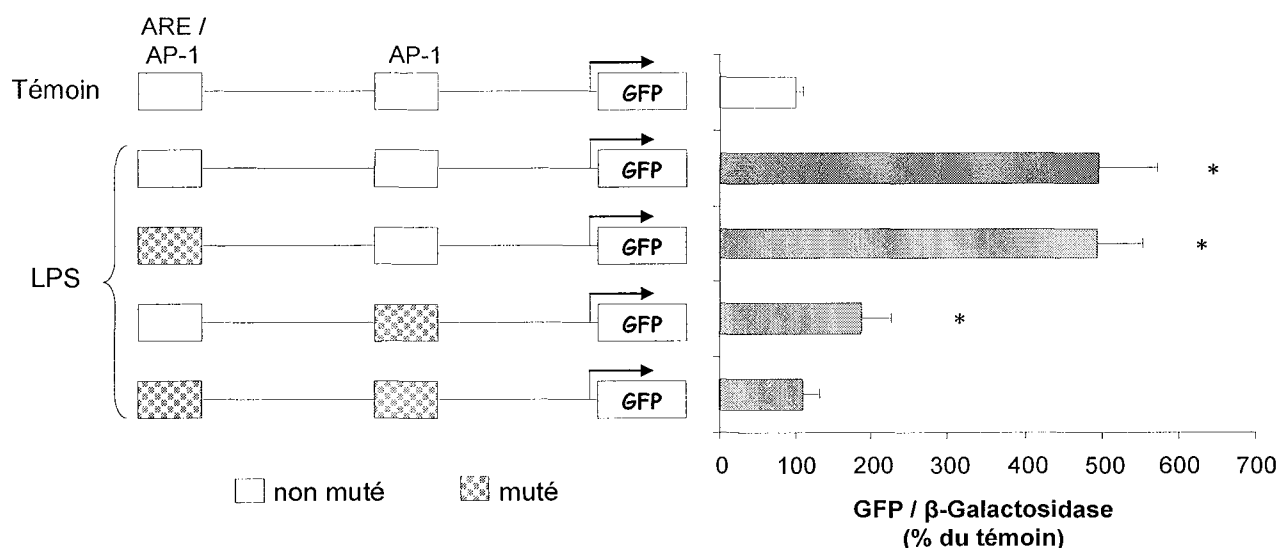
**Figure 58.** Inactivation d'AP-1 par des co-traitements

(Cp : compétition avec 100 fois plus de sonde non radiomarquée, Dex : dexaméthasone, R : retard, SL : sonde libre, SS : sonde seule)

Par rapport au traitement au LPS seul, les co-traitements réalisés avec la dexaméthasone et le L-NAME (Figure 58) diminuent la fixation des protéines nucléaires sur la sonde. De plus, l'intensité de la bande de retard, en comparaison de celle du témoin (0), est identique pour un co-traitement avec le L-NAME alors qu'elle est diminuée suite à l'utilisation de la dexaméthasone.

#### 7.5 - Implication des sites de fixation à AP-1 sur le promoteur de l'UGT1A6

Le rapport GFP/ $\beta$ -Galactosidase (Figure 59) a été établi, par transfection transitoire de nos cultures astrocytaires, après traitement au LPS (1  $\mu$ g/ml, 24h). La mutation du site ARE, qui est également un site AP-1, correspondant à la région - 933 à - 925 du promoteur, n'entraîne pas de diminution de l'expression de la GFP (x 5). En revanche, une mutation de la région - 460 à - 454 du promoteur, correspondant également à un site AP-1, diminue fortement l'expression de la GFP (x 1,9). Une double mutation bloque totalement l'augmentation de l'expression de la GFP induite par le traitement au LPS.



**Figure 59.** Implication des sites AP-1 présents sur le promoteur de l'UGT1A6 (AP-1 : Activator Protein-1 ; ARE : Antioxidant Response Element)

#### D - Analyse du métabolisme de composés endogènes

Nous avons évalué la conjugaison de composés endogènes tels que des neurostéroïdes à 18, 19 et 21 carbones (C18, C19 et C21) ainsi que d'autres composés comme la sérotonine, la T3 et la T4 (Tableau 11).

échantillons	glucuronides formés (V79-1A6)	glucuronides formés (astrocytes)
4-méthylombélliférone	++++	++++
C18		
estrone	ND	traces
estradiol	ND	traces
estriol	ND	+
16α-hydroxyestrone	ND	+
C19		
testostérone	ND	ND
dihydrotestostérone	ND	ND
androstérone	ND	ND
épiandrostérone	ND	ND
déhydroépiandrostérone	ND	ND
C21		
progestérone	ND	ND
17- hydroxyprogestérone	ND	ND
prégnénolone	ND	ND
17-hydroxyprégnénolone	ND	traces
sérotonine	++	+
triiodo-L- thyronine (T3)	ND	traces
tétraiodo-L-thyronine (T4)	ND	traces

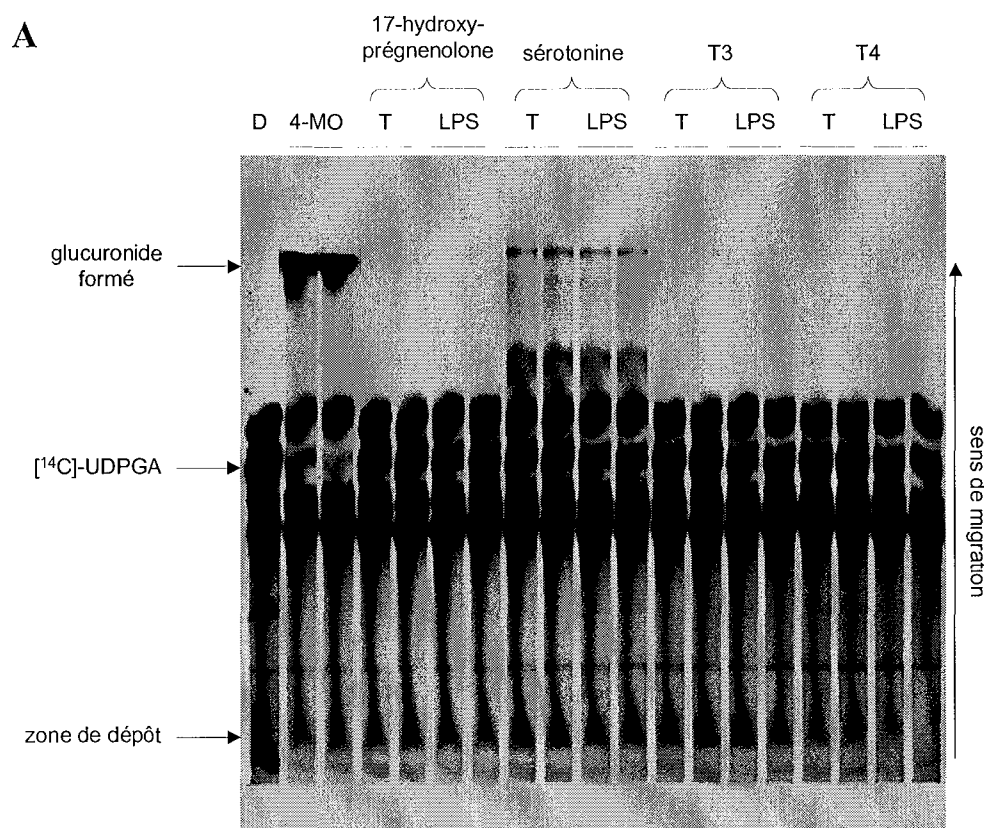
**Tableau 11.** Récapitulatif du métabolisme de composés endogènes par CCM



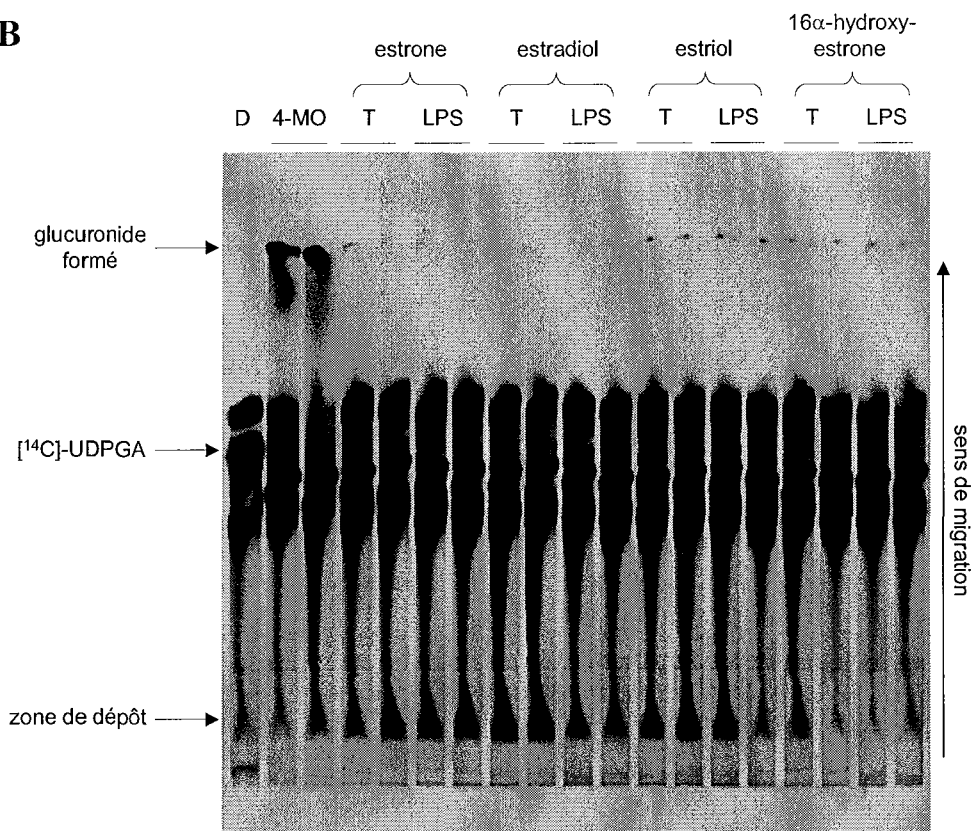
Les résultats, obtenus après chromatographie sur couche mince et autoradiographie, montrent que peu de substrats sont métabolisés au niveau des V79-1A6. En effet, dans la liste des substrats choisis, en plus du témoin (4-MO), seule la sérotonine est glucuroconjuguée par l'isoforme UGT1A6 (Figure 60A). Cependant, le métabolisme de la sérotonine se révèle être beaucoup moins important que celui de la 4-MO.

Aucune modification de la glucuroconjugaison de la sérotonine n'est visible suite au traitement LPS ; les bandes correspondantes aux glucuronides sont d'intensité égale.

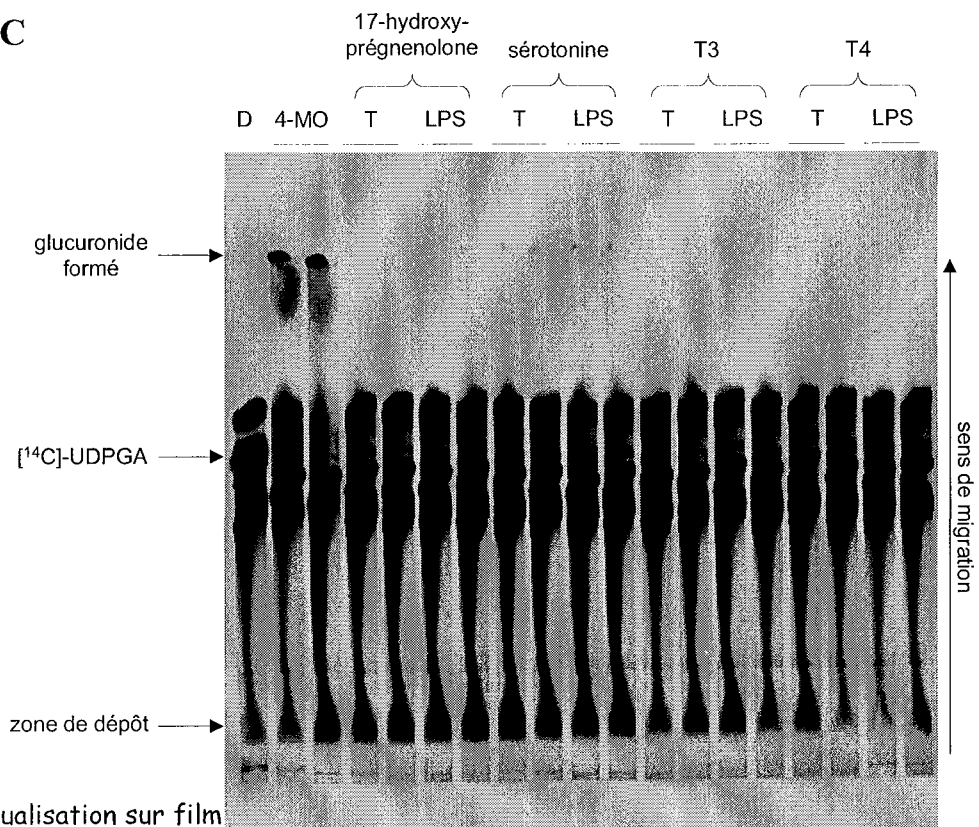
Au niveau astrocytaire, un nombre plus important de substrats sont métabolisés. Cependant, la glucuroconjugaison de ces molécules (Figure 60B et 60C) s'avère être très inférieure à celle du substrat témoin (4-MO). On observe ainsi la formation de traces de glucuronides d'estrone, d'estradiol, de 17-hydroxyprégnénolone, de triiodo-L- thyronine (T3) et de tétraiodo-L- thyronine (T4). Les composés comme l'estriol, le 16 $\alpha$ -hydroxyestrone et la sérotonine sont quant à eux davantage métabolisés. Dans ces cellules astrocytaires, aucune activité de glucuroconjugaison n'est observée pour les composés en C19 et pour les  $\frac{3}{4}$  des composés en C21. De plus, aucune modification de la glucuroconjugaison ne peut être décelée suite au traitement LPS, excepté pour la sérotonine dont les bandes de migration des métabolites semblent légèrement plus intenses que celles des témoins.



**B**



**C**

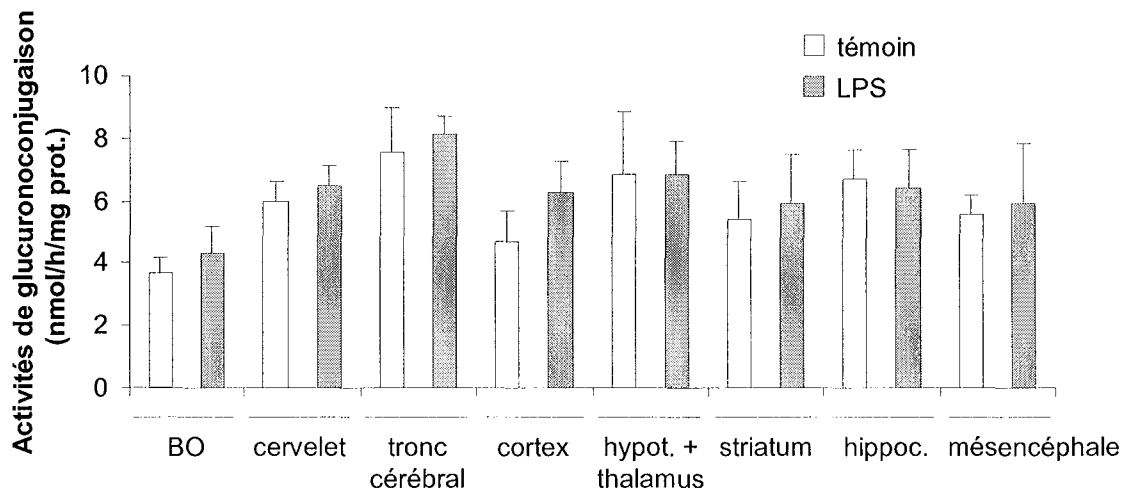


**Figure 60.** Visualisation sur film (A : microsomes de V79-1A6, B et C : microsomes d'astrocytes) - (D : témoin DMSO ; LPS : cellules traitées au LPS (1  $\mu$ g/ml, 48h) ; T : cellules non traitées au LPS)

## Etude *in vivo*

### 1 - Mesure de la glucuroconjugaison

La glucuroconjugaison vis-à-vis de la 4-MO est mesurée dans les différentes zones cérébrales 48h après injection de LPS (2 mg/kg) par voie intrapéritonéale (Figure 61).



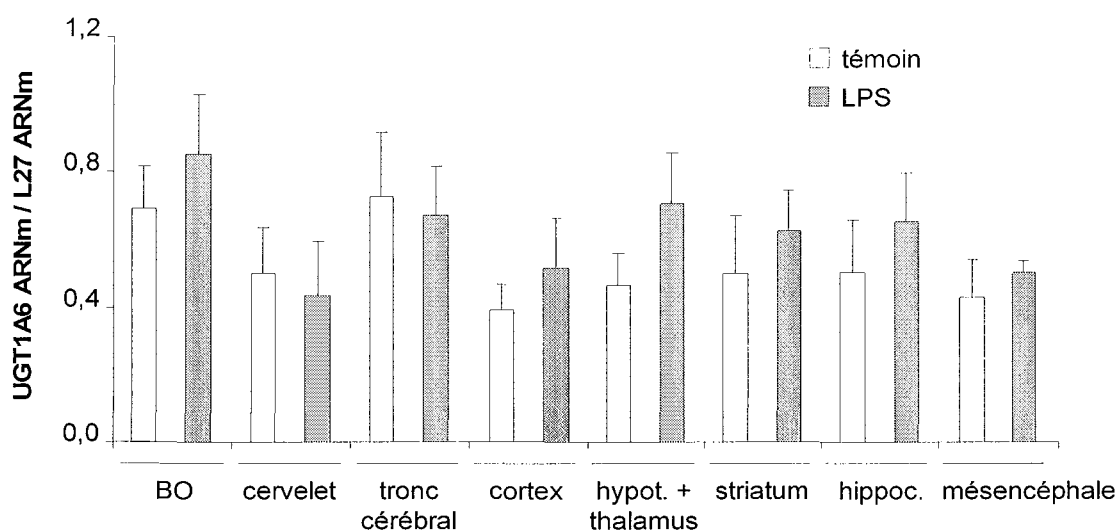
**Figure 61.** Mesure des activités de glucuroconjugaison dans les différentes zones cérébrales (BO : bulbes olfactifs ; hippoc. : hippocampe ; hypot. : hypothalamus)

Tout d'abord, il est important de noter que les activités de glucuroconjugaison *in vivo* sont présentes dans les différentes zones cérébrales étudiées mais sont très inférieures à celles mesurées précédemment à partir de cultures primaires d'astrocytes.

On observe des différences d'activités en fonction de la zone étudiée. L'activité de glucuroconjugaison la plus importante est mesurée au niveau du tronc cérébral ( $7,5 \pm 1,5$  nmoles/h/mg de protéines) alors que la plus faible est mesurée au niveau des bulbes olfactifs ( $3,7 \pm 0,6$  nmoles/h/mg de protéines). Les activités de glucuroconjugaison mesurées dans les autres régions cérébrales oscillent entre 4,7 et 6,9 nmoles/h/mg de protéines. Une administration de LPS a tendance à augmenter cette activité enzymatique, dans la plupart des régions, mais d'une manière non significative.

### 2 - Expression de l'UGT1A6

L'expression de l'UGT1A6 a été analysée, 24h après administration de LPS, par RT-PCR semi-quantitative et rapportée à l'expression de la L27 (Figure 62).



**Figure 62.** Expression de l'isoforme UGT1A6 dans les différentes zones cérébrales (BO : bulbes olfactifs ; hippoc. : hippocampe ; hypot. : hypothalamus)

L'isoforme UGT1A6 est présente dans les différentes régions cérébrales étudiées. Comme pour les activités de glucuronoconjugaison, on s'aperçoit que l'expression de l'UGT1A6 est variable d'une région à une autre. Cependant, les échantillons, ayant subi des amplifications par des PCR différentes, ne peuvent être tous comparés les uns aux autres. En effet, une PCR a été réalisée avec un groupe d'échantillons (témoins et traités) constitués des BO, du cervelet, du tronc cérébral et du cortex, et une autre PCR avec les autres échantillons.

Ainsi, on peut dire que l'expression de l'UGT1A6 est moins importante dans le cortex que dans les BO et le tronc cérébral. Aucune différence significative n'est observée dans les autres régions (hypothalamus + thalamus, striatum, hippocampe et mésencéphale).

De plus, l'administration de LPS (2 mg/kg, 24h) a tendance à augmenter l'expression de l'UGT1A6 dans la plupart des régions cérébrales mais de manière non significative.

## Chapitre VI - Discussion

Les astrocytes constituent les cellules majoritaires au niveau cérébral. Le métabolisme de neurotransmetteurs, l'homéostasie du SNC, la formation et la maintenance de la BHE, le stockage du glucose, sont autant de rôles qui permettent aux astrocytes d'entretenir, de protéger et de participer à la fonction des neurones (Giaume *et al.*, 2005).

La barrière hémato-encéphalique, caractérisée par la présence des astrocytes et des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, est une véritable barrière séparant le sang du parenchyme cérébral. Une perturbation de cette barrière a des conséquences dramatiques comme l'œdème cérébral, l'altération de la structure et des fonctions cérébrales et des perturbations neurologiques. Cette barrière est également dotée des enzymes nécessaires à la dégradation de toutes substances exogènes nocives pour le cerveau, ou pouvant perturber son fonctionnement. Ce métabolisme permet de prévenir l'entrée de ces molécules. Si l'on compare le foie et le cerveau d'un point de vue métabolique, on s'aperçoit que la proportion d'enzymes responsables de la dégradation de ces substances diverses est beaucoup plus importante au niveau hépatique que dans le cerveau. Cependant, ce dernier est un organe hétérogène et la présence de ces enzymes peut varier d'une région à l'autre (Perrin *et al.*, 1990). Des travaux ont d'ailleurs montré que les taux en certaines isoformes de cytochrome P450, au niveau cérébral, étaient supérieurs aux taux hépatiques (Miksys *et al.*, 2000). En plus, certaines enzymes sont également capables de moduler les taux de composés endogènes comme des neurotransmetteurs et des neurostéroïdes.

Nous avons donc estimé que les rôles fonctionnels et métaboliques des astrocytes constituent un outil de choix pour l'étude de l'impact et des conséquences d'une pathologie du SNC, principalement responsable de la formation de formes actives de l'oxygène ou d'inflammation.

### A - Glucuroconjugaison et stress oxydant

La production d'espèces activées de l'oxygène est un phénomène normal de la vie cellulaire intervenant dans la plupart des processus biologiques. Cette production est liée à l'activité catalytique de nombreuses enzymes mais peut également se produire suite à des processus extérieurs accidentels (radiations ionisantes, intoxications). Une augmentation trop importante entraîne un déséquilibre de la balance production / neutralisation des EAO et est à

l'origine du stress oxydant. Ce phénomène apparaît également lors du métabolisme de certaines substances qui subissent une réduction monoélectronique NADPH-dépendante par la NADPH-cytochrome P450. Dans ce travail, nous avons choisi la ménadione comme molécule génératrice d'EAO. Nous nous sommes placés dans des conditions de traitement pour lesquelles la viabilité cellulaire n'est pas modifiée et qui, de plus, sont suffisantes pour engendrer une production significative d'EAO. Ainsi, nous avons établi qu'un traitement à la dose de 5  $\mu$ M en ménadione pendant 15 minutes était suffisant pour mimer des conditions oxydantes retrouvées lors de pathologies inflammatoires (Cuzzocrea, 2005) ou encore lors du vieillissement (Galli *et al.*, 2005; Kang et Hamasaki, 2005). La production d'EAO est rapide puisqu'elle intervient dès la fin du traitement. Au cours du temps, ces EAO ne sont plus quantifiables car les systèmes de défenses anti-oxydantes ont réagi à l'agression et ont donc piégé ou métabolisé ces molécules. Le résultat est identique avec l'utilisation d'un précurseur de la synthèse du glutathion, la *N*-acétyl-L-cystéine (NAC).

Les conséquences de cette surproduction d'EAO par la ménadione sont évaluées au niveau de deux paramètres : le glutathion intracellulaire et les groupements carbonyles. La réponse d'une cellule à un stress oxydant implique souvent des changements du contenu en thiols qui est en première ligne dans les réactions de protection de la cellule dans le but de supprimer le composé délétère. Le glutathion, comme la thiorédoxine, sont des composés intracellulaires complémentaires intervenant dans le maintien de l'état redox intracellulaire. Le glutathion réduit, présent à des concentrations de l'ordre du millimolaire, est le composé thiol le plus abondant dans la plupart des cellules. Ses rôles sont nombreux : il intervient dans la défense anti-oxydante, la conjugaison de xénobiotiques, et dans l'expression de gènes (Dickinson et Forman, 2002). L'état redox intracellulaire correspond à l'équilibre entre les groupes sulfhydryles et sulfures qui peut être altéré par les EAO et autres oxydants. De plus, contrairement aux oligodendrocytes ou aux neurones, les astrocytes présentent de forts taux de glutathion (Cooper et Kristal, 1997; Wilson, 1997). Nos données montrent que l'exposition à la ménadione diminue rapidement les taux de GSH sans augmenter le GSSG. Il a en effet été reporté que la ménadione était capable de former un conjugué ménadione-GSH (Seung *et al.*, 1998). Les taux de GSSG sont augmentés plus tardivement ; l'état redox intracellulaire est ainsi modifié puis revient à la normale avec le temps. Nous avons également observé la formation de groupements carbonyles, qui est le marqueur d'oxydation protéique le plus utilisé (Chevion *et al.*, 2000). Les taux de carbonyles sont rapidement augmentés puis reviennent à la normale suggérant la dégradation des protéines oxydés par des protéases cytosoliques et/ou une augmentation de la synthèse protéique. Ceci caractérise l'induction

d'un stress oxydant. L'augmentation des défenses intracellulaires et le maintien de l'état redox intracellulaire, par un traitement anti-oxydant (NAC), empêchent l'oxydation des protéines et ainsi l'augmentation des groupements carbonyles. De plus, les médiateurs pro-inflammatoires tels que les PGE<sub>2</sub> et le monoxyde d'azote ne sont pas produits au cours de ce traitement. Cela va donc nous permettre d'examiner l'effet pro-oxydant d'une inflammation sans avoir les effets des médiateurs. Cela permet également de mimer les conditions d'un vieillissement.

L'altération de l'état redox intracellulaire peut modifier l'activité d'enzymes qui ont des résidus cystéines dans leur domaine catalytique (Atmane *et al.*, 2003). Dans nos conditions pro-oxydantes, nous avons cherché à évaluer les conséquences de cet environnement sur les activités de glucuronoconjugaison dans les astrocytes et les lignées cellulaires V79. Pour cela, nous avons utilisé deux substrats phénoliques (1-NP et 4-MO) qui sont des substrats préférentiels pour l'isoforme UGT1A6, et le KPF, un AINS, substrat préférentiel de l'UGT2B1. L'utilisation des lignées cellulaires V79 permet de mesurer l'activité propre aux isoformes UGT1A6 (V79-1A6) et UGT2B1 (V79-2B1). En revanche, au niveau astrocytaire, c'est une activité globale de glucuronoconjugaison catalysée par les différentes isoformes exprimées et compétentes qui est mesurée. Les activités astrocytaires mesurées vis-à-vis du 1-NP et de la 4-MO sont plus importantes que celles mesurées vis-à-vis du KPF. Ceci est en accord avec des travaux antérieurs qui ont montré que l'isoforme UGT1A6 est préférentiellement exprimée dans les astrocytes plutôt que dans les cellules endothéliales et les neurones (Suleman *et al.*, 1998). Après traitement par la ménadione, nous observons deux réponses différentes en fonction du temps après l'induction du stress oxydant. Tout d'abord, le profil observé des activités est sensiblement le même dans les 3 types cellulaires et quel que soit le substrat, à savoir une diminution importante des activités dès  $t = 0$  puis un retour à la normale 24 à 48h plus tard. L'utilisation des lignées V79 montre que les isoformes UGT2B1 et surtout 1A6 sont sensibles au stress oxydant expliquant ainsi la diminution de l'activité globale mesurée au niveau astrocytaire. Cependant, les diminutions d'activité observées au niveau des V79-2B1 sont moins importantes et soulignent ainsi une sensibilité moindre de cette isoforme au traitement. La diminution rapide des activités est liée à l'excès d'EAO intracellulaires responsables de l'oxydation de la protéine. En effet, une exposition à des générateurs d'EAO peut entraîner des modifications de l'activité de nombreuses protéines (Davies, 1987; Dean *et al.*, 1997). Un prétraitement anti-oxydant permet de préserver totalement cette activité enzymatique dans les astrocytes mais partiellement dans les V79. Cette différence de réponse à la NAC est probablement due à des capacités de défense anti-

oxydante plus limitées dans les lignées cellulaires. Nous avons vérifié ce concept en utilisant de la BSO qui est un inhibiteur d'une enzyme clé de la synthèse du glutathion, la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS). En effectuant un prétraitement pendant 24h, on diminue les taux de GSH et ainsi les défenses anti-oxydantes. On s'aperçoit alors que la ménadione diminue davantage les activités astrocytaires que lors d'un traitement seul. Ainsi la modulation des taux de glutathion, et donc la modification de l'état redox intracellulaire, est à l'origine de la baisse d'activité de glucuroconjugaison. En revanche, lorsqu'on augmente les défenses anti-oxydantes par un co-traitement avec de la SOD, on piège une partie des EAO ce qui évite partiellement la diminution de l'activité. L'utilisation de cette superoxyde dismutase permet également de montrer l'influence que peut avoir l'anion superoxyde dans notre modèle de stress oxydant. Nous n'avons pu mettre en évidence dans ce modèle la formation d' $H_2O_2$ . Cependant quand on traite nos cultures astrocytaires avec de l' $H_2O_2$ , on observe une diminution des activités, semblable à celle obtenue après traitement à la ménadione. Ces résultats suggèrent ainsi la présence de résidus thiol fonctionnels dans le site actif de l'enzyme ou sur les différents sites de fixation présents. Il a récemment été démontré la présence de 3 cystéines (Cys 121, 125 et 126) dans le site actif de l'UGT1A6 (Ikushiro *et al.*, 2002; Senay *et al.*, 2002). En plus de ces résidus cystéines, des acides aminés méthionines sont également la cible de réactions d'oxydation (Stadtman, 1993). Au cours du vieillissement, normal ou pathologique, il a été montré que les changements cellulaires et notamment les modifications des activités catalytiques de certaines protéines étaient dues en partie à l'action des EAO produites (ozone, oxygène singulet, ...) (Stadtman *et al.*, 1992; Hoshi et Heinemann, 2001). De plus, l'oxydation d'acides aminés dans le site actif de l'enzyme peut entraîner des modifications conformationnelles et/ou des changements d'hydrophobicité (Dean *et al.*, 1997). Si on prend le cas des UDP-glucuronosyltransférases, ces changements pourraient avoir de l'importance. En effet, le site actif de ces enzymes possède une région hydrophobe N-terminale fortement conservée avec des acides aminés importants pour l'intégrité fonctionnelle et structurale de l'enzyme (Senay *et al.*, 1997).

La deuxième phase observée consiste en un rétablissement des activités enzymatiques 48h après traitement dans les astrocytes, les V79-1A6 et les V79-2B1. Comme on a pu le montrer par RT-PCR semi-quantitative, le rétablissement de ces activités au niveau astrocytaire peut notamment s'expliquer par une surexpression de l'isoforme 1A6 24h après traitement. Ces modifications ne sont pas visibles pour l'isoforme UGT2B1. Les espèces activées de l'oxygène générées par la ménadione peuvent ainsi modifier la régulation des UGT au niveau transcriptionnel. Dans ce sens, il est montré dans la littérature que certains



cytochromes P450 peuvent être régulés négativement par des agents oxydants (Morel *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Divers travaux ont montré la surexpression d'enzymes de phase II dans certains tissus. En effet, après un stress oxydant, une surexpression des UGT1A6 et 2B1 est observée chez le rat au niveau hépatique mais pas dans l'intestin (Vargas *et al.*, 1998). Dans les lignées cellulaires V79, les modifications observées ne peuvent correspondre à une régulation transcriptionnelle puisque le promoteur des gènes des deux isoformes n'est pas présent dans ces cellules. Il est plus probable que cette diminution d'activité, suivie par un retour à des conditions normales, soit due à une oxydation réversible de certains résidus dans le site actif de l'enzyme qui perturberait ainsi la fixation du substrat et/ou l'action de l'enzyme.

De nombreuses études ont démontré l'implication de récepteurs nucléaires dans la régulation d'enzymes du métabolisme des médicaments. Ainsi, les récepteurs nucléaires de type PXR (*Pregnane X Receptor*), RXR (*Retinoid X Receptor*) ou CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) sont impliqués en tant que régulateur clé d'induction. Une exposition au phénobarbital, à la dexaméthasone, ou encore à des hydrocarbures polycycliques aromatiques entraîne l'augmentation de la fixation d'hétérodimères PXR/CAR ou RXR/CAR sur le promoteur. Ceci a pour conséquence d'augmenter l'expression de cytochromes P450 de la famille 2, et de la famille 3A, d'UGT ou encore de GST (Souidi *et al.*, 2005; Sugatani *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). De plus, en présence d'hydrocarbures polycycliques aromatiques, un autre type de récepteur nucléaire est activé, les AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) qui en association avec un ARNt (*Ah Receptor Nuclear translocator*) se fixe sur un élément de réponse (AhRE) au niveau du promoteur de cytochromes P450 et augmente également l'expression de ces enzymes (Nebert *et al.*, 2000). Un nombre important de gènes codant pour des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques présentent, au niveau de leur promoteur, des éléments de réponse spécifiques comme notamment des séquences ARE (*Antioxidant Response Element*), ou encore XRE (*Xenobiotic Response Element*). Ces séquences jouent un rôle important dans l'activation transcriptionnelle de l'enzyme (Lee *et al.*, 2003) au cours de conditions oxydantes ou lors d'intoxication. Pour expliquer la surexpression de l'UGT1A6 dans notre étude, nous avons analysé la séquence du promoteur de son gène. On note ainsi la présence de nombreux sites de fixation de facteurs de transcription, notamment des sites de fixation de type AP-1, et des éléments de réponse aux anti-oxydants. Le gène de l'UGT1A6, qui contient dans sa région promotrice une séquence ARE fonctionnelle (Buetler *et al.*, 1995), est surexprimé au niveau hépatique suite à un stress oxydant par le facteur de transcription NrF2 (Enomoto *et al.*, 2001). De plus, il est bien connu

que les facteurs de transcription NrF2 mais également AP-1 sont activés dans des conditions de stress oxydant (Closa et Folch-Puy, 2004; Egger *et al.*, 2005) ou des conditions inflammatoires (Hwang *et al.*, 2005; Rangasamy *et al.*, 2005). Au cours du vieillissement, il a cependant été observé une diminution de l'activation de ces facteurs de transcription (Lavrovsky *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2004).

Dans des conditions normales, le facteur de transcription NrF2 est séquestré dans le cytoplasme. Il est lié à la protéine d'ancrage Keap1 (*Kelch-like-ECH-associated protein 1*) qui empêche sa translocation dans le noyau. Lors de conditions oxydantes, NrF2 est libéré de Keap1, pénètre dans le noyau, et induit, en association avec des oncogènes (c-Jun, Jun-D, Fra-1 ou Maf), de nombreux gènes intervenant dans la synthèse de protéines anti-oxydantes et anti-inflammatoires. AP-1 est également un facteur de transcription inducteur de l'expression de gènes codant pour des protéines anti-oxydantes. Ce facteur est composé de deux sous-unités protéiques parmi lesquelles figurent des protéines issues de la famille des gènes de réponse immédiate Fos et Jun. AP-1 est sous forme d'homodimère Jun/Jun ou d'hétérodimère Fos/Jun, la famille Fos étant constituée des protéines c-Fos, Fra-1 et -2, Fos-B et v-Fos (Angel et Karin, 1991) et la famille Jun, des protéines c-Jun, Jun-B, Jun-D et v-Jun (Vogt et Bos, 1990). Une fois phosphorylées, les deux protéines s'associent pour former le complexe AP-1 qui va se fixer sur son site sur l'ADN et induire l'expression de gènes. Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier les facteurs de transcription AP-1 et NrF2 car leurs éléments de réponse sont présents sur le promoteur du gène de l'UGT1A6. Ainsi, par transfection transitoire, nous mettons en évidence l'activation de facteurs de transcription suite au traitement pro-oxydant. Cela se traduit par une fixation de protéines nucléaires sur le promoteur de l'UGT1A6 et une augmentation de l'expression de la GFP présente dans notre construction plasmidique. Cette activation est totalement inhibée suite à un traitement anti-oxydant. Dans ces conditions, nous démontrons ainsi une régulation transcriptionnelle de l'isoforme UGT1A6. Pour étudier cette régulation, nous avons fait synthétiser deux régions du promoteur de l'UGT1A6 : une séquence possédant un élément de réponse ARE (TGACTAAGC ; région - 942 à - 920) et une séquence possédant un site de fixation de type AP-1 (TGACTCT ; région - 467 à - 448). Il faut noter que le site ARE choisi contient également un site de type AP-1. Par la technique de gel retard, nous avons observé, après traitement, une augmentation de la fixation de protéines sur ces deux sondes. L'utilisation d'anticorps a permis de révéler les protéines en question. Sur la sonde AP-1, on note la fixation d'un complexe qui est constitué en hétérodimère Fos/Jun. En effet, l'anticorps anti-cFos retarde le complexe protéine-sonde. En revanche, l'anticorps anti-cJun n'a aucune

influence sur ce complexe. Mais comme on a pu le voir précédemment, la famille Jun est constituée de plusieurs protéines. Ainsi, une protéine autre que c-Jun semble intervenir en association avec c-Fos pour former le complexe AP-1. L'utilisation de la sonde NrF2 n'a pas permis de mettre en évidence l'implication de NrF2 dans nos conditions. Les conditions de traitement à la ménadione ne sont peut-être pas assez fortes pour pouvoir libérer le facteur NrF2 de sa protéine d'ancrage Keap1 et ainsi l'activer. Des travaux antérieurs ont montré que la ménadione, à une concentration de 100  $\mu$ M soit une dose 20 fois supérieure à celle utilisée dans notre étude, pouvait augmenter l'expression de la  $\gamma$ -GCS dans les cellules épithéliales humaines (Rahman *et al.*, 1996). En réalisant des mutations du promoteur du gène de la  $\gamma$ -GCS, ils n'ont pu mettre en évidence, dans ces conditions, l'implication de la séquence ARE présente sur le promoteur et l'activation du facteur de transcription NrF2. En revanche, le mécanisme d'activation de la  $\gamma$ -GCS impliquerait les éléments de réponse à AP-1. Dans ce travail, nous avons montré que l'anticorps anti-cFos, contrairement à l'anticorps anti-NrF2, retarde le complexe protéine-sonde NrF2 par la fixation de l'hétérodimère Fos/Jun sur cette sonde et souligne une nouvelle fois l'activation d'AP-1. On a également établi que la NAC, dont on a démontré qu'elle empêchait totalement la baisse des activités de glucuroconjugaison au niveau astrocytaire, agissait en bloquant l'activation d'AP-1. Ceci est en accord avec les travaux de Kamata *et al.*, 2005.

Par ces différentes techniques, nous avons observé l'activation et la fixation d'AP-1 sur nos sondes. Cependant, il a fallu vérifier que les sites présents sur le promoteur de l'UGT1A6 étaient fonctionnels et impliqués, par la fixation du complexe AP-1, dans la régulation de l'isoforme UGT1A6. Nous avons alors muté, par mutagenèse dirigée, les deux sites de fixation à AP-1 présents sur le promoteur. Les résultats obtenus confirment l'importance du site AP-1 de la région -460 à -454 du promoteur dans la régulation de l'UGT1A6. Cependant, le site AP-1 (région -933 à -925), qui coïncide avec un élément de réponse ARE, peut être également impliqué dans l'augmentation de l'expression de l'UGT1A6 mais à un degré moindre. Ainsi, le site AP-1 présent dans la région -460 à -454 semble être le site privilégié quant à la surexpression de l'UGT1A6. La double mutation bloque la surexpression de l'isoforme UGT1A6 et confirme ainsi le rôle joué par le complexe AP-1 sur le promoteur de l'UGT1A6 lors d'un traitement à la ménadione.

## **B - Glucuroconjugaison et conditions inflammatoires**

Dans cette deuxième partie, nous avons évalué la glucuroconjugaison dans des conditions inflammatoires. Par rapport au modèle précédent de stress oxydant, nous avons estimé, en plus du caractère oxydant du traitement, l'implication et le rôle de médiateurs dans les modifications observées.

### **1 - Conditions inflammatoires *in vitro***

#### 1.1 - Modification de la glucuroconjugaison et régulation de l'UGT1A6

De nombreuses études ont montré que des conditions inflammatoires pouvaient modifier des voies du métabolisme cellulaire (Hassan *et al.*, 2001; Renton, 2004). En effet, lors de réactions inflammatoires ou de maladies infectieuses, le métabolisme des xénobiotiques est fortement perturbé entraînant ainsi des modifications de l'élimination de ces composés et notamment des risques de toxicité. Cependant, les conséquences de telles réactions sont différentes selon l'enzyme, le tissu, l'organe ou l'organisme étudié (Ferrari *et al.*, 1993; Langouet *et al.*, 1995; Renton et Nicholson, 2000; Su et Ding, 2004; Abdulla *et al.*, 2005). Dans nos conditions, le traitement pro-inflammatoire au LPS est capable d'augmenter les activités astrocytaires de glucuroconjugaison après 48h d'exposition. Le LPS est connu pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (Wierinckx *et al.*, 2005). Parallèlement à l'étude d'une exposition au LPS, nous avons évalué l'impact des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  sur la glucuroconjugaison au niveau astrocytaire. L'IL-1 $\beta$ , contrairement au TNF- $\alpha$ , est capable d'augmenter l'activité enzymatique totale après 48h de traitement. Ainsi, cette cytokine pourrait intervenir dans le mécanisme d'augmentation de l'activité enzymatique induit par le LPS. Cette modification d'activité peut être due à une surexpression de l'UGT1A6, isoforme majoritaire au niveau astrocytaire. En effet, par RT-PCR, nous avons mis en évidence une surexpression maximale à 24h de traitement par le LPS (x 3,8) et l'IL-1 $\beta$  (x 1,6), alors que le TNF- $\alpha$  n'entraîne aucune modification. Il faut également noter que l'UGT2B1 n'est pas surexprimée suite aux différents traitements pro-inflammatoires. De plus, aucune augmentation d'activité n'est visible dans les lignées V79 ce qui suggère donc l'implication d'un mécanisme de régulation dans les cultures primaires.

La faible production d'EAO induite par le LPS n'est pas suffisante pour entraîner des modifications de la glucuronoconjugaison à court terme. Cependant, le LPS et les deux cytokines induisent les gènes pro-inflammatoires COX-2 et/ou iNOS. Comme on a pu le montrer au niveau astrocytaire, l'induction de ces deux gènes, iNOS et COX-2, entraînent au cours du temps une production accrue de leurs médiateurs respectifs, le monoxyde d'azote et les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Contrairement à ce qui est suggéré dans la littérature, l'IL-1 $\beta$ , dans nos conditions, n'est pas capable d'induire iNOS. De plus, le TNF- $\alpha$  induit fortement COX-2 et iNOS sans pour autant avoir une répercussion sur la glucuronoconjugaison. En effet, on s'aperçoit que le maximum d'induction d'iNOS et COX-2 par le TNF- $\alpha$  est observé à 24h alors que pour le LPS et l'IL-1 $\beta$ , l'induction maximale se situe à 12h de traitement. L'induction maximale des gènes pro-inflammatoires se faisant plus tard, on peut concevoir que les conséquences du TNF- $\alpha$  sur la glucuronoconjugaison puissent être visibles pour un temps d'exposition supérieur à 48h.

Les taux de GSH varient peu en fonction des traitements au LPS. Cependant, on peut noter une modification de l'état redox intracellulaire pour les temps de 48h d'exposition. On s'aperçoit que plus les taux de monoxyde d'azote augmentent, plus les taux de GSH diminuent. En effet, le monoxyde d'azote réagit avec le glutathion réduit pour former un composé appelé nitrosoglutathion (GSNO) (Chiueh, 1999). Il est important de noter que le GSNO produit aurait, pour des concentrations identiques, des capacités anti-oxydantes plus fortes que le précurseur du glutathion, la NAC (Ju *et al.*, 2004).

Les cyclooxygénases, les NO synthases et leurs médiateurs respectifs interviennent de manière importante dans tous les phénomènes d'inflammation et de neuroinflammation. Même si ces mécanismes sont complexes et encore peu connus, on observe néanmoins un accroissement de ces facteurs, en terme d'induction de gènes pro-inflammatoires et de production de médiateurs, au cours de multiples scléroses, d'ischémies, de radiations ionisantes ou de désordres neurologiques. Dans nos conditions, nous avons montré qu'un traitement au LPS sur des cultures astrocytaires augmentait les taux de monoxyde d'azote et de PGE<sub>2</sub>. Toutefois, nous avons voulu vérifier le rôle et l'importance de ces deux médiateurs pro-inflammatoires dans le mécanisme de surexpression de l'UGT1A6. Pour se faire, le reste du travail a été réalisé avec une dose de LPS à 1  $\mu$ g/ml pendant 24h car c'est dans ces conditions que l'on observe une surexpression maximale de l'isoforme étudiée.

Afin de contrer l'induction de COX-2 dans notre modèle, nous avons choisi deux anti-inflammatoires. Tout d'abord, la dexaméthasone, anti-inflammatoire stéroïdien, agit indirectement sur COX-2. En effet, cette molécule est un inhibiteur de la phospholipase A<sub>2</sub>.

Cette enzyme intervient dans la première étape de dégradation des phospholipides membranaires en acide arachidonique lequel est ensuite dégradé notamment en prostaglandines par les cyclooxygénases. Le NS398, anti-inflammatoire non stéroïdien, a quant à lui une action inhibitrice spécifique sur COX-2. L'utilisation de ces deux molécules empêche la surexpression de l'UGT1A6 engendrée par le LPS. Ainsi, en diminuant que partiellement l'induction de COX-2, la production de PGE<sub>2</sub> est fortement réduite. Cependant, on ne peut conclure à un lien direct entre la diminution d'induction de COX-2 et la baisse des taux de PGE<sub>2</sub> formés car l'activité des prostaglandines synthases, et notamment celle de la mPGES qui intervient dans la synthèse des PGE<sub>2</sub>, n'a pas été évaluée dans ces conditions. L'action de cette prostaglandine E<sub>2</sub> a déjà été décrite dans la littérature. Par exemple, elle est capable de réguler négativement le cytochrome P450 2B1 (Li *et al.*, 2005) et de surexprimer la cytochrome P450 aromatisation (CYP 19) dans le cancer du sein (Zhou *et al.*, 2005). Pour l'étude de l'autre médiateur, le monoxyde d'azote, nous avons utilisé deux analogues de l'arginine. En effet, les NO synthases transforment l'arginine en citrulline et monoxyde d'azote. L'oxydoréduction de la L-arginine en NO et L-citrulline se fait en deux étapes avec la génération d'un composé intermédiaire très instable la N(G)-hydroxy-L-arginine. Ces deux étapes sont stéréospécifiques et sont inhibées par certains analogues structuraux de la L-arginine dont les plus connus sont le L-NAME ou le L-NMMA. Dans nos conditions, ces deux analogues diminuent la production de nitrites ainsi que l'induction de iNOS. Les conséquences de ces modifications sont visibles au niveau de l'expression de l'UGT1A6 puisque celle-ci n'est plus surexprimée suite à l'exposition au LPS. On peut donc conclure que l'induction des gènes pro-inflammatoires iNOS et COX-2 intervient dans le mécanisme de surexpression de l'isoforme UGT1A6, le monoxyde d'azote ainsi que les PGE<sub>2</sub> étant les médiateurs impliqués dans ce mécanisme. Cependant pour confirmer cette hypothèse, il faudrait traiter nos cultures astrocytaires avec des donneurs de NO et des prostaglandines pour observer l'action directe de ces médiateurs sur la glucuronocouplage. En bloquant soit la voie du NO soit celle des prostaglandines, on observe une réponse identique à savoir une inhibition de la surexpression de l'UGT1A6 induite par le LPS. Ces résultats montrent donc l'implication de mécanismes croisés entre les voies de COX-2 et d'iNOS. Dans ce sens, il est connu que les PGE<sub>2</sub> activent iNOS et ainsi le relargage de monoxyde d'azote chez le rat traité au LPS (Uno *et al.*, 2004) alors que des donneurs de NO induisent COX-2 dans des lignées cancéreuses (Park *et al.*, 2003). De plus, nos données sont en accord avec de nombreuses études qui ont démontré que la dexaméthasone, le NS398, le L-NAME ou encore

le L-NMMA peuvent empêcher l'induction d'iNOS et COX-2 (Day *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Uno *et al.*, 2004).

L'augmentation maximale de l'expression du gène de l'UGT1A6 est observée à 24h de traitement au LPS. En prétraitant nos cellules avec de l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, l'augmentation des taux d'ARNm de l'UGT1A6 est inhibée, indiquant ainsi que l'effet observé est dû à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène codant pour cette isoforme plutôt qu'à une stabilisation de son ARNm. Cela est confirmé par l'augmentation de l'expression de la GFP, observée par transfection transitoire, suggérant ainsi la participation de facteurs de transcription suite à un traitement LPS mais aussi d'IL-1 $\beta$ . L'utilisation d'un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide, nous informe que l'augmentation des taux des ARNm de l'UGT1A6 implique également une synthèse protéique *de novo*.

Dans la continuité de notre étude sur la voie de transduction du signal impliquée dans la surexpression de l'UGT1A6, nous nous sommes intéressés à la famille des MAPK et notamment aux deux sous-familles p38 et ERK. Des études récentes ont montré que la phosphorylation de tyrosine jouait un rôle important dans la signalisation cellulaire induite par le LPS, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription (Buzas *et al.*, 2002; Pawate *et al.*, 2004). Bhat *et al.* ont rapporté que l'inhibition des MAPK p38 et ERK empêchait la production de NO et l'induction d'iNOS par le LPS dans des cultures primaires gliales (Bhat *et al.*, 1998). De plus, les sous-familles de MAPK interviennent dans l'induction de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> dans des monocytes et neutrophiles humains (Nagano *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2004). Nos résultats montrent que l'inhibition spécifique de la p38 MAPK par le SB230580 et de ERK par le PD98059 conduit à une suppression totale de la surexpression de l'UGT1A6 ; la phosphorylation de p38 et ERK est donc nécessaire dans ce mécanisme induit par le LPS. Il est ainsi de plus en plus probable qu'iNOS, COX-2 et leurs médiateurs interviennent dans la (les) voie(s) de signalisation induite(s) par le LPS résultant finalement de la surexpression de l'UGT1A6.

Au cours d'une inflammation, des facteurs de transcription comme AP-1, NrF2 ou NF $\kappa$ B sont activés. Il a été récemment démontré que l'élastase pancréatique, impliquée dans la pancréatite sévère aiguë, active les facteurs de transcription NF $\kappa$ B et AP-1 dans les cellules myéloïdes humaines (Hietaranta *et al.*, 2004). De plus, NrF2, qui se fixe aux éléments de réponse ARE, peut supprimer la réponse inflammatoire en induisant des enzymes de détoxification de phase II (Chen et Kunsch, 2004). Au vu de l'organisation du promoteur du gène de l'UGT1A6, on s'est une nouvelle fois intéressé au complexe AP-1 ; d'autant plus

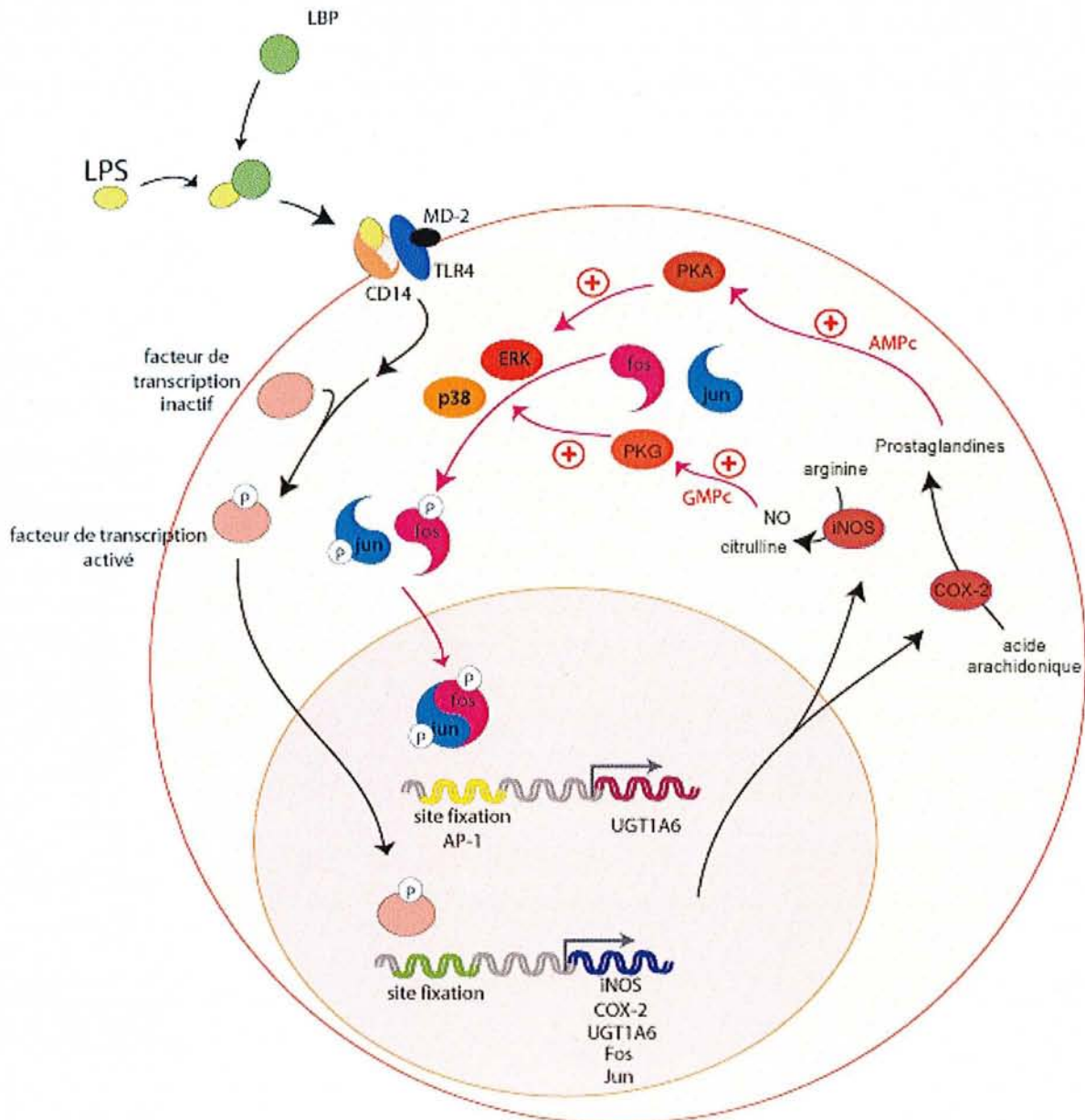
qu'il est montré dans la littérature que p38 et ERK sont capables d'activer ce complexe (Jang et Surh, 2005) en phosphorylant les deux sous-unités qui le composent. Dans nos conditions, on observe l'activation de l'hétérodimère Fos/Jun correspondant au facteur de transcription AP-1. Des co-traitements avec de la dexaméthasone ou du L-NAME inhibent l'activation du complexe AP-1. Le retard observé suite au co-traitement avec la dexaméthasone est d'ailleurs moins intense que celui observé dans les conditions témoins. Il est vrai que les glucocorticoïdes peuvent agir dans le noyau en activant ou inhibant divers facteurs de transcriptions et notamment AP-1. En effet, la dexaméthasone se fixe sur son récepteur cytoplasmique inactif. Le complexe récepteur-dexaméthasone est alors activé et rentre dans le noyau. Il peut ensuite interagir avec une des sous-unités d'AP-1 et inhiber son action transcriptionnelle. Une étude récente a montré qu'en inhibant la signalisation cellulaire induite par des facteurs de transcription comme AP-1 et NFκB, il est possible de réduire à la fois l'inflammation des tissus et la mort neuronale en augmentant la neuroprotection dans des modèles animaux de neurodégénération (Fahrig *et al.*, 2005).

Par la suite, nous avons utilisé les constructions plasmidiques présentant les mutations des sites AP-1 afin de vérifier leurs implications dans ce modèle au LPS. Les résultats obtenus confirment l'importance du site AP-1 de la région - 460 à - 454 du promoteur dans la régulation de l'UGT1A6. La mutation de ce site diminue d'un facteur 2,6 l'augmentation d'expression de la GFP soulignant une fonctionnalité plus importante que celle du site AP-1 plus en amont sur le promoteur. Ainsi, le site AP-1 présent dans la région - 460 à - 454 semble être le site privilégié quant à la surexpression de l'UGT1A6. La double mutation bloque la surexpression de l'isoforme UGT1A6 et confirme l'implication du facteur de transcription AP-1 et de ses sites de fixation sur le promoteur suite à un traitement au LPS.

En tenant compte des données de la littérature et des résultats obtenus, le mécanisme possible d'action du LPS est présenté en Figure 63. En effet, les composés pathogènes, comme le LPS, sont reconnus par des récepteurs spécifiques de motifs microbiens, les "*Toll-like receptors*" (TLR) (Tsan et Gao, 2004). Après fixation, le LPS active toute une cascade de réactions intracellulaires menant à l'activation de facteurs de transcription. Ces derniers vont ensuite se fixer à l'ADN et induire des gènes pro-inflammatoires qui vont libérer leurs médiateurs. Le monoxyde d'azote et les prostaglandines, ainsi produits, augmentent les taux de GMPc et d'AMPc lesquels vont activer respectivement la protéine kinase G (Pilz *et al.*, 1995; Komalavilas *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2003) et la protéine kinase A (Li *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004). Ces deux protéines kinases entraînent une cascade de phosphorylations passant par l'activation des MAP kinases ERK et p38 puis des sous-unités Fos et Jun qui vont



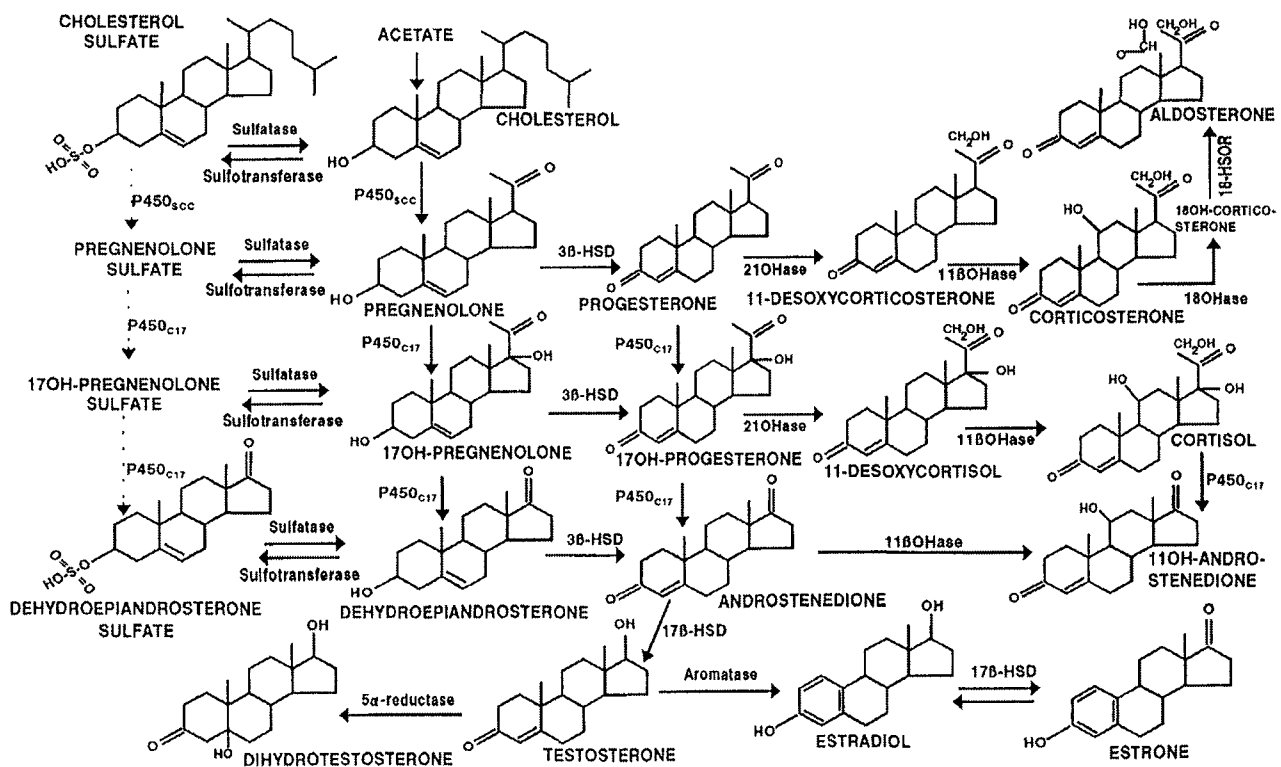
par conséquent s'associer pour former le complexe AP-1. Celui-ci va subir une translocation dans le noyau et se fixer sur son élément de réponse présent sur l'ADN. Le facteur de transcription AP-1 va alors pouvoir induire les gènes pro-inflammatoires iNOS (Jang et Surh, 2005) et COX-2 (Subbaramaiah *et al.*, 2002) et par la suite augmenter l'expression de l'isoforme UGT1A6.



**Figure 63.** Mécanisme de surexpression de l'UGT1A6 après exposition au LPS (LBP : *LPS Binding Protein* ; PKA : protéine kinase A ; PKG : protéine kinase G ; TLR : *Toll-like receptor*)

## 1.2 - Glucuronoconjugaison de composés endogènes

La machinerie enzymatique située dans le cerveau, et notamment dans les cellules qui constituent la BHE, présente des affinités vis-à-vis de composés endogènes, et notamment des neurostéroïdes. Le terme de « neurostéroïdes » ne désigne pas une catégorie chimique particulière de stéroïdes, mais indique le lieu de leur synthèse à savoir le système nerveux central et périphérique. Les neurostéroïdes sont des stéroïdes synthétisés à partir du cholestérol (Figure 64), indépendamment de l'activité des glandes endocrines stéroïdogènes comme les gonades et les glandes surrénales. Ainsi, la testostérone mais également l'estradiol ne sont pas considérés comme des neurostéroïdes car ils disparaissent du cerveau après castration et surrénalectomie chez l'animal.



**Figure 64.** Biosynthèse des neurostéroïdes  
(d'après Mensah-Nyagan *et al.*, 1999)

Les fonctions attribuées aux neurostéroïdes sont nombreuses. Ils interviennent en particulier dans la modulation des récepteurs GABAergiques, NMDA, nicotiques, muscariniques, et sérotoninergiques. Ils participent également à la synaptogenèse et la neuroprotection (Stoffel-Wagner, 2003). Ce sont des neuromodulateurs qui peuvent

notamment activer ou inactiver les communications neurone-neurone. Ils interviennent aussi lors de pathologies inflammatoires. La  $7\beta$ -hydroxyépiandrosterone, produit de conversion de l'épiandrosterone, montre des effets neuroprotecteurs dans un modèle animal présentant des lésions de type maladie d'Alzheimer (Dudas *et al.*, 2004). Chez des patients atteints par cette maladie, les taux retrouvés de prégnénolone sulfate et de déhydro-épiandrosterone sulfate sont inférieurs à ceux mesurés chez des patients sains. Ces taux en neurostéroïdes sont inversement proportionnels aux taux des protéines clés intervenant dans la formation des plaques et enchevêtrements neurofibrillaires (Weill-Engerer *et al.*, 2002) suggérant ainsi un rôle neuroprotecteur de ces deux neurostéroïdes. De plus, certains neurostéroïdes sont capables d'influencer les processus d'apprentissage et de mémoire en régulant la neurotransmission au niveau de l'hippocampe (Schumacher *et al.*, 1997). Ils pourraient alors être bénéfiques lors de désordres cognitifs liés à l'âge ou à la maladie. Une perturbation de la quantité de neurostéroïdes peut avoir des conséquences plus ou moins graves. En effet, une production accrue de neurostéroïdes peut stimuler de manière importante les récepteurs GABA et ainsi inhiber l'excitabilité des neurones (Reddy, 2004) alors qu'une production diminuée peut notamment être en cause dans la pathophysiologie de la schizophrénie (Kurumaji *et al.*, 1997).

Pour revenir à ce travail, nous avons voulu savoir dans un premier temps si les UGT, et notamment l'UGT1A6, sont capables de métaboliser des neurostéroïdes. Mais, comme il est montré dans la littérature, ce sont essentiellement les UGT de la famille 2 qui les métabolisent (King *et al.*, 2000; De Leon, 2003) ; les résultats que nous avons obtenu avec les V79-1A6 vont dans ce sens. Cependant, au niveau astrocytaire, nous observons une biotransformation plus ou moins importantes de certains neurostéroïdes comme l'estriol ou le  $16\alpha$ -hydroxyestrone. L'estriol est une source d'amélioration de maladies démyélinisantes auto-immunes (Kim *et al.*, 1999) alors que le  $16\alpha$ -hydroxyestrone est, quant à lui, reporté comme étant carcinogène (Raju *et al.*, 2000). Dans un deuxième temps, nous avons évalué les conséquences que pourraient avoir des conditions inflammatoires sur ce métabolisme endogène. Cependant, les traces des glucuronides formés ne nous permettent pas d'établir une quelconque conclusion quant au traitement.

La glucuronoconjugaison d'autres substrats endogènes comme les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) ainsi que la sérotonine a été étudiée. Les hormones T3 et T4 sont connues pour être métabolisées par les isoformes UGT1A1 et UGT1A9 (Findlay *et al.*, 2000). Elles sont très faiblement métabolisées au niveau astrocytaire. Les trente dernières années ont vu une multiplication importante du nombre des travaux expérimentaux et observations

cliniques démontrant l'implication d'un neurotransmetteur, la sérotonine, non seulement dans la dépression mais aussi l'anxiété, la conduite suicidaire, les désordres alimentaires, le trouble obsessionnel compulsif et l'alcoolisme. En parallèle, il était aussi montré que la sérotonine exerçait un rôle important dans nombre de fonctions physiologiques telles que le sommeil, l'appétit, le rythme circadien, la régulation de l'humeur, les fonctions cognitives et le développement du cerveau. Des travaux récents ont montré que les syndromes neuropsychiatriques observés dans la maladie d'Alzheimer n'étaient pas simplement une conséquence de la neurodégénération mais résulteraient probablement de différentes altérations en neurotransmetteurs (Garcia-Alloza *et al.*, 2005). Lors d'épisodes inflammatoires, il est décrit que la sérotonine peut moduler la production de cytokines dans les monocytes humains par l'activation de certains de ses récepteurs (Durk *et al.*, 2005). Des travaux ont montré qu'une libération importante de sérotonine dans la moelle épinière pouvait intervenir au cours d'une inflammation périphérique, modulant ainsi la composante neurogénique de l'œdème (Daher *et al.*, 2005). Un dysfonctionnement d'un tel mécanisme peut être impliqué dans la pathophysiologie de certains types de maux de tête ou migraine qui semblent dépendre d'une vasodilatation neurogénique. Les résultats obtenus avec la sérotonine sont en accord avec les données de la littérature (Kohle *et al.*, 2005). En effet, nous avons montré une glucuronoconjugaison de ce neurotransmetteur par l'isoforme UGT1A6. Au niveau des cultures astrocytaires, la biotransformation de la sérotonine est également visible et semble être augmentée dans les astrocytes lors du traitement au LPS.

## 2 - Conditions inflammatoires *in vivo*

L'administration intrapéritonéale de LPS chez le rat n'a pas permis de confirmer les résultats obtenus à partir de nos cultures astrocytaires de rats nouveaux-nés. Ces travaux sont, à notre connaissance, les premiers à mettre en évidence l'activité de glucuronoconjugaison ainsi que l'expression de l'isoforme UGT1A6 dans les différentes zones cérébrales.

Le LPS est fréquemment utilisé chez l'animal dans le but d'induire une réponse inflammatoire. En effet, l'administration de LPS induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires responsables notamment de l'apparition de fièvre (Roth et De Souza, 2001). Les doses utilisées de LPS, que l'on retrouve dans la littérature, varient fortement. Elles se situent sur une échelle pouvant aller de quelques  $\mu\text{g}/\text{kg}$  à une dizaine de  $\text{mg}/\text{kg}$  par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. Différents travaux ont montré que le LPS administré aux doses de 0,3 et 4  $\text{mg}/\text{kg}$  réduisait l'activité de cytochromes P450 respectivement au niveau

intestinal (Maezono *et al.*, 2005) et hépatique (Masubuchi et Horie, 2004). Les travaux de Saitoh *et al.* ont établi qu'une administration de LPS (17 µg/kg) en intraveineuse, répétée cinq fois à raison d'une fois par heure, chez le lapin entraînait également une diminution des taux de cytochromes P450 hépatiques jusqu'à trois jours après administration de LPS (Saitoh *et al.*, 1999). De plus, les auteurs n'ont observé aucune modification concernant les UGT.

Dans nos conditions, le LPS n'a pas d'effet sur l'activité de glucuronoconjugaison ni sur l'expression de l'isoforme UGT1A6. Cependant, on observe une « tendance » à l'augmentation de l'activité enzymatique et de l'expression de l'UGT1A6 dans la plupart des régions cérébrales. Ceci nous amène à penser que la dose utilisée de LPS n'est peut-être pas suffisante pour observer des modifications et/ou que les temps d'analyse ne sont pas appropriés, d'où l'hypothèse d'évaluer ces paramètres plus tard après l'administration de LPS. On pourrait également évaluer l'action du LPS sur la glucuronoconjugaison après l'avoir administré non plus par voie intrapéritonéale mais en intracérébroventriculaire.

## **Chapitre VII - Conclusions et perspectives**

Dans ce travail, nous nous sommes consacré à l'étude des effets engendrés par différents traitements sur des enzymes du métabolisme des médicaments, les UDP-glucuronosyltransférases, au niveau cérébral chez le rat. Nous avons choisi les astrocytes comme modèle cellulaire d'étude car en plus d'être les cellules majoritaires du SNC, elles interviennent dans la formation et la maintenance de la BHE et jouent donc un rôle d'approvisionnement et de protection vis-à-vis des neurones. Afin de mimer des conditions inflammatoires, deux modèles expérimentaux ont été utilisés. Le premier consiste à vérifier les conséquences de la composante pro-oxydante d'une inflammation sans se préoccuper de la « soupe » de médiateurs produits par celle-ci. Ce modèle permet également de mimer les conditions rencontrées au cours du vieillissement pour lequel une production croissante d'EAO ainsi qu'un accroissement des risques d'oxydation sont observés en fonction de l'âge. Pour ce faire, nous avons utilisé la ménadione qui, par son métabolisme, entraîne une production bien quantifiée de radical superoxyde. Le deuxième modèle a consisté à établir des conditions inflammatoires en traitant nos cultures avec des parois de bactéries (LPS).

Dans les deux cas, on s'aperçoit que la glucuronoconjugaison est modifiée. En effet, un stress oxydant va perturber l'état redox de la cellule, et provoquer l'oxydation de nombreuses protéines, dont des enzymes du métabolisme des médicaments comme les UGT. Comme on a pu le voir dans ce travail, les activités de glucuronoconjugaison sont diminuées, dans ces conditions, de l'ordre de 50%. Ainsi, pour des médicaments, dont le métabolisme serait principalement réalisé par les UGT, il y aurait des risques de toxicité importants liés à une diminution de la vitesse d'élimination de la molécule, maintenue plus longtemps sur son site d'action. Il conviendrait donc d'adapter la posologie du médicament administré afin de supprimer un risque toxique, tout en maintenant son action thérapeutique. De plus, on a montré que l'utilisation d'anti-oxydants est suffisante pour protéger la cellule contre les conséquences du stress oxydant produit. Une protection thérapeutique contre ce stress oxydant devra donc s'orienter vers l'administration de substances anti-radicalaires. L'isoforme UGT1A6 étant majoritaire au niveau astrocytaire, les résultats suggèrent une possible perturbation du métabolisme au niveau de la BHE, où cette enzyme est active, et soulignent le risque possible d'agression encouru par le cerveau.

Le modèle au LPS a permis d'observer une augmentation de la glucuronoconjugaison à 48h de traitement (+ 84%). Les gènes pro-inflammatoires, iNOS et COX-2, sont induits et

engendrent la production importante de médiateurs pro-inflammatoires tels que les PGE<sub>2</sub> et le monoxyde d'azote. L'augmentation de l'activité de glucuroconjugaison, visible à 48h, entraînerait ainsi une biotransformation accrue de substances médicamenteuses, cibles de ces enzymes. Il s'ensuit une présence diminuée du médicament sur son site d'action et donc une baisse de l'efficacité thérapeutique de la molécule. Donc, afin d'éviter une diminution de l'efficacité thérapeutique d'un médicament, il serait envisageable d'augmenter, au cours du temps, la dose initialement administrée, particulièrement si la glucuroconjugaison liée à l'UGT1A6 est la voie principale de biotransformation.

Il faut également prendre en considération le cas des pro-drogues qui ont besoin d'être métabolisées pour être plus actives (cas de la morphine). L'augmentation de la glucuroconjugaison entraînerait une production plus importante de composés actifs et donc un risque de toxicité pourrait apparaître.

Dans le modèle au LPS, il serait intéressant d'évaluer la production de cytokines pro-inflammatoires consécutives à l'exposition au LPS puisque l'on a démontré que l'IL-1 $\beta$  augmente les activités de glucuroconjugaison et régule l'expression de l'UGT1A6. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie du NO<sup>\*</sup>, de la voie des prostaglandines ainsi que des MAP kinases empêchent la surexpression de l'UGT1A6 induite par le LPS. Toutes ces voies représentent ainsi des réponses thérapeutiques destinées à diminuer l'inflammation cérébrale.

On a également montré que les UGT agissaient en association avec les enzymes de la stéroïdogénèse afin de maintenir des concentrations hormonales physiologiques nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. De plus, ces enzymes sont également capables de conjuguer des neurotransmetteurs, comme la sérotonine. Un changement de l'activité des UGT peut ainsi entraîner une perturbation du métabolisme endogène et engendrer des modifications des différents systèmes hormonaux ou des transmissions synaptiques. En accord avec cette hypothèse, il a été montré une diminution des taux de sérotonine dans les structures corticales et sous-corticales chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Les modifications des propriétés fonctionnelles de la BHE, observées en particulier au cours de maladies neurodégénératives, sont probablement l'une des causes des graves troubles neurologiques résultant de l'entrée dans l'espace cérébral de molécules normalement confinées à l'extérieur. Ce travail paraît alors être susceptible de déboucher sur des traitements préventifs, limitant la dégradation fonctionnelle de la BHE et l'apparition de certains symptômes neurologiques observés lors du vieillissement normal ou pathologique ou lors de conditions inflammatoires.

Bien entendu, tous les résultats et hypothèses présentés dans ce travail ayant été réalisés sur un modèle *in vitro*, leur validation devra être réalisée au préalable chez l'animal avant qu'elle ne puisse s'appliquer en pratique humaine.



## Chapitre VIII - Références bibliographiques

- Abbott FV and Palmour RM (1988) Morphine-6-glucuronide: analgesic effects and receptor binding profile in rats. *Life Sci* **43**:1685-95.
- Abbruscato TJ and Davis TP (1999) Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain Res* **842**:277-86.
- Abdulla D, Goralski KB, Garcia Del Busto Cano E and Renton KW (2005) The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during an LPS-induced model of CNS inflammation. *Drug Metab Dispos.*
- Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C and Ikeda K (2000) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **14 Suppl 1**:S47-53.
- Allen RG and Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* **28**:463-99.
- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C and Przedborski S (2001) Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **49**:176-85.
- Angel P and Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**:129-57.
- Atmane N, Dairou J, Paul A, Dupret JM and Rodrigues-Lima F (2003) Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). Reversible inactivation by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **278**:35086-92.
- Auyeung DJ, Kessler FK and Ritter JK (2003) Mechanism of rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 induction by oltipraz: evidence for a contribution of the Aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol* **63**:119-27.
- Avraham KB, Sugarman H, Rotshenker S and Groner Y (1991) Down's syndrome: morphological remodelling and increased complexity in the neuromuscular junction of transgenic CuZn-superoxide dismutase mice. *J Neurocytol* **20**:208-15.
- Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**:1464-76.
- Baker MA, Cerniglia GJ and Zaman A (1990) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* **190**:360-5.
- Bansal SK and Gessner T (1980) A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-14C]glucuronic acid. *Anal Biochem* **109**:321-9.
- Barbier O, Girard H, Inoue Y, Duez H, Villeneuve L, Kamiya A, Fruchart JC, Guillemette C, Gonzalez FJ and Staels B (2005) Hepatic expression of the UGT1A9 gene is governed by hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Mol Pharmacol* **67**:241-9.
- Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* **31**:347-66.
- Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB and Chock PB (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* **274**:34543-6.
- Battaglia E, Pritchard M, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Radomska A, Siest G and Magdalou J (1994) Chemical modification of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1\*6 by diethyl pyrocarbonate: possible involvement of a histidine residue in the catalytic process. *Arch Biochem Biophys* **309**:266-72.
- Bazan NG, Colangelo V and Lukiw WJ (2002) Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:197-210.
- Becher B, Prat A and Antel JP (2000) Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* **29**:293-304.
- Benedetti MS (2001) Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam Clin Pharmacol* **15**:75-84.
- Bentz BG, Hammer ND, Radosevich JA and Haines GK, 3rd (2004) Nitrosative stress induces DNA strand breaks but not caspase mediated apoptosis in a lung cancer cell line. *J Carcinog* **3**:16.
- Bhagwat SV, Boyd MR and Ravindranath V (2000) Multiple forms of cytochrome P450 and associated monooxygenase activities in human brain mitochondria. *Biochem Pharmacol* **59**:573-82.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC and Hogan EL (1998) Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* **18**:1633-41.
- Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB and Kola I (1997) Response of a primary human fibroblast cell line to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ* **8**:589-98.

- Boaziz C, Breau JL, Morere JF and Israel L (1991) [The blood-brain barrier: implications for chemotherapy in brain tumors]. *Pathol Biol (Paris)* **39**:789-95.
- Bock KW and Bock-Hennig BS (1987) Differential induction of human liver UDP-glucuronosyltransferase activities by phenobarbital-type inducers. *Biochem Pharmacol* **36**:4137-43.
- Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, Lehmkoetter T, Munzel PA and Bock-Hennig BS (1999) Functions and transcriptional regulation of PAH-inducible human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* **31**:411-22.
- Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB and Heales SJ (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* **68**:2227-40.
- Bonifacio MJ, Vieira-Coelho MA, Borges N and Soares-da-Silva P (2000) Kinetics of rat brain and liver solubilized membrane-bound catechol-O-methyltransferase. *Arch Biochem Biophys* **384**:361-7.
- Booher J and Sensenbrenner M (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**:97-105.
- Bors W, Heller W, Michel C and Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **186**:343-55.
- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**:1295-302.
- Brosnan JT, Jacobs RL, Stead LM and Brosnan ME (2004) Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol* **51**:405-13.
- Buetler TM, Gallagher EP, Wang C, Stahl DL, Hayes JD and Eaton DL (1995) Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz. *Toxicol Appl Pharmacol* **135**:45-57.
- Burchell B, Brierley CH and Rance D (1995) Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* **57**:1819-31.
- Burchell B and Coughtrie MW (1989) UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol Ther* **43**:261-89.
- Busciglio J and Yankner BA (1995) Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* **378**:776-9.
- Buzas B, Rosenberger J, Kim KW and Cox BM (2002) Inflammatory mediators increase the expression of nociceptin/orphanin FQ in rat astrocytes in culture. *Glia* **39**:237-46.
- Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S and Vivien D (2004) Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* **5**:529-34.
- Calderon PB and Roberfroid M (1988) [Free radicals and free radical-mediated toxicity]. *J Pharm Belg* **43**:390-400.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M and Krause KH (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* **48**:16-42.
- Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P and Liguri G (2002) Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med* **33**:1372-9.
- Chandrasekharan NV and Simmons DL (2004) The cyclooxygenases. *Genome Biol* **5**:241.
- Chen XL and Kunsch C (2004) Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* **10**:879-91.
- Chen YH, Wang JP, Wang H, Sun MF, Wei LZ, Wei W and Xu DX (2005) Lipopolysaccharide treatment downregulates the expression of the pregnane X receptor, cyp3a11 and mdr1a genes in mouse placenta. *Toxicology* **211**:242-52.
- Chevion M, Berenshtein E and Stadtman ER (2000) Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* **33 Suppl**:S99-108.
- Chiarugi P and Cirri P (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**:509-14.
- Chiou TJ and Tzeng WF (2000) The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* **154**:75-84.
- Chiueh CC (1999) Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* **890**:301-11.
- Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY and Kleeberger SR (2002) Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**:175-82.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-9.
- Closa D and Folch-Puy E (2004) Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* **56**:185-91.

- Cooper AJ and Kristal BS (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* **378**:793-802.
- Cross AR and Jones OT (1991) Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* **1057**:281-98.
- Cuzzocrea S (2005) Shock, inflammation and PARP. *Pharmacol Res* **52**:72-82.
- Daher JB, de Melo MD and Tonussi CR (2005) Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. *Life Sci* **76**:2349-59.
- Davies KJ (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**:9895-901.
- Day SM, McLean JS, Lockhart JC and Ferrell WR (2003) Combined inhibition of nitrenergic and prostanoid pathways in J774 macrophages. *Clin Exp Rheumatol* **21**:625-31.
- de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ and Kola I (1996) Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* **5**:283-92.
- De Leon J (2003) Glucuronidation enzymes, genes and psychiatry. *Int J Neuropsychopharmacol* **6**:57-72.
- Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* **324 ( Pt 1)**:1-18.
- Decleves X, Regina A, Laplanche JL, Roux F, Boval B, Launay JM and Scherrmann JM (2000) Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* **60**:594-601.
- Denu JM and Tanner KG (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**:5633-42.
- Dickinson DA and Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* **64**:1019-26.
- Dringen R (2000) Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem* **267**:4903.
- Dringen R and Hamprecht B (1999) N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci Lett* **259**:79-82.
- Driscoll KE (2000) TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett* **112-113**:177-83.
- Dudas B, Hanin I, Rose M and Wulfert E (2004) Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7beta-hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid. *Neurobiol Dis* **15**:262-8.
- Durk T, Panther E, Muller T, Sorichter S, Ferrari D, Pizzirani C, Di Virgilio F, Myrtek D, Norgauer J and Idzko M (2005) 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Int Immunol* **17**:599-606.
- Eggler AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB and Mesecar AD (2005) Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10070-5.
- el Mouelhi M, Beck S and Bock KW (1993) Stereoselective glucuronidation of (R)- and (S)-naproxen by recombinant rat phenol UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) and its human orthologue. *Biochem Pharmacol* **46**:1298-300.
- el Mouelhi M, Didolkar MS, Elias EG, Guengerich FP and Kauffman FC (1987) Hepatic drug-metabolizing enzymes in primary and secondary tumors of human liver. *Cancer Res* **47**:460-6.
- El-Bacha RS, Leclerc S, Netter P, Magdalou J and Minn A (2000) Glucuronidation of apomorphine. *Life Sci* **67**:1735-45.
- Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T and Yamamoto M (2001) High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* **59**:169-77.
- Ezoe T, Vanier MT, Oya Y, Popko B, Tohyama J, Matsuda J and Suzuki K (2000) Biochemistry and neuropathology of mice doubly deficient in synthesis and degradation of galactosylceramide. *J Neurosci Res* **59**:170-8.
- Fahrig T, Gerlach I and Horvath E (2005) A synthetic derivative of the natural product rocaglaol is a potent inhibitor of cytokine-mediated signaling and shows neuroprotective activity in vitro and in animal models of Parkinson's disease and traumatic brain injury. *Mol Pharmacol* **67**:1544-55.
- Fauvert R and Benhamou JP (1958) [A solution pending for 50 years: that problem of the direct & indirect bilirubins.]. *Rev Fr Etud Clin Biol* **3**:539-41.
- Favier A (1997) [Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker]. *Ann Biol Clin (Paris)* **55**:9-16.

- Feng J, Bussiere F and Hekimi S (2001) Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* **1**:633-44.
- Fenstermacher JD (1980) Comparative aspects of blood-brain exchange. *Fed Proc* **39**:3201-6.
- Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**:722-6.
- Ferrari L, Herber R, Batt AM and Siest G (1993) Differential effects of human recombinant interleukin-1 beta and dexamethasone on hepatic drug-metabolizing enzymes in male and female rats. *Biochem Pharmacol* **45**:2269-77.
- Ffrench-Constant C and Raff MC (1986) The oligodendrocyte-type-2 astrocyte cell lineage is specialized for myelination. *Nature* **323**:335-8.
- Filippatos G, Ang E, Gidea C, Dincer E, Wang R and Uhal BD (2004) Fas induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells in vitro. *BMC Cell Biol* **5**:6.
- Findlay KA, Kaptein E, Visser TJ and Burchell B (2000) Characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase-catalyzing thyroid hormone glucuronidation in man. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:2879-83.
- Flora G, Lee YW, Nath A, Maragos W, Hennig B and Toborek M (2002) Methamphetamine-induced TNF-alpha gene expression and activation of AP-1 in discrete regions of mouse brain: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Neuromolecular Med* **2**:71-85.
- Fontana E, Boucher J, Marti L, Lizcano JM, Testar X, Zorzano A and Carpena C (2001) Amine oxidase substrates mimic several of the insulin effects on adipocyte differentiation in 3T3 F442A cells. *Biochem J* **356**:769-77.
- Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B and Siest G (1991) Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferase cDNAs in V79 cell cultures. *Mol Pharmacol* **39**:177-83.
- Gabuzda D, He J, Ohagen A and Vallat AV (1998) Chemokine receptors in HIV-1 infection of the central nervous system. *Semin Immunol* **10**:203-13.
- Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E and Floridi A (2005) Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol* **149**:240-60.
- Garcia-Alloza M, Gil-Bea FJ, Diez-Ariza M, Chen CP, Francis PT, Lasheras B and Ramirez MJ (2005) Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* **43**:442-9.
- Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G and Lenaz G (2003) Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:506-13.
- Gherzi-Egea JF, Walther B, Decolin D, Minn A and Siest G (1987) The activity of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase in the brain. *Neuropharmacology* **26**:367-72.
- Giaume C, Froger N and Koulakoff A (2005) [Gap junction-mediated intercellular communication in astrocytes and neuroprotection.]. *Ann Fr Anesth Reanim* **24**:695-6.
- Glowinski J and Iversen LL (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* **13**:655-69.
- Golden PL and Pardridge WM (1999) P-Glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. *Brain Res* **819**:143-6.
- Grancharov K, Naydenova Z, Lozeva S and Golovinsky E (2001) Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol Ther* **89**:171-86.
- Gregory PA, Lewinsky RH, Gardner-Stephen DA and Mackenzie PI (2004) Regulation of UDP-glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:354-63.
- Griendling KK, Sorescu D and Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**:494-501.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q and Holbrook NJ (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* **271**:4138-42.
- Haasio K, Sapanen L, Vaalavirta L, Linden IB and Heinonen EH (2001) Comparative toxicological study on the hepatic safety of entacapone and tolcapone in the rat. *J Neural Transm* **108**:79-91.
- Haberkorn V, Heydel JM, Mounie J, Artur Y and Goudonnet H (2001) Influence of vitamin A status on the regulation of uridine (5'-)diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and UGT1A6 expression by L-triiodothyronine. *Br J Nutr* **85**:289-97.
- Hagenbuch B and Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**:1-18.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**:298-300.

- Hassan MQ, Hadi RA, Al-Rawi ZS, Padron VA and Stohs SJ (2001) The glutathione defense system in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Appl Toxicol* **21**:69-73.
- Haumont M, Magdalou J, Lafaurie C, Ziegler JM, Siest G and Colin JN (1990) Phenobarbital inducible UDP-glucuronosyltransferase is responsible for glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine: characterization of the enzyme in human and rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **281**:264-70.
- Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC and Cadenas E (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* **335**:295-304.
- Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M and Kikugawa K (2003) Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *Embo J* **22**:3356-66.
- Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2004) Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Hays MT, Hsu L and Kohatsu S (1992) Transport of the thyroid hormones across the feline gut wall. *Thyroid* **2**:45-56.
- Heales SJ, Barker JE, Stewart VC, Brand MP, Hargreaves IP, Foppa P, Land JM, Clark JB and Bolanos JP (1997) Nitric oxide, energy metabolism and neurological disease. *Biochem Soc Trans* **25**:939-43.
- Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM and Clark JB (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* **1410**:215-28.
- Hein DW (2002) Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* **506-507**:65-77.
- Hekimi S and Guarente L (2003) Genetics and the specificity of the aging process. *Science* **299**:1351-4.
- Herber R, Magdalou J, Haumont M, Bidault R, van Es H and Siest G (1992) Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine in human liver microsomes: enzyme inhibition by drugs and steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* **1139**:20-4.
- Heurtaux T, Benani A, Bianchi A, Moindrot A, Gradinaru D, Magdalou J, Netter P and Minn A (2004) Redox state alteration modulates astrocyte glucuronidation. *Free Radic Biol Med* **37**:1051-63.
- Heydel J, Leclerc S, Bernard P, Pelczar H, Gradinaru D, Magdalou J, Minn A, Artur Y and Goudonnet H (2001) Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: in situ mRNA localization and quantitative analysis. *Brain Res Mol Brain Res* **90**:83-92.
- Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, Haapiainen R and Kempainen E (2004) Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* **323**:192-6.
- Hirrlinger J, König J and Dringen R (2002) Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* **82**:716-9.
- Honda Y and Honda S (1999) The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J* **13**:1385-93.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, Rozemuller AJ and Eikelenboom P (2001) Interleukin-1beta induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E2 secretion by human neuroblastoma cells: implications for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **36**:559-70.
- Hoshi T and Heinemann S (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* **531**:1-11.
- Howell SR, Shirley MA and Ulm EH (1998) Effects of retinoid treatment of rats on hepatic microsomal metabolism and cytochromes P450. Correlation between retinoic acid receptor/retinoid x receptor selectivity and effects on metabolic enzymes. *Drug Metab Dispos* **26**:234-9.
- Huang G, Dragan M, Freeman D and Wilson JX (2005) Activation of catechol-O-methyltransferase in astrocytes stimulates homocysteine synthesis and export to neurons. *Glia*.
- Hunot S and Hirsch EC (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**:S49-58; discussion S58-60.
- Hwang SG, Yu SS, Poo H and Chun JS (2005) c-Jun/AP-1 mediates interleukin-1beta -induced dedifferentiation but not cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem*.
- Ikushiro S, Emi Y and Iyanagi T (2002) Activation of glucuronidation through reduction of a disulfide bond in rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Biochemistry* **41**:12813-20.
- Inoue Y, Otsuka T, Niino H, Nagano S, Arinobu Y, Ogami E, Akahoshi M, Miyake K, Ninomiya I, Shimizu S, Nakashima H and Harada M (2004) Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoid synthesis by IL-4 and IL-10 in human monocytes. *J Immunol* **172**:2147-54.
- Ishii Y, Takami A, Tsuruda K, Kurogi A, Yamada H and Oguri K (1997) Induction of two UDP-glucuronosyltransferase isoforms sensitive to phenobarbital that are involved in morphine glucuronidation: production of isoform-selective antipeptide antibodies toward UGT1.1r and UGT2B1. *Drug Metab Dispos* **25**:163-7.
- Jacinto JD and Kovacic P (2003) Neurotransmission and neurotoxicity by nitric oxide, catecholamines, and glutamate: unifying themes of reactive oxygen species and electron transfer. *Curr Med Chem* **10**:2693-703.

- Jang JH and Surh YJ (2005) AP-1 mediates beta-amyloid-induced iNOS expression in PC12 cells via the ERK2 and p38 MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:1421-8.
- Janmohamed A, Hernandez D, Phillips IR and Shephard EA (2004) Cell-, tissue-, sex- and developmental stage-specific expression of mouse flavin-containing monooxygenases (Fmos). *Biochem Pharmacol* **68**:73-83.
- Janzer RC and Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**:253-7.
- Jiang ZY, Woollard AC and Wolff SP (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**:853-6.
- Johannessen JN (1991) A model of chronic neurotoxicity: long-term retention of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) within catecholaminergic neurons. *Neurotoxicology* **12**:285-302.
- Ju TC, Yang YT and Yang DI (2004) Protective effects of S-nitrosoglutathione against neurotoxicity of 3-nitropropionic acid in rat. *Neurosci Lett* **362**:226-31.
- Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR and Chowdhury NR (2000) Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* **16**:297-306.
- Kamata H and Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**:1-14.
- Kamata H, Oka S, Shibukawa Y, Kakuta J and Hirata H (2005) Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Arch Biochem Biophys* **434**:16-25.
- Kang D and Hamasaki N (2005) Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem* **12**:429-41.
- Kas HS (2004) Drug delivery to brain by microparticulate systems. *Adv Exp Med Biol* **553**:221-30.
- Kawashima C, Terayama K, Ii M, Oka S and Kawasaki T (1992) Characterization of a glucuronyltransferase: neolactotetraosylceramide glucuronyltransferase from rat brain. *Glycoconj J* **9**:307-14.
- Keating GM and Lyseng-Williamson KA (2005) Tolcapone: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *CNS Drugs* **19**:165-84.
- Kelicen P and Tindberg N (2004) Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPbeta and -delta. *J Biol Chem* **279**:15734-42.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A and Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**:461-4.
- Kiang TK, Ensom MH and Chang TK (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* **106**:97-132.
- Kielian T and Esen N (2004) Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective. *Neurochem Int* **45**:429-36.
- Kiemer AK and Vollmar AM (1997) Effects of different natriuretic peptides on nitric oxide synthesis in macrophages. *Endocrinology* **138**:4282-90.
- Kim S, Liva SM, Dalal MA, Verity MA and Voskuhl RR (1999) Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurology* **52**:1230-8.
- King CD, Rios GR, Assouline JA and Tephly TR (1999) Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys* **365**:156-62.
- King CD, Rios GR, Green MD and Tephly TR (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* **1**:143-61.
- Kinosaki M, Masuko T, Sogawa K, Iyanagi T, Yamamoto T, Hashimoto Y and Fujii-Kuriyama Y (1993) Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells. *Cell Struct Funct* **18**:41-51.
- Kohle C, Badary OA, Nill K, Bock-Hennig BS and Bock KW (2005) Serotonin glucuronidation by Ah receptor- and oxidative stress-inducible human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **69**:1397-402.
- Komalavilas P, Shah PK, Jo H and Lincoln TM (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**:34301-9.
- Konsman JP, Parnet P and Dantzer R (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* **25**:154-9.
- Kreuter J (2004) Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol* **4**:484-8.
- Krinsky NI (1989) Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* **7**:617-35.

- Krishnaswamy S, Hao Q, Von Moltke LL, Greenblatt DJ and Court MH (2004) Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Drug Metab Dispos* **32**:862-9.
- Kuo MT, Bao J, Furuichi M, Yamane Y, Gomi A, Savaraj N, Masuzawa T and Ishikawa T (1998) Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem Pharmacol* **55**:605-15.
- Kurumaji A, Wakai T and Toru M (1997) Decreases in peripheral-type benzodiazepine receptors in postmortem brains of chronic schizophrenics. *J Neural Transm* **104**:1361-70.
- Kwong LK and Sohal RS (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **350**:118-26.
- Langouet S, Corcos L, Abdel-Razzak Z, Loyer P, Ketterer B and Guillouzo A (1995) Up-regulation of glutathione S-transferases alpha by interleukin 4 in human hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **216**:793-800.
- Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA and Roy AK (2000) Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol* **35**:521-32.
- Lawler JM and Song W (2002) Specificity of antioxidant enzyme inhibition in skeletal muscle to reactive nitrogen species donors. *Biochem Biophys Res Commun* **294**:1093-100.
- Le Guellec C, Lacarelle B, Villard PH, Point H, Catalin J and Durand A (1995) Glucuronidation of propofol in microsomal fractions from various tissues and species including humans: effect of different drugs. *Anesth Analg* **81**:855-61.
- Leclerc S, Heydel JM, Amosse V, Gradinaru D, Cattarelli M, Artur Y, Goudonnet H, Magdalou J, Netter P, Pelczar H and Minn A (2002) Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Brain Res Mol Brain Res* **107**:201-13.
- Lee G, Dallas S, Hong M and Bendayan R (2001) Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* **53**:569-96.
- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW and Johnson JA (2003) Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* **278**:12029-38.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG and Keppler D (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* **269**:27807-10.
- Leininger-Muller B, Ghersi-Egea JF, Siest G and Minn A (1994) Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neurosci Lett* **175**:37-40.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* **167**:3-23.
- Levesque E, Beaulieu M, Green MD, Tephly TR, Belanger A and Hum DW (1997) Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* **7**:317-25.
- Levesque E, Beaulieu M, Guillemette C, Hum DW and Belanger A (1998a) Effect of fibroblastic growth factors (FGF) on steroid UDP-glucuronosyltransferase expression and activity in the LNCaP cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* **64**:43-8.
- Levesque E, Beaulieu M, Guillemette C, Hum DW and Belanger A (1998b) Effect of interleukins on UGT2B15 and UGT2B17 steroid uridine diphosphate-glucuronosyltransferase expression and activity in the LNCaP cell line. *Endocrinology* **139**:2375-81.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S and Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **186**:464-78.
- Li CC, Shen HL, Lii CK, Liu KL, Yang JJ and Chen HW (2005) Prostaglandin E2 down-regulation of cytochrome P-450 2B1 expression induced by phenobarbital is through EP2 receptor in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **327**:424-30.
- Li TF, Zuscik MJ, Ionescu AM, Zhang X, Rosier RN, Schwarz EM, Drissi H and O'Keefe RJ (2004) PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp Cell Res* **300**:159-69.
- Li YQ, Prentice DA, Howard ML, Mashford ML and Desmond PV (1999) The effect of hormones on the expression of five isoforms of UDP-glucuronosyltransferase in primary cultures of rat hepatocytes. *Pharm Res* **16**:191-7.
- Li YQ, Prentice DA, Howard ML, Mashford ML, Wilson JS and Desmond PV (2000) Alcohol up-regulates UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in rat liver and in primary rat hepatocyte culture. *Life Sci* **66**:575-84.

- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G and Guarente L (2004) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* **18**:12-6.
- Liochev SI and Fridovich I (1994) The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **16**:29-33.
- Liu M, Hurn PD and Alkayed NJ (2004) Cytochrome P450 in neurological disease. *Curr Drug Metab* **5**:225-34.
- Liu Y, Fiskum G and Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**:780-7.
- Livertoux MH, Lagrange P and Minn A (1996) The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes is dependent on their reduction potential. *Brain Res* **725**:207-16.
- Lledias F, Rangel P and Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**:10630-7.
- Lo YY, Wong JM and Cruz TF (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* **271**:15703-7.
- Lockman PR, McAfee JH, Geldenhuys WJ and Allen DD (2004) Cation transport specificity at the blood-brain barrier. *Neurochem Res* **29**:2245-50.
- Mackenzie PI, Miners JO and McKinnon RA (2000) Polymorphisms in UDP glucuronosyltransferase genes: functional consequences and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* **38**:889-92.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF and Nebert DW (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**:255-69.
- Maezono S, Sugimoto K, Sakamoto K, Ohmori M, Hishikawa S, Mizuta K, Kawarasaki H, Watanabe Y and Fujimura A (2005) Elevated blood concentrations of calcineurin inhibitors during diarrheal episode in pediatric liver transplant recipients: involvement of the suppression of intestinal cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Pediatr Transplant* **9**:315-23.
- Magdalou J, Chajes V, Lafaurie C and Siest G (1990) Glucuronidation of 2-arylpropionic acids pirprofen, flurbiprofen, and ibuprofen by liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **18**:692-7.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW and Aggarwal BB (1998) Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* **273**:13245-54.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD and Matsushima GK (2001) Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* **21**:7046-52.
- Masubuchi Y and Horie T (2004) Endotoxin-mediated disturbance of hepatic cytochrome P450 function and development of endotoxin tolerance in the rat model of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Drug Metab Dispos* **32**:437-41.
- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE and Weinberger DR (2003) Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* **116**:127-37.
- McGeer PL and McGeer EG (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* **21**:195-218.
- McGeer PL and McGeer EG (2001) Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **22**:799-809.
- Mealey KL (2004) Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* **27**:257-64.
- Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR and Lithgow GJ (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**:1567-9.
- Meneshian A and Bulkley GB (2002) The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* **9**:161-75.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G and Vaudry H (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**:63-81.
- Mercadante S (1999) The role of morphine glucuronides in cancer pain. *Palliat Med* **13**:95-104.
- Meyer M, Pahl HL and Baeuerle PA (1994) Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* **91**:91-100.
- Miksys S, Hoffmann E and Tyndale RF (2000) Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochem Pharmacol* **59**:1501-11.
- Miksys SL and Tyndale RF (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J Psychiatry Neurosci* **27**:406-15.
- Miller KP and Ramos KS (2001) Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev* **33**:1-35.



- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M and Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **202**:13-23.
- Miners JO, Attwood J and Birkett DJ (1984) Determinants of acetaminophen metabolism: effect of inducers and inhibitors of drug metabolism on acetaminophen's metabolic pathways. *Clin Pharmacol Ther* **35**:480-6.
- Minn A, Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger B and Siest G (1991) Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res Brain Res Rev* **16**:65-82.
- Minn A, Leclerc S, Heydel JM, Minn AL, Denizcot C, Cattarelli M, Netter P and Gradinaru D (2002) Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *J Drug Target* **10**:285-96.
- Miyauchi M, Hiraoka M, Oka H, Sato S, Kudo Y, Ogawa I, Noguchi K, Ishikawa I and Takata T (2004) Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Arch Oral Biol* **49**:739-46.
- Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA and McMahan RF (2004) Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* **57**:350-4.
- Morel Y and Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* **342 Pt 3**:481-96.
- Morel Y, de Waziers I and Barouki R (2000) A repressive cross-regulation between catalytic and promoter activities of the CYP1A1 and CYP2E1 genes: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mol Pharmacol* **57**:1158-64.
- Mulder GJ (1992) Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**:25-49.
- Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Beher D, Masters CL and Beyreuther K (1997) Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **54**:533-9.
- Munzel PA, Schmohl S, Buckler F, Jaehrling J, Raschko FT, Kohle C and Bock KW (2003) Contribution of the Ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 in Caco-2 and rat hepatoma 5L cells. *Biochem Pharmacol* **66**:841-7.
- Munzel PA, Schmohl S, Heel H, Kalberer K, Bock-Hennig BS and Bock KW (1999) Induction of human UDP-glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* **27**:569-73.
- Mushiroda T, Ariyoshi N, Yokoi T, Takahara E, Nagata O, Kato H and Kamataki T (2001) Accumulation of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in suncus (Suncus murinus) brain: implication for flavin-containing monooxygenase activity in brain microvessels. *Chem Res Toxicol* **14**:228-32.
- Nagano S, Otsuka T, Niuro H, Yamaoka K, Arinobu Y, Ogami E, Akahoshi M, Inoue Y, Miyake K, Nakashima H, Niho Y and Harada M (2002) Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway and regulation by anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol* **14**:733-40.
- Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG and Fierro IM (2005) Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 on endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Nebert DW (1994) Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem Pharmacol* **47**:25-37.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y and Dalton TP (2000) Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* **59**:65-85.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ and Finkel T (2000) Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* **20**:7311-8.
- Neuhaus J, Risau W and Wolburg H (1991) Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann N Y Acad Sci* **633**:578-80.
- Newman EA (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* **26**:536-42.
- Newman JW, Morisseau C and Hammock BD (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **44**:1-51.
- Newton RC and Vaddi K (1997) Biological responses to C-C chemokines. *Methods Enzymol* **287**:174-86.
- Oldendorf WH (1976) Certain aspects of drug distribution to brain. *Adv Exp Med Biol* **69**:103-9.
- Oliveira CJ, Schindler F, Ventura AM, Morais MS, Arai RJ, Debbas V, Stern A and Monteiro HP (2003) Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **35**:381-96.
- Olson JA, Moon RC, Anders MW, Fenselau C and Shane B (1992) Enhancement of biological activity by conjugation reactions. *J Nutr* **122**:615-24.
- Packer L (1991) Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* **53**:1050S-1055S.
- Pande JN, Pande A and Singh SP (2003) Acetylator status, drug metabolism and disease. *Natl Med J India* **16**:24-6.

- Panesar SK, Orr JM, Farrell K, Burton RW, Kassahun K and Abbott FS (1989) The effect of carbamazepine on valproic acid disposition in adult volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **27**:323-8.
- Pardridge WM, Golden PL, Kang YS and Bickel U (1997) Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem* **68**:1278-85.
- Park SW, Lee SG, Song SH, Heo DS, Park BJ, Lee DW, Kim KH and Sung MW (2003) The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. *Int J Cancer* **107**:729-38.
- Park YG, Kang SK, Noh SH, Park KK, Chang YC, Lee YC and Kim CH (2004) PGE2 induces IL-1beta gene expression in mouse osteoblasts through a cAMP-PKA signaling pathway. *Int Immunopharmacol* **4**:779-89.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Jr. and Cleveland DW (2000) Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13901-6.
- Pawate S, Shen Q, Fan F and Bhat NR (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res* **77**:540-51.
- Peinado MA, del Moral ML, Esteban FJ, Martinez-Lara E, Siles E, Jimenez A, Hernandez-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J and Pedrosa JA (2000) [Aging and neurodegeneration: molecular and cellular bases]. *Rev Neurol* **31**:1054-65.
- Perrin R, Minn A, Ghersi-Egea JF, Grassiot MC and Siest G (1990) Distribution of cytochrome P450 activities towards alkoxyresorufin derivatives in rat brain regions, subcellular fractions and isolated cerebral microvessels. *Biochem Pharmacol* **40**:2145-51.
- Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL and Boss GR (1995) Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J* **9**:552-8.
- Powell DA, Nahata MC, Durrell DC, Glazer JP and Hilty MD (1981) Interactions among chloramphenicol, phenytoin, and phenobarbital in a pediatric patient. *J Pediatr* **98**:1001-3.
- Pritchard M, Fournel-Gigleux S, Siest G, Mackenzie P and Magdalou J (1994) A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase 2B1) stably expressed in V79 cells catalyzes the glucuronidation of morphine, phenols, and carboxylic acids. *Mol Pharmacol* **45**:42-50.
- Prokai L, Prokai-Tatrai K and Bodor N (2000) Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med Res Rev* **20**:367-416.
- Qatanani M, Zhang J and Moore DD (2005) Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* **146**:995-1002.
- Radominska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E and Mackenzie PI (1999) Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* **31**:817-99.
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, Macnee W and Smith CA (1996) Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:832-7.
- Raju U, Sepkovic DW, Miller WR, Dixon JM, Bradlow HL and Levitz M (2000) Estrone and estradiol metabolism in vivo in human breast cysts. *Steroids* **65**:883-8.
- Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tuder RM, Georas SN and Biswal S (2005) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* **202**:47-59.
- Reddy DS (2004) Role of neurosteroids in catamenial epilepsy. *Epilepsy Res* **62**:99-118.
- Ren Q, Murphy SE, Zheng Z and Lazarus P (2000) O-Glucuronidation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by human UDP-glucuronosyltransferases 2B7 and 1A9. *Drug Metab Dispos* **28**:1352-60.
- Renton KW (2004) Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab* **5**:235-43.
- Renton KW and Nicholson TE (2000) Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:524-30.
- Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT and Owens IS (1992) A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* **267**:3257-61.
- Rizner TL, Lin HK and Penning TM (2003) Role of human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2) in androgen metabolism of prostate cancer cells. *Chem Biol Interact* **143-144**:401-9.
- Robinson BH (1998) Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* **1364**:271-86.
- Rosenbrock H, Hagemeyer CE, Ditter M, Knoth R and Volk B (2001) Identification, induction and localization of cytochrome P450s of the 3A-subfamily in mouse brain. *Neurotox Res* **3**:339-49.

- Roth J and De Souza GE (2001) Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res* **34**:301-14.
- Rushmore TH and Kong AN (2002) Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* **3**:481-90.
- Saitoh T, Kokue E and Shimoda M (1999) The suppressive effects of lipopolysaccharide-induced acute phase response on hepatic cytochrome P450-dependent drug metabolism in rabbits. *J Vet Pharmacol Ther* **22**:87-95.
- Samokyszyn VM, Thomas CE, Reif DW, Saito M and Aust SD (1988) Release of iron from ferritin and its role in oxygen radical toxicities. *Drug Metab Rev* **19**:283-303.
- Sastre J, Pallardo FV and Vina J (2003) The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* **35**:1-8.
- Sawicki J, Kuzma M and Baranczyk-Kuzma A (2001) The effect of serotonin, its precursors and metabolites on brain glutathione-S-transferase. *Neurochem Res* **26**:469-72.
- Schaeren-Wiemers N, van der Bijl P and Schwab ME (1995) The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and Schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *J Neurochem* **65**:2267-78.
- Schapira AH (1998) Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1364**:261-70.
- Schubert SY, Neeman I and Resnick N (2002) A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *Faseb J* **16**:1931-3.
- Schulte S and Stoffel W (1993) Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10265-9.
- Schulze-Osthoff K, Los M and Baeuerle PA (1995) Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **50**:735-41.
- Schumacher M, Guennoun R, Robel P and Baulieu EE (1997) Neurosteroids in the Hippocampus: Neuronal Plasticity and Memory. *Stress* **2**:65-78.
- Senay C, Jedlitschky G, Terrier N, Burchell B, Magdalou J and Fournel-Gigleux S (2002) The importance of cysteine 126 in the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6. *Biochim Biophys Acta* **1597**:90-6.
- Senay C, Ouzzine M, Battaglia E, Pless D, Cano V, Burchell B, Radomska A, Magdalou J and Fournel-Gigleux S (1997) Arginine 52 and histidine 54 located in a conserved amino-terminal hydrophobic region (LX2-R52-G-H54-X3-V-L) are important amino acids for the functional and structural integrity of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1\*6. *Mol Pharmacol* **51**:406-13.
- Serhan CN and Chiang N (2002) Lipid-derived mediators in endogenous anti-inflammation and resolution: lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. *ScientificWorldJournal* **2**:169-204.
- Seung SA, Lee JY, Lee MY, Park JS and Chung JH (1998) The relative importance of oxidative stress versus arylation in the mechanism of quinone-induced cytotoxicity to platelets. *Chem Biol Interact* **113**:133-44.
- Sharom FJ (1997) The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol* **160**:161-75.
- Sharp S, Mak LY, Smith DJ and Coughtrie MW (1992) Inhibition of human and rabbit liver steroid and xenobiotic UDP-glucuronosyltransferases by tertiary amine drugs--implications for adverse drug reactions. *Xenobiotica* **22**:13-25.
- Shelby MK, Cherrington NJ, Vansell NR and Klaassen CD (2003) Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos* **31**:326-33.
- Shirakawa T, Abe M, Oshima S, Mitome M and Oguchi H (2004) Neuronal expression of catechol O-methyltransferase mRNA in neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* **15**:1239-43.
- Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K and Kato T (1999) Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res* **35**:155-64.
- Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P, Aigueperse J and Dublineau I (2005) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology*.
- Spahn-Langguth H and Benet LZ (1992) Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev* **24**:5-47.
- Stadtman ER (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62**:797-821.
- Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM and Floyd RA (1992) Protein modification in aging. *Exs* **62**:64-72.
- Staines AG, Sindelar P, Coughtrie MW and Burchell B (2004) Farnesol is glucuronidated in human liver, kidney and intestine in vitro, and is a novel substrate for UGT2B7 and UGT1A1. *Biochem J* **384**:637-45.

- Stathopoulos PB, Rumpfheldt JA, Scholz GA, Irani RA, Frey HE, Hallewell RA, Lepock JR and Meiering EM (2003) Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7021-6.
- Stewart VC, Heslegrave AJ, Brown GC, Clark JB and Heales SJ (2002) Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *Eur J Neurosci* **15**:458-64.
- Stoffel-Wagner B (2003) Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* **1007**:64-78.
- Stoll G, Jander S and Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* **56**:149-71.
- Strobel HW, Thompson CM and Antonovic L (2001) Cytochromes P450 in brain: function and significance. *Curr Drug Metab* **2**:199-214.
- Su T and Ding X (2004) Regulation of the cytochrome P450 2A genes. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:285-94.
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W and Dannenberg AJ (2002) Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* **277**:18649-57.
- Sugatani J, Nishitani S, Yamakawa K, Yoshinari K, Sueyoshi T, Negishi M and Miwa M (2005) Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Mol Pharmacol* **67**:845-55.
- Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM and Hagen TM (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3381-6.
- Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J and Minn A (1998) Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys* **358**:63-7.
- Suleman FG, Ghersi-Egea JF, Leininger-Muller B and Minn A (1993) Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes. *Neurosci Lett* **161**:219-22.
- Suzuki T, Nishio K and Tanabe S (2001) The MRP family and anticancer drug metabolism. *Curr Drug Metab* **2**:367-77.
- Svehlikova V, Wang S, Jakubikova J, Williamson G, Mithen R and Bao Y (2004) Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in CaCo-2 cells. *Carcinogenesis* **25**:1629-37.
- Tao-Cheng JH, Nagy Z and Brightman MW (1987) Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* **7**:3293-9.
- Terrier N, Benoit E, Senay C, Lapique F, Radomska-Pandya A, Magdalou J and Fournel-Gigleux S (1999) Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide. *Mol Pharmacol* **56**:226-34.
- Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M and Biswal S (2002) Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* **62**:5196-203.
- Tsan MF and Gao B (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* **76**:514-9.
- Tsoutsikos P, Miners JO, Stapleton A, Thomas A, Sallustio BC and Knights KM (2004) Evidence that unsaturated fatty acids are potent inhibitors of renal UDP-glucuronosyltransferases (UGT): kinetic studies using human kidney cortical microsomes and recombinant UGT1A9 and UGT2B7. *Biochem Pharmacol* **67**:191-9.
- Tu PH, Gurney ME, Julien JP, Lee VM and Trojanowski JQ (1997) Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest* **76**:441-56.
- Tukey RH, Pendurthi UR, Nguyen NT, Green MD and Tephly TR (1993) Cloning and characterization of rabbit liver UDP-glucuronosyltransferase cDNAs. Developmental and inducible expression of 4-hydroxybiphenyl UGT2B13. *J Biol Chem* **268**:15260-6.
- Turgeon D, Carrier JS, Levesque E, Beatty BG, Belanger A and Hum DW (2000) Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *J Mol Biol* **295**:489-504.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* **17**:3-8.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**:335-44.
- Turrens JF, Alexandre A and Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **237**:408-14.
- Turrens JF and Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **191**:421-7.

- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM and Pastan I (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:3004-8.
- Uno K, Iuchi Y, Fujii J, Sugata H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T and Yoshimura T (2004) In vivo study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:995-1002.
- Vargas M, Lamb JG and Franklin MR (1998) Phase II-selective induction of hepatic drug-metabolizing enzymes by oltipraz -5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione-, 1,7-phenanthroline, and 2,2'-dipyridyl in rats is not accompanied by induction of intestinal enzymes. *Drug Metab Dispos* **26**:91-7.
- Vienneau DS, DeBonis U and Wells PG (1995) Potential genoprotective role for UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis: initiation of micronuclei by benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene in UDP-glucuronosyltransferase-deficient cultured rat skin fibroblasts. *Cancer Res* **55**:1045-51.
- Vogt PK and Bos TJ (1990) jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res* **55**:1-35.
- Volk HA and Loscher W (2005) Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain*.
- Vore M, Montgomery C and Meyers M (1983) Steroid D-ring glucuronides: characterization of a new class of cholestatic agents. *Drug Metab Rev* **14**:1005-19.
- Wallace DC (2001) Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* **106**:71-93.
- Wallis JP (2005) Nitric oxide and blood: a review. *Transfus Med* **15**:1-11.
- Walther B, Ghersi-Egea JF, Jayyosi Z, Minn A and Siest G (1987) Ethoxyresorufin O-deethylase activity in rat brain subcellular fractions. *Neurosci Lett* **76**:58-62.
- Wang X, Li X, Yaish-Ohad S, Sarau HM, Barone FC and Feuerstein GZ (1999) Molecular cloning and expression of the rat monocyte chemotactic protein-3 gene: a possible role in stroke. *Brain Res Mol Brain Res* **71**:304-12.
- Warner M, Kohler C, Hansson T and Gustafsson JA (1988) Regional distribution of cytochrome P-450 in the rat brain: spectral quantitation and contribution of P-450b,e, and P-450c,d. *J Neurochem* **50**:1057-65.
- Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE and Akwa Y (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:5138-43.
- Wierinckx A, Breve J, Mercier D, Schultzberg M, Drukarch B and Van Dam AM (2005) Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. *J Neuroimmunol*.
- Wilkin GP, Marriott DR and Cholewinski AJ (1990) Astrocyte heterogeneity. *Trends Neurosci* **13**:43-6.
- Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* **75**:1149-63.
- Xia MQ and Hyman BT (1999) Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J Neurovirol* **5**:32-41.
- Xu C, Li CY and Kong AN (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **28**:249-68.
- Yan L, Szumlanski CL, Rice SR, Sobell JL, Lachman HM and Weinshilboum RM (2000) Histamine N-methyltransferase functional polymorphism: lack of association with schizophrenia. *Am J Med Genet* **96**:404-6.
- Yarom R, Sagher U, Havivi Y, Peled IJ and Wexler MR (1986) Myofibers in tongues of Down's syndrome. *J Neurol Sci* **73**:279-87.
- Yarom R, Sherman Y, Sagher U, Peled IJ, Wexler MR and Gorodetsky R (1987) Elevated concentrations of elements and abnormalities of neuromuscular junctions in tongue muscles of Down's syndrome. *J Neurol Sci* **79**:315-26.
- Yoshimura A, Mori H, Ohishi M, Aki D and Hanada T (2003) Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Curr Opin Immunol* **15**:704-8.
- Youdim MB, Bar Am O, Yogev-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M and Amit T (2005) Rasagiline: neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *J Neurosci Res* **79**:172-9.
- Youdim MB and Weinstock M (2004) Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. *Neurotoxicology* **25**:243-50.
- Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, Sasano H and Clyne CD (2005) Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res* **65**:657-63.

**Annexe**



ELSEVIER

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.020

 **Original Contribution**

## REDOX STATE ALTERATION MODULATES ASTROCYTE GLUCURONIDATION

T. HEURTAUX,\* A. BENANI,\* A. BIANCHI,\* A. MOINDROT,\* D. GRADINARU,<sup>†</sup> J. MAGDALOU,\*  
P. NETTER,\* and A. MINN\*

\*Unité Mixte de Recherche CNRS, Université Henri Poincaré Nancy 1, No. 7561, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; and <sup>†</sup>Unité Mixte de Recherche, Université de Bourgogne-INRA, No. 1234, Laboratoire de Biochimie Pharmacologie Toxicologie, Faculté de Pharmacie, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

(Received 11 March 2004; Revised 24 May 2004; Accepted 17 June 2004)

Available online 20 July 2004

**Abstract**—We have investigated the effects of mild oxidative conditions on drug-metabolizing enzyme activity in rat cultured astrocytes. These experimental conditions promoting an oxidative environment were obtained by short exposure to a low concentration of menadione (5  $\mu$ M) for a short duration (15 min). This resulted in the rapid and transient production of reactive oxygen species (+130%), associated with a decrease in GSH cellular content (–24%), and an increase in total protein oxidation (+26%), but promoted neither PGE<sub>2</sub> nor NO production. This treatment induced a rapid and persistent decrease in astrocyte glucuronidation activities, which was totally prevented by *N*-acetyl-L-cysteine. These oxidative conditions also affected the specific UGT1A6 activity measured in transfected V79-1A6 cells. Finally, the subsequent recovery of astrocyte glucuronidation activity may result from upregulation of UGT1A6 expression (+62%) as shown by RT-PCR and gene reporter assay. These results show that the catalytic properties and expression of cerebral UGT1A6 are highly sensitive to the redox environment. The protective effect of *N*-acetyl-L-cysteine suggests both a direct action of reactive oxygen species on the protein and a more delayed action on the transcriptional regulation of UGT1A6. These results suggest that cerebral metabolism can be altered by physiological or pathological redox modifications. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords**—Brain, Oxidative stress, Aging, Metabolism, UGT1A6, Protein oxidation, Free radicals

### INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are continuously generated during cell respiration and metabolism, but their interaction with cellular components can deeply alter the cellular physiology (for a review, see [1]). Therefore, neutralization of ROS is required, and achieved by several intracellular scavenger systems, including superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, as well as scavenger molecules such as tocopherol and ascorbate [2]. However, during injury, drug intoxication, and pathological states such as cancer and inflammatory diseases, high ROS formation exceeding the cell antioxidant abilities is frequently observed, which

promotes a noxious oxidative stress [3,4]. Because of its high oxygen consumption, and its important content of free iron and oxidizable unsaturated lipids, the brain is particularly vulnerable to oxidative stress [5]. This raises the possibility that oxidative stress is implicated in both the initiation and progression of several neurodegenerative diseases, as well as in normal brain aging [6]. In addition, current evidence indicates that cerebral oxidative stress can induce modification of enzyme or transporter activity [7,8], loss of neurotransmitter receptor affinity and synaptic efficacy [9,10], and induction of neuronal death [11], leading to numerous neurophysiological alterations [12] and cognitive impairments [13]. Moreover, a recent study has suggested that mitochondrial dysfunction generating oxidative stress can be the central cause of neurodegenerative diseases [14].

Due to their high levels of antioxidants [15,16], astrocytes can sustain the presence of ROS, and then

Address correspondence to: Dr. A. Minn, Unité Mixte de Recherche CNRS, Université Henri Poincaré Nancy 1, No. 7561, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; Fax: +33 383 683 959; E-mail: minn@medecine.uhp-nancy.fr.

prevent their neurotoxicity [17]. However, even if astrocytes tolerate a mild oxidative stress, their metabolic processes and biosynthetic activities may be strongly altered. For instance, oxidative stress causes diminution of rat brain astrocyte energy status, dysregulation of osmotic control, and perturbation of glucose metabolism [18]. We hypothesized that oxidative conditions could also modulate the cerebral activity of enzymes involved in xenobiotic metabolism as it has been already observed in hepatocytes and colorectal cells [19]. Therefore, we investigated the changes in glucuronidation activity in an experimental model of mild oxidative stress. Glucuronidation is achieved by a number of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoenzymes, belonging to a multigenic superfamily of enzymes that catalyze the transfer of glucuronic acid (UDP-GlcA) to a wide range of exogenous and endogenous substrates. This enzymatic activity results in an increase in substrate water solubility, and generally suppresses the pharmacological activity or toxicity of these substrates [20]. In the brain, glucuronidation is completed mainly by astrocytes which exhibit the highest UGT1A6 activity and expression among brain cells [21].

The first aim of the present study was to validate a model of nontoxic oxidative conditions in rat cerebral astrocytes in primary culture. For this purpose, we used a short-duration (15 min) treatment with a low concentration (5  $\mu$ M) of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone), which efficiently produces superoxide if added to the culture medium of brain cells, including astrocytes [22]. Other aims of the study were to investigate the total glucuronidation activity in astrocytes submitted to an increased oxidative environment; to investigate the specific activity of the UGT1A6 isoform after oxidative stress; and to examine the regulation of UGT1A6 isoform expression in astrocytes exposed to an altered redox environment.

## MATERIALS AND METHODS

### *Drugs and chemicals*

Menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone), ketoprofen (KPF, 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid), 1-naphthol (1-NP), UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), L-buthionine[*S,R*]sulfoximine (BSO), superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1, 15,000 U/mg), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt ( $\beta$ -NADPH), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), dihydrorhodamine-123 (DHR-123), guanidine hydrochloride and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), hydrogen peroxide was from Carlo Erba (Val de Reuil, France), and

glutathione reductase (EC 1.6.4.2) was from Roche (Meylan, France). Cell culture products were provided by Gibco (Cergy-Pontoise, France). All reagents for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were obtained from Eurobio (Les Ulis, France).

### *Animals*

This study was performed with female and male Wistar rats (Iffa Credo, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). The animals were maintained under standard laboratory conditions on 12/12-h light/dark cycle with unrestricted access to standard food and tap water. To obtain newborn rats, two adult females and one male were housed together for 48 h. Pregnant females were then maintained in separate cages. The study was approved by the local animal ethics committee, and all procedures adhered to the Principles of Laboratory Animal Care.

### *Primary cultures and characterization of astrocytes*

Astrocytes were prepared from newborn Wistar rat brains, as described previously [22]. Precisely, 1-day-old rats were sacrificed by decapitation and the brains were rapidly removed and placed in the culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum). Residual meningeal tissues were removed from brains using fine scissors and tweezers. The cells were dissociated in the culture medium by passage through a hypodermic syringe (21 G, 0.8  $\times$  25 mm) and centrifuged at 200g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in culture medium and plated on 75-cm<sup>2</sup> flasks at a density of two brains per flask. The cells were grown in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, and the culture medium was renewed twice a week. All experiments were carried out on cell subcultures at passage 2.

Cell culture purity was characterized by immunocytochemical detection of a specific astrocyte marker, glial fibrillary acidic protein (GFAP). Cells were fixed with paraformaldehyde (4% w/v) and marked with a primary antibody anti-GFAP (1:100, polyclonal rabbit anti-GFAP; Sigma, France) and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled secondary antibody (1:100, goat anti-rabbit IgG (H + L); Zymed, France). Cells were costained with 4  $\mu$ M propidium iodide, a nuclear marker. Fluorescence-labeled cells were observed using an epifluorescence microscope (AX 70 Provis, Olympus, France) equipped with a mercury vapor lamp, a FITC filter (excitation between 450 and 490 nm/emission at 505 nm), and a propidium iodide filter (excitation between 540 and 580 nm/emission at 590 nm). Pictures were then recorded using a  $\times$ 40 oil immersion objective.



### *Culture of V79 cell line*

We used an established recombinant V79 cell line (Chinese hamster lung fibroblasts) that stably expresses rat UGT1A6 cDNA [23]. V79 cells were grown in DMEM containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 8% (v/v) heat-inactivated Nu-serum in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The culture medium was renewed twice a week.

### *Cell treatments*

All treatments were applied to confluent cultures. To promote oxidative stress, cells were first rinsed with phosphate-buffered saline solution (PBS), and then exposed to menadione diluted in PBS containing 0.1% DMSO (v/v). For the antioxidant pretreatment, cells were rinsed with PBS, and incubated for 15 min with 500  $\mu$ M NAC diluted in PBS before menadione exposure. Control cells were incubated with PBS containing the vehicle (0.1% DMSO, v/v) for 15 min. The  $t = 0$  time point refers to the end of the menadione exposure corresponding to substitution of the menadione medium with fresh complete medium.

### *Cellular viability assay*

Mitochondrial function was assessed as an index of cellular viability using the MTT method. This assay measures the ability of mitochondrial dehydrogenases to convert 3-[4,5-dimethylthiazol -2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to colored formazan. Cells were seeded on six-well plates (9.5 cm<sup>2</sup>) at an initial density of  $0.15 \times 10^6$  cells/well. After treatment, cells were incubated for 3 h at 37°C with MTT (5 mg/ml) diluted in PBS. Then, the medium was removed, and cells were lysed by addition of 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS). Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (MR 5000, Dynatech, France). Viability was estimated from the absorbance of treated versus untreated cells.

### *Measurement of intracellular ROS production*

ROS production was measured by using the oxidant-sensitive dye dihydrorhodamine-123 (DHR-123). DHR-123 easily crosses cell membranes and, on oxidation by ROS, turns into fluorescent rhodamine-123. Astrocytes were plated on 10 cm culture dishes at an initial density of  $0.5 \times 10^6$  cells. Cell cultures were treated with menadione and were further incubated with 5  $\mu$ M DHR-123 for 15 min before the end of the treatment. Production of intracellular ROS was measured at different times after menadione exposure. After treatment, the cells were rinsed with PBS before being scraped off with a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.5% Tween 20

(v/v). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 10 min. The supernatant was then subjected to a spectrophotometric analysis to measure the rhodamine-123 fluorescence at 535 nm under excitation at 500 nm.

### *Glutathione assay*

Total glutathione (GSx) content was quantified according to the technique of Baker et al. [24] using the method originally described by Tietze [25]. This method requires the conversion of GSSG into GSH, which can react with DTNB. Astrocyte primary cultures were seeded on 10 cm culture dishes at an initial density of  $0.5 \times 10^6$  cells. Cells were scraped off after treatments with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). Proteins were subsequently precipitated with an equal volume of 5% TCA and pelleted by centrifugation at 2600g for 5 min. Supernatants were neutralized at a ratio of 130:55 with 20 mM Hepes buffer containing 300 mM KOH. Aliquots of the neutralized extract (50  $\mu$ l) were further treated with 100  $\mu$ l of reaction mixture containing 225  $\mu$ M DTNB, 300  $\mu$ M NADPH, and 23 units of glutathione reductase in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). GSx, which is the amount of GSH plus two times the amount of GSSG, was then measured by a spectrophotometric analysis using a Dynatech microplate reader at 405 nm. To determine the GSH content, aliquots of the neutralized extract (50  $\mu$ l) were treated with the reaction mixture without glutathione reductase. GSSG content was calculated as follows:  $2\text{GSSG} = \text{GSx} - \text{GSH}$ . Glutathione levels were quantified using standards of GSH, which were processed through exactly the same procedure as the cell extracts.

### *Estimation of protein oxidation*

Carbonyl content was determined as an index of protein oxidation using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivation method as described by [26]. This spectrophotometric assay is based on the detection of protein hydrazones formed by the reaction of DNPH with protein carbonyls. Astrocyte primary cultures were seeded on 10 cm culture dishes at an initial density of  $0.5 \times 10^6$  cells. After treatment, astrocytes were scraped off with PBS. The harvested cellular homogenates were mixed with 4 vol of 2 M HCl solution containing 10 mM DNPH, except for the blanks. The protein concentration of homogenates was usually of 1 mg/ml. Mixtures were left for 1 h at room temperature in the dark with agitation every 10 min. An equal volume of 20% TCA (w/v) was added and the samples were further incubated for 10 min at 4°C, and then centrifuged for 3 min at 11,000g. The pellets were washed for 10 min with 1.5 ml of ethanol:ethyl acetate (1:1) (v/v) to remove the excess DNPH and TCA, and were centrifuged for 3 min at 11,000g. This washing step was performed five times.

The resulting pellets were dissolved in 6 M guanidine hydrochloride (0.6 ml) for 15 min at 37°C with agitation. Carbonyl content was calculated from absorbance at 360 nm using an absorption coefficient of 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### *Measurement of pro-inflammatory mediator release*

Cells were seeded on six-well plates (9.5 cm<sup>2</sup>) at an initial density of 0.15 × 10<sup>6</sup> cells/well. Production of nitrite and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) was measured 12, 24, and 48 h after the menadione exposure. The concentration of nitrite, a stable metabolite of NO, was determined in culture supernatants by the Griess assay as described by Kiemer and Vollmar [27]. PGE<sub>2</sub> release was measured in the medium with a commercially available enzyme immunoassay kit (Assay Designs, USA). Positive controls were obtained by exposure of astrocytes to bacterial lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (1 µg/ml).

#### *Preparation of microsomes from cultured cells*

Astrocytes were seeded on 10 cm culture dishes at an initial density of 0.5 × 10<sup>6</sup> cells. After treatment, cells were scraped off in a 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) complemented with 1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol, and were sonicated for 50 s at 60 W output power. The homogenate was centrifuged at 10,000g for 20 min, and the resulting supernatant was further centrifuged at 100,000g for 60 min. The microsomal pellet was suspended using a manual glass Dounce-type homogenizer in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) to which was added 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 20% glycerol (v/v), and stored at -80°C until use. For the V79 cell line, microsomes were obtained by the same method but using a 5 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose.

#### *Protein content measurement*

Protein content was determined using the BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Chemical Co., London, UK) according to the manufacturer's protocol.

#### *Measurement of glucuronidation activity*

As UDP-glucuronosyltransferases are membrane-bound enzymes, microsomes were activated before assays by addition of 0.15 mg Triton X-100/mg protein for 15 min on ice [28] to obtain maximal enzyme activation.

For 1-NP glucuronidation measurement, activated astrocytes or V79 cell line microsomes (100 µg) were incubated for 30 min at 37°C in 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.4), in the presence of 1 mM 1-NP, 2 mM UDP-GlcA, in a final volume of 200 µl. The reaction was stopped by addition of 200 µl of 0.4 M TCA and 0.6 M glycine buffer (pH 2.2), and the

unreacted substrate was extracted with 4 ml of chloroform. The mixture was centrifuged at 1000g for 10 min, and 1.8 ml of 0.1 M NaOH solution was added to the supernatant. 1-NP glucuronide was quantified by spectrofluorometry at 330 nm under excitation at 290 nm, using 1-β-D-naphthylglucuronide as a calibration standard.

For ketoprofen (KPF) glucuronidation measurement, activated microsomes (100 µg) were incubated for 60 min at 37°C in 100 mM sodium acetate (pH 5.4), containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, in the presence of 1 mM KPF and 3 mM UDP-GlcA, in a final volume of 100 µl. The reaction was stopped by addition of 6 M HCl (10 µl). Samples were centrifuged at 2300g for 10 min. The supernatant was analyzed by HPLC on a 100 × 8 mm, 5 µm particle Novapak C18 column inserted in a Radial-Pak compression module. Chromatographic separation was performed using a mobile phase (water:acetonitrile:trifluoroacetic acid, 65:35:0.04, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Spectrophotometric changes were detected with a UV detector (486-Waters; Waters, France) at 256 nm.

#### *RT-PCR analysis of iNOS, COX-2, and UGT1A6 mRNA expression in astrocytes*

Astrocytes were seeded on six-well plates (9.5 cm<sup>2</sup>). Total RNA from astrocytes was isolated by the single-step guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method using Trizol Reagent (Life Technologies Inc., France) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was recovered in water and quantified from the absorbance at 260 nm. The purity was verified by spectrophotometry (absorbance ratio at 260 nm vs that at 280 nm). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from RNA samples by mixing 2 µg total RNA and 500 pmol of poly(dT) in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3), 80 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM dithiothreitol, 200 units of Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase, and 0.5 mM of each dNTP in a total volume of 20 µl. Samples were incubated for 1 h at 37°C and 5 min at 95°C. The cDNA products were diluted 2-fold. A 2 µl aliquot was used for each amplification by PCR and added to the incubation mixture containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase in a total volume of 50 µl. Separate PCRs for UGT1A6, iNOS, COX-2, and L27 amplification were performed using the following primers: UGT1A6 (Accession No. U16818, 817 bp product), sense 5'-CTC AGT TCT AGG TGA CAA GC-3', antisense 5'-GCC GTT GAC ATA GGC TTC AAA TTC C-3'; iNOS (Accession No. L09210, 333 bp product), sense 5'-AGA ATG TGA CCA TCA TGG ACC-3', antisense 5'-ATG CAG ACA ACC TTG GTG TTG AAG G-3';

COX-2 (Accession No. M90100, 443 bp product), sense 5'-TCC AGA TCA CAT TTG ATT GAC AG-3', antisense 5'-TGT GGG AGG ATA CAT CTC TCC-3' and L27 (Accession No. NM022514, 364 bp product), sense 5'-GCT GTC GAA ATG GGC AAG TT-3', antisense 5'-CAA ACT TGA CCT TGG CCT CC-3'. PCR conditions allowing to be in the exponential phase of PCR were: number of cycles ( $n$ ) = 34, annealing temperature (AT) = 62°C for UGT1A6;  $n$  = 28, AT = 59°C for COX-2; and  $n$  = 28, AT = 62°C for iNOS and L27. Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining, and quantified by densitometry with Quantity One software (Version 4.3) and Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad Laboratories, France). All amplicons were of the expected size. Results were expressed relative to the level of L27 (a housekeeping gene coding for a ribosomal protein) and are shown as percentages of mRNA expression from control.

#### Reporter plasmid construction

The UGT1A6 promoter fragment -979 to -93 (relative to the transcription start point in the UGT1A6 gene) was amplified by PCR on rat astrocyte genomic DNA using the following primers: UGT1A6 (Accession No. AF359280, 887 bp product), sense 5'-CAG CTT CTG ATA ATT CTG GCT CTA C-3', antisense 5'-AGC TCT CTC TCC CTG ACT CTA A-3'. The PCR product was visualized by agarose gel electrophoresis, excised for purification using a gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and cloned into a green fluorescent protein (GFP) reporter vector, pGlow-TOPO (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's protocol. Plasmid construct was recovered using an endotoxin-free Maxiprep kit (Qiagen, France). DNA sequencing was used to verify the plasmid construct.

#### Transient transfection assay

For transfection experiment,  $5 \times 10^4$  astrocytes were seeded onto six-well plates. At 50% confluence, astrocytes were co-transfected for 2 h with 2  $\mu$ g of pGlow/UGT1A6 (-979/-93)-GFP construct, and 0.5  $\mu$ g of the  $\beta$ -galactosidase plasmid cytomegalovirus (Promega, Charbonnières, France) using Exgen 500 (Euromedex, Mundolsheim, France) according to the manufacturer's instructions, and were further grown for 48 h in complete medium. After menadione exposure, astrocytes were harvested with PBS and pelleted at 1500g for 5 min. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40). The lysate was incubated on ice for 10 min and centrifuged at 10,000g for 10 min. GFP expression was measured in the supernatant (50  $\mu$ l) by spectrofluorometry at 510 nm under excitation at 485 nm. GFP

expression was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity that was assessed photometrically at 420 nm in the supernatant, using *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside as substrate.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed on experimental data. Following analysis of variances, different groups were compared using Student's *t* test. Differences between groups were considered significant when *p* values were less than .05. Results are expressed as means  $\pm$  SD.

## RESULTS

#### Characterization of astrocyte primary culture purity

The purity of our primary cultures was checked by detection of a specific astrocyte marker, GFAP, by immunocytochemistry. Figure 1 clearly shows the green fluorescence staining of GFAP in most ( $\geq 95\%$ ) cultured cells (1: GFAP-positive cell; 2: GFAP-negative cell).

#### Effect of a menadione treatment on cell viability

The MTT assay was used to determine time- and concentration-dependent changes in viability after exposure of confluent primary astrocyte cultures and recombinant cells to menadione (Table 1). Loss of viability was limited ( $\sim 10\%$  or less) in V79 cells treated with 5  $\mu$ M menadione for 4 h and with 20  $\mu$ M for 15 min or 1 h for

■ GFAP  
■ propidium iodide

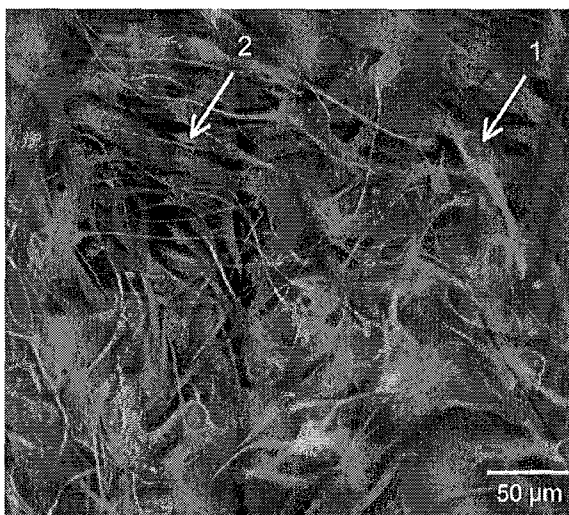


Fig. 1. Characterization of astrocyte primary cultures. The purity of the cultured cells was evaluated by detection of GFAP (green color), a specific astrocyte marker (1: GFAP-positive cell/2: GFAP-negative cell), and co-staining with propidium iodide (red color) for the nuclear DNA. Magnification:  $\times 40$ , Bar = 50  $\mu$ m.

Table 1. Cellular Viability after Menadione Treatments

Menadione ( $\mu\text{M}$ )	Incubation time (h)	Cellular viability (% of control)	
		Astrocytes	V79-1A6
5	0.25	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 9
	1	97 $\pm$ 21	100 $\pm$ 15
	4	95 $\pm$ 12	83 $\pm$ 5*
20	0.25	91 $\pm$ 7*	93 $\pm$ 2*
	1	92 $\pm$ 7*	91 $\pm$ 3*
	4	44 $\pm$ 8*	71 $\pm$ 5*

\*Cell cultures were incubated with different concentrations of menadione for 0–4 h. Cellular viability was determined by the MTT method. Results are given as means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments).

\* $p < .05$ , significantly different from control.

both V79-1A6 cells and astrocytes. No significant modification of cellular viability was observed with 5  $\mu\text{M}$  menadione added for 15 min or 1 h.

Cellular viability was not affected even 48 h after a 5  $\mu\text{M}$  menadione treatment for 15 min and a 500  $\mu\text{M}$  NAC antioxidative treatment for 15 min. Moreover, no modification of cell viability was observed after treatment with BSO (20  $\mu\text{M}$ , 24 h), SOD (30  $\mu\text{g/ml}$ , 15 min), and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{M}$ , 15 min) (data not shown).

### Reactive oxygen species production

DHR-123 allowed visualization of intracellular ROS production (Fig. 2). In the presence of menadione, both V79-1A6 cell and primary astrocyte cultures produced ROS in a concentration-dependent manner but the highest ROS-dependent fluorescence was observed with astrocytes (data not shown). Thus, ROS production was measured after a 5  $\mu\text{M}$ , 15 min menadione exposure (considered as  $t = 0$ ) and from 6 to 48 h after the treatment (Fig. 2A). At  $t = 0$ , ROS production was already higher than the control level (+119%). However, the quantity of rhodamine-123 detected in astrocytes returned to control level at  $t = 6$  h and remained constant up to 48 h. Moreover, pretreatment with 500  $\mu\text{M}$  NAC for 15 min (Fig. 2B) partially prevented the production of ROS (+46%). Therefore, we considered that 5  $\mu\text{M}$  menadione treatment of cells for 15 min was nontoxic, and a valuable experimental model of the increase in the oxidative environment of the cultured cells.

### Glutathione assay in astrocyte cultures

After oxidative treatment, a significant loss of GSH was observed ( $-24\%$  at  $t = 0$ , compared with control), whereas GSSG content remained unaffected (Fig. 3A). GSH level then returned to the basal value at  $t = 6$  h and remained constant up to 48 h after menadione exposure.

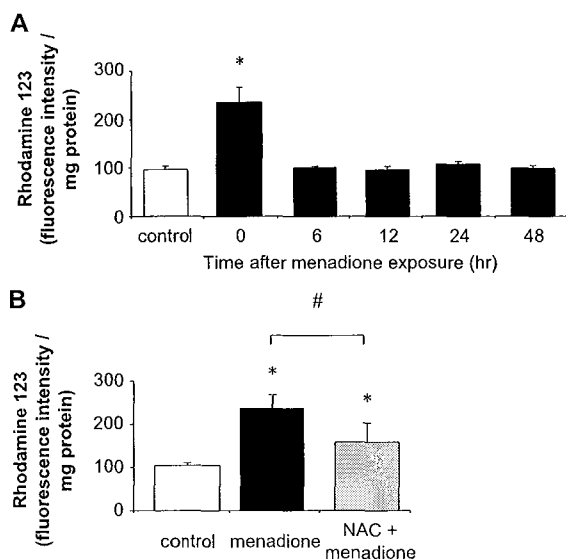


Fig. 2. Measurement of intracellular ROS production. Astrocytes were co-incubated with 5  $\mu\text{M}$  DHR-123 and 5  $\mu\text{M}$  menadione for 15 min. (A) Production of intracellular ROS was measured at  $t = 0$ , as well as 6, 12, 24, and 48 h after treatment. (B) ROS production was also measured at  $t = 0$  after a 500  $\mu\text{M}$ , 15 min NAC pretreatment. The fluorescent rhodamine-123 was measured by spectrofluorometry at 535 nm under excitation at 500 nm. Results are given as means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments). \* $p < .05$ , significantly different from control; # $p < .05$ , significantly different between treatments.

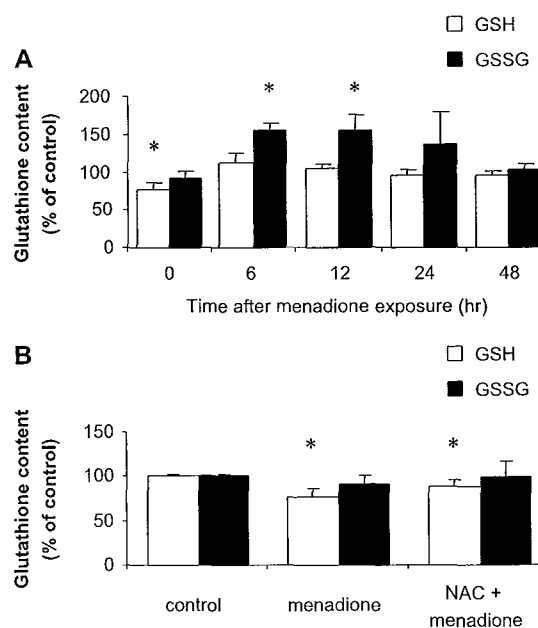


Fig. 3. Variations of intracellular GSH and GSSG levels in astrocyte cultures. (A) Cellular GSH and GSSG levels were measured from  $t = 0$  to 48 h after 5  $\mu\text{M}$  menadione treatment for 15 min. (B). These levels were also observed at  $t = 0$  after a 500  $\mu\text{M}$ , 15 min NAC pretreatment. All values are means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments). \* $p < .05$ , significantly different compared with control.

In contrast, the GSSG level was significantly increased at 6 and 12 h after oxidative treatment (+55% and +50%, respectively). The GSSG level returned to basal values at  $t = 24$  h after treatment. In addition, at  $t = 0$ , a NAC pretreatment (Fig. 3B) partially prevented the loss of GSH (-10%), whereas the GSSG level remained unchanged.

*Carbonyl content in astrocyte cultures*

The menadione treatment rapidly induced total protein oxidation. From  $t = 0$  to 12 h after menadione exposure (Fig. 4A), carbonyl content remained significantly higher (+26%) than that of the control. Then, a decrease in the carbonyl level to basal value was observed 24 h after oxidative treatment, and remained constant up to 48 h. At  $t = 0$ , NAC pretreatment entirely prevented the carbonyl content increase (Fig. 4B).

*Estimation of pro-inflammatory mediator release*

In contrast to endotoxin exposure (LPS, 1  $\mu\text{g/ml}$ ), no significant release of nitrite and PGE<sub>2</sub> was observed 12, 24, and 48 h after menadione treatment (Figs. 5A and 5B). Furthermore, no expression of COX-2 and

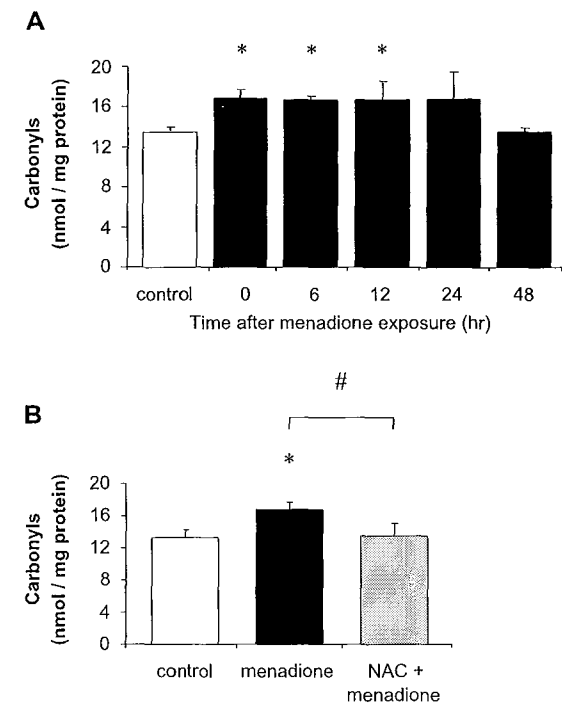


Fig. 4. Effect of menadione on carbonyl content in astrocyte cultures. (A) Carbonyl content was measured after 15 min exposure to 5  $\mu\text{M}$ , menadione ( $t = 0$ ) and 6, 12, 24, and 48 h after treatment. (B) Carbonyl content was also measured at  $t = 0$  after a 500  $\mu\text{M}$ , 15 min NAC pretreatment. All values are means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments). \* $p < .05$ , significantly different compared with control; # $p < .05$ , significantly different between treatments.

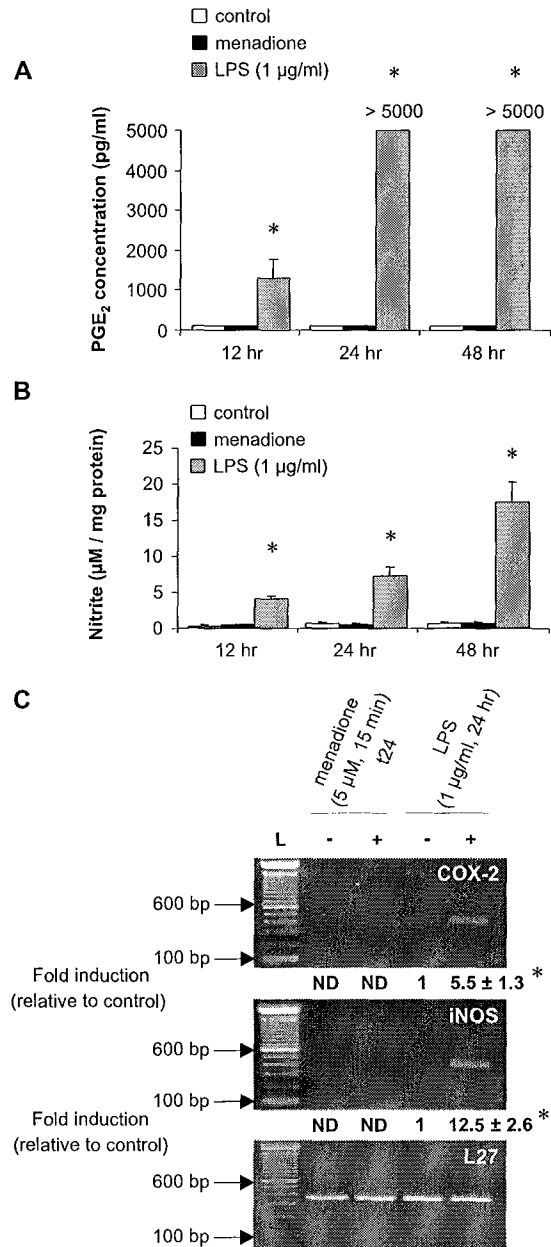


Fig. 5. Measurement of release of pro-inflammatory mediators and analysis of levels of COX-2 and iNOS expression. (A,B) Induction of PGE<sub>2</sub> (A) and nitrite (B) release in supernatant of primary astrocyte cultures 12, 24, and 48 h after a 5  $\mu\text{M}$ , 15 min menadione treatment. Exposures to LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 12, 24, and 48 h are shown as positive controls. Results are given as means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments). (C) Semiquantitative RT-PCR of COX-2 and iNOS expression after a 24 h recovery following a 5  $\mu\text{M}$ , 15 min menadione treatment and after a 1  $\mu\text{g/ml}$ , 24 h LPS exposure. This experiment is representative of three assays. \* $p < .05$ , significantly different between control and LPS treatments. L, ladder; ND, not detectable.

iNOS mRNA (Fig. 5C) occurred after oxidative treatment, whereas treatment with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS promoted 5.5- and 12.5-fold induction for COX-2 and iNOS, respectively.

### Glucuronidation activity in astrocytes after menadione exposure

As suggested by their glucuronidation ability toward different substrates, astrocytes express several UGT isoforms. Glucuronidation toward 1-NP and KPF was measured after menadione exposure (5  $\mu$ M, 15 min) to assess the activity of both the UGT1A and UGT2B families (Fig. 6). At  $t = 0$ , glucuronidation activity strongly decreased by 50% for 1-NP and 32% for KPF, corresponding to the maximum effect of oxidative stress. At 6, 12, and 24 h after menadione exposure, glucuronidation in astrocytes was still significantly decreased compared with control, but the decrease was less than that observed at  $t = 0$ . Total recovery of glucuronidation was observed at  $t = 48$  h after oxidative treatment. Conversely, pretreatment with 500  $\mu$ M NAC for 15 min entirely prevented the decrease in astrocyte glucuronidation activity induced by oxidative stress, whatever the time point considered.

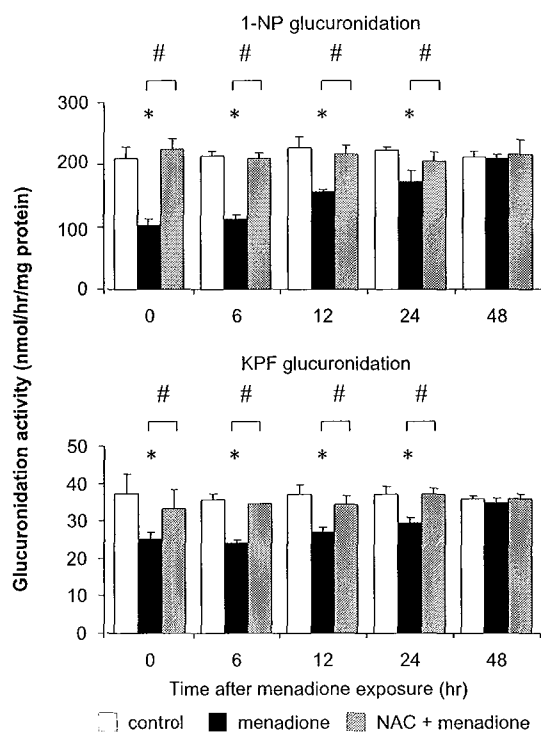


Fig. 6. Measurement of glucuronidation activity of astrocytes. Glucuronidation activity was studied in a primary culture of astrocytes, pretreated or not with NAC (500  $\mu$ M, 15 min). After 15 min incubation with 5  $\mu$ M menadione ( $t = 0$ ), as well as after 6, 12, 24, and 48 h recovery following incubation, glucuronidation activity was evaluated in activated astrocytes microsomes (100  $\mu$ g) using 1-NP or KPF, and the cosubstrate. The amount of glucuronide was measured by spectrofluorometry at 330 nm under excitation at 290 nm for 1-NP and by HPLC at 256 nm for KPF. Results are given as means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments). \* $p < .05$ , significantly different from control; # $p < .05$ , significantly different between treatments.

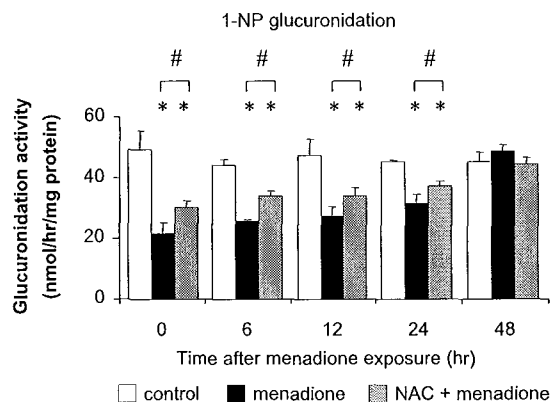


Fig. 7. Measurement of glucuronidation activity of V79 cells. Glucuronidation activity was studied in a V79-1A6 cell line, pretreated or not with NAC (500  $\mu$ M for 15 min). After 15 min incubation with 5  $\mu$ M menadione ( $t = 0$ ), as well as after 6, 12, 24, and 48 h recovery following incubation, 1-NP glucuronidation activity was evaluated in activated V79-1A6 cell line microsomes (100  $\mu$ g). The amount of glucuronide was measured by spectrofluorometry at 330 nm under excitation at 290 nm for 1-NP. Results are given as means  $\pm$  SD ( $n = 5$  independent experiments). \* $p < .05$ , significantly different from control; # $p < .05$ , significantly different between treatments.

### Glucuronidation activity in V79 cell line after menadione exposure

The use of a V79 cell line transfected with rat UGT1A6 cDNA allowed the specific measurement of conjugation activity triggered by the UGT1A6 isoform (Fig. 7). V79-1A6 cells metabolized 1-NP four times less efficiently than astrocytes. Moreover, V79-1A6 cells

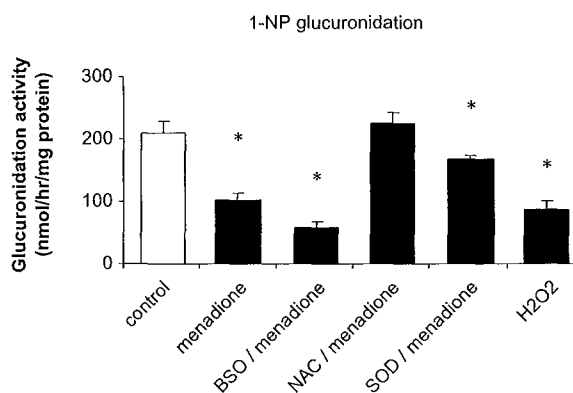


Fig. 8. Effect of SOD, BSO, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments on glucuronidation activity in astrocytes. Primary cultures were treated with 5  $\mu$ M menadione for 15 min or with 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min or were exposed to 20  $\mu$ M L-buthionine[*S,R*]sulfoximine and 500  $\mu$ M NAC 24 h and 15 min, respectively, prior to menadione (5  $\mu$ M, 15 min) treatment. Cells were co-treated with menadione (5  $\mu$ M) and superoxide dismutase (30  $\mu$ g/ml) for 15 min. After incubation, glucuronidation activity was evaluated in activated astrocytes microsomes (100  $\mu$ g) using 1-NP and the cosubstrate. The amount of glucuronide was measured by spectrofluorometry at 330 nm under excitation at 290 nm. Results are given as means  $\pm$  SD ( $n = 6$  independent experiments). \* $p < .05$ , significantly different from control.

were not able to metabolize KPF. After menadione exposure, glucuronidation activity strongly decreased ( $-55\%$  at  $t = 0$ ). At 6, 12, and 24 h after the oxidative treatment, V79-1A6 glucuronidation was still significantly decreased compared with control, but the decrease was lower than that observed at  $t = 0$ . Total recovery of glucuronidation was observed at  $t = 48$  h after oxidative treatment. Pretreatment with NAC ( $500 \mu\text{M}$ , 15 min) partially prevented the oxidant treatment-induced decrease in glucuronidation activity. The control level of 1-NP glucuronidation, after NAC pretreatment, was recovered 48 h after treatment.

#### Effects of $\text{H}_2\text{O}_2$ , BSO/menadione, and SOD/menadione treatments on astrocyte glucuronidation activity

To better characterize the mechanisms by which menadione induces the decrease in glucuronidation activity, astrocytes were treated with  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 15 min, pretreated with BSO ( $20 \mu\text{M}$ , 24 h) before menadione exposure ( $5 \mu\text{M}$ , 15 min), and co-treated with SOD ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) and menadione ( $5 \mu\text{M}$ ) for 15 min (Fig.

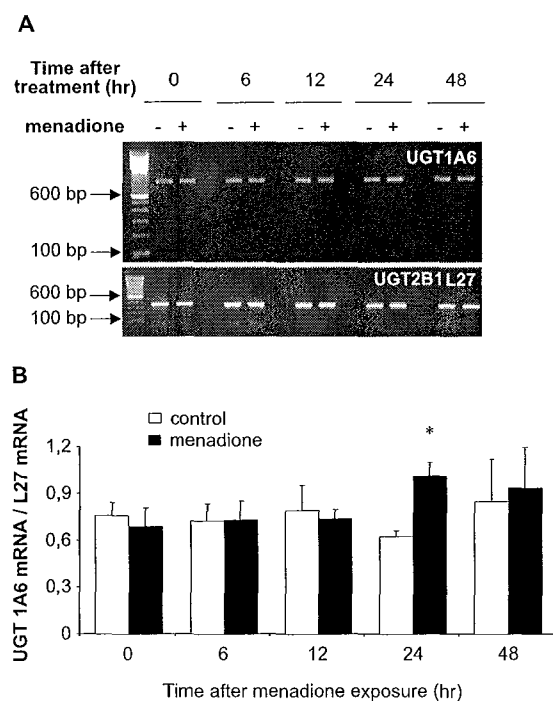


Fig. 9. Expression of UGT1A6 mRNA in astrocyte cultures. Expression of the UGT1A6 and L27 genes was studied at different times of recovery following the menadione treatment. (A) Ethidium bromide gel electrophoresis of RT-PCR amplicons was achieved with primers to probe the UGT1A6 and L27 in rat astrocytes. The size of the amplicons was 817 and 364 bp for UGT1A6 and L27, respectively. This experiment is representative of six assays. (B) The quantity of UGT1A6 mRNA relative to L27 mRNA was calculated in astrocyte cultures treated or not with menadione as described under Materials and Methods. Each value represents the mean  $\pm$  SD of six separate measurements. \* $p < .05$ , significantly different from control.

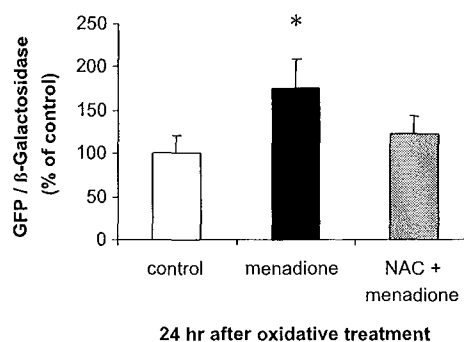


Fig. 10. Transient transfection assay. Astrocytes were cotransfected with pGlow/UGT1A6 ( $-979/-93$ )-GFP and pCMV/ $\beta$ -galactosidase plasmids and incubated 48 h later with  $5 \mu\text{M}$  menadione for 15 min with or without a NAC pretreatment. Results from six independent experiments are means  $\pm$  SD of GFP expression normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and shown as percentages increase in control values. \* $p < .05$ , significantly different from control.

8). Then, under these conditions,  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment induced a decrease in glucuronidation by approximately 60%. Compared with menadione exposure, pretreatment with BSO strongly decreased glucuronidation activity ( $-73\%$ ), whereas SOD co-treatment partially prevented this decrease ( $-19\%$ ).

#### Regulation of UGT1A6 isoform expression in astrocytes after menadione exposure

The effect of menadione treatment on UGT1A6 isoform mRNA levels was assessed by semiquantitative RT-PCR (Figs. 9A and 9B). A significant increase (1.7-fold) in UGT1A6 expression was observed only at  $t = 24$  h after oxidative treatment. PBS containing the vehicle (0.1% DMSO v/v) altered neither UGT1A6 nor L27 mRNA levels (data not shown).

#### Activation of the UGT1A6 isoform promoter after menadione exposure

Expression of GFP driven by the UGT1A6 isoform promoter was assessed in transfected astrocytes after oxidative treatment (Fig. 10). An increase in GFP expression (+80%) was clearly observed 24 h after menadione exposure ( $5 \mu\text{M}$ , 15 min). Moreover, pretreatment with  $500 \mu\text{M}$  NAC for 15 min was sufficient to prevent the increase in GFP expression.

## DISCUSSION

In the present work, we first validated a procedure to obtain a moderate experimental oxidative stress that promotes the production of significant amounts of ROS without altering the viability of astrocytes during our assays. For that purpose, treatments with different low concentrations of menadione and for limited durations were run on astrocytes. We considered the treatment with

5  $\mu\text{M}$  menadione for 15 min as valuable in obtaining a mild oxidative stress. This protocol was also applied to the transfected V79 cell line, and did not promote disturbances in mitochondrial function (MTT assay). The efficiency of this pro-oxidant treatment was established by the increase in intracellular ROS content as shown by the increase in rhodamine-123 fluorescence. The presence of NAC prevented menadione-dependent superoxide production.

The intracellular redox state is controlled mainly by intracellular glutathione levels, and reflects a balance between sulfhydryls and disulfides that can be altered by ROS and other oxidants. Our data on astrocytes have shown that menadione exposure rapidly depletes GSH without increasing GSSG ( $t = 0$ ). As reported by Seung *et al.* [29], menadione is able to deplete GSH by arylation and formation of a menadione–glutathione conjugate. Moreover, superoxide radicals produced during menadione metabolism by cultured astrocytes [22] also promote GSH oxidation, observable as an increase in the GSSG level 6 and 12 h after treatment. Thus, we have chosen to study the formation of protein carbonyls, which are actually the most general indicator and, by far, the most commonly used marker of protein oxidation [30,31]. Thus, in addition to GSH/GSSG level modifications, production of ROS caused a carbonyl content increase from  $t = 0$  to 12 h after menadione exposure. Twenty-four hours after treatment, carbonyl content returned to the control level, suggesting a degradation of the oxidized proteins by cytosolic proteases and/or an increase in protein synthesis. Furthermore, this oxidative treatment neither produced pro-inflammatory mediators (NO and  $\text{PGE}_2$ ) nor induced the COX-2 or iNOS expression level. We can conclude that all these cellular modifications result from increased intracellular ROS production. In this way, a precursor of GSH synthesis, *N*-acetyl-L-cysteine, partially prevented the decrease in GSH level but totally prevented carbonyl formation.

Alterations in the intracellular redox state can modify the activity of a number of enzymes that have a cysteine residue in their catalytic domain [32]. To characterize UGT activity modifications promoted by a moderate oxidative stress, we used 1-NP, an exogenous phenol that is a preferential substrate for the UGT1A6 isoform, and a nonsteroidal anti-inflammatory drug, KPF, which is metabolized mainly by the rat UGT2B1 isoform [33]. The use of V79 cells transfected with rat UGT1A6 cDNA allowed us to demonstrate modifications in the specific activity of UGT1A6 isoform after oxidative treatments. On the other hand, modifications of total glucuronidation activity toward the model substrates were established on astrocyte primary cultures. Astrocytes displayed an important basal glucuronidation activity toward 1-NP, but a low activity toward KPF. These results are in

accordance with previous studies, where we showed that, as compared with neurons or cerebrovascular endothelial cells, the UGT1A6 isoform is preferentially expressed in rat astrocyte primary cultures, where it efficiently catalyzes 1-NP glucuronidation [21].

After a time-limited exposure to 5  $\mu\text{M}$  menadione, we observed two different responses depending on the delay after the experimental oxidative stress. First, as a result of protein oxidation, glucuronidation activity rapidly decreased in both astrocyte and V79 cell cultures. This inhibitory effect was completely abolished in astrocytes by pretreatment with NAC. In the transfected V79 cell line, the presence of NAC only partially prevented the decrease in glucuronidation efficiency, probably due to antioxidant defense capacities lower than those of astrocytes. To verify this hypothesis, astrocytes were pretreated with BSO, which causes glutathione depletion and decreases antioxidant defense capacities. Thus, the decrease in glucuronidation activity was more important after pre-treatment with BSO. Moreover, when astrocytes were co-treated with superoxide dismutase and menadione, the decrease in UGT activity was lower than that after treatment with menadione alone. The presence of SOD partially prevented the enzymatic inhibition, confirming the important involvement of superoxide radicals. Furthermore, superoxide can be transformed to hydrogen peroxide which, as shown in our results, also causes a decrease in glucuronidation activity. Then, the rapid decrease in UGT1A6 activity should directly result from the intracellular excess of ROS triggering oxidative modification of the protein. This concept is supported by the evidence that exposure to free radical-generating systems changes catalytic activities and thermal stability and increases sensitivity to proteolytic degradation due to partial unfolding of numerous proteins [34,35]. All the above-mentioned actions of ROS are fully reversed or prevented by thiol reagents, suggesting the presence of functionally important thiol-containing residues in the active or binding sites. Accordingly, the presence of cysteine side chains (Cys 121, 125, and 126) has recently been demonstrated in the active site of UGT1A6, which is involved in the 1-NP glucuronidation process [36,37]. Both thiol-directed agents and site-directed mutagenesis of Cys 126 inactivated UGT1A6. Therefore, the UGT1A6 inhibition we observed after an oxidative treatment should result from direct Cys 121, 125, or 126 oxidation. The susceptibility of amino acids to oxidation varies greatly, although methionine and cysteine residues are highly susceptible to oxidation by a variety of physiological and nonphysiological systems [38]. Such oxidations, producing methionine and cysteine sulfoxide, have been implicated in the cellular changes



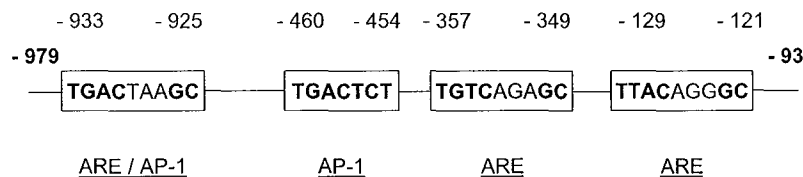


Fig. 11. Visualization of the UGT1A6 promoter fragment (-979/-93) used for the reporter plasmid construction. Numbers indicate the position relative to the transcription start site.

associated with normal or pathological brain aging [39]. More subtle changes in catalytic activity due to active site amino acid oxidation may also result from limited conformational changes and/or from hydrophobicity changes [35], which could be important as the UGT active site possesses a highly conserved amino-terminal hydrophobic region with amino acids important for the functional and structural integrity of the enzyme [40].

On the other hand, the recovery of 1-NP glucuronidation activity we observed in astrocytes 48 h after menadione treatment suggests the involvement of another mechanism. In that case, the recovery of glucuronidation may result from an upregulation of UGT1A6 expression, as suggested by semiquantitative RT-PCR. Thus, ROS could alter UGT regulation at both transcriptional and translational levels. In this way, a downregulation of CYP1A1 expression has been observed in rat H4 hepatoma cells under a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-promoted oxidative stress [19]. Some CYP isoforms are downregulated by oxidant agents, whereas some others remain unaffected. In contrast, it has been shown that the expression of several phase II enzymes, including UGT, was induced in rat liver subjected to an oxidative stress by oral oltipraz administration [41]. Moreover, regulation of UGT1A6 isoform expression should differ depending on the tissue considered. Thus, induction of UGT expression in rat liver but no variation in the rat small intestinal mucosa was described after an oxidative stress [42]. Therefore, the experimental conditions of oxidative treatment, the tissue, and the nature of oxidant agents may promote different responses.

A number of genes encoding enzymes involved in phase I and II (i.e., functionalization and conjugation) metabolism of xenobiotics have been found to contain functional responsive elements in their 5'-regulatory region: the antioxidant response element (ARE), and the xenobiotic response element (XRE). Cellular exposure to chemical entities, including electrophilic compounds, antioxidants, and other agents capable of generating radical species that alter the cellular redox state, lead to transcriptional activation through the ARE and, then, upregulation of drug-metabolizing enzymes [43]. Thus, UGT genes, which contain functional ARE in the promoter region [41], are upregulated in the liver by the transcription factor NrF2 during oxidative stress [44].

This NrF2 factor can also be a key regulator of cytoprotective phase II genes in mouse [45,46]. Moreover, an increase in AP-1 DNA binding activity has also been shown in neuronal and mice astrocytic primary cultures after an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress [47] and in rat brain after hyperoxia [48]. In the present study, the overexpression of mRNA encoding UGT1A6 by moderate oxidative conditions may be associated with the presence of ARE regulatory elements and/or AP-1 binding sites. The UGT1A6 promoter fragment (887 bp, Fig. 11), used for the reporter plasmid construction, contained a conserved ARE motif (TGACNNGC) and two modified ARE motifs. It also contained two modified AP-1 binding sites (TGACTCA). In this way, the increase in GFP expression, observed by transient transfection assay, suggests the involvement of transcription factors such as NrF2 and AP-1.

In conclusion, the present work shows that an experimental increase in oxidative cellular status can rapidly modulate glucuronidation activity in cerebral astrocytes. Alternatively, intracellular redox status change can induce overexpression of the UGT1A6 isoform through activation of its promoter as shown by transient transfection. This increase in UGT1A6 expression may be associated with transcription factor activation and suggests then the involvement of specific binding sites on the UGT1A6 promoter. These results can explain the decrease in cerebral glucuronidation previously described in aged brain [49]. Hence, these findings may be relevant to aging, but also to neurodegenerative diseases involving inflammation where brain metabolism can be deeply altered.

*Acknowledgments*—We warmly thank Dr. S. Fournel-Gigleux for valuable comments on the manuscript and for supplying the V79 cell line expressing rat recombinant UGT1A6.

#### REFERENCES

- [1] Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**:47–95; 2002.
- [2] Franco, A. A.; Odom, R. S.; Rando, T. A. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:1122–1132; 1999.
- [3] Khodr, B.; Khalil, Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:1–8; 2001.

- [4] LeBel, C. P.; Bondy, S. C. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* **13**:341–346; 1991.
- [5] Schafer, F. Q.; Qian, S. Y.; Buettner, G. R. Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **46**:657–662; 2000.
- [6] Floyd, R. A.; Hensley, K. Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **23**:795–807; 2002.
- [7] Lehotsky, J.; Kaplan, P.; Matejovicova, M.; Murin, R.; Racay, P.; Raeymaekers, L. Ion transport systems as targets of free radicals during ischemia reperfusion injury. *Gen. Physiol. Biophys.* **21**:31–37; 2002.
- [8] Lagrange, P.; Romero, I. A.; Minn, A.; Revest, P. A. Trans-endothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood–brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:667–672; 1999.
- [9] Guan, Z. Z.; Zhang, X.; Mousavi, M.; Tian, J. Y.; Unger, C.; Nordberg, A. Reduced expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptors during the early stages of damage by oxidative stress in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **66**:551–558; 2001.
- [10] Gilman, S. C.; Bonner, M. J.; Pellmar, T. C. Effect of oxidative stress on excitatory amino acid release by cerebral cortical synaptosomes. *Free Radic. Biol. Med.* **15**:671–675; 1993.
- [11] Wang, J. Y.; Shum, A. Y.; Ho, Y. J. Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J. Neurosci. Res.* **72**:508–519; 2003.
- [12] Mattson, M. P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* **21**:53–57; 1998.
- [13] Fukui, K.; Omoi, N. O.; Hayasaka, T.; Shinnkai, T.; Suzuki, S.; Abe, K.; Urano, S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann. NY Acad. Sci.* **959**:275–284; 2002.
- [14] Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* **302**:819–822; 2003.
- [15] Makar, T. K.; Nedergaard, M.; Pruss, A.; Gelbard, A. S.; Perumal, A. S.; Cooper, A. J. Vitamin E ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* **62**:45–53; 1994.
- [16] Dringen, R.; Hirrlinger, J. Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* **384**:505–516; 2003.
- [17] Wilson, J. X. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**:1149–1163; 1997.
- [18] Brand, A.; Leibfritz, D.; Richter-Landsberg, C. Oxidative stress-induced metabolic alterations in rat brain astrocytes studied by multinuclear NMR spectroscopy. *J. Neurosci. Res.* **58**:576–585; 1999.
- [19] Morel, Y.; de Waziers, I.; Barouki, R. A repressive cross-regulation between catalytic and promoter activities of the CYP1A1 and CYP2E1 genes: role of H(2)O(2). *Mol. Pharmacol.* **57**:1158–1164; 2000.
- [20] Bock, K. W. Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem. Pharmacol.* **66**:691–696; 2003.
- [21] Suleman, F. G.; Abid, A.; Gradinaru, D.; Daval, J. L.; Magdalou, J.; Minn, A. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**:63–67; 1998.
- [22] Bayol-Denizot, C.; Daval, J. L.; Netter, P.; Minn, A. Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurones. *Biochim. Biophys. Acta* **1497**:115–126; 2000.
- [23] Fournel-Gigleux, S.; Sutherland, L.; Sabolovic, N.; Burchell, B.; Siest, G. Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferase cDNAs in V79 cell cultures. *Mol. Pharmacol.* **39**:177–183; 1991.
- [24] Baker, M. A.; Cerniglia, G. J.; Zaman, A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.* **190**:360–365; 1990.
- [25] Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**:502–522; 1969.
- [26] Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**:464–478; 1990.
- [27] Kiemer, A. K.; Vollmar, A. M. Effects of different natriuretic peptides on nitric oxide synthesis in macrophages. *Endocrinology* **138**:4282–4290; 1997.
- [28] Suleman, F. G.; Ghersi-Egea, J. F.; Leininger-Muller, B.; Minn, A. Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes. *Neurosci. Lett.* **161**:219–222; 1993.
- [29] Seung, S. A.; Lee, J. Y.; Lee, M. Y.; Park, J. S.; Chung, J. H. The relative importance of oxidative stress versus arylation in the mechanism of quinone-induced cytotoxicity to platelets. *Chem. Biol. Interact.* **113**:133–144; 1998.
- [30] Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**:20313–20316; 1997.
- [31] Chevion, M.; Berenshtein, E.; Stadtman, E. R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.* **33**(Suppl.):S99–S108; 2000.
- [32] Ziegler, M.; Xiao, R.; Penefsky, H. S. Close proximity of Cys64 and Cys140 in the delta subunit of *Escherichia coli* F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**:4233–4239; 1994.
- [33] Pritchard, M.; Fournel-Gigleux, S.; Siest, G.; Mackenzie, P.; Magdalou, J. A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase 2B1) stably expressed in V79 cells catalyzes the glucuronidation of morphine, phenols, and carboxylic acids. *Mol. Pharmacol.* **45**:42–50; 1994.
- [34] Davies, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. General aspects. *J. Biol. Chem.* **262**:9895–9901; 1987.
- [35] Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**(Pt. 1):1–18; 1997.
- [36] Ikushiro, S.; Emi, Y.; Iyanagi, T. Activation of glucuronidation through reduction of a disulfide bond in rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Biochemistry* **41**:12813–12820; 2002.
- [37] Senay, C.; Jedlitschky, G.; Terrier, N.; Burchell, B.; Magdalou, J.; Fournel-Gigleux, S. The importance of cysteine 126 in the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6. *Biochim. Biophys. Acta* **1597**:90–96; 2002.
- [38] Stadtman, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:797–821; 1993.
- [39] Hoshi, T.; Heinemann, S. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.* **531**:1–11; 2001.
- [40] Senay, C.; Ouzzine, M.; Battaglia, E.; Pless, D.; Cano, V.; Burchell, B.; Radomska, A.; Magdalou, J.; Fournel-Gigleux, S. Arginine 52 and histidine 54 located in a conserved amino-terminal hydrophobic region (LX2-R52-G-H54-X3-V-L) are important amino acids for the functional and structural integrity of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1\*6. *Mol. Pharmacol.* **51**:406–413; 1997.

- [41] Buetler, T. M.; Gallagher, E. P.; Wang, C.; Stahl, D. L.; Hayes, J. D.; Eaton, D. L. Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **135**:45–57; 1995.
- [42] Vargas, M.; Lamb, J. G.; Franklin, M. R. Phase II-selective induction of hepatic drug-metabolizing enzymes by oltipraz-5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione-, 1,7-phenanthroline, and 2,2'-dipyridyl in rats is not accompanied by induction of intestinal enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **26**:91–97; 1998.
- [43] Lee, J. M.; Shih, A. Y.; Murphy, T. H.; Johnson, J. A. NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **278**: 37948–37956; 2003.
- [44] Enomoto, A.; Itoh, K.; Nagayoshi, E.; Haruta, J.; Kimura, T.; O'Connor, T.; Harada, T.; Yamamoto, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* **59**:169–177; 2001.
- [45] Wakabayashi, N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kang, M. I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Talalay, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2040–2045; 2004.
- [46] Kang, M. I.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, N.; Kim, S. G.; Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:2046–2051; 2004.
- [47] Scortegagna, M.; Galdzicki, Z.; Rapoport, S. I.; Hanbauer, I. Activator protein-1 DNA binding activation by hydrogen peroxide in neuronal and astrocytic primary cultures of trisomy-16 and diploid mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **73**:144–150; 1999.
- [48] Tong, L.; Toliver-Kinsky, T.; Rassin, D.; Werrbach-Perez, K.; Perez-Polo, J. R. Hyperoxia increases AP-1 DNA binding in rat brain. *Neurochem. Res.* **28**:111–115; 2003.
- [49] Leclerc, S.; Heydel, J. M.; Amosse, V.; Gradinaru, D.; Cattarelli, M.; Artur, Y.; Goudonnet, H.; Magdalou, J.; Netter, P.; Pelczar, H.; Minn, A. Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase iso-

forms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **107**:201–213; 2002.

#### ABBREVIATIONS

ARE — antioxidant response element  
 BSO — L-buthionine [*S,R*]- sulfoximine  
 COX-2 — cyclooxygenase 2  
 DHR-123 — dihydrorhodamine-123  
 DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium  
 DNP — 2,4-dinitrophenylhydrazine  
 DTNB — 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)  
 FITC — fluorescein isothiocyanate  
 GFAP — glial fibrillary acidic protein  
 GFP — green fluorescent protein  
 GSH — reduced glutathione  
 GSSG — oxidized glutathione  
 GSx — total glutathione  
 iNOS — inducible nitric oxide synthase  
 KPF — ketoprofen  
 LPS — lipopolysaccharide  
 MTT — 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
 NAC — *N*-acetyl-L-cysteine  
 $\beta$ -NADPH —  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt  
 1-NP — 1-naphthol  
 PGE<sub>2</sub> — prostaglandin E<sub>2</sub>  
 ROS — reactive oxygen species  
 RT-PCR — reverse transcription polymerase chain reaction  
 SOD — superoxide dismutase  
 TCA — trichloroacetic acid  
 UDP-GlcA — UDP-glucuronic acid  
 UGT — UDP-glucuronosyltransferase

Manuscript prepared for: *Neuropharmacology*

Title:

**Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes**

Running title: Alteration of drug biotransformation by LPS

**Heurtaux T., Benani A., Moulin D., Muller N., Netter P., Minn A.**

*Unité Mixte de Recherche CNRS – Université Henri Poincaré Nancy 1, N° 7561, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.*

Keywords: Brain, Metabolism, Nitric Oxide, Prostaglandin E<sub>2</sub>, UGT1A6, EMSA

Corresponding author: Dr A. Minn

Unité Mixte de Recherche CNRS-Université Henri Poincaré Nancy 1, N° 7561, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Tel.: +33-383 683 976; fax: +33-383 683 959

e-mail: [minn@medecine.uhp-nancy.fr](mailto:minn@medecine.uhp-nancy.fr)

List of Abbreviations

AP-1 – Activator Protein-1 / Dex – dexamethasone / DHR-123 – dihydrorhodamine-123 / EMSA – electrophoretic mobility shift analysis / ERK – extracellular signal-regulated protein kinase / GFAP – glial fibrillary acidic protein / GFP – green fluorescent protein / LPS – lipopolysaccharide / MAPK – mitogen-activated protein kinase / MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide / 4-MU – 4-methylumbelliferone / L-NAME – N(O)-nitro-L-arginine methyl ester / L-NMMA – N(G)-monomethyl-L-arginine acetate salt / NO – nitric oxide / PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub> / ROS – reactive oxygen species / RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction / UDP-GlcA – UDP-glucuronic acid / UGT – UDP-glucuronosyltransferase

## **Abstract**

Alteration of drug metabolism under diseased conditions is of clinical importance. We have investigated the effects of inflammatory conditions on phase II drug-metabolizing enzyme activity in rat cultured astrocytes. Lipopolysaccharide (LPS) treatment was used to promote inflammatory conditions. Thus, we reported that LPS initiates an inflammatory response, which is mediated by pro-inflammatory mediators and free radical generation. An increase in astrocyte glucuronidation activity was observed after a 48 hr LPS treatment. This increase in glucuronidation activity was associated with an up-regulation of the UGT1A6 isoform mRNA level as shown by RT-PCR and gene reporter assay. Moreover, this endotoxin-induced increase in UGT1A6 expression level was blocked by actinomycin D and cycloheximide, indicating the requirement for RNA and protein synthesis. The UGT1A6 expression enhancement could be prevented by anti-inflammatory drugs (dexamethasone and NS398) or nitric oxide synthase inhibitors (L-NAME and L-NMMA). Moreover, gel shift assay revealed increased AP-1 (activator protein-1) binding activity after LPS treatment.

We propose, based on the data presented, that the action of LPS to induce UGT1A6 isoform up-regulation may be mediated by pro-inflammatory mediator accumulation, and AP-1 binding activity increase.

## **Introduction**

The inflammatory reaction occurs in response to tissue injury, and is intended primarily to restore tissue integrity (Ali and Mann, 2004). It is characterized by the production of numerous cellular mediators as cytokines, arachidonic acid metabolites, reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), which act in concert to eliminate harmful agents and facilitate healing. Although acute inflammation is fundamentally beneficial, persistent inflammation may display deleterious effects triggered by a long-term secretion of cytokines and others pro-inflammatory mediators, as observed during sepsis (Mueller et al., 2001). In the central nervous system (CNS), inflammation is associated to various neurological injuries such as bacterial and viral infections (Pawate et al., 2004), cerebral ischemia (Berti et al., 2002), and neurodegenerative disorders including multiple sclerosis (Barac-Latas et al., 1997), Alzheimer's (Paris et al., 1999) and Parkinson's diseases (Castano et al., 2002). Current evidence indicates that inflammatory processes may cause neurotransmission changes (Linthorst and Reul, 1998), neuronal apoptosis (Nolan et al., 2003), neural stem cell dysfunction (Monje et al., 2003), and cognitive impairment (Hokkanen and Launes, 2000). However, little is known about the impact of the inflammatory reaction on CNS homeostasis and brain metabolism. Nevertheless, it has been recently proposed that cerebral metabolism could be altered under oxidative stress, an event frequently associated to ageing or neuro-inflammation (Heurtaux et al., 2004).

Numerous studies have shown that pro-inflammatory stimuli could markedly interfere in cellular metabolism pathways in liver, kidney, or intestine, by affecting either transport system efficiency or enzymatic activity (Kielian and Esen, 2004). Among enzymes whose functions are altered by inflammation mediators, hepatic drug-metabolizing enzymes appear highly sensitive to cytokines and endotoxin exposure (Ferrari et al., 1993). In particular, the

expression of phase I drug-metabolizing enzymes, including numerous cytochrome P450 isoforms, are up- or down-regulated during inflammation, depending on both the isoform and the tissue considered (Sewer et al, 1997; Kelicen and Tindberg, 2004). However, there is limited knowledge concerning inflammation effects on phase II drug-metabolizing enzymes, such as UDP-glucuronosyltransferases (UGT, EC 2.4.1.17). The reaction of glucuronidation is achieved by several UGT isoenzymes, belonging to a multigenic superfamily of enzymes that catalyze the transfer of glucuronic acid (UDP-GlcA) to a wide range of exogenous and endogenous substrates. This enzymatic activity results in an increase in substrate water solubility, and modifies biological activity or toxicity of these substrates (Bock, 2003). In the brain, glucuronidation is completed mainly by astrocytes which exhibit the highest UGT1A6 activity and expression among brain cells (Suleman et al., 1998).

Therefore, we investigated whether the cerebral activity of phase II drug-metabolizing enzymes could be affected under inflammatory conditions in the CNS as it has been already reported in hepatocytes (Congiu et al., 2002). For this purpose, we subjected rat astrocyte primary cultures to an endotoxin exposure, using lipopolysaccharide (LPS). We also investigated the implication of pro-inflammatory mediators in order to characterize UGT1A6 expression regulation in these conditions.

## **Materials and methods**

### *Drugs and chemicals*

4-methylumbelliferone (4-MU), actinomycin D (ActD), cycloheximide (CHX), dexamethasone (Dex), dihydrorhodamine-123 (DHR-123), NS398, N(O)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N(G)-monomethyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA), lipopolysaccharide (LPS, from *E. coli* 0111:B4), UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA), were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Cell culture products were provided by Gibco (Cergy-Pontoise, France). All reagents for reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) were obtained from Eurobio (Les Ulis, France).

### *Animals*

This study was performed with female and male Wistar rats (Iffa Credo, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). The animals were maintained under standard laboratory conditions on 12:12 hr light/dark cycle with unrestricted access to standard food and tap water. To obtain newborn rats, two adult females and one male were housed together for 48 hr. Pregnant females were then maintained in separate cages. The study was approved by the local Animal Ethic Committee, and all procedures adhered to the "Principles of laboratory animal care".

### *Primary cultures and characterization of astrocytes*

Astrocytes were prepared from newborn Wistar rat brains, as described previously (Bayol-Denizot et al., 2000). Precisely, 1-day-old rats were sacrificed by decapitation and the brains were rapidly removed and placed in the culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum). Residual meningeal tissues were



removed from brains by using fine scissors and tweezers. The cells were dissociated in the culture medium by passing through a hypodermic syringe (21G, 0.8 × 25 mm) and centrifuged at 200 g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in culture medium and plated on 75 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 2 brains per flask. The cells were grown in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, and the culture medium was renewed twice a week. All experiments were carried out on cell subcultures at passage 2. Cell culture purity was characterized by immunocytochemical detection of a specific astrocyte marker, the glial fibrillary acidic protein (GFAP) as previously described (Heurtaux et al., 2004).

#### *Cell treatments*

All treatments were applied to confluent cultures. Cells were treated with different concentrations of LPS (0.1, 1 and 10 µg/ml) diluted in PBS and added to the culture medium during 12, 24 and 48 hr. In order to elucidate whether LPS may regulate UGT1A6 isoform, primary astrocyte cultures were pre-treated for 4 hr with 3 µM actinomycin D or 30 µM cycloheximide before LPS treatment or co-treated for 24 hr with LPS and dexamethasone (10 µM), NS398 (100 nM), L-NAME (1 mM) or L-NMMA (1 mM).

#### *Cellular viability assay*

Mitochondrial function was assessed as an index of cellular viability using the MTT method. This assay measures the ability of mitochondrial dehydrogenases to convert 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to colored formazan. Cells were seeded on 6 wells plate (9.5 cm<sup>2</sup>) at an initial density of 0.15 × 10<sup>6</sup> cells/well. After treatment, cells were incubated for 3 hr at 37°C with MTT (5 mg/ml) diluted in PBS. Then, the medium was removed, and cells were lysed by addition of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) (w/v). Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (MR 5000,

Dynatech, France). Viability was estimated from the absorbance of treated versus untreated cells.

#### *Measurement of intracellular ROS production*

ROS production was measured using the oxidant-sensitive dye dihydrorhodamine 123 (DHR-123). DHR-123 easily crosses cell membranes, and upon oxidation by ROS, turns into fluorescent rhodamine-123. Astrocytes were plated on 10 cm culture dishes at an initial density of  $0.5 \times 10^6$  cells. Cell cultures were treated with LPS and were further incubated with 5  $\mu$ M DHR-123 for 15 min before the end of the treatment. After treatment, the cells were rinsed with PBS before being scraped off with a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), and 0.5% Tween 20 (v/v). The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant was then subjected to spectrophotometric analysis to measure rhodamine-123 fluorescence at 535 nm under excitation at 500 nm.

#### *Measurement of pro-inflammatory mediator release*

Cells were seeded on 6 wells plates (9.5 cm<sup>2</sup>) at an initial density of  $0.15 \times 10^6$  cells/well. The production of nitrite and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) was measured after 12, 24 and 48 hr LPS treatment or after co-treatments. The concentration of nitrite, a stable metabolite of NO, was determined in culture supernatants by the Griess assay as described by Kiemer and Vollmar (1997). PGE<sub>2</sub> release was measured in the medium by a commercially available enzyme immunoassay kit (Assay Designs, USA).

#### *Preparation of microsomes from cultured cells*

Astrocytes were seeded on 10 cm culture dishes at an initial density of  $0.5 \times 10^6$  cells. After treatments, cells were scraped off in a 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)

complemented with 1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol (DTT), and were sonicated for 50 sec at a 60 W-output power. The homogenate was centrifuged at 10,000 *g* for 20 min, and the resulting supernatant was further centrifuged at 100,000 *g* for 60 min. The microsomal pellet was suspended using a manual glass Dounce-type homogenizer in a 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) added with 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol (v/v), and stored at - 80°C until use.

#### *Protein content measurement*

Protein content was determined using the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Chemical Company, London, UK) according to the manufacturer's protocol.

#### *Measurement of glucuronidation activity*

As UDP-glucuronosyltransferases are membrane-bound enzymes, microsomes were activated before assays by addition of 0.15 mg Triton X-100/mg protein for 15 min on ice (Suleman et al., 1993) to obtain maximal enzyme activation.

For 4-methylumbelliferone (4-MU) glucuronidation measurement, activated astrocytes microsomes (100 µg) were incubated for 30 min at 37°C in a 150 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> buffer (pH 7.6), in the presence of 1 mM 4-MU, 5 mM UDP-GlcA, in a final volume of 200 µl. The reaction was stopped by addition of 800 µl of cold water, and the unreacted substrate was extracted with 4 ml of ethyl acetate. The mixture was centrifuged at 1,000 *g* for 10 min, and 1.8 ml of 0.25 M glycine solution was added to the aqueous phase. 4-MU glucuronide was quantified by spectrofluorometry at 380 nm under excitation at 320 nm, using 4-β-D-methylumbelliferylglucuronide as a calibration standard.

*RT-PCR analysis of iNOS, COX-2 and UGT1A6 mRNA expression in astrocytes*

Astrocytes were seeded on 6 wells plates (9.5 cm<sup>2</sup>) at an initial density of  $0.15 \times 10^6$  cells/well. Total RNA from astrocytes was isolated by a single-step guanidium thiocyanate-phenol chloroform method using Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was recovered in water and quantified from the absorbance at 260 nm. The purity was verified by spectrophotometry (absorbance ratio at 260 nm *versus* 280 nm). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from RNA samples by mixing 2 µg total RNA, 500 pmol of polydT in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3), 80 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT, 200 units of Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase, and 0.5 mM of each dNTP in a total volume of 20 µl. Samples were incubated for 1 hr at 37°C and 15 min at 70°C. The cDNA products were diluted 2-fold. A 2 µl aliquot was used for each amplification by PCR and added to the incubation mixture containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase in a total volume of 50 µl. Separate PCR for UGT1A6, iNOS, COX-2 and L27 amplification was performed using the following primers: UGT1A6 (access number: U16818, 817 bp product), sense 5'-CTC AGT TCT AGG TGA CAA GC-3', antisense 5'-GCC GTT GAC ATA GGC TTC AAA TTC C-3'; iNOS (access number: L09210, 433 bp product), sense 5'-AGC AGA ATG TGA CCA TCA TGG ACC-3', antisense 5'-ATG CAG ACA ACC TTG GTG TTG AAG G-3'; COX-2 (access number: M90100, 443 bp product), sense 5'-TCC AGA TCA CAT TTG ATT GAC AG-3', antisense 5'-TGT GGG AGG ATA CAT CTC TCC-3' and L27 (access number: NM022514, 364 bp product), sense 5'-GCT GTC GAA ATG GGC AAG TT-3', antisense 5'-CAA ACT TGA CCT TGG CCT CC-3'. PCR conditions allowing to be in the exponential phase of PCR were: number of cycles (n) = 34, annealing temperature (AT) = 62°C for UGT1A6; n = 28, AT = 59°C for COX-2 and n = 28, AT = 62°C for iNOS and L27.

Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining, and quantified by densitometry with Quantity One<sup>®</sup> software (v. 4.3) and Gel Doc 2000<sup>™</sup> apparatus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). All amplicons were of the expected size. Results were expressed relatively to the level of L27, a housekeeping gene coding for a ribosomal protein, and are shown as percentage of mRNA expression from control.

#### *Reporter plasmid construction*

The UGT1A6 promoter fragment - 979 to - 93 (number relative to the transcription start point in the UGT1A6 gene) was amplified by PCR on rat astrocyte genomic DNA using the following primers: UGT1A6 (access number: AF359280, 887 bp product), sense 5'-CAG CTT CTG ATA ATT CTG GCT CTA C-3', antisense 5'-AGC TCT CTC TCC CTG ACT CTA A-3'. The PCR product was visualized by agarose gel electrophoresis, excised for purification using a gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and cloned into a green fluorescent protein (GFP) reporter vector, pGlow-TOPO (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Plasmid construct was recovered using an endotoxin-free Maxiprep kit (Qiagen). DNA sequencing was used to verify the plasmid construct.

#### *Transient transfection assay*

For transfection experiment,  $5 \times 10^4$  astrocytes were seeded onto 6 well plates. At 50% confluence, astrocytes were cotransfected for 2 hr with 2  $\mu$ g of pGlow/UGT1A6 (-979/-93)-GFP construct, and 0.5  $\mu$ g of the  $\beta$ -galactosidase plasmid CMV (Promega, Charbonnieres, France) using Exgen 500 (Euromedex, Mundolsheim, France) according to the manufacturer's instructions, and were further grown for 48 hr in complete medium. After LPS exposure, astrocytes were harvested with PBS and pelleted at 1,500 g for 5 min. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1%

(v/v) Nonidet P-40). The lysate was incubated on ice for 10 min and centrifuged at 10,000 g for 10 min. GFP expression was measured in the supernatant (50  $\mu$ l) by spectrofluorometry at 510 nm under excitation at 485 nm. The GFP expression was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity that was assessed photometrically at 420 nm in the supernatant, using *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside as a substrate.

#### *Preparation of nuclear extracts*

Primary astrocyte cultures in 10 cm culture dishes were washed twice with cold PBS. Cells were scraped off in PBS and centrifuged at 200 g for 5 min. The pellet was then suspended in 500  $\mu$ l cytoplasmic extraction buffer consisting of 10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA and 1 mM DTT with proteases inhibitors (Roche, Meylan, France). The detergent Igepal CA-630 (Sigma) was added to a final concentration of 0.6% (v/v). Samples were mixed before centrifugation at 200 g for 5 min at 4°C. Nucleus pellets were then incubated in 50  $\mu$ l nuclear extraction buffer consisting of 20 mM Hepes (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.25% Igepal (v/v) and protease inhibitors for 30 min and vortexed every 6 min. The mixture was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Following centrifugation, an aliquot was removed for protein analysis. Nuclear extracts were stored at -80°C until use.

#### *Electrophoretic mobility shift analysis (EMSA)*

Nuclear protein extracts from primary astrocyte cultures treated by LPS were subjected to EMSA. The determination of AP-1 activation was assessed by evaluation of the nuclear protein extract-binding activity on a DNA probe containing the potential AP-1 binding site (**bold type**) which represents the fragment - 467 to - 448 (number relative to the transcription start point) of the rat UGT1A6 promoter. The probe was double-stranded oligonucleotides as

follows: sense 5'-CAGAAGGTGACTCT-3' and antisense 5'-CTCCTCAGAGTCAC-3', which were diluted at 10 ng/μl, and hybridized by incubation for 10 min at room temperature. The probe was labeled using Klenow enzyme (Promega, Madison, USA) and [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (Amersham, Saclay, France) according to the manufacturer's instructions. To remove unincorporated nucleotides, the probe was centrifuged at 1,200 g for 4 min on a Bio-Spin 30 Tris column (Bio-Rad). For gel shift analysis, purified probe (1 μl) and nuclear protein extract (10 μg) were incubated for 30 min at 4°C in a binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 5 mM DTT, 50% glycerol) containing 1 μg poly-dIdC in a final volume of 10 μl. Unlabelled oligomers, containing AP-1 sequences in a 100-fold molar excess, were used in competition assay. The DNA-protein complexes were separated by 5% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-Borate-EDTA buffer (0.5 X) at 150 V for 1 h 45. The gel was dried and then exposed onto storage Phosphor Screens<sup>®</sup> (Amersham), revealed and analyzed using a high resolution laser scanner (Typhoon<sup>™</sup>, Amersham). For gel supershift analysis, the following antibodies were further added to the reaction mixture: anti-cFos (sc-253X; Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France), anti-cJun (sc-45X; Tebu) or anti-p65 (sc-372X; Tebu).

#### *Site-directed mutagenesis*

The functionality of AP-1 binding sites on the UGT1A6 promoter was assessed by site-directed mutagenesis. The promoter of the UGT1A6 gene contained two AP-1 binding sites respectively in the - 933 to - 927 region (TGACTAA) and in the - 460 to - 454 region (TGACTCT) (number relative to the transcription start point). Thus, we mutated both regions present in our pGlow/UGT1A6(-979/-93)-GFP construct by using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, USA) according to the manufacturer's

protocol. All mutant constructs were verified by sequencing before transient transfection assay (previously described).

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed on experimental data. Following analysis of variances, different groups were compared using Student's *t*-test. Differences between groups were considered as significant when *P*-values were less than 0.05. Results are then expressed in means  $\pm$  standard deviation (S.D.).



## Results

### *Characterization of astrocyte primary culture purity*

The purity of our primary cultures was checked by detection of a specific astrocyte marker, the glial fibrillary acidic protein (GFAP) by immunocytochemistry. In our experimental conditions, most of 95% of the cultured cells were stained by the green fluorescence of GFAP (not shown).

### *Effect of treatments on cell viability*

MTT assay was used to determine changes in viability following exposure of confluent primary astrocyte cultures and recombinant cells to LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and others pre- and co-treatments. No loss of viability occurred in astrocyte cultures (data not shown).

### *Glucuronidation activity following LPS and pro-inflammatory cytokine exposure*

As suggested by their glucuronidation ability towards different substrates, astrocytes express several UGT isoforms. Glucuronidation toward 4-MU was measured after LPS exposure to assess the activity of UGT1A family (Fig. 1A). At t = 12 hr, glucuronidation activities decreased by 34% after a 0.1  $\mu$ g/ml LPS treatment whereas a 1 or 10  $\mu$ g/ml LPS treatment did not induce significant modification of activity. At t = 24 hr, LPS exposure had no effect on astrocyte glucuronidation activity. Moreover, at t = 48 hr, glucuronidation was increased by 84% in a dose-independent manner.

Glucuronidation activity was also evaluated in astrocytes following IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) and TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) exposure (respectively Fig. 1B and 1C), to verify the part of such cytokines in glucuronidation modulation. An IL-1 $\beta$  exposure did not induce activity modification at 12 and 24 hr of treatment, but after a 48 hr IL-1 $\beta$  treatment, glucuronidation

activity was increased by 41%. On the other hand, no effect on UGT activity was observed following a TNF- $\alpha$  treatment.

#### *Regulation of the UGT1A6 isoform expression in astrocytes following LPS and pro-inflammatory cytokine exposure*

The effect of LPS treatment on UGT1A6 isoform mRNA levels was assessed by semi-quantitative RT-PCR (Figs. 2A and 2B). From 12 hr of LPS treatment, a significant increase in UGT1A6 expression (1.6 fold) was observed. However, the highest increase in UGT1A6 expression (3.8 fold) was observed at 24 hr of treatment. At 48 hr of LPS exposure, this increase was less important (2.2 fold). Moreover, for a same time of treatment, no dose effect was observed. The effect of cytokine treatment on UGT1A6 isoform mRNA levels was also assessed by semi-quantitative RT-PCR. An IL-1 $\beta$  treatment was able to significantly increase the UGT1A6 expression level (1.6 fold) at only 24 hr of exposure (Figs. 2C and 2D). However, TNF- $\alpha$  treatment induced no modification of the UGT1A6 expression (Figs. 2E and 2F).

#### *Reactive oxygen species production*

DHR-123 allowed to visualize intracellular ROS production (not shown). Primary astrocyte cultures produced reactive oxygen species during 12 hr of LPS exposure in a dose-independent manner (+30%). However, no significant quantity of rhodamine-123 was detected in astrocytes after 24 and 48 hr of LPS exposure.

*Induction of COX-2 and iNOS expression levels and production of pro-inflammatory mediators following LPS treatment in astrocytes*

COX-2 and iNOS expression levels (Fig. 3A) were increased from 12 hr of 0.1 µg/ml LPS treatment. The increase in expression of both genes was also detectable at 24 hr and 48 hr of treatment but with a lower intensity. As a result of COX-2 and iNOS induction, PGE<sub>2</sub> and nitrite contents, respectively Figs. 3B and 3C, increased significantly after LPS exposure in a time-dependent manner.

*Effect of actinomycin D and cycloheximide on the LPS-induced UGT1A6 expression increase*

Pre-treatment of primary astrocyte cultures with actinomycin D (ActD, 3 µM) or cycloheximide (CHX, 30 µM) did not affect the basal expression of UGT1A6 whereas it suppressed the stimulating effect of LPS on UGT1A6, as respectively shown in Figs. 4A and 4B.

*Activation of the UGT1A6 isoform promoter after LPS exposure*

Expression of GFP driven by the UGT1A6 isoform promoter was assessed in transfected astrocytes after LPS treatment (Fig. 5). An increase in GFP expression (5.2 fold) was clearly observed 24 hr after LPS (1 µg/ml) exposure.

*Inhibition of the LPS-induced UGT1A6 expression increase by anti-inflammatory drugs*

Anti-inflammatory drugs (dexamethasone or NS398) were able to prevent LPS-induced UGT1A6 expression level increase (Fig. 6A). Moreover, dexamethasone totally prevented PGE<sub>2</sub> production (Fig. 6B) whereas NS398 strongly decreased this production. COX-2 induction promoted by LPS exposure was completely prevented by dexamethasone but partially by NS398 (Fig. 6C).

### *Inhibition of the LPS-induced UGT1A6 expression increase by NO synthase inhibitors*

Nitric oxide synthase inhibitors (L-NAME and L-NMMA) totally prevented the increase of the UGT1A6 expression level induced by LPS treatment (Fig. 7A). These compounds partially reduced nitrite production (Fig. 7B) but also iNOS expression increase resulting from LPS exposure (Fig. 7C).

### *LPS-mediated induction of UGT1A6 enhances AP-1 binding activity*

The DNA-binding activity of AP-1 was observed after 5 min LPS exposure (Fig. 8A), the maximal AP-1 activation being observed at 1 hr of treatment. The shifted band disappeared when an excess of unlabeled oligonucleotides was added as competitors in the nuclear protein-labeled probe mixture, demonstrating binding specificity. A supershift band appeared only with anti-cFos antibody (Fig. 8B) concomitantly with a decrease of the intensity of the related shifted band, confirming the binding of AP-1 on the radiolabeled probe. Neither the presence of anti-cJun nor anti-p65 antibodies was able to induce the formation of such a supershifted band. Moreover, AP-1 activation was inhibited by dexamethasone or L-NAME (Fig. 8C).

### *Mutation of the AP-1 binding sites in the UGT1A6 gene promoter decreased transcription from this promoter*

To investigate whether AP-1 motifs were involved in transcription of UGT1A6 gene promoter, we carried out transfection assays with promoter constructs mutated at the - 933 / - 927 site (Mut1), at the - 460 / - 454 site (Mut2), or at both sites (Mut3). As shown in Fig. 9, LPS-stimulated expression of GFP was seen in astrocytes transfected with the wild type construct (pGlow/UGT1A6(-979/-93)-GFP) (5 fold). The mutation of the - 933 / - 927 AP-1 site (Mut1 construct) did not affect the increase in GFP expression. However, the mutation of

the second AP-1 site in the - 460 / - 454 region (Mut2 construct) decreased the GFP expression by 2.6 fold. Mutation of both AP-1 binding sites, using the Mut3 construct, absolutely blocked the LPS-induced elevation of GFP expression.

## Discussion

In this study, we presented evidence that UGT1A6 isoform expression and AP-1 binding activity are increased by inflammatory signals in rat astrocyte cultures.

Numerous studies have shown that pro-inflammatory conditions could modify cellular metabolism pathways (Hassan et al., 2001; Renton, 2004). Our data on astrocytes show that a bacterial lipopolysaccharide exposure modifies total glucuronidation activity. To characterize these modifications, we used 4-MU, an exogenous phenol that is a preferential substrate for the UGT1A6 isoform (King et al., 2000; Hanioka et al., 2001). In astrocyte cultures, we observed two different responses depending on the duration of LPS exposure. First, we recorded a significant decrease in total glucuronidation activity at a dose of 0.1  $\mu\text{g/ml}$  after 12 hr of treatment. A non significant enzymatic activity decrease was observed at 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ . This total UGT activity modification, at  $t = 12$  hr, could be associated with a ROS production increase. These results are in accordance with a recent study where we showed that an increase in oxidative cellular status can rapidly decrease glucuronidation activity in cerebral astrocytes (Heurtaux et al., 2004). 4-MU glucuronidation was not affected after 24 hr of treatment but the highest increase in UGT activity was observed at 48 hr of treatment.

Administration of LPS induces an inflammatory response in animals through the activation of macrophages and the subsequent release of cytokines (Paton and Renton, 1998). Indeed, in both *in vivo* and *in vitro* experiments, LPS acts by inducing pro-inflammatory cytokines including notably interleukins (IL-1, IL-6), tumor necrosis factors and interferon-gamma (Pawate et al., 2004). Then, we wanted to show whether pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , could modulate cerebral glucuronidation. Contrary to TNF- $\alpha$ , which did not modify glucuronidation activity, IL-1 $\beta$  was able to increase the total enzymatic activity at 48 hr of treatment. The increase in UGT activity, observed for both LPS and IL-1 $\beta$

exposure, may result from an up-regulation of UGT1A6 expression, as suggested by semi-quantitative RT-PCR. We have also established that our conditions of LPS treatments induced pro-inflammatory genes, such as COX-2 and iNOS, resulting in an increase in PGE<sub>2</sub> and nitrite levels. It can be noticed that these pro-inflammatory conditions did not induce modification of the UGT2B1 isoform (not shown). Then, UGT2B1 seemed not to be regulated by the same mechanisms that the UGT1A6 isoform.

To establish the LPS-induced UGT1A6 overexpression mechanism, we used a single dose of LPS (1 µg/ml for 24 hr), corresponding to the highest induction of UGT1A6 expression level (3.8 fold). First, as it was shown by actinomycin D pre-treatment, the increase in UGT1A6 mRNA level is likely due to a stimulation of the transcriptional activity of the UGT1A6 gene rather than a stabilization of UGT1A6 mRNA. This was confirmed by the increase in GFP expression, observed by transient transfection assay, suggesting the involvement of transcription factors in LPS treatment. Using the translational inhibitor cycloheximide indicated also the requirement for *de novo* protein synthesis in the LPS stimulating effect on UGT1A6 gene. On the other hand, astrocytes were co-treated with LPS and COX-2 inhibitors (dexamethasone and NS398) or iNOS inhibitors (L-NAME and L-NMMA) to show the part of responsibility of prostaglandin and NO pathways in the LPS-induced UGT1A6 expression increase. The partial or total reduction of COX-2 expression, respectively by NS398 or dexamethasone, also inhibited UGT1A6 overexpression induced by the endotoxin exposure. Moreover, as a result of NO production decrease, both L-NAME and L-NMMA iNOS inhibitors also repressed UGT1A6 overexpression. These results suggest cross-talk between COX-2 and iNOS pathways. Our data are in accordance with numerous studies which established that dexamethasone, NS398, L-NAME or L-NMMA could prevent the induction of both iNOS and COX-2 (Day et al., 2003; Park et al., 2003; Uno et al., 2004).

Recent studies in astrocytes have indicated that tyrosine phosphorylation plays a crucial role in LPS signaling. One of the intracellular signaling pathways, brought about by LPS, was the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway which finally resulted in transcription factor activation (Buzas et al., 2002; Pawate et al., 2004). On the other hand, Bhat et al. (1998) reported that inhibition of p38 and ERK MAP kinases inhibited the LPS-induced NO production and iNOS expression in primary glial cultures. Furthermore, MAPK subfamilies were involved in COX-2 expression induction and subsequent PGE<sub>2</sub> production in human monocytes (Inoue et al., 2004) but also in human neutrophils (Nagano et al., 2002). On sight of these results, it was more and more reliable that iNOS, COX-2 and their metabolic products were tied with LPS-signaling pathway activation resulting finally in UGT1A6 overexpression.

A number of genes encoding enzymes involved in phase I and II (i.e., functionalization and conjugation) metabolism of xenobiotics have been found to contain functional responsive elements in their 5'-regulatory region. It is well known that UGT genes contain functional antioxidant response element (ARE) (Buetler et al., 1995), and AP-1 (Activator Protein-1) or NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) binding sites (Turgeon et al., 2000). During inflammation, pro-inflammatory transcription factors, such as AP-1, NF- $\kappa$ B or Nrf2 (Nuclear factor erythroid2-related factor 2), are activated (Hietaranta et al., 2004).

In the present study, the overexpression of mRNA encoding UGT1A6 by endotoxin is associated with the activation of the AP-1 transcription factor. We have demonstrated by Electrophoretic Mobility Shift Assay that the AP-1 dimer is early activated following LPS exposure. Moreover, the mutation of the two AP-1 binding sites blocked totally the increase in GFP expression induced by LPS exposure. The AP-1 site located in the - 460 / - 454 region of the UGT1A6 promoter seems to be the preferential site for AP-1 binding. Then, these results present evidence that AP-1 transcription factor could bind to its response element



located in the promoter to regulate the expression of UGT1A6, during inflammatory states. In our conditions, activated AP-1 complex may be composed in heterodimer with cFos and a member of the Jun family. We have also established that dexamethasone and L-NAME co-treatments could inhibit the AP-1 pathway. These results are in accordance with previous studies which reported that dexamethasone could suppress inflammation by inhibition of AP-1 activity (Gonzalez et al., 2000; Mittelstadt and Ashwell, 2001) and that nitric oxide actions are mediated by PKC and MAPK acting on AP-1 (Jones et al., 2004). Then, the inhibition of NO production by NO synthase inhibitors could inhibit AP-1 binding activity.

In conclusion, the present work shows that an experimental inflammatory state can induce the expression of the UGT1A6 isoform and thus modulate the glucuronidation activity in cerebral astrocytes. We reported that UGT1A6 expression level increase, following inflammatory state by LPS exposure, may be due to the activation and binding of AP-1 on the UGT1A6 promoter.

## References

Ali S, Mann DA (2004) - Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem Funct* 22:67-79.

Barac-Latas V, Suchanek G, Breitschopf H, Stuehler A, Wege H, Lassmann H (1997) - Patterns of oligodendrocyte pathology in coronavirus-induced subacute demyelinating encephalomyelitis in the Lewis rat. *Glia* 19:1-12.

Bayol-Denizot C, Daval JL, Netter P, Minn A (2000) - Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurones. *Biochim Biophys Acta* 1497:115-26.

Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC (2002) - Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1068-79.

Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL (1998) - Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 18:1633-41.

Bock KW (2003) - Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem Pharmacol* 66:691-6.

Buetler TM, Gallagher EP, Wang C, Stahl DL, Hayes JD, Eaton DL (1995) - Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz. *Toxicol Appl Pharmacol* 135:45-57.

Buzas B, Rosenberger J, Kim KW, Cox BM (2002) - Inflammatory mediators increase the expression of nociceptin/orphanin FQ in rat astrocytes in culture. *Glia* 39:237-46.

Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (2002) - The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 81:150-7.

Congiu M, Mashford ML, Slavin JL, Desmond PV (2002) - UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug Metab Dispos* 30:129-34.

Day SM, McLean JS, Lockhart JC, Ferrell WR (2003) - Combined inhibition of nitrenergic and prostanoid pathways in J774 macrophages. *Clin Exp Rheumatol* 21:625-31.

Ferrari L, Herber R, Batt AM, Siest G (1993) - Differential effects of human recombinant interleukin-1 beta and dexamethasone on hepatic drug-metabolizing enzymes in male and female rats. *Biochem Pharmacol* 45:2269-77.

Gonzalez MV, Jimenez B, Berciano MT, Gonzalez-Sancho JM, Caelles C, Lafarga M, Munoz A (2000) - Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol* 150:1199-208.

Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M (2001) - Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 25:65-75.

Hassan MQ, Hadi RA, Al-Rawi ZS, Padron VA, Stohs SJ (2001) - The glutathione defense system in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Appl Toxicol* 21:69-73.

Heurtaux T, Benani A, Bianchi A, Moindrot A, Gradinaru D, Magdalou J, Netter P, Minn A (2004) - Redox state alteration modulates astrocyte glucuronidation. *Free Radic Biol Med* 37:1051-63.

Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, Haapiainen R, Kempainen E (2004) - Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 323:192-6.

Hokkanen L, Launes J (2000) - Cognitive outcome in acute sporadic encephalitis. *Neuropsychol Rev* 10:151-67.

Inoue Y, Otsuka T, Niino H, Nagano S, Arinobu Y, Ogami E, Akahoshi M, Miyake K, Ninomiya I, Shimizu S, Nakashima H, Harada M (2004) - Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoid synthesis by IL-4 and IL-10 in human monocytes. *J Immunol* 172:2147-54.

Jones MK, Tsugawa K, Tarnawski AS, Baatar D (2004) - Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 318:520-8.

Kelicen P, Tindberg N (2004) - Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPbeta and -delta. *J Biol Chem* 279:15734-42.

Kielian T, Esen N (2004) - Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective. *Neurochem Int* 45:429-36.

Kiemer AK, Vollmar AM (1997) - Effects of different natriuretic peptides on nitric oxide synthesis in macrophages. *Endocrinology* 138:4282-90.

King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR (2000) - UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 1:143-61.

Linthorst AC, Reul JM (1998) - Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840:139-52.

Mittelstadt PR, Ashwell JD (2001) - Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 276:29603-10.

Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) - Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-5.

Mueller LP, Yoza BK, Neuhaus K, Loeser CS, Cousart S, Chang MC, Meredith JW, Li L, McCall CE (2001) - Endotoxin-adapted septic shock leukocytes selectively alter production of sIL-1RA and IL-1beta. *Shock* 16:430-7.

Nagano S, Otsuka T, Niino H, Yamaoka K, Arinobu Y, Ogami E, Akahoshi M, Inoue Y, Miyake K, Nakashima H, Niho Y, Harada M (2002) - Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway and regulation by anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol* 14:733-40.

Nolan Y, Vereker E, Lynch AM, Lynch MA (2003) - Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Exp Neurol* 184:794-804.

Paris D, Town T, Parker TA, Tan J, Humphrey J, Crawford F, Mullan M (1999) - Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Exp Neurol* 157:211-21.

Park SW, Lee SG, Song SH, Heo DS, Park BJ, Lee DW, Kim KH, Sung MW (2003) - The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. *Int J Cancer* 107:729-38.

Paton TE, Renton KW (1998) - Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in Hepal cells. *Biochem Pharmacol* 55:1791-6.

Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR (2004) - Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res* 77:540-51.

Renton KW (2004) - Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab* 5:235-43.

Sewer MB, Koop DR, Morgan ET (1997) - Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1445-54.

Suleman FG, Ghersi-Egea JF, Leininger-Muller B, Minn A (1993) - Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activities in rat brain microsomes. *Neurosci Lett* 161:219-22.

Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A (1998) - Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 358:63-7.

Turgeon D, Carrier JS, Levesque E, Beatty BG, Belanger A, Hum DW (2000) - Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *J Mol Biol* 295:489-504.

Uno K, Iuchi Y, Fujii J, Sugata H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T, Yoshimura T (2004) - In vivo study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* 309:995-1002.

## Figure legends

### **Fig. 1. Measurement of glucuronidation activity after LPS and cytokine exposure.**

Glucuronidation activity was studied on primary astrocyte cultures (A, B, C) using 4-MU and the cosubstrate. (A) After 12, 24 and 48 hr LPS exposure (0.1, 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ ), glucuronidation activity was evaluated in activated astrocyte microsomes (100  $\mu\text{g}$ ). (B, C) After 12, 24 and 48 hr IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) or TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) exposure, glucuronidation activity was measured in activated astrocyte microsomes (100  $\mu\text{g}$ ). The amount of 4-MU glucuronide was measured by spectrofluorometry at 380 nm under excitation at 320 nm. Results are given as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 independent experiments). \*  $p < 0.05$ , significantly different from control.

### **Fig. 2. Expression of UGT1A6 mRNA in astrocyte cultures after LPS and cytokine exposure.**

The expression of the UGT1A6 and L27 genes was studied at 12, 24 and 48 hr LPS (A, B) and cytokine treatments (C, D, E, F). (A, C, E) Ethidium bromide gel electrophoresis of RT-PCR amplicons was achieved with primers to probe the UGT1A6 and L27 in rat astrocytes. The size of the amplicons was 817 and 364 bp for UGT1A6 and L27, respectively. This is a representative experiment of six assays. (B, D, F) The quantity of UGT1A6 mRNA relative to L27 mRNA was calculated in astrocyte cultures treated with LPS or cytokines as described in Materials and Methods. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of six separate measurements. \*  $p < 0.05$ , significantly different from control. L, ladder.

### **Fig. 3. Analysis of COX-2 and iNOS expression levels and measurement of pro-inflammatory mediator release.**

The expression of COX-2 and iNOS genes was studied at 12, 24 and 48 hr LPS (0.1, 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Ethidium bromide gel electrophoresis of RT-PCR



amplicons was achieved with primers to probe the L27, COX-2 and iNOS in rat astrocytes after LPS exposure (A). The size of the amplicons was 364 bp, 443 bp and 433 bp for L27, COX-2 and iNOS respectively. This is a representative experiment of six assays. The induction of PGE<sub>2</sub> (B) and nitrite (C) release were measured in supernatant of primary astrocyte cultures after 12, 24 and 48 hr LPS treatment (0.1, 1 and 10 µg/ml). Results are given as mean ± S.D. (n = 6 independent experiments). \* *p*<0.05, significantly different between control and treatments. L, ladder.

**Fig. 4. Effects of actinomycin D and cycloheximide pre-treatment on the LPS-induced UGT1A6 mRNA overexpression.** (A, B) Primary astrocyte cultures were pre-treated for 4 hr with 3 µM actinomycin D (ActD) or 30 µM cycloheximide (CHX) with or without LPS treatment (1 µg/ml) for 24 hr. The quantity of UGT1A6 mRNA relative to L27 mRNA was evaluated and each value represents the mean ± S.D. of six separate measurements. \* *p*<0.05, significantly different from control.

**Fig. 5. Transient transfection assay.** Astrocytes were cotransfected with the pGlow/UGT1A6(-979/-93)-GFP and pCMV/β-galactosidase plasmids and incubated 48 hr later with LPS (1 µg/ml) for 24 hr. Results from six independent experiments are mean ± S.D of GFP expression normalized to β-galactosidase activity and shown as percentage increase in control values. \* *p*<0.05, significantly different from control.

**Fig. 6. Effects of COX-2 inhibitors on LPS-induced UGT1A6 expression increase.** Primary astrocyte cultures were cotreated with LPS and COX-2 inhibitors (dexamethasone (Dex) and NS398 (NS)). Primary astrocyte cultures were cotreated with 1 µg/ml LPS and 10 µM Dex or 100 nM NS for 24 hr. The quantity of UGT1A6 mRNA relative to L27 mRNA

was evaluated in (A). The effect of COX-2 inhibitors on PGE<sub>2</sub> release and the quantity of COX-2 mRNA relative to L27 mRNA were estimated in (B) and (C) respectively. Each value represents the mean ± S.D. of six separate measurements. \*  $p < 0.05$ , significantly different from control.

**Fig. 7. Effects of iNOS inhibitors on LPS-induced UGT1A6 expression increase.** Primary astrocyte cultures were cotreated with LPS and iNOS inhibitors (L-NAME and L-NMMA). Primary astrocyte cultures were cotreated with 1 µg/ml LPS and 1 mM L-NAME or 1 mM L-NMMA for 24 hr. The quantity of UGT1A6 relative to L27 mRNA was evaluated in (A). The effect of iNOS inhibitors on NO release and the quantity of iNOS mRNA relative to L27 mRNA were measured in (B) and (C) respectively. Each value represents the mean ± S.D. of six separate measurements. \*  $p < 0.05$ , significantly different from control.

**Fig. 8. Effect of LPS exposure on AP-1 DNA-binding activity in astrocytes.** Primary astrocyte cultures were treated with 1 µg/ml LPS. (A) Representative autoradiography showing the time course of AP-1 activation monitored by EMSA analysis. Nuclear proteins were extracted at 5 min, 15 min, 30 min, 1 hr, 3 hr, 6 hr and 12 hr LPS treatment. (B) Astrocyte nuclear extracts from 1 hr LPS exposure were mixed to labeled DNA probe with different antibodies. This is a representative autoradiography of six assays. (C) Astrocytes were co-treated with LPS (1 µg/ml) and an anti-inflammatory drug (10 µM dexamethasone, Dex), or a NO synthase inhibitor (1 mM L-NAME, N). Nuclear proteins were extracted after 1 hr LPS exposure. This is a representative autoradiography of six assays. FP indicates free probe; S, AP-1 related shifted complex; S-S, AP-1 related supershifted complex; (-) no nuclear extract added; 0, not treated astrocytes; n, no antibody added; cFos, cJun, p65, indicates addition of anti-cFos, anti-cJun, or anti-p65, respectively, into the nuclear extract-

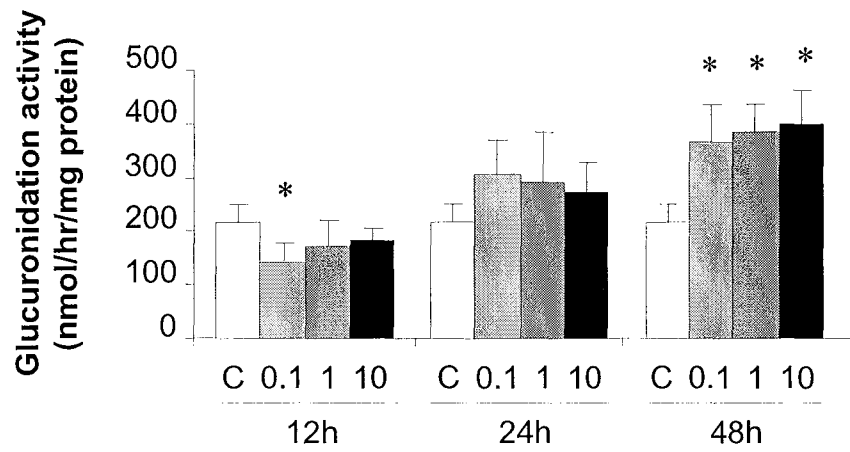
DNA probe mixture; Cp., competitor consisting in 100-fold unlabeled probe; P/cFos indicates mixture of DNA probe with anti-cFos and without protein extracts.

**Fig. 9. Effects of AP-1 site mutations in the UGT1A6 gene on responses to LPS exposure.**

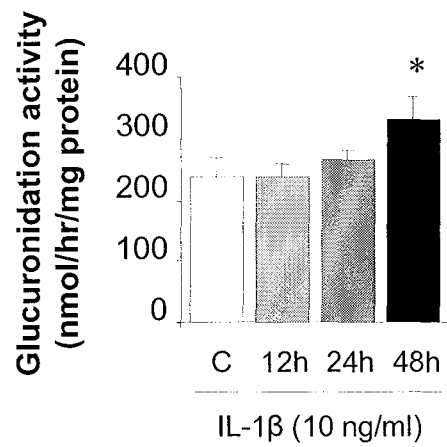
Astrocytes were cotransfected with the wild type (pGlow/UGT1A6(-979/-93)-GFP) or mutant constructs (Mut1, Mut2 and Mut3) and pCMV/ $\beta$ -galactosidase plasmid and incubated 48 hr later with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 24 hr. Mutated bases in AP-1 sites are shown by bold letters. Control samples were obtained after astrocyte cotransfection with the wild type and pCMV/ $\beta$ -galactosidase plasmids but without LPS exposure. Mut3 was a double mutant in which both AP-1 sites were mutated. Results from six independent experiments are mean  $\pm$  S.D. of GFP expression normalized to  $\beta$ -galactosidase activity and shown as percentage of control values. \*  $p < 0.05$ , significantly different from control.

Figure 1

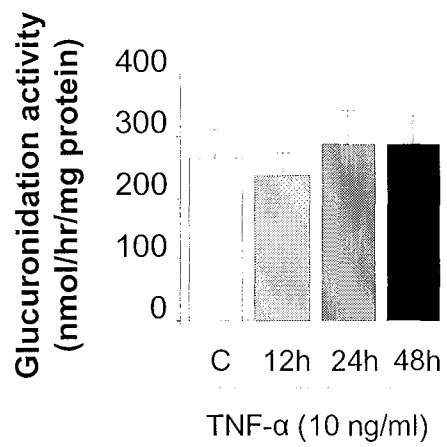
A



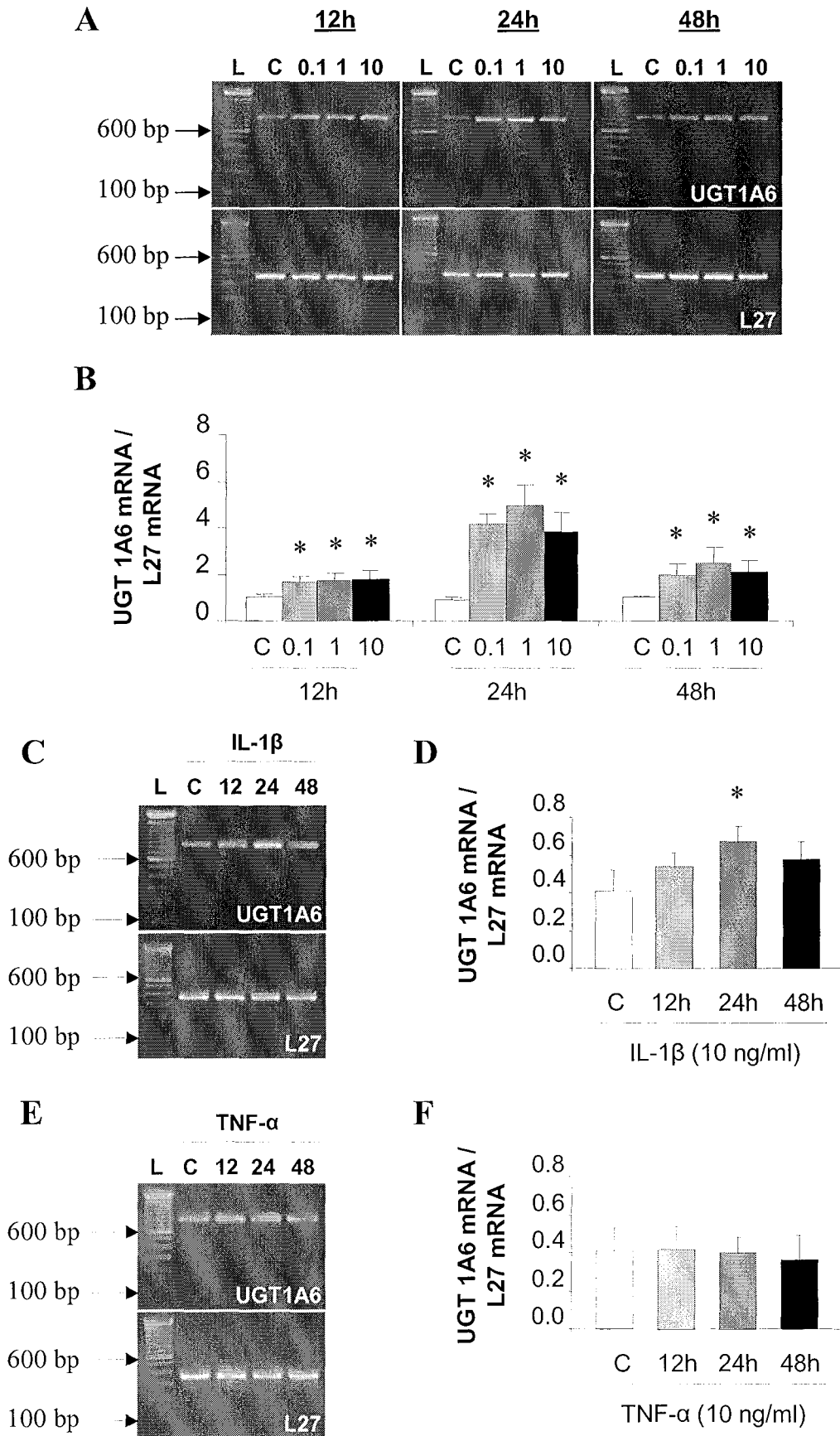
B



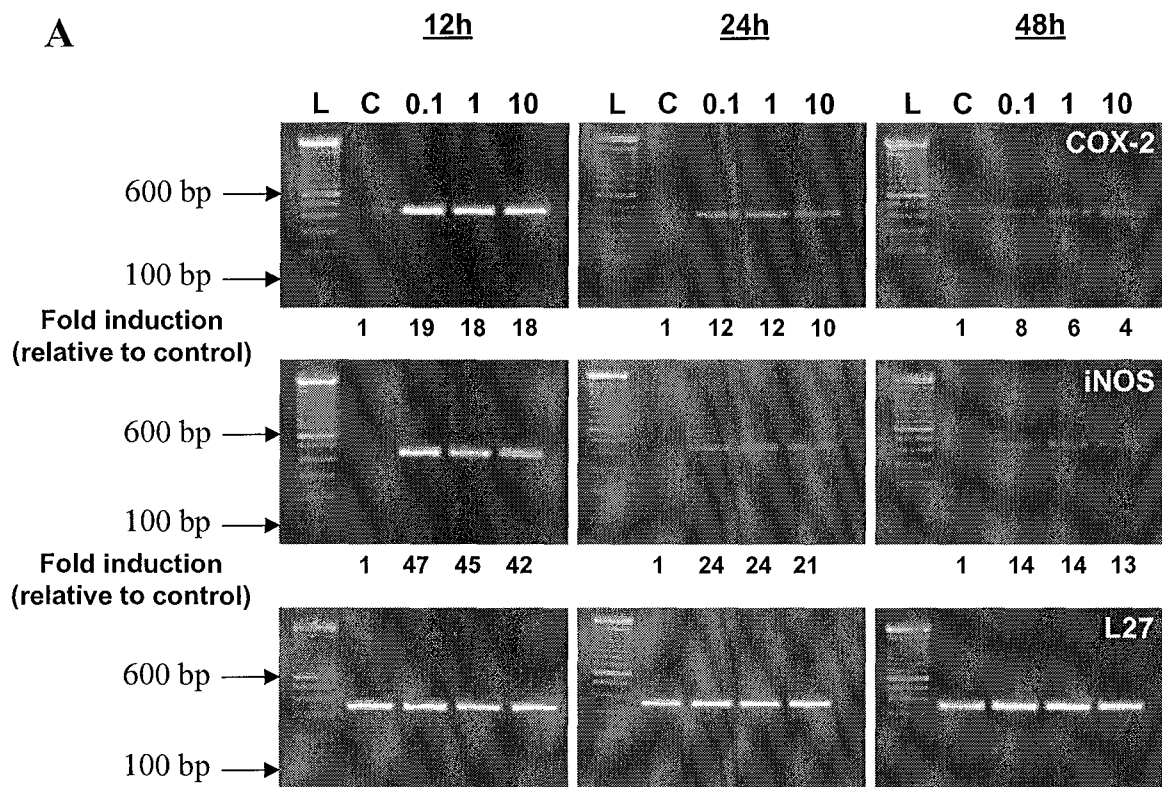
C



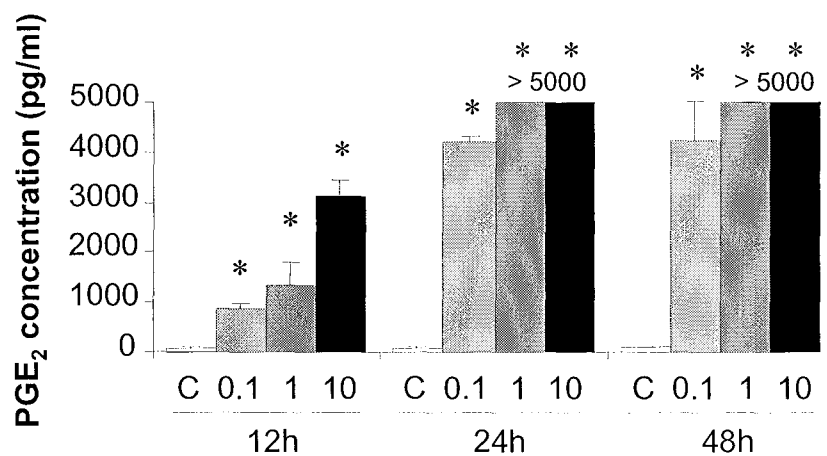
**Figure 2**



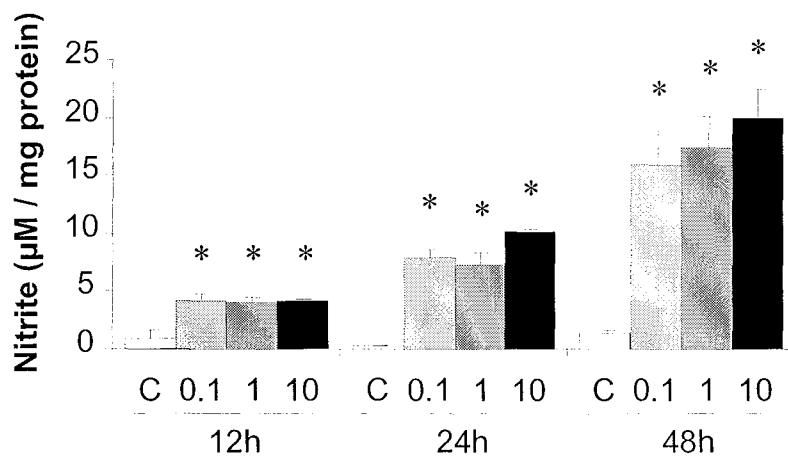
**Figure 3**



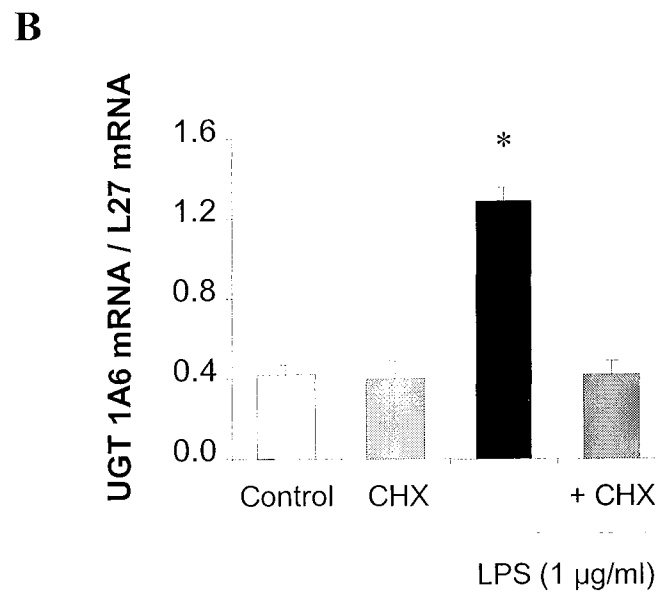
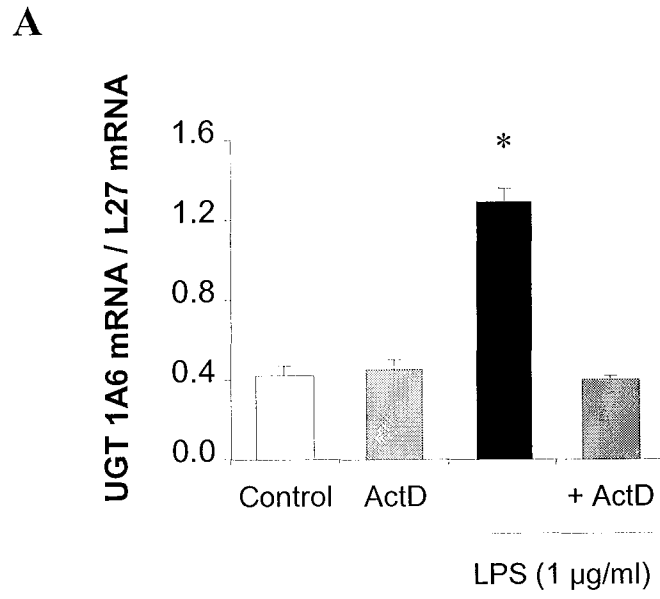
**B**



**C**



**Figure 4**



**Figure 5**

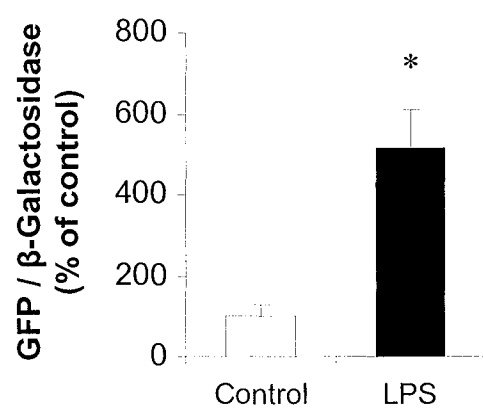
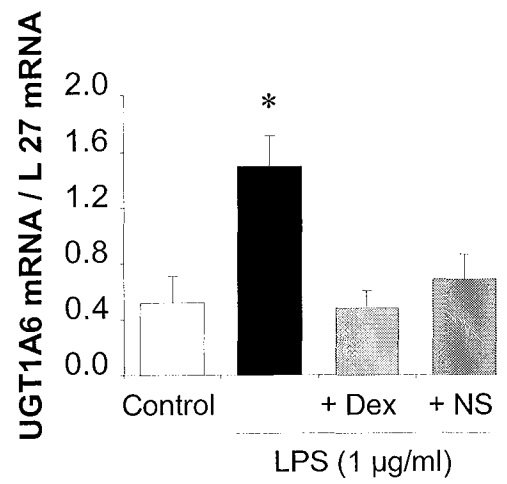


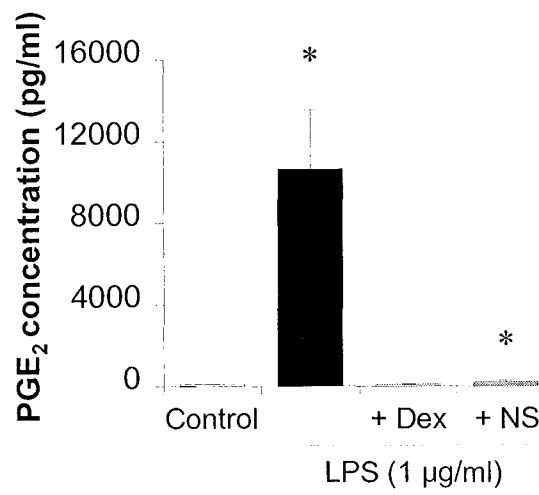


Figure 6

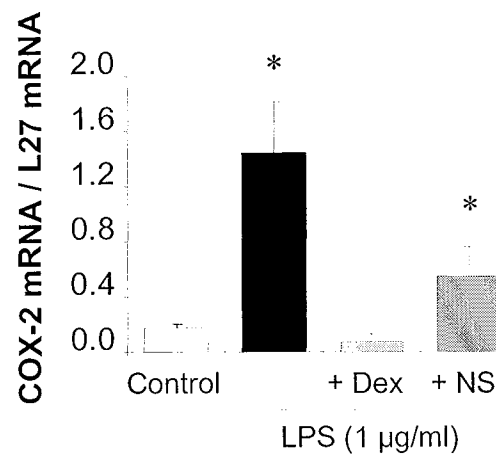
A



B

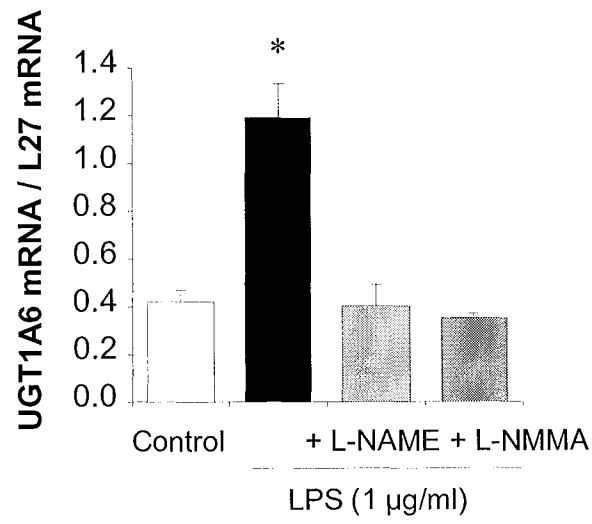


C

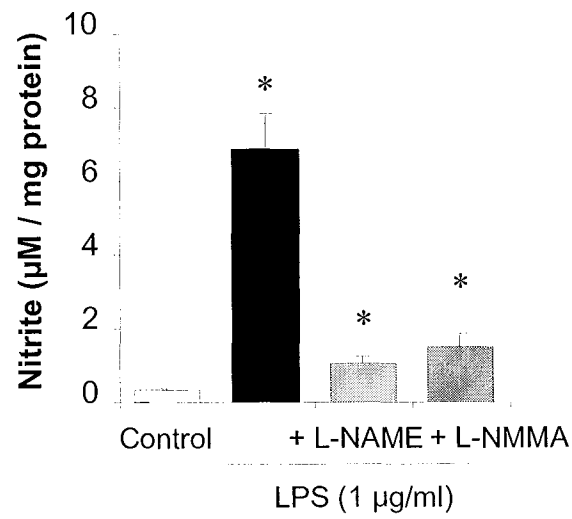


**Figure 7**

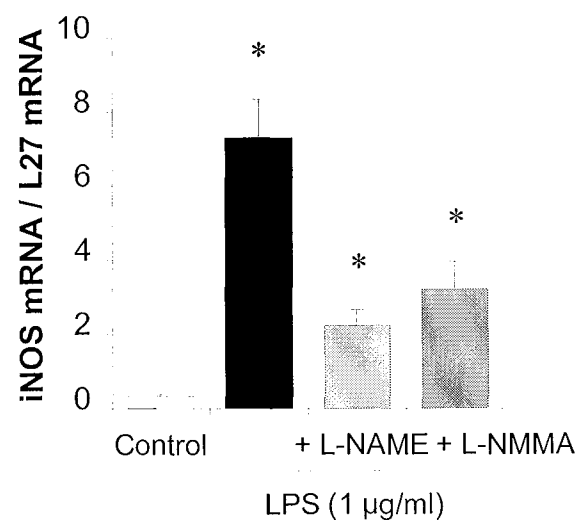
**A**



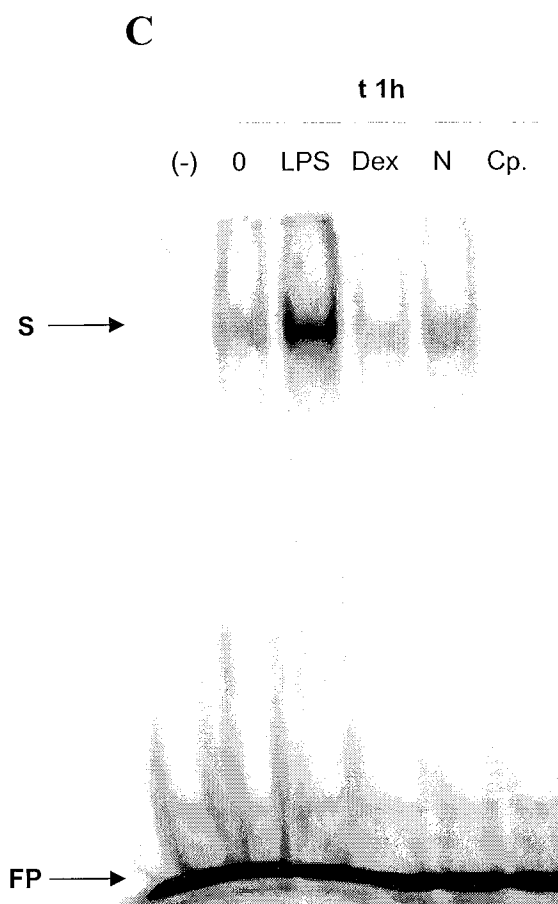
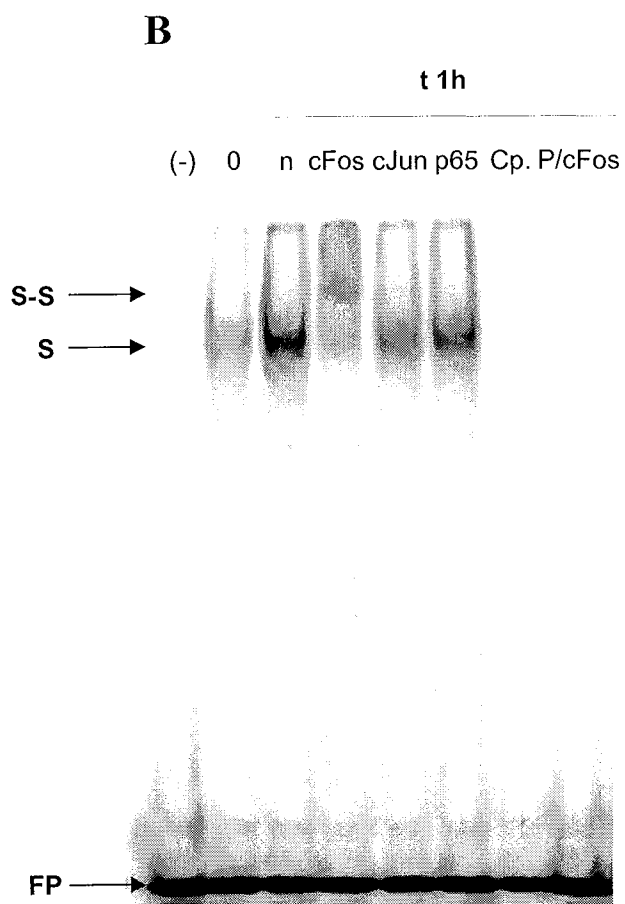
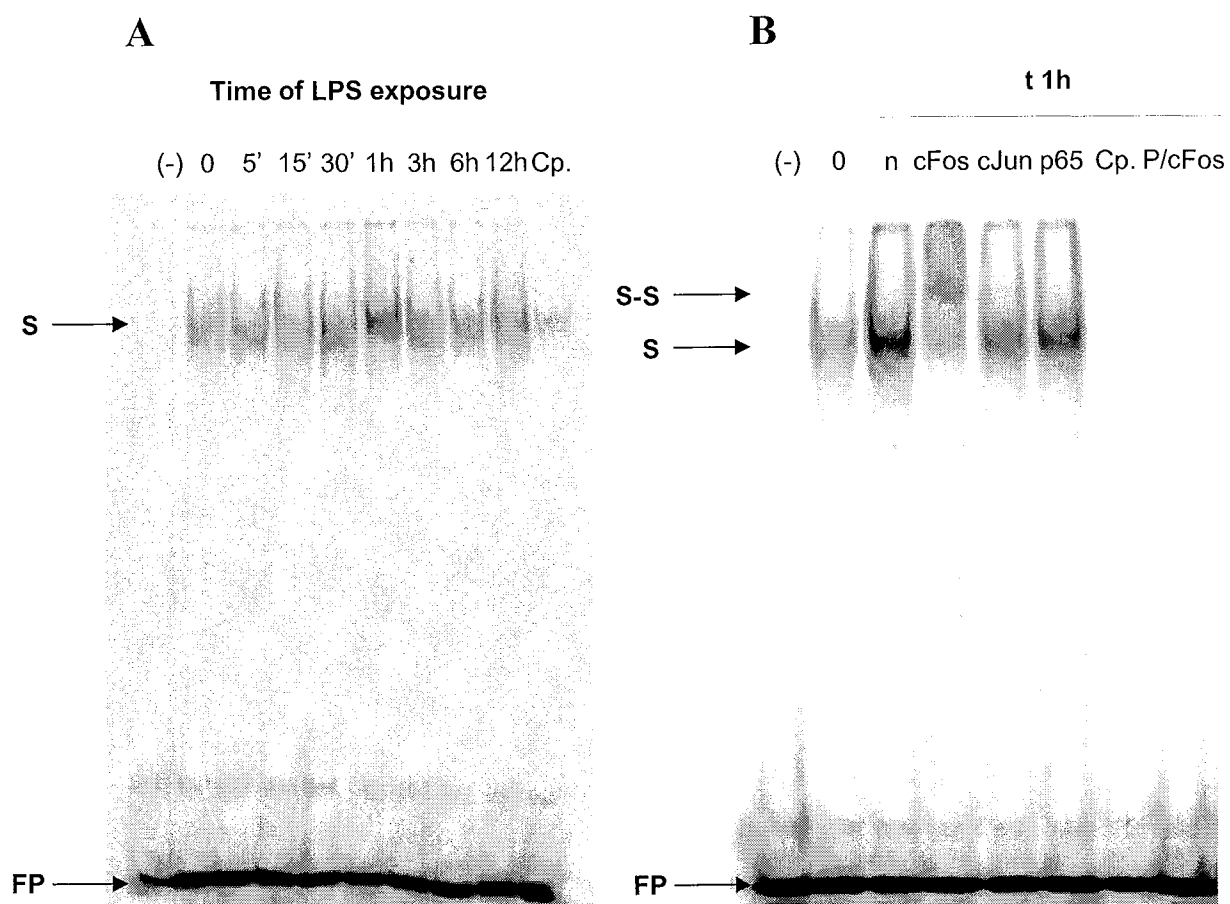
**B**



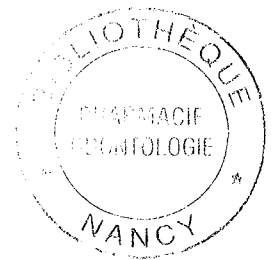
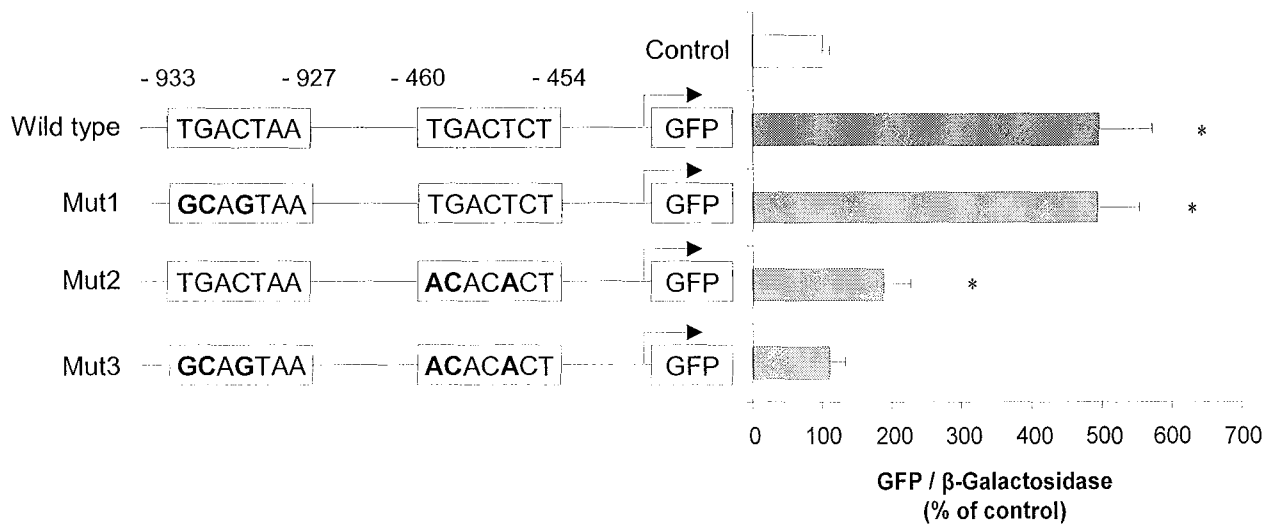
**C**



**Figure 8**



**Figure 9**



Prénom, Nom :

**Tony HEURTAUX**



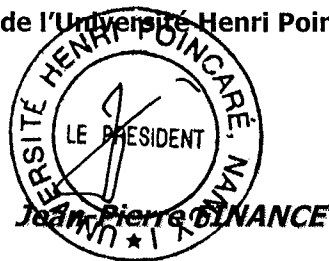
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1  
en Biologie - Santé - Environnement**

**VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER** N° 1109

Nancy, le 16 Novembre 2005.

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



**Résumé.** Les astrocytes constituent une population de cellules cérébrales dont les fonctions se révèlent très importantes pour un fonctionnement optimum du cerveau. En effet, ils participent à la fourniture de nutriments aux neurones, ainsi que de précurseurs et de facteurs de croissance ; ils participent également à leur activité fonctionnelle en maintenant l'homéostasie de l'environnement neuronal, et enfin, ils assurent la différenciation des cellules endothéliales cérébrales, dont les propriétés spécifiques constituent une structure fonctionnelle très importante, la barrière hémato-encéphalique (BHE). Située à l'interface entre le sang et le cerveau, la BHE permet de contrôler rigoureusement les échanges moléculaires entre le sang et le parenchyme cérébral. Cette barrière est nécessaire afin de protéger le cerveau des agressions extérieures et de maintenir son homéostasie. En plus d'être une barrière physique, la BHE est également considérée comme une barrière métabolique car dotée d'enzymes intervenant dans la biotransformation des xénobiotiques. Les activités enzymatiques observées sont beaucoup plus faibles dans le cerveau que dans les autres organes, mais il est évident que celles-ci présentent tout de même un rôle de protection significatif. De ce fait, les caractéristiques de la BHE peuvent modifier considérablement l'efficacité des médicaments à visée cérébrale.

Notre travail a été consacré à l'étude d'enzymes du métabolisme des médicaments, les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), dans un modèle cérébral *in vitro* constitué par des cultures primaires d'astrocytes de rats ainsi que dans un modèle *in vivo*. Plus précisément, sachant qu'un état inflammatoire perturbe fortement les propriétés de la BHE, nous avons cherché à déterminer les conséquences que pouvaient avoir des conditions pro-inflammatoires sur la glucuronoconjugaison astrocytaire.

Notre travail a permis de démontrer une diminution des activités astrocytaires de glucuronoconjugaison suite à un stress oxydant induit par la ménadione. Cette diminution d'activité est liée à une perturbation de l'état redox intracellulaire et une augmentation de l'oxydation des protéines. Cependant, au cours du temps, nous observons un rétablissement des activités enzymatiques consécutif à la surexpression d'isoformes d'UGT et notamment de l'UGT1A6, isoforme majoritaire au niveau astrocytaire. Le modèle pro-inflammatoire, mis en place par traitement de nos cultures avec des parois de bactéries (lipopolysaccharide, LPS), provoque une augmentation de la glucuronoconjugaison. L'état redox intracellulaire reste inchangé, cependant la production de médiateurs pro-inflammatoires, dans ces conditions, est à l'origine de mécanismes intracellulaires menant à la surexpression de l'UGT1A6. Parallèlement, nous n'avons pu vérifier ces résultats chez le rat, après injection de LPS par voie intrapéritonéale.

En conclusion, ces travaux présentent de nouvelles données concernant les UGT cérébrales. Nous avons montré leur sensibilité au stress oxydant ainsi que leur perturbation lors d'états pro-inflammatoires. Dans de telles conditions, la glucuronoconjugaison est modifiée et peut entraîner une diminution ou une augmentation du métabolisme de composés endogènes et exogènes. Ces perturbations pourraient alors engendrer une toxicité cérébrale de la molécule administrée ou une diminution de l'efficacité thérapeutique de cette molécule.

---

**Mots-clés :** système nerveux central, astrocytes, inflammation, stress oxydant, UDP-glucuronosyltransférases

---

**Doctorat de l'université Henri Poincaré - Nancy 1, École doctorale « Biologie, Santé, Environnement »**  
Mention « Sciences du médicament »

---

**Laboratoire de Pharmacologie, UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès Nancy**