



HAL
open science

**Étude des propriétés de deux séries de substances
d'origine naturelle : les cucurbitacines et les parabènes :
analyse de leur biotransformation chez l'homme et
mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur
une lignée cellulaire de chondrosarcome humain**

Suzanne Abbas

► **To cite this version:**

Suzanne Abbas. Étude des propriétés de deux séries de substances d'origine naturelle : les cucurbitacines et les parabènes : analyse de leur biotransformation chez l'homme et mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0135 . tel-01749356

HAL Id: tel-01749356

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749356v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Suzanne ABBAS**

Sujet : Etude des propriétés de deux séries de substances d'origine naturelle : les cucurbitacines et les parabènes : analyse de leur biotransformation chez l'homme et mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain.

Le 23 Novembre 2012

Membres du Jury :

Rapporteurs : **Geneviève UBEAUD-SEQUIER, Pr**, Université d'Alsace, Illkirch
Pirouz SHIRALI, Pr, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque

Examineurs : **Jean-Marie HEYDEL, MCF, HDR**, Université de Bourgogne, Dijon
Jacques MAGDALOU, DRCE1 CNRS-UMR7561, Université Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, directeur de thèse
Hélène GREIGE-GERGES, Pr, co-directrice de thèse, Université Libanaise, Fanar, Liban
Jean-Baptiste VINCOURT, IR2 CNRS-UMR7561, Université Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Tant de personnes ont rendu possible l'avènement de ce travail de thèse qu'il m'est aujourd'hui difficile de n'en oublier aucune. Je m'excuse donc par avance des oublis éventuels. Au terme de ces années de doctorat, j'éprouve une sincère gratitude envers tous ceux qui ont participé à ce travail et que je tiens ici à remercier.

Je tiens à adresser en premier lieu mes plus chaleureux remerciements à mon directeur de thèse M. Jacques Magdalou. Je le remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse, de m'avoir transmis la passion de la recherche scientifique. Je le remercie pour son soutien et sa guidance tout au long de ces trois années, pour ses précieuses remarques et pour son encouragement continu malgré toutes les difficultés que j'ai pu rencontrer durant cette période. Il est difficile de trouver des qualificatifs assez forts pour souligner sa gentillesse et sa patience à prodiguer des conseils pertinents. J'ai pu apprécier non seulement sa dimension scientifique, mais aussi sa dimension humaine qui est non plus de moindre importance. J'en profite pour lui exprimer ma plus profonde gratitude.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères et les plus profonds à ma co-directrice de thèse Mme Hélène Greige-Gerges dont les grandes qualités professionnelles et aussi humaines m'ont aidée à aller au bout de ce travail dans la confiance et la reconnaissance. Je la remercie de m'avoir remotivée dans les moments de doute et d'avoir été vraiment une mère pour moi. Je la remercie pour sa disponibilité, la confiance qu'elle m'a accordée, sa guidance, ses conseils et son soutien à tous les niveaux tout au long de la thèse.

Je tiens aussi à remercier M. Patrick Netter de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie M. Jean-Baptiste Baptiste Vincourt pour son encadrement dans une partie de ma thèse. Je suis vraiment ravie et reconnaissante d'avoir travaillé avec une personne assez compétente et qui m'a beaucoup appris au niveau scientifique. Je le remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du Jury, Mme Geneviève UBEAUD-SEQUIER, M. Pirouz SHIRALI et M. Jean-Marie HEYDEL, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je remercie chaleureusement Mesdames Sandrine Gulberti, Marie-Hélène Piet et Cécile Guillaume pour leur aide et conseils en tout ce qui concernait l'HPLC et M. Laurent Grossin pour son aide.

Je remercie également Mesdames Nadia Bezai, Valérie Gobert et Malika Mahmoudi pour leur aide dans tout ce qui est administratif.

Je remercie de tout cœur M. Jean-Marc Alberto de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans le secteur radioactivité de son laboratoire et de m'avoir fourni tout dont j'avais besoin. Je le remercie infiniment pour sa gentillesse.

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de côtoyer à Nancy de nombreuses personnes attachantes, que toutes soient remerciées pour les bons moments partagés. Je pense notamment (pardon à ceux que j'oublie) à la famille Reber, la famille Tromp, la famille Perrot, la famille Schneider, la famille Lutz, la famille Agha, Johan Dib, Ourida Loutis, Père Sayed Marroun, Zaki Samia et sa femme Marie Belle, Claude Mahfouz et sa femme Florence, Roland Hage et sa femme Maria, Antoine Eid et sa femme Célia, Khalil Haddad et sa femme Samira, Khodr Issa et sa femme Tala, Jocelyne Conus, Julien Jabbour, Hind Darwiche et Heba Assaghir qui m'ont offert leur amitié sincère et authentique. Je voudrais remercier également mes collègues et mes amis de laboratoire Xianqing Mao, Dong Li, Rodrigo Labat, Melissa Yelehe-Okouma, Nick Ramalanjaona, Moustapha Bourhim, Mathieu Chabel, Irfan Shaukat, Mathieu Riffault, Emilie Roeder et plus particulièrement Lina Tabcheh avec lesquels j'ai passé des moments amusants même en dehors des heures du travail.

Enfin, je souhaite remercier avec tout mon cœur ma famille et ma belle famille pour leur soutien constant. Il m'est impossible de trouver des mots pour dire à quel point je suis fière d'eux et je les aime. Je remercie ma grande sœur et son mari pour leur soutien à tous les niveaux et j'avoue qu'ils me manquent encore plus dans les étapes importantes de ma vie telles qu'aujourd'hui. A ma maman, qui plus qu'une mère est mon amie et ma confidente. A mon père et mes deux frères pour leur amour et leur soutien discret et essentiel. Pour conclure, je souhaite bien évidemment

remercier mon extraordinaire, merveilleux et splendide fiancé qui m'épaule, m'accompagne et me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles. Dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir, il a été l'autre moi. Je le remercie infiniment.

Ce travail a bénéficié d'un financement apporté par :

- Le contrat CEDRE « Métabolisme plasmatique et glucuroconjugaison hépatique des esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque » n° 06 S F10 : L41.
- Le contrat CEDRE « Etude de biotransformation et caractérisation des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses de trois cucurbitacines chez l'homme et le rat » n° 75/2010.
- Le CNRS Libanais (Réf. 02-04-09).
- Le Programme Français de Coopération avec la Chine (PFCC) « Recherche de principes actifs de l'Angélique pour le traitement de l'arthrose : détermination du mécanisme d'action », (2009-2010).
- La Ligue Régionale contre le Cancer.

Liste des abréviations

COX : Cyclooxygénase

COMT : Catéchol *O*-MéthylTransférase

Cuc : Cucurbitacine

DTNB : 5,5'-DiThiobis-(2-NitroBenzoate)

EdUTP : Uridine 5'-(tetrahydrogen triphosphate) 2'-deoxy-5-ethynyl

HPLC : High performance Liquid Chromatography

iNOs : Forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

LC/MS : Liquid Chromatography/Mass spectrometry

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MMP : Métalloprotéinase

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NO : Oxyde nitrique

NTB : 2-Nitro-5-ThioBenzoate

PAPS : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate

PBS : Phosphate Buffered Saline

PGE₂ : Prostaglandine E₂

SVF : Sérum de veau fœtal

TDT : déoxynucléotidyl terminale transférase

TPA : 12-*O*-tétradécanoylphorbol 13-acétate

UDPGA : Uridine 5'-diphospho-glucuronic acid

UDP-glucuronosyltransférase ou UGT : Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations.....	6
Liste des figures	11
Liste des tableaux.....	17
Présentation du travail.....	19
Chapitre 1 : Introduction bibliographique.....	22
1 Substances triterpéniques cycliques.....	23
1.1 Cucurbitacines : Généralités, structures et propriétés.....	23
1.1.1 Généralités	23
1.1.2 Structure des cucurbitacines	23
1.1.3 Propriétés physico-chimiques	24
1.1.4 Biosynthèse des cucurbitacines.....	26
1.1.5 Propriétés anticancéreuses des cucurbitacines.....	30
1.1.6 Propriétés anti-inflammatoires des cucurbitacines	33
1.1.7 Pharmacocinétique des cucurbitacines	37
1.1.7.1 Rappel sur la pharmacocinétique des xénobiotiques (ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion).....	37
1.1.7.2 Distribution des cucurbitacines.....	45
1.1.7.3 Métabolisme des cucurbitacines	46
1.1.7.4 Excrétion des cucurbitacines.....	47
1.2 Acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol: Généralités, structures, fonctions et biosynthèse.....	49
1.2.1 Généralités	49

1.2.2 Structures	49
1.2.3 Propriétés physico-chimiques	49
1.2.4 Biosynthèse	50
1.2.5 Pharmacocinétique	52
2 Substances phénoliques : acide férulique, acide caféique, parabènes, tyrosol et hydroxytyrosol	52
2.1 Généralités	52
2.2 Structures	53
2.3 Propriétés physico-chimiques	54
2.4 Biosynthèse	55
2.5 Pharmacocinétique	55
3 Pathologies articulaires : place des chondrosarcomes	59
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes	66
3.1 Produits	67
3.1.1 Produits chimiques et substrats des enzymes étudiées	67
3.1.2 Sources enzymatiques	69
3.1.3 Culture cellulaire	70
3.2 Métabolisme des substances naturelles <i>in vitro</i> chez l'homme et le rat	70
3.2.1 Spectre d'absorption des cucurbitacines I, D et E	70
3.2.2 Réactions de phase I	71
3.2.2.1 Hydroxylation des cucurbitacines I, D et E	71
3.2.2.2 Déshydrogénation des cucurbitacines I, D et E	73
3.2.2.3 Hydrolyse de la cucurbitacine E et des parabènes	74
3.2.2.3.1 Déacétylation de la cucurbitacine E <i>in vitro</i> dans les microsomes/cytosols hépatiques et le plasma de l'homme et du rat	74

3.2.2.3.2 Hydrolyse des parabènes par les microsomes hépatiques humains	76
3.2.3 Réactions de phase II	77
3.2.3.1 Glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E, parabènes, acide oléanolique, acide ursolique, érythrodiol, acide férulique, acide caféique, tyrosol et hydroxytyrosol. 77	
3.2.3.2 Acétylation des cucurbitacines I, D et E	79
3.2.3.3 Glucosylation des cucurbitacines I, D et E	82
3.2.3.4 Sulfoconjugaison des cucurbitacines I, D et E.....	84
3.2.4 Etudes cinétiques	85
3.3 Cytotoxicité des cucurbitacines	86
3.3.1 Viabilité des cellules et essai MTT	86
3.3.2 Effet apoptotique et essai TUNEL.....	87
Chapitre 4 : Résultats	90
4.1 Métabolisme des substances naturelles <i>in vitro</i> chez l'homme et le rat	91
4.1.1 Elution chromatographique et spectre d'absorption des cucurbitacines I, D et E	91
4.1.2 Réactions de phase I.....	93
4.1.2.1 Hydroxylation des cucurbitacines I, D et E par des microsomes hépatiques humains	93
4.1.2.2 Déshydrogénation des cucurbitacines I, D et E	95
4.1.2.3 Hydrolyse de la cucurbitacine E et des parabènes	96
4.1.2.3.1 Déacétylation de la cucurbitacine E <i>in vitro</i> dans les microsomes/cytosols hépatiques et le plasma de l'homme et du rat	96
4.1.2.3.2 Hydrolyse des parabènes par les microsomes hépatiques humains	101
4.1.3 Réactions de phase II	103
4.1.3.1 Glucuroconjugaison des substances triterpéniques cycliques et phénoliques 103	
4.1.3.1.1 Glucuroconjugaison des substances triterpéniques cycliques.....	103

4.1.3.1.2 Glucuronoconjugaison des substances phénoliques	109
4.1.3.2 Acétylation des cucurbitacines I, D et E	117
4.1.3.3 Glucosylation des cucurbitacines I, D et E	118
4.1.3.4 Sulfoconjugaison des cucurbitacines I, D et E.....	119
4.2 Cytotoxicité des cucurbitacines et effet anticancéreux	120
4.2.1 Viabilité des cellules et essai MTT	120
4.2.2 Effet apoptotique et essai TUNEL	122
Chapitre 5 : Discussion	128
Conclusion et perspectives.....	144
Références bibliographiques	148
Annexe 1 : Publication 1	165
Annexe 2 : Publication 2.....	166
Annexe 3 : Différentes catégories et sources des cucurbitacines	167
Annexe 4 : Publication 3.....	169

Liste des figures

Figure 1 : Structure de base des cucurbitanes [19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène].....	24
Figure 2 : Structure chimique des cucurbitacines les plus abondantes et les plus étudiées.....	25
Figure 3 : Schéma représentatif des voies de biosynthèse suggérées pour le cucurbita-5,24-diéno, précurseur des cucurbitacines (Balliano <i>et al.</i> , 1983b).....	27
Figure 4 : Schéma représentatif de la production des cucurbitacines catalysée par les enzymes acétyllestérases et la cucurbitacine Δ^{23} réductase (schéma modifié de Gry <i>et al.</i> , 2006).....	29
Figure 5 : Représentation schématique de l'inhibition de l'activation de NFκB et de l'expression des iNOS et COX-2 induits par LPS par MSE dans les macrophages des souris. LPS active JNK1/2 p38, ERK1/2 MAPK, IκB kinases et PI3K/Akt. La phosphorylation de IκBα et p65 contribuent à l'activation de NFκB et par la suite à l'induction des iNOS et COX-2. Tous ces événements son bloqués par MSE (Pan <i>et al.</i> , 2009).....	36
Figure 6 : Réaction de mono-oxygénation d'un substrat (R-H) catalysée par les cytochromes P450 du réticulum endoplasmique.....	39
Figure 7 : Contribution des cytochromes P450 humains au métabolisme des médicaments actuellement commercialisés. Les non-P450 enzymes comprennent l'alcool et l'aldéhyde déshydrogénases, la flavine mono-oxygénases etc. (Guengerich, 2003).....	39
Figure 8 : Réaction de déshydrogénation du substrat (R-CH ₂ -OH) catalysée par l'alcool déshydrogénase.....	40
Figure 9 : Réaction d'hydrolyse d'une fonction époxyde, ester, nitrate ou amide d'un substrat par des hydrolases.....	40
Figure 10 : Schématique des réactions de glucuroconjugaison des substrats possédants des fonctions OH ou COOH catalysées par les UGTs. R correspondant au groupement alkyle.....	42
Figure 11 : Schéma de la réaction de sulfoconjugaison d'un substrat R-OH.....	43
Figure 12 : Réaction d'acétylation d'un substrat (R-H) par les acétyltransférases tout en utilisant l'acétyl-CoA (CoA-CO-CH ₃) comme substrat donneur du groupe acétyle.....	43

Figure 13 : Schéma représentatif de la glucosylation de la cucurbitacine I par les glucosyltransférases.	44
Figure 14 : Schéma représentatif de la biotransformation de la cucurbitacine E 2-O-β-D-glucopyranoside par la <i>Curvularia lunata</i> (Maatooq <i>et al.</i> , 1995).	48
Figure 15 : Structure chimique des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol.	50
Figure 16 : Schéma représentatif de la voie de biosynthèse des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol dans les plantes.	51
Figure 17 : Structures chimiques des acide férulique, acide caféique, acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque, méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène, benzylparabène, tyrosol et hydroxytyrosol.	54
Figure 18 : Schéma représentatif de la biosynthèse des phénols naturels (tyrosol, acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque et acide férulique) dans les plantes (Chen <i>et al.</i> , 2006 ; Negishi <i>et al.</i> , 2009 ; Sircar and Mitra, 2009 ; Zhang <i>et al.</i> , 2011).	56
Figure 19 : Structure chimique des deux isomères cis- et trans-resvératrol.	58
Figure 20 : Schéma d'un cartilage articulaire montrant les 4 couches : la couche superficielle (chondrocytes de forme allongée), la couche moyenne (distribution aléatoire des chondrocytes), la couche profonde (disposition en colonnette des chondrocytes), la ligne de démarcation (<i>tide mark</i>) et la couche calcifiée.	60
Figure 21 : Réaction de DTNB avec un substrat possédant un groupe thiol (R-SH).	79
Figure 22 : Acétylation de la cucurbitacine I par l'acétyltransférase en présence de l'acétyl-coenzyme A.	81
Figure 23 : Spectre d'absorption et temps de rétentions des cucurbitacines D, I et E (1 mM) dissous dans du DMSO après analyse par HPLC couplé à un détecteur photodiode array. Les cucurbitacines D, I et E présentent des temps de rétention de 5,6 ; 8,2 et 29,1 min, respectivement.	92
Figure 24 : (a) La variation de l'absorbance du NADPH en fonction du temps durant l'hydroxylation des cucurbitacines par les cytochromes P450 des microsomes hépatiques humains. (b) L'hydroxylation de la nifédipine et des cucurbitacines I, D et E et de la nifédipine	

(100 μ M) par les monooxygénases hépatiques humaines, cytochrome P450 dépendantes en présence de NADPH et du tampon Tris-HCl pH 7,4. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.	94
Figure 25 : Spectre de masse de l'hydroxylation de la cucurbitacine I après incubation avec les microsomes hépatiques humains en présence de NADPH à pH 7,4.....	95
Figure 26 : L'absorbance du NADH produit en fonction du temps durant la déshydrogénation de l'éthanol 3,2% (v/v) (losange noir) et de la cucurbitacine D (rectangle noir) par 20 μ g de protéines de cytosols hépatiques humains en présence du NAD ⁺ et dans le tampon sodium pyrophosphate (pH 8,8). Chaque point est la moyenne \pm SE de trois essais.	96
Figure 27 : Droites d'étalonnage (a) de la cucurbitacine E et (b) de la cucurbitacine I tracées en utilisant la moyenne du rapport Aire Cuc / Aire 4-hydroxybenzophénone en fonction de la concentration de la cucurbitacine appropriée. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois essais.	97
Figure 28 : Production de la cucurbitacine I après hydrolyse de la cucurbitacine E (0,54 mM) par les estérases des microsomes et des cytosols hépatiques humains après 0 ; 1 ; 4 ; 8 ; 12 et 24h d'incubation. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.	98
Figure 29 : Production de la cucurbitacine I après hydrolyse du groupe acétyle de la cucurbitacine E par les estérases des microsomes hépatiques humains. La cucurbitacine E (0,54 mM) a été incubée avec les microsomes hépatiques humains dans 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4) pendant 1h à 37°C. La diminution de la concentration de la cucurbitacine E (rectangles noirs) et la production de la cucurbitacine I (losanges noirs) au cours du temps sont quantifiées après séparation par HPLC. La stabilité de la cucurbitacine E après incubation avec du tampon seulement dans les mêmes conditions expérimentales est montrée (triangles noirs). Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.	99
Figure 30 : Cinétiques de la réaction de déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques humains en (a) suivant la linéarité de la réaction en fonction du temps. Les représentations graphiques de (b) Michaelis-Menten et de (c) Linweaver-Burk de cette réaction ont permis de calculer les constantes cinétiques (K_m 22 μ M, V_{max} 571 nmol/min/mg protéine). Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SE de trois essais.	100

Figure 31 : Production de la cucurbitacine I après hydrolyse de la cucurbitacine E (0,54 mM) par les estérases des microsomes hépatiques du rat durant 1h d'incubation. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois essais.	101
Figure 32 : Hydrolyse des parabènes (164 μ M) par les estérases des microsomes hépatiques humains après incubation à 37°C avec 67 mM du tampon phosphate (pH 7,4). La cinétique d'hydrolyse de 1 ^{er} ordre est représentée (Log du % d'hydrolyse en fonction du temps). Méthylparabène (losanges noirs), éthylparabène (rectangles noirs), propylparabène (triangles noirs), butylparabène (x) et benzylparabène (ronds noirs). Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.	102
Figure 33 : Autoradiogramme d'une chromatographie sur couche mince après glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E (1 mM) par (a) les microsomes hépatiques humains (50 μ g) et (b) les microsomes hépatiques de rats (50 μ g). L'UDPGA, plus polaire que les glucuronides, ne migre presque pas sur la plaque de gel de silice. Le control négatif comprend seulement du DMSO, utilisé comme véhicule pour le 1-naphtol et les cucurbitacines. Le 1-naphtol est utilisé comme substrat marqueur des UGTs des microsomes hépatiques humains et de rat.	104
Figure 34 : Glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et par les différentes isoformes d'UGT recombinantes en présence de l'UDPGA (1 mM) et du [¹⁴ C]-UDPGA à pH 7,4. Les valeurs sont la moyenne de deux essais.	105
Figure 35 : Glucuroconjugaison du 1-naphtol et de la cucurbitacine E (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et de rats en présence et en absence de PMSF (0,5 mM). Les valeurs sont la moyenne de deux essais.	106
Figure 36 : Cinétiques de la réaction de glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E par les microsomes hépatiques humains. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk de cette réaction ont permis de calculer les constantes cinétiques (K_m 0,700 ; 0,370 et 0,013 mM, V_{max} 0,132 ; 0,035 et 0,077 nmol/min/mg protéine, respectivement). Les valeurs présentées sont la moyenne de deux essais.	107
Figure 37 : Glucuroconjugaison des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et les différentes isoformes d'UGT en présence de	

l'UDPGA (1 mM) et du [¹⁴ C]-UDPGA à pH 7,4. Les valeurs présentées sont la moyenne de deux essais.	109
Figure 38 : Cinétiques de la réaction de glucuroconjugaison de l'acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol par les microsomes hépatiques humains. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk de cette réaction ont permis de calculer les constantes cinétiques (K_m 5,3 ; 2,4 et 26,4 μ M, V_{max} 0,246 ; 0,388 et 0,620 nmol/min/mg protéine, respectivement). Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SE de trois essais.	110
Figure 39 : Glucuroconjugaison de l'acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque et des parabènes (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et les différentes isoformes d'UGT en présence de 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl ₂ et 5 mM de l'acide UDP-glucuronique. Les activités de glucuroconjugaison sont la moyenne de deux essais.	112
Figure 40 : Glucuroconjugaison des parabènes par les microsomes hépatiques humains en présence (noir) ou en absence (blanc) de PMSF (1 mM). Le 1-naphtol est utilisé comme control positif. Les valeurs sont la moyenne de deux essais. * $p < 0,05$, différence significative avec la glucuroconjugaison en absence de PMSF.	113
Figure 41 : Représentations graphiques des cinétiques de la glucuroconjugaison de l'acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque, méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène et benzylparabène par les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9 à différentes concentrations de substrats. Les valeurs sont la moyenne de trois essais.	114
Figure 42 : Glucuroconjugaison de l'acide caféique, tyrosol et 4-hydroxytyrosol (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et par les différentes isoformes d'UGT en présence de l'UDPGA (1 mM) et du [¹⁴ C]-UDPGA à pH 7,4. Les valeurs présentées sont la moyenne des deux essais. ND = non détectable.	116
Figure 43 : Autoradiographie d'un chromatogramme après glucuroconjugaison du 1-naphtol, de l'acide caféique, du tyrosol et de l'hydroxytyrosol (1 mM) par les microsomes hépatiques humains (50 μ g). L'UDPGA, plus polaire que les glucuronides, ne migre presque pas sur la plaque de gel de silice. Le control négatif comprend seulement du DMSO, utilisé comme véhicule pour le 1-naphtol et les cucurbitacines. Le 1-naphtol est utilisé comme substrat marqueur des UGTs des microsomes hépatiques humains.	116

Figure 44 : Spectre de masse de l'acétylation de la cucurbitacine I par les microsomes et les cytosols hépatiques humains en présence et en absence du PMSF.	118
Figure 45 : Spectre de masse de la glycosylation de la cucurbitacine I par les microsomes ou les cytosols hépatiques humains.	119
Figure 46 : Sulfoconjugaison du 1-Naphtol (substrat marqueur) et des cucurbitacines I, D et E (0,2 mM) par les protéines cytosoliques (0,25 mg/mL) et en présence du DTT (1 mM) et du tampon tris-HCl (pH 7,4). Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.	119
Figure 47 : Pourcentage de cellules vivantes des cellules SW 1353 évalué par l'essai MTT après 6 ; 12 ; 24 ; 46 et 70h de traitement par (a) 0,1; 1; 10 et 100 μ M cucurbitacine I, (b) 0,1; 1; 10 et 100 μ M cucurbitacine D, (c) 0,1; 1; 10 et 100 μ M cucurbitacine E et (d) 4 μ M de cytochalasine D et un mélange de cucurbitacines glycosylées. Le témoin négatif étant pris comme l'incubation des cellules SW 1353 en présence du milieu de culture + DMSO (0,1% de concentration finale). Les pourcentages des cellules présentées sont la moyenne \pm SE de trois répétitions.	121
Figure 48 : Pourcentage des cellules apoptotiques calculé après l'application de l'essai TUNEL et après 24h de traitement par 0,1 ; 1 et 10 μ M des cucurbitacines I, D et E, 4 et 10 μ M d'un mélange de cucurbitacines glycosylées, DMSO (0,1% v/v) et 4 μ M de cytochalasine D. Les valeurs sont la moyenne des trois essais.	123
Figure 49 : Schéma représentatif des voies métaboliques pouvant être subies par les parabènes chez l'homme. Les parabènes sont principalement hydrolysés sous l'action des estérases et glucuronoconjugués sous l'action des UGTs. Ils peuvent être aussi sulfoconjugués ou conjugués à la glycine.	141

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les paramètres de liaison (constantes de liaisons et nombre de sites de liaison) des interactions de la bilirubine et de l'ibuprofène avec la sérum albumine humaine en absence et en présence des cucurbitacines I, D et E, mesurés par fluorimétrie à pH 7,4.....	45
Tableau 2 : Structure chimique des substances naturelles utilisées durant la thèse et des substrats marqueurs des enzymes utilisées pour tester le métabolisme de ces substances.....	67
Tableau 3 : Gradient d'élution de la phase mobile utilisée pour l'analyse de l'hydroxylation de la Cucurbitacine I par LC/MS.....	73
Tableau 4 : Equations des droites des absorbances du NADPH en fonction du temps après l'hydroxylation de la nifédipine et des cucurbitacines I, D et E par les microsomes hépatiques humains.....	94
Tableau 5 : Les constantes de vitesse d'hydrolyse (K) et les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des parabènes incubés pendant une heure avec des microsomes hépatiques humains et du tampon phosphate (pH 7,4). Les constantes ont été calculées d'après les données présentées dans la Figure 32.....	102
Tableau 6 : Paramètres cinétiques de la glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E par les microsomes hépatiques humains. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont calculés d'après les données de la Figure 36.....	108
Tableau 7 : Paramètres cinétiques de la glucuroconjugaison des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol par les microsomes hépatiques humains. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été calculés d'après les données de la Figure 38.....	110
Tableau 8 : Valeurs de K_m et V_{max} de la glucuroconjugaison des parabènes et de l'acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque par les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été calculés d'après les données de la Figure 41	115
Tableau 9 : Valeurs IC_{50} (μM) des cucurbitacines I, D et E envers les chondrosarcomes SW 1353 calculées d'après les droites des « % cellules vivantes = f (Log [concentration cucurbitacine]) »	

pour les temps de traitement de 6 ; 12 et 24h. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais et ont été calculées d'après les données de la Figure 47..... 122

Tableau 10 : Apoptose des cellules SW 1353 évaluée par essai TUNEL et photographiée par microscopie fluorescente. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu et les coupures au niveau des ADNs sont marquées en vert. 123

Présentation du travail

Présentation du travail

Les plantes constituent un réservoir inépuisable de substances pharmacologiquement actives, d'où leur utilisation depuis l'antiquité dans les médecines traditionnelles. L'Industrie Pharmaceutique se tourne de plus en plus vers cette source de molécules originales pour pallier le manque de développement de substances synthétiques et pour mettre sur le marché des composés plus efficaces et présentant en même temps des effets indésirables moindres. La mise sur le marché du Taxotère, anticancéreux issu du taxol de l'If, est un exemple d'école à cet égard.

Cependant, la présence dans les extraits des plantes de mélanges de plusieurs produits chimiques à propriétés inconnues ainsi que l'ignorance des mécanismes d'action moléculaires de ces substances actives limitent le développement de médicaments d'origine naturelle. D'où la nécessité de purifier ces substances actives, de tester leur toxicité et d'évaluer leurs effets pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*. Des études ont montré que de nombreux composés naturels à structures phénolique, polyphénolique et triterpénoïque présentent des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antidégénératives.... Dans notre laboratoire, nous nous intéressons à la biotransformation des substances naturelles actives de structure hydroxylée, plus précisément par glucuronoconjugaison qui est une des voies de détoxification majeure chez l'homme. Ainsi des études ont été réalisées au sein de notre équipe portant sur la glucuronoconjugaison du resvératrol catalysée par les UDP-glucuronosyltransférases du foie et du tractus gastro-intestinal (**Aumont *et al.*, 2001 ; Sabolovic *et al.*, 2006 ; Sabolovic *et al.*, 2007**). Le resvératrol est un polyphénol présent dans les raisins et cacahuètes et possédant des activités anti-inflammatoires, anti-cancérogènes et antiplaquettaires.

Les travaux qui font l'objet de cette thèse sont consacrés à l'étude de deux séries de composés d'origine végétale :

- des substances phénoliques, en particulier les parabènes (esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**annexe 1**), le tyrosol, l'hydroxytyrosol, l'acide caféique et l'acide férulique (**annexe 2**),

- des triterpéniques cycliques (exemple les cucurbitacines I, D et E, ainsi que des composés de structure apparentée stéroïdienne comme l'érythrodiol, l'acide oléanolique et l'acide ursolique).

Deux aspects de leurs caractéristiques ont été considérés au cours de ce travail :

- leurs voies de biotransformation *in vitro* chez l'homme, ainsi que les enzymes de métabolisation impliquée. Ces informations sont indispensables si ces substances sont administrées chez l'homme.
- leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques qui peuvent se révéler intéressantes en vue de leur utilisation chez l'homme.

Dans ce contexte nous avons focalisé notre travail sur les cucurbitacines, qui sont des substances extraites principalement du jus de fruit de la plante *Ecballium elaterium* et connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires et chimiopréventives (**Greige-Gerges et al., 2007 ; Saade et al., 2009**). Nous nous sommes intéressés à leurs propriétés cytotoxiques puissantes en particulier *vis-à-vis* d'une lignée de cellules cancéreuses SW 1353 issue d'un chondrosarcome. Les chondrosarcomes sont des tumeurs malignes à évolution lente mais très agressives (métastases pulmonaires, 10% de survie à 5 ans) pour lesquelles il n'existe pas actuellement de traitements efficaces (**Costa et al., 2009 ; Berrone et al., 1993**). Il est donc important de caractériser de nouvelles molécules cytotoxiques pour envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La partie Introduction de ce travail s'attachera à décrire les propriétés des différentes substances naturelles étudiées, en particulier leur structure, propriétés physicochimiques, leurs biosynthèse et principales voies de biotransformation que ces substances peuvent emprunter chez l'homme, ainsi que leurs actions pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires et anticancéreuses. Etant donné les axes de recherche menés par le laboratoire sur le développement de nouveaux traitements pour les pathologies articulaires, nous avons focalisé notre étude sur les tumeurs produisant du tissu cartilagineux comme les chondrosarcomes.

Après avoir énoncé le but du travail ainsi que les stratégies expérimentales mises en œuvre pour le réaliser, nous décrirons les résultats obtenus que nous discuterons ensuite en regard à la littérature internationale.

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

1 Substances triterpéniques cycliques

1.1 Cucurbitacines : Généralités, structures et propriétés.

1.1.1 Généralités

Les cucurbitacines sont des substances naturelles extraites des plantes médicinales, plus principalement de la famille *Cucurbitaceae*. Elles se trouvent également sous forme glycosylée ou non glycosylée dans plusieurs autres plantes: *Brassicaceae*, *Scrophulariaceae*, *Begoniaceae*, *Cruciferae*, *Elaeocarpaceae*, *Daticaceae*, *Desfontainiaceae*, *Polemoniaceae*, *Primulaceae*, *Rubiaceae*, *Scrofulariaceae*, *Sterculiaceae*, *Rosaceae* et *Thymelaeaceae*. Récemment, elles ont été isolées à partir de champignons et de mollusques marins (**Bittner et al., 1973 ; Chen et al., 2005**). Selon les différentes familles, elles sont localisées dans les racines, les rhizomes, les fruits ou les graines de la plante. A l'exception des dérivés glycosidiques des cucurbitacines, ces substances présentent un goût très amer (**Ochi et al., 2009**) qui permet de protéger les plantes des herbivores (**Andersen et al., 1988**). Ce sont des substances très toxiques qui provoquent des irritations des membranes muqueuses, ainsi que la dysphagie, le vomissement etc. Cependant malgré leur toxicité, ces molécules sont d'un grand intérêt en pharmacologie du fait de leurs activités biologiques diverses qu'elles exercent. Elles présentent des effets bénéfiques cytotoxiques, anti-inflammatoires, antipyrétiques, analgésiques, purgatifs, anti-hépatotoxiques, diurétiques, antioxydants, antidiabétiques, antinéoplasiques, antimicrobiens, fongicides et anti-fertilité. Elles sont également des insecticides capables d'antagoniser les hormones stéroïdiennes des insectes. (**Delporte et al., 2002 ; Dinan et al., 1997 ; Everaldo Attard, 2002 ; Hatam et al., 1989 ; Jayaprakasam et al., 2003 ; Maatooq et al., 1995 ; Molavi et al., 2006 ; Sturm and Stuppner, 2000**).

1.1.2 Structure des cucurbitacines

Les cucurbitacines sont des stérols naturels triterpéniques tétracycliques riches en oxygène. Leur structure de base est composée du squelette d'un noyau cucurbitane tétracyclique, le 19-

(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène aussi connu sous le nom de 9β-méthyl-19-norlanosta-5-ène (**Figure 1**). Les cucurbitacines sont arbitrairement réparties en douze catégories selon leurs caractéristiques structurales (**annexe 3**). Toutes les cucurbitacines identifiées à ce jour possèdent une double liaison entre C-5 et C-6. Elles diffèrent entre elles par la présence d'une double liaison en C-1 et/ou C-23, un groupement hydroxyle en C-2, C-3, C-9, C-16, C-20, C-24 et/ou C-25, une fonction cétone (C=O) en C-2, C-3, C-11 et/ou C-22 et par l'acétylation du groupe fonctionnel hydroxyle en C-26. En plus, les cucurbitacines glycosylées présentent des résidus glycosydiques au niveau C-2 ou C-3 (**Chen *et al.*, 2005 ; Greige-Gerges *et al.*, 2007a ; Greige-Gerges *et al.*, 2007b ; Saade *et al.*, 2009 ; Yuan *et al.*, 2006**).

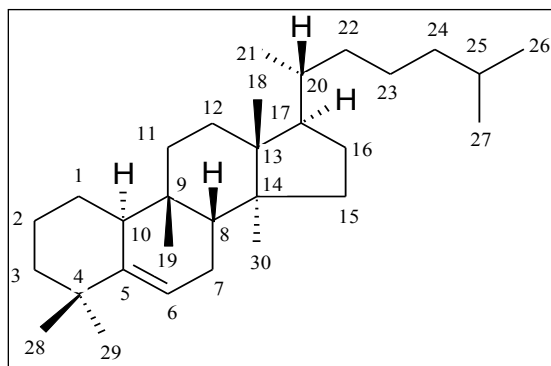


Figure 1 : Structure de base des cucurbitanes [19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène].

Les trois cucurbitacines I, D et E qui sont parmi les cucurbitacines les plus abondantes chez les plantes (**Andersen *et al.*, 1988**) ainsi qu'un mélange des glycosides des cucurbitacines sont étudiées dans cette thèse dont les structures sont illustrées ci-dessous (**Figure 2**).

1.1.3 Propriétés physico-chimiques

Les cucurbitacines se présentent généralement sous forme de substances cristallines (**Gry *et al.*, 2006**). Elles ne sont pas très stables à température ambiante et à pH basique. En revanche, elles sont plutôt stables à un pH acide (pH 5,13) (**Martin *et al.*, 2002**). A l'exception des dérivés β-D-glucosides des cucurbitacines, elles sont très peu solubles dans l'eau mais très solubles dans les

solvants organiques tels que le chloroforme, le benzène, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'éthanol (Gry *et al.*, 2006).

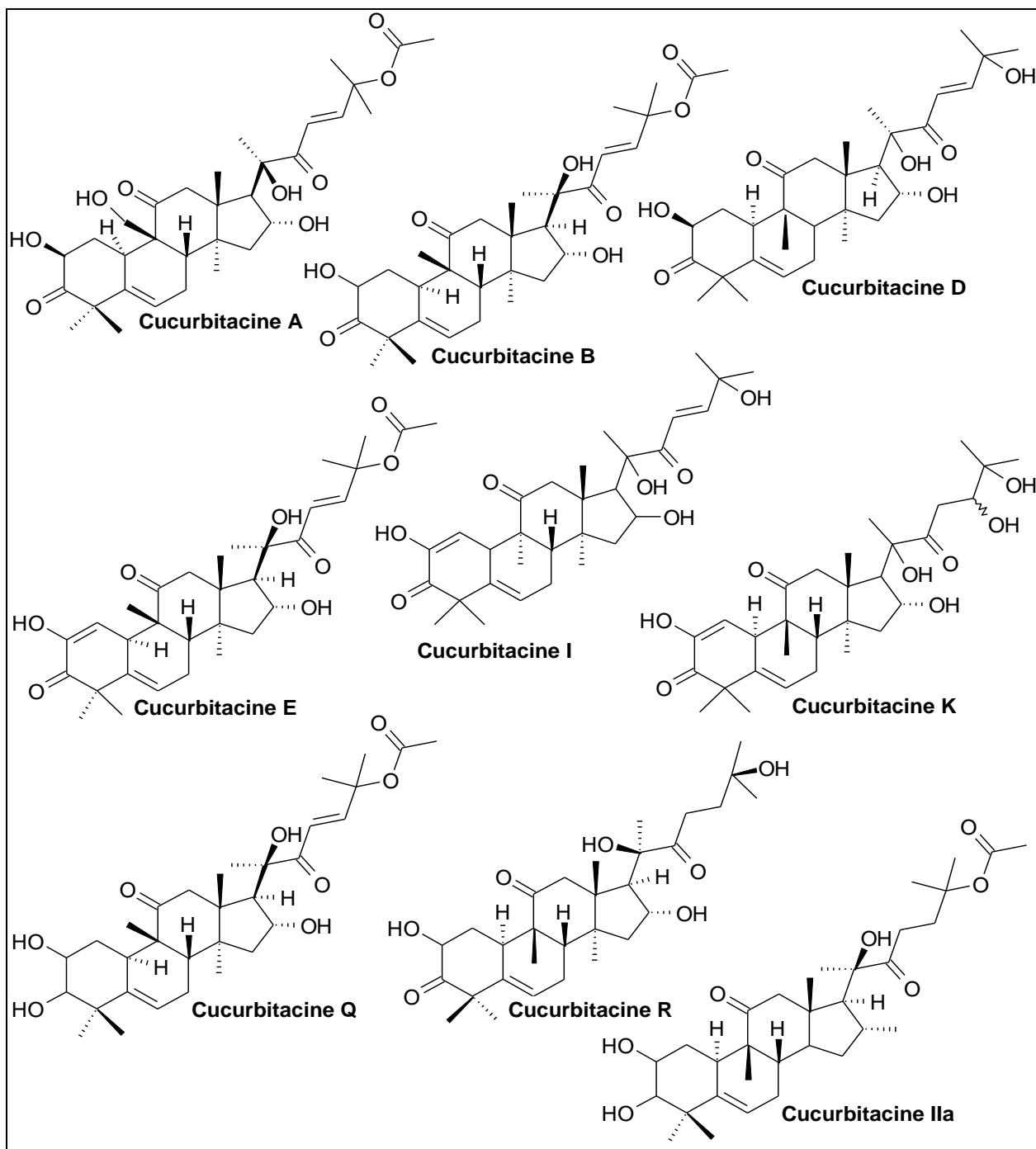


Figure 2 : Structure chimique des cucurbitacines les plus abondantes et les plus étudiées.

1.1.4 Biosynthèse des cucurbitacines

Les cucurbitacines sont biosynthétisées dans les plantes à partir de la squalène-2,3-époxyde. Des études ont été réalisées afin de savoir si ces substances sont directement obtenues à partir de l'ion C-9 carbonium lanostane, issu de la cyclisation en cation de la squalène-2,3-époxyde, ou si elles sont obtenues après plusieurs transformations successives de cet ion selon trois voies (**Figure 3**).

Première voie (a) : l'ion C-9 carbonium lanostane perd un proton en C-11 tout en donnant le parkéol, un triterpène tétracyclique. Ensuite, une déficience en électron en C-9 induit la migration du groupement méthyle de C-10 vers C-9, suivie de la migration de l'hydrogène H-5 vers H-10 et l'élimination du proton en C-6, formant par la suite le squelette du cucurbitane, le cucurbita-5,24-diène (**Figure 3**).

Deuxième voie (b) : l'ion C-9 carbonium lanostane perd un proton du groupe méthyle en C-19 et le noyau 9 β ,19-cyclopropane se ferme formant par la suite un produit intermédiaire, le cycloarténol, un précurseur des phytostérols. Le cucurbita-5,24-diène est ensuite formé par l'ouverture simultanée du noyau 9 β ,19-cyclopropane, la migration d'un hydrogène et l'élimination du proton en C6 (**Figure 3**).

Troisième voie (c) : Cette voie se base sur la formation du cucurbita-5,24-diène directement à partir de l'ion C-9 carbonium lanostane et ceci par la migration du groupement méthyle-10 vers C-9, la migration de l'hydrogène H-5 vers H-10 et l'élimination du proton en C-6 (**Figure 3**) (**Balliano et al., 1983**).

Des études avec des précurseurs radiomarqués ont été ensuite réalisées afin de voir laquelle des trois voies a, b et c est impliquée dans la conversion de l'ion C-9 carbonium lanostane en cucurbita-5,24-diène. Ces études ont montré que l'incubation *in vivo* des semis du *Cucumis sativus* avec le:

- 1) [2-³H]cucurbita-5,24-diène permet la détection de la cucurbitacine C radiomarquée.
- 2) [2-³H]cycloarténol permet la formation des 4-desméthylstérols, 4 α -méthylstérols et des dérivés des esters du cycloarténol.

- 3) [2-³H]parkéol permet en majorité la récupération intacte du parkéol. Cependant une partie du [2-³H]parkéol est transformée en esters. (Balliano *et al.*, 1983a)

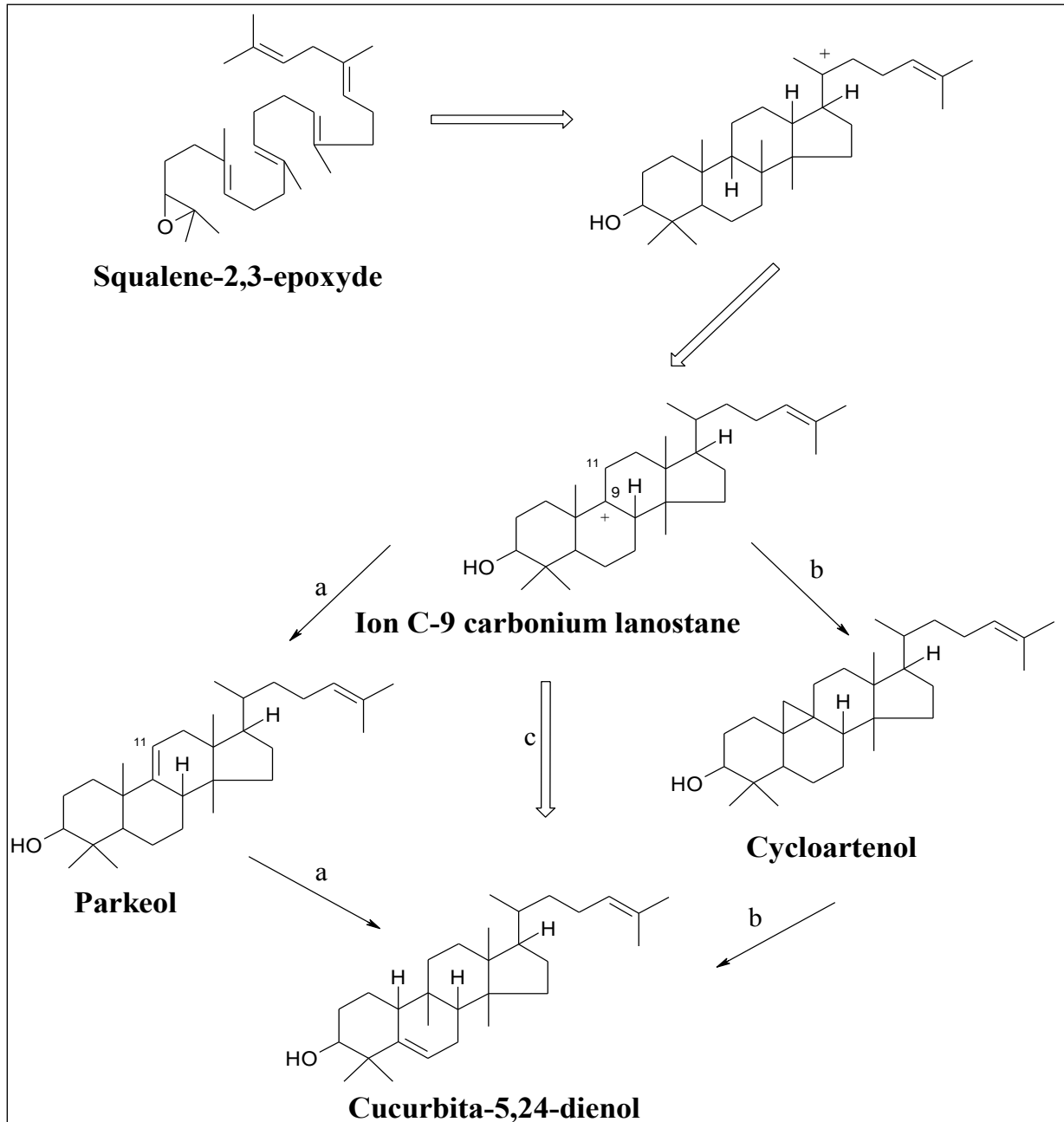


Figure 3 : Schéma représentatif des voies de biosynthèse suggérées pour le cucurbita-5,24-diénoI, précurseur des cucurbitacines (Balliano *et al.*, 1983b).

Une autre étude a été réalisée sur la cyclisation du squalène-2,3-époxyde par des fractions microsomiales de la *Cucurbitaceae* et la détermination des réarrangements squelettiques possibles des parkéol et cycloarténol en dérivés de cucurbitane sollicités (**Balliano et al., 1983b**).

Les résultats de ces deux études montrent que seule la voie c est impliquée dans la biosynthèse des cucurbitacines. Elles soutiennent par la suite l'idée de la présence d'une enzyme dans la *Cucurbitaceae* capable de convertir directement la squalène-2,3-époxyde en cucurbita-5,24-diénoïl (**Balliano et al., 1983a ; Balliano et al., 1983b**). Cette enzyme est la cucurbitadiénoïl synthétase, première enzyme spécifique de la synthèse des cucurbitacines dans les plantes (**Shibuya et al., 2004**). Les premières cucurbitacines formées dans les plantes sont les cucurbitacines B et E (**Gry et al., 2006**). Toutes les autres cucurbitacines sont des dérivés de ces deux cucurbitacines et sont produites suite à des réactions métaboliques à des stades ultérieurs de développement des plantes. Ces réactions comprennent l'hydrogénation (catalysée par la cucurbitacine Δ^{23} -réductase), la déshydrogénation, l'hydroxylation, l'isomérisation, la deacétylation (catalysée par les acétyltransférases) (**Dirr et al., 1986 ; Gry et al., 2006 ; Saade et al., 2009 ; Schabort and Teijema, 1968**).

La cucurbitacine Δ^{23} -réductase est une enzyme NADPH dépendante qui joue un rôle important dans le métabolisme des cucurbitacines primaires et de leurs dérivés. Elle catalyse la réduction de la liaison Δ^{23} de la chaîne latérale des cucurbitacines en présence des cations bivalents tels que le Mn^{2+} . Elle possède une activité plus élevée *vis-à-vis* des dérivés β -D-glucosides qui sont plus hydrophiles que les cucurbitacines elles-mêmes. Les cucurbitacines G et H et les cucurbitacines J, K et L sont produites (**Figure 4**) suite à l'action de cette enzyme sur les cucurbitacines D et I respectivement (**Dirr et al., 1986 ; Gry et al., 2006 ; Schabort and Teijema, 1968**).

Les cucurbitacines estérases (acétyltransférases) sont plus fréquemment trouvées dans les plantes de la famille *Cucurbitaceae*. Elles catalysent la deacétylation des cucurbitacines tout en convertissant par exemple la cucurbitacine B en D, la cucurbitacine E en I et la cucurbitacine A en N (**Figure 4**) (**Gry et al., 2006 ; Schwartz et al., 1964**).

La β -glycosidase elastérase est une enzyme qui joue également un rôle dans l'hydrolyse des dérivés glycosides des cucurbitacines dans les plantes (**Schwartz et al., 1964**).

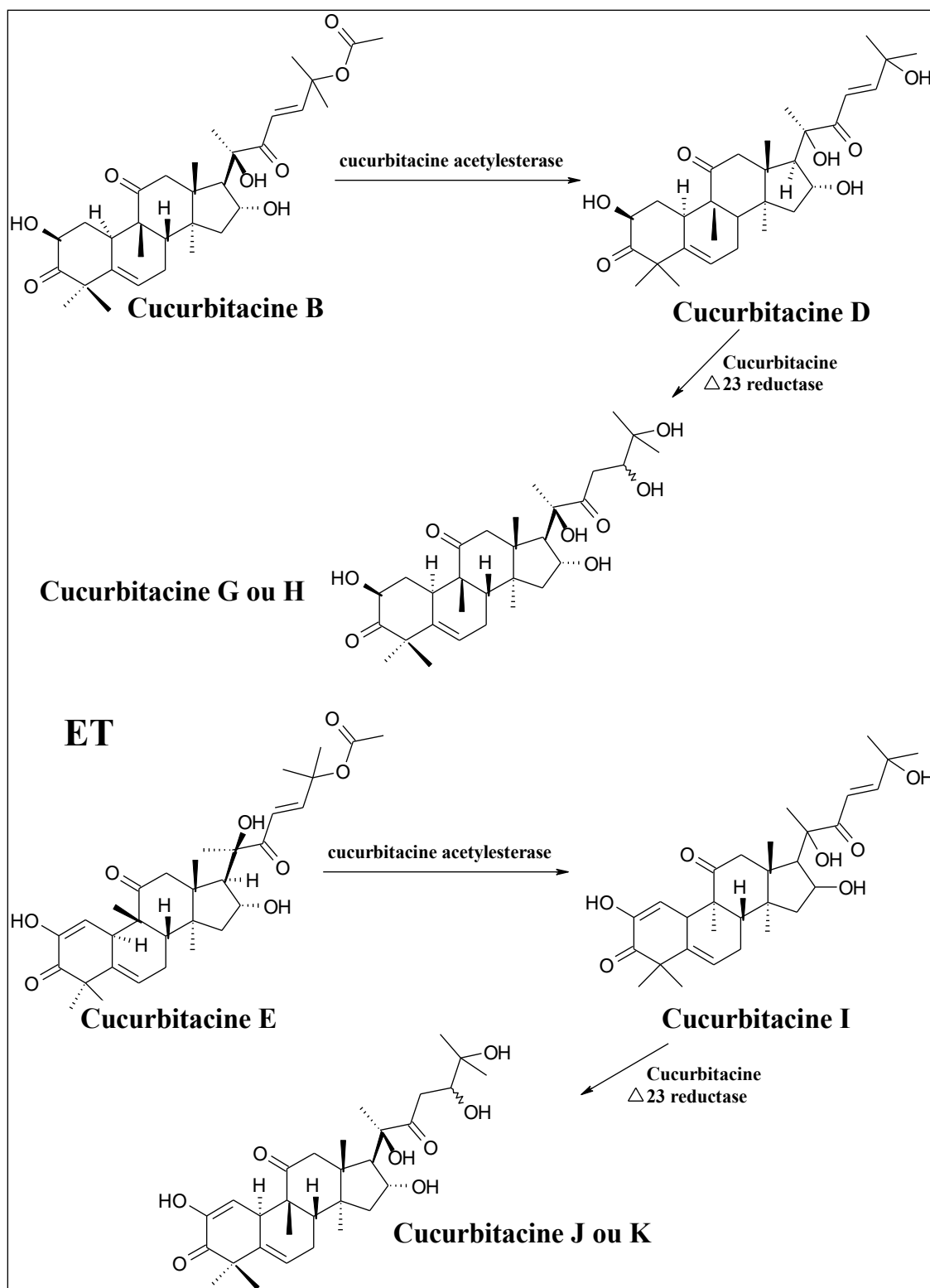


Figure 4 : Schéma représentatif de la production des cucurbitacines catalysée par les enzymes acétyl transférases et la cucurbitacine Δ^{23} réductase (schéma modifié de Gry *et al.*, 2006).

1.1.5 Propriétés anticancéreuses des cucurbitacines

Des cucurbitacines telles que les cucurbitacines A, B, D, E, I, F, O, P, Q et R ont montré des effets cytotoxiques envers plusieurs lignées de cellules cancéreuses mais chacune agit avec un mécanisme et une activité différents. Les cucurbitacines F, O, P, Q et leurs dérivés possèdent des activités plus faibles que les autres cucurbitacines (**Lee *et al.*, 2010**). Toutefois, les dérivés des cucurbitacines de la même catégorie ne présentent pas les mêmes activités. La cucurbitacine D, par exemple, présente des activités anticancéreuses sur plusieurs lignées de cellules humaines tandis que son dérivé le 2-*O*-glucoside n'agit pas comme anticancéreux sur ces mêmes lignées (**Chen *et al.*, 2005**).

Les effets anticancéreux et les mécanismes d'action des cucurbitacines seront présentés avec plus de détails ci-dessous.

Des études sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses des poumons, du colon, du système nerveux central, de l'ovaire, des reins, des leucémies/lymphome et de mélanome montrent que l'effet antiprolifératif des cucurbitacines suit une relation structure-activité et est étroitement relié à leur capacité à modifier la structure et le réseau des micro-filaments d'actine du cytosquelette. Ces deux activités dépendent de la structure de la chaîne latérale des cucurbitacines. La présence d'un groupement hydroxyle au niveau C-24 de la chaîne latérale des cucurbitacines I et D et l'hydroxylation du C-3 de la cucurbitacine Q (**Figure 2**) réduisent mais n'éliminent pas leurs activités antiprolifératives. Par contre, l'hydroxylation des cucurbitacines K et P en C-23 et la réduction de la double liaison en C-22 éliminent totalement leurs activités antiprolifératives et celles dirigées contre les filaments d'actines (**Duncan *et al.*, 1996**). La présence du groupement cétone en C-22 et du groupe acétoxy en C-25 dans la structure des cucurbitacines B et E rend leur effet cytotoxique envers les lignées cellulaires leucémiques (U937) beaucoup plus important que celui de la cucurbitacine I qui possède un groupe hydroxyle en C-25. Les cucurbitacines I et E agissent aussi comme agents cytotoxiques en inhibant la phosphorylation de la cofiline. Cette dernière est une protéine permettant la régénération des filaments d'actines en dépolymérisant les filaments les plus anciens et son activité est réprimée suite à sa phosphorylation. Toutefois, l'activité de la cucurbitacine E envers la cofiline est beaucoup plus importante même à des concentrations plus faibles grâce au groupe acétoxy en C-25 (**Nakashima *et al.*, 2010**).

La cucurbitacine A est un agent anti-tumoral qui agit en inhibant la voie JAK2¹ mais pas la voie STAT3² (**Sun et al., 2005**). La cucurbitacine Iia n'inhibe ni la voie JAK2 ni la voie STAT3 (**Boykin et al., 2011**). La cucurbitacine Q agit, par contre, en inhibant l'activation de la voie STAT3 mais pas celle de la voie JAK2 ; tandis que les cucurbitacines B, E et I agissent en inhibant ces deux voies (**Banerjee et al., 2010 ; Blaskovich et al., 2003 ; Graness et al., 2006 ; Lui et al., 2009 ; Rivat et al., 2005 ; Sun et al., 2005**). La cucurbitacine R inhibe l'activation de la voie STAT-3 induite par l'IL-6, cependant l'effet de cette cucurbitacine n'a pas été testé sur l'activation de la voie JAK2 (**Escandell et al., 2007**). A noter que ces sept cucurbitacines présentent des structures similaires (**Figure 5**), cependant leurs effets biologiques et physiologiques sont différents et elles inhibent ces deux voies suivant une relation structure-activité. En effet, l'ajout d'un groupement hydroxyle au niveau C11 chez la cucurbitacine A ne lui permet pas d'inhiber la voie STAT3. La conversion de la fonction cétone en fonction hydroxyle au niveau C3 chez les cucurbitacines Q et Iia explique le fait de son incapacité à inhiber l'activation de la voie JAK2. Les cucurbitacines B, E et I ne possédants pas un groupe hydroxyle en C11 et ayant un groupe hydroxyle en C3 sont capables d'inhiber l'activation des deux voies JAK2 et STAT3 (**Sun et al., 2005**).

Les cucurbitacines I et Iia entraînent des désagréations dans les filaments d'actine du cytosquelette des cellules cancéreuses du foie, des poumons, de la prostate, et des reins (**Boykin et al., 2011 ; Graness et al., 2006**). En plus de son inhibition des voies JAK2/STAT3 et des changements dans la morphologie cellulaire, la cucurbitacine I présente une activité cytotoxique contre les cellules HeLa du cancer du col de l'utérus reliée à sa fixation sur le récepteur des glucocorticoïdes (**Witkowski and Konopa, 1981**).

¹ La Janus kinase 2 (JAK2) est une protéine de type tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire. Elle phosphoryle une variété de protéines intracellulaires sur leurs résidus tyrosine. Cette phosphorylation vient attirer d'autres molécules de signalisation (ex. STATs) pour les phosphoryler à leur tour. Ces substrats sont des facteurs de transcription. Ils migreront jusqu'au noyau et moduleront l'expression des gènes cibles. Ces cascades de phosphorylation entraînent ultimement : la prolifération cellulaire (par la voie des MAP3-Ks), l'inhibition de l'apoptose (par la voie des PI3-Ks/AKT) et la croissance cellulaire (par la voie des STAT1 et STAT5).

² Les protéines STATs (Signal transducers and activators of transcription) sont identifiées comme étant des régulateurs importants de plusieurs fonctions physiologiques telles que la réponse immunitaire, l'inflammation, la prolifération, la différenciation, le développement, la survie cellulaire et l'apoptose. Elles possèdent l'unique capacité de transduire des signaux extracellulaires de cytokines (ex. IL-6, interférons ou facteurs de croissance comme platelet-derived growth factor et epidermal growth factor) et de réguler directement la transcription.

La cucurbitacine E inhibe la croissance de plusieurs lignées de cellules cancéreuses des poumons, du colon, du système nerveux central, de l'ovaire, des reins, du foie, issues de leucémies/lymphome et du mélanome. Elle entraîne des altérations dans la morphologie de ces cellules comme l'apparition des inclusions sous-membranaires. Plusieurs noyaux apparaissent dans ces cellules après une longue durée d'exposition supposant que la cucurbitacine E inhibe la cytokinèse mais pas la caryocinèse. Elle entraîne aussi des modifications dans la distribution des filaments de F-actine et de vimentine mais pas dans le réseau des microtubules. En effet, les filaments F-actine jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires comme par exemple la contraction musculaire, la division cellulaire et la cytokinèse. La vimentine appartient à la famille des filaments intermédiaires qui jouent un rôle important dans la structure dynamique des cellules et qui forment le cytosquelette avec les filaments d'actine et les microtubules. La modification au niveau du réseau des filaments d'actine change d'une lignée cellulaire à une autre. Une dépolymérisation d'actine est observée avec les lignées cellulaires du cancer endothélial alors qu'une sur-polymérisation d'actine est observée avec les cellules du cancer de la prostate traitées par la cucurbitacine E. L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses n'est irréversible qu'après 24h d'exposition suggérant que la cucurbitacine E a besoin d'un cycle complet pour inhiber la croissance cellulaire (**Duncan *et al.*, 1996, 1997 ; Momma *et al.*, 2008**).

Les cucurbitacines D et la 23,24-dihydrocucurbitacine D inhibent la prolifération des lignées cellulaires du cancer du foie (Hep3B) tout en induisant leur apoptose par activation de la caspase-3 et de la phosphorylation des JNKs (c-Jun N-terminal kinases) qui jouent un rôle important dans l'induction de l'apoptose (**Takahashi *et al.*, 2009**). Ces deux cucurbitacines présentent aussi une cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du mélanome en inhibant la synthèse de mélanine par inhibition de l'activité de la tyrosinase, une enzyme clé dans la biosynthèse de la mélanine. Toutefois, l'index thérapeutique de la cucurbitacine D reste plus élevé que celui de la 23,24-dihydrocucurbitacine D du fait de la présence de la double liaison $\Delta^{23,24}$ chez la cucurbitacine D (**Oh *et al.*, 2002**).

La cucurbitacine B inhibe la croissance des cellules leucémiques HL60 et U937 et ceci en entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase S (phase de répllication de l'ADN), la diminution du pourcentage des cellules en phase G₀-G₁ (phase de croissance cellulaire et préparation à la répllication) et des modifications dans la morphologie cellulaire (élargissement, multi-nucléation,

altération des filaments d'actine du cytosquelette) (**Haritunians et al., 2008**). Cette cucurbitacine entraîne aussi l'inhibition de la prolifération de plusieurs lignées cellulaires des cancers de l'os et du larynx tout en arrêtant le cycle cellulaire en phase G₂/M (phase de croissance, de préparation à la mitose et de division cellulaire) par diminution de l'expression de la cycline B1 dont l'accumulation est essentielle dans la transition de cette phase du cycle cellulaire. Elle provoque aussi l'apoptose par inhibition de l'activation de la voie STAT3 qui à son tour diminue l'expression de la cycline B1 et du Bcl-2 qui est un inhibiteur de l'apoptose mitochondriale (**Lee et al., 2011 ; Liu et al., 2008**).

La 23,24-dihydrocucurbitacine B présente des activités cytotoxiques envers plusieurs lignées cellulaires leucémiques, du cancer de sein, du col de l'utérus et du colon en provoquant l'arrêt de leur prolifération pendant la phase G₂/M du cycle cellulaire entraînant par la suite leur apoptose via l'activation de la caspase. L'apoptose est détectée à partir des changements observés dans la morphologie cellulaire comme par exemple le rétrécissement cellulaire, la condensation et la fragmentation de la chromatine même après 6h de traitement et à 3,6 µM (**Yang et al., 2007**).

La cucurbitacine Q et la deacétyl-cucurbitacine Q entraînent une inhibition de la prolifération des lymphocytes T tout en inhibant l'activité métabolique intracellulaire (**Smit et al., 2000**).

1.1.6 Propriétés anti-inflammatoires des cucurbitacines

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les cucurbitacines sont des substances anti-inflammatoires qui inhibent la migration des cellules vers le site de l'inflammation ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

En effet, les extraits dichlorométhaniques de la racine de *Wilbrandia ebracteata* Cogn (*Cucurbitaceae*) sont couramment utilisés en Brésil dans le traitement des maladies rhumatismales. Ces extraits contiennent les cucurbitacines B, D, E, G, H et P, les dihydrocucurbitacines B et E, la dihydroisocucurbitacine B, la 22-déoxycucurbitacine D et d'autres cucurbitacines. Ces extraits ainsi que les cucurbitacines isolées B et E et la dihydrocucurbitacine B inhibent le développement de l'œdème induit par le carraghénane dans la patte des souris et des rats. Cette inhibition est dose dépendante. Les cucurbitacines B et E

purifiées et administrées par voie intrapéritonéale réduisent l'œdème de 61 et 58 %, respectivement, après 4h d'administration. La dihydrocucurbitacine B inhibe le développement de l'œdème dans la patte des souris de l'ordre de 26, 24 et 56% pour les doses de 0,3, 1 et 3 mg/kg, respectivement (**Peters et al., 1997 ; Peters et al., 1999 ; Peters et al., 2003 ; Siqueira et al., 2007**). Les extraits dichlorométhaniques de la racine de cette plante, la cucurbitacine B et la dihydrocucurbitacine B inhibent également d'une manière dose dépendante l'inflammation de la plèvre induite par le carraghénane chez les souris. L'effet anti-inflammatoire de ces cucurbitacines revient à leur capacité à diminuer le taux de la prostaglandine E2 (PGE2) en inhibant sélectivement la cyclooxygénase-2 (COX-2) et à inhiber l'influx cellulaire des leucocytes dans la cavité pleurale et par la suite le taux des leucotriènes B4 dans l'exsudat pleural (**Peters et al., 1999 ; Siqueira et al., 2007**). Ces extraits dichlorométhaniques (1, 3 et 10 mg/kg) entraînent aussi une réduction dose-dépendante d'une part de la migration des cellules vers les articulations dont l'inflammation est induite par le zymosan, et d'autre part dans le temps que les rats mettent pour élever leurs pattes. L'effet anti-inflammatoire de ces extraits est dû à la réduction du taux d'oxyde nitrique (NO) libéré dans les articulations arthritiques et à l'inhibition de la COX-2 par les cucurbitacines présentes dans l'extrait (**Peters et al., 2003**).

Une autre étude a permis d'identifier sept cucurbitacines dans l'extrait chloroformique des racines de la plante *Cayaponia tayuya*, parmi lesquelles les 23,24-dihydrocucurbitacine B et cucurbitacine R sont des composés majeurs (**Bauer et al., 2009 ; Recio et al., 2004**). Le degré d'arthrite est clairement atténué après traitement par ces deux cucurbitacines. En fait ces deux cucurbitacines à une dose de 1 mg/kg réduisent significativement le gonflement de la patte des rats induit par la *Mycobacterium butyricum*. Elles diminuent l'atteinte articulaire, le gonflement des tissus mous de la patte des rats, l'infiltration cellulaire, le pannus³ et l'activité ostéoclastique tout en laissant une légère calcification. Elles réduisent également la destruction de l'articulation et le degré d'arthrite et ceci en inhibant l'expression de la NO synthétase et de la COX-2 et en inhibant la production de TNF- α , NO et de PGE₂. Cependant, elles ne présentent aucun effet sur l'expression de la COX-1 ni sur la production de NO si la nitrate synthétase est induite avant le traitement ; par contre elle inhibe l'activité de la COX-2 même dans la phase de post-induction.

³ Le pannus se forme au niveau de la surface articulaire et se caractérise par la formation d'une couche anormale du tissu fibrovasculaire et aboutit à la destruction du cartilage et à l'érosion de l'os en stimulant la libération de l'IL-1 et des prostaglandines par les macrophages.

Les cucurbitacines sont aussi de puissants analgésiques. Elles inhibent la libération de l'élastase, une enzyme sécrétée durant l'inflammation par les neutrophiles et qui entraîne la protéolyse du collagène IV et de l'élastine de la matrice extracellulaire du cartilage. En revanche, elles ne présentent aucun effet sur la libération des radicaux superoxydes. En parallèle, l'ibuprofène qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé pour soulager les symptômes de l'arthrite et comme analgésique surtout en cas d'inflammation, à 10 mg/kg et sous les mêmes conditions présente presque les mêmes caractéristiques de traitement que celles de la cucurbitacine R et de la 23,24-dihydrocucurbitacine B. Une étude a été réalisée aussi pour la 23,24-dihydrocucurbitacine B et a montré qu'elle inhibe à 100% la production de TNF- α et de l'IL-1 β dans les lymphocytes humains mais pas dans les macrophages de murines où la production de ces deux cytokines n'a pas été affectée (**Escandell *et al.*, 2006 ; Escandell *et al.*, 2007**).

L'extrait butanolique de la plante *Cayaponia tayuya*, contenant une grande variété de cucurbitacines sous forme glycosidique et un mélange de flavonoïdes, entraîne une inhibition de l'œdème aigu ou chronique de l'oreille des souris induit par le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA), une diminution de 42% de la production de NO dans les macrophages de murine (RAW 264.7) à 33,45 $\mu\text{g/mL}$ et une inhibition de l'expression des iNOS et COX-2 de 97 et 63%, respectivement, à 22,30 $\mu\text{g/mL}$. Cependant, les produits de cet extrait ne présentent aucun effet sur la production de TNF α (**Aquila *et al.*, 2009**).

Les cucurbitacines B, D, E et I isolées des fruits de la *Cucurbita andreana* inhibent à 100 $\mu\text{g/mL}$ l'activité de la COX-2 mais pas celle de la COX-1. Cette inhibition est de l'ordre de 32, 29, 35 et 27% pour les cucurbitacines B, D, E et I, respectivement. L'inhibition de la COX-2 augmente en présence du groupement acétyle-C-28 qui est présent chez les cucurbitacines B et E et absent chez les cucurbitacines D et I. A cette même dose, la cucurbitacine B est la cucurbitacine la plus puissante dans l'inhibition de la peroxydation des lipides (59%) suivie par la cucurbitacine I (23%). Cependant, les cucurbitacines D et E ne présentent aucun effet sur la peroxydation des lipides (**Jayaprakasam *et al.*, 2003**).

La cucurbitacine E isolée de *Citrullus lanatus* var. *citroides* inhibe significativement, à 30 et 60 mg/kg, l'inflammation de la patte du rat induite par le carraghénane après 4h d'administration. Cet effet anti-inflammatoire est dû à l'inhibition de la production de NO par les macrophages de murine (RAW 264.7) d'une manière dose dépendante et par l'inhibition de la COX. En fait,

durant cette étude, la cucurbitacine E a montré une inhibition des deux enzymes COX-1 et COX-2 mais avec plus de sélectivité *vis-à-vis* de la COX-2 (Abdelwahab *et al.*, 2011).

Les extraits de la batte de *Momordica grosvenori* (*Momordica grosvenori* Swingle MSE) contenant des glycosyl-cucurbitacines présentent des propriétés anti-inflammatoires chez les macrophages de la murine (RAW 264,7) dont l'inflammation est induite par les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont capables de bloquer la phosphorylation et la dégradation des protéines I κ B α entraînant une diminution de la production de NO et PGE2 par l'inhibition du taux d'expression des protéines iNOS et COX-2, respectivement et prévenant par la suite la translocation et l'activation de NF κ B dans le noyau. Ces extraits diminuent également l'activation des ERK1/2 et p38 MAPK par le LPS, impliqués dans l'induction des iNOS et COX-2, et celle de la voie PI3K/Akt qui aboutit à la phosphorylation et l'activation du NF κ B (Figure 5). En effet, NF κ B joue un rôle crucial dans l'induction de l'iNOS et de la COX-2 par le LPS et sa translocation dans le noyau est précédée par la phosphorylation et la dégradation des protéines I κ B α . La réduction de la production du nitrite (>50% à partir de 500 μ g/mL) et du PGE2 (600 et 800 μ g/mL) par ces extraits est significative et est dose dépendante (Pan *et al.*, 2009).

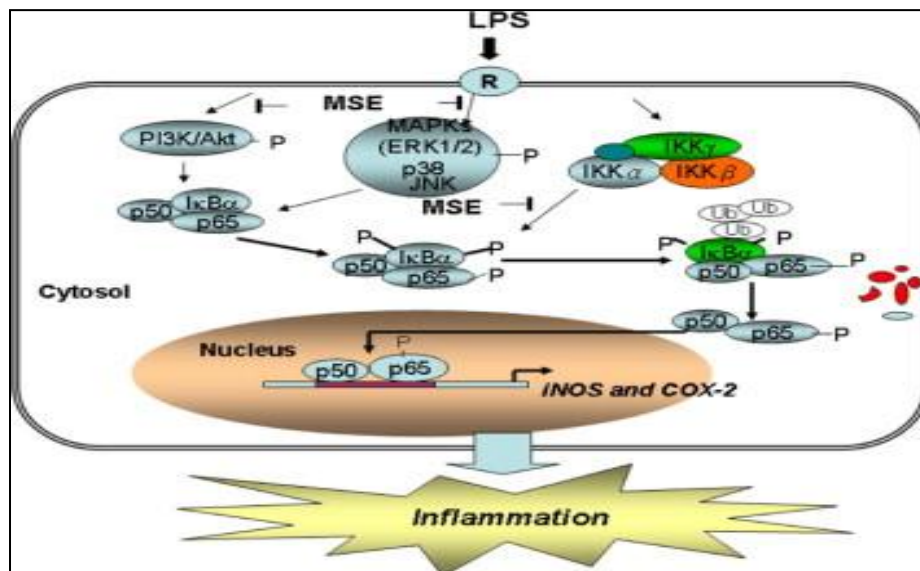


Figure 5 : Représentation schématique de l'inhibition de l'activation de NF κ B et de l'expression des iNOS et COX-2 induits par LPS par MSE dans les macrophages des souris. LPS active JNK1/2 p38, ERK1/2 MAPK, I κ B kinases et PI3K/Akt. La phosphorylation de I κ B α et p65 contribue à l'activation de NF κ B et par la suite à l'induction des iNOS et COX-2. Tous ces événements sont bloqués par MSE (Pan *et al.*, 2009).

1.1.7 Pharmacocinétique des cucurbitacines

1.1.7.1 Rappel sur la pharmacocinétique des xénobiotiques (ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion)

La pharmacocinétique est l'étude du devenir des substances actives des médicaments dans l'organisme. Elle comporte quatre phases se déroulant simultanément : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion.

➤ La phase d'**absorption** permet à la substance active de traverser les membranes biologiques vers le sang.

➤ Durant la phase de **distribution**, la substance active circule dans le sang sous forme libre ou liée d'une façon réversible aux protéines plasmatiques (albumine, globuline, lipoprotéines). Ensuite, elle peut s'accumuler dans certains organes ou tissus selon ses propriétés physico-chimiques.

L'albumine sérique humaine est la protéine la plus abondante du sérum. Elle représente plus que 50 – 75% des protéines plasmatiques. Elle permet le transport d'un grand nombre de substances endogènes et exogènes ce qui augmente leurs solubilités dans le plasma, diminue leurs toxicités, leur protège contre l'oxydation et augmente leur demi-vie. Elle possède aussi des propriétés enzymatiques parmi lesquelles l'activité estérase-like est la plus importante (**Kragh-Hansen et al., 2002**).

➤ La phase de **métabolisme** correspond à la transformation d'un médicament par une réaction enzymatique en un ou plusieurs métabolites actifs, inactifs ou toxiques. C'est une étape qui conduit à la formation de substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les urines, la bile, la salive ou la sueur. De nombreux tissus sont impliqués dans le métabolisme des médicaments tels le foie, le rein, l'intestin, les poumons etc. mais le foie reste le principale site de métabolisme des médicaments du fait que les hépatocytes sont riches en enzymes impliquées

dans les voies de biotransformation. On distingue deux grandes phases dans le métabolisme des médicaments : les réactions de phase I et les réactions de phase II.

1) les réactions de phase I

Les réactions de phase I regroupent des réactions d'oxydation catalysées par des mono-oxygénases (ex. cytochromes P450) ou d'autres oxydoréductases, des réactions de réductions et des réactions d'hydrolyse par des estérases. Les métabolites issus de ces réactions possèdent des groupes fonctionnels hydroxyles (OH), carboxyles (COOH), amines (NH₂) qui peuvent être ensuite conjugués par les réactions de phase II.

- **Les cytochromes P450 (CYP)** appartiennent à la famille des mono-oxygénases. Ils sont des hémoprotéines présentes dans les microsomes du foie, de l'intestin, des reins et des poumons. Ils jouent un rôle important dans l'oxydation des xénobiotiques ainsi que dans le métabolisme des stéroïdes, acides gras, acides biliaires et éicosanoïdes. Ils catalysent des réactions d'hydroxylation, de dealkylation, d'époxydation, de déshydratation, de désaturation, des réactions d'aromatisation etc. Ces enzymes regroupent 4000 membres classés en 17 familles selon la similitude de leurs séquences en acide aminés. Les cytochromes P450s impliqués dans le métabolisme des médicaments appartiennent aux familles 1, 2, 3 et 4 et sont en majorité localisés dans le réticulum endoplasmique des microsomes du foie et d'autres sont localisés dans la mitochondrie (**Guengerich, 2003 ; Guengerich, 2006 ; Park *et al.*, 1995 ; Remacle *et al.*, 1974 ; Sohl *et al.*, 2009 ; Vail *et al.*, 2005**).

Les cytochromes P450s microsomaux catalysent une réaction de mono-oxygénation à partir de dioxygène (O₂), dont un atome d'oxygène est transféré au substrat accepteur et un autre est réduit en eau (H₂O) (**Figure 6**). Cette réaction nécessite la présence des électrons transférés par la NADPH-P450 réductase et issus de l'oxydation du NADPH. En revanche, les cytochromes P450s mitochondriaux utilisent pour leur activité les électrons fournis par la chaîne de transfert d'électrons composée de ferrédoxine/adrénodoxine et ferrédoxine/adrénodoxine réductase (**Guengerich, 2003 ; Vail *et al.*, 2005**).

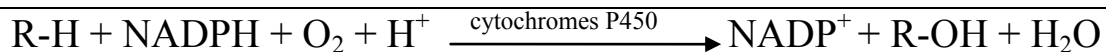


Figure 6 : Réaction de mono-oxygénation d'un substrat (R-H) catalysée par les cytochromes P450 du réticulum endoplasmique.

Parmi les cytochromes P450s identifiés chez l'homme, seulement cinq isoformes sont les plus abondantes dans le foie humain et les plus impliquées dans le métabolisme des médicaments. Ce sont les CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 et CYP2C19 (**Figure 7**). Le cytochrome P450 3A4 reste l'isoforme le plus important chez l'homme du fait qu'il est le plus abondant dans le foie et qu'il est capable de catalyser environ 50% des médicaments du marché (**Guengerich, 2003 ; Sohl et al., 2009 ; Vail et al., 2005**).

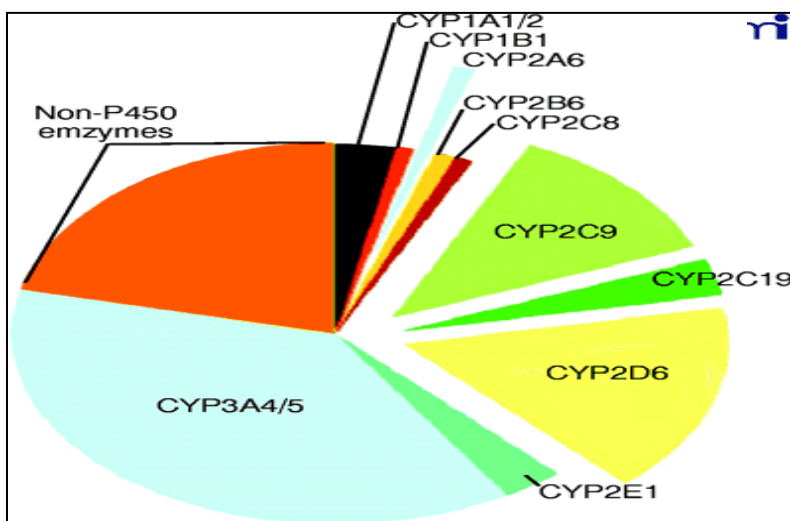


Figure 7 : Contribution des cytochromes P450 humains au métabolisme des médicaments actuellement commercialisés. Les non-P450 enzymes comprennent l'alcool et l'aldéhyde déshydrogénases, la flavine mono-oxygénases etc. (**Guengerich, 2003**).

- **L'alcool déshydrogénase** est une métalloprotéine à zinc localisée dans le cytoplasme des hépatocytes. Cette enzyme permet la détoxification de l'organisme des alcools toxiques tout en catalysant leur oxydation en aldéhydes et en transportant l'hydrogène de l'alcool sur le coenzyme NAD^+ (**Figure 8**) (**Frey and Vallee ; 1980**).

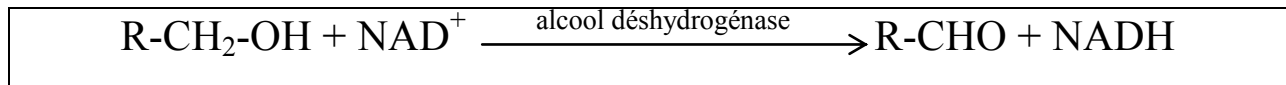


Figure 8 : Réaction de déshydrogénation du substrat (R-CH₂-OH) catalysée par l'alcool déshydrogénase.

- **Les hydrolases** : Cette famille des enzymes regroupe les carboxylestérases, arylestérases, cholinestérases, arylsulfatases, β-glucuronidases, époxyde hydrolases, métallo-endopeptidases etc. Ces enzymes catalysent des réactions d'hydrolyse des esters, des nitrates et des amides (**Figure 9**). Les époxydes hydrolases sont localisées dans les fractions microsomiales et cytosoliques. Elles aboutissent à la formation des *trans*-dihydrodiols (**Figure 9**) en catalysant l'addition d'une molécule d'eau au cycle époxyde (**Yamada et al., 2000**).

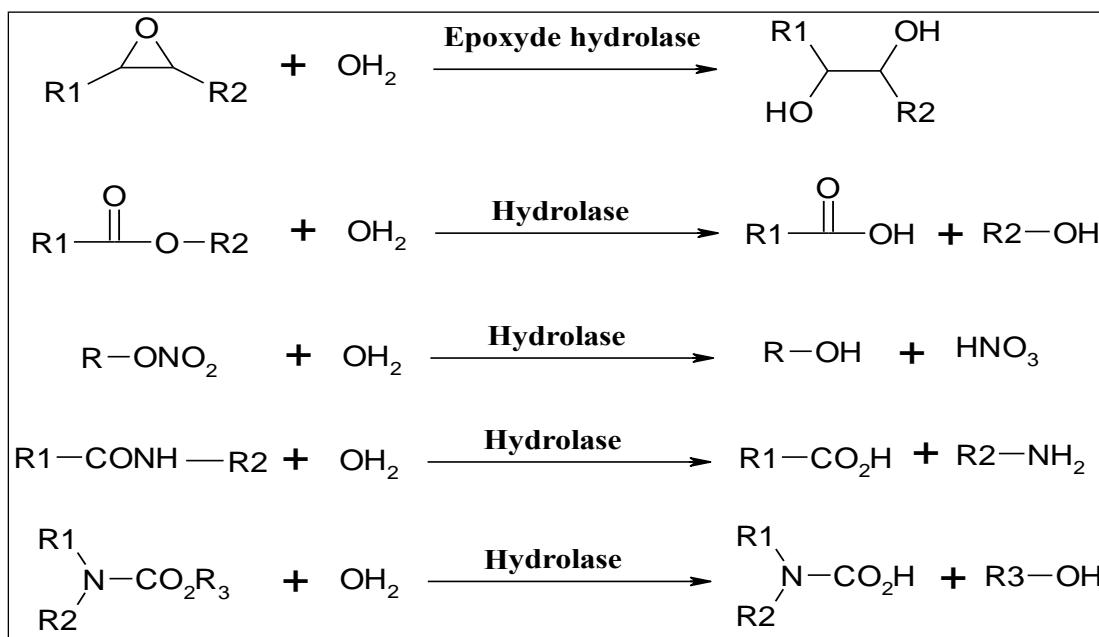


Figure 9 : Réaction d'hydrolyse d'une fonction époxyde, ester, nitrate ou amide d'un substrat par des hydrolases.

2) les réactions de phase II

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison avec des substrats hydrophiles comme l'acide-αD-glucuronique, le sulfate, conjugaison au glutathion etc. ou avec des substrats hydrophobes comme le groupement méthyle, le groupement acétyle etc. Ces réactions

regroupent la glucuroconjugaison, la sulfoconjugaison, la conjugaison au glutathion, la méthylation (alkylation), la glycosylation, l'acétylation etc.

- **La glucuroconjugaison** : La glucuroconjugaison est une voie métabolique catalysée par les UDP-glucuronyl-transférases (UGTs) qui sont des glycoprotéines transmembranaires localisées surtout dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Elles sont aussi exprimées dans les reins, le tractus biliaire, l'estomac, l'intestin et les tissus du colon et du cerveau. Les isoformes d'UGTs sont divisées en deux familles principales : 1A et 2B. Cette division est basée sur les similitudes entre leurs séquences en acides aminés. Les UGTs catalysent la biotransformation de divers substrats endogènes et exogènes hydrophobes possédants des structures chimiques et des propriétés physicochimiques différentes. Ils catalysent le transfert du groupement glucuronosyl depuis l'acide UDP- α D-glucuronique (UDPGA) vers les différents groupements fonctionnels -OH, -COOH, -NH₂, -SH et C-C des substrats aboutissant ainsi à la formation des β -D-glucuronides (**Figure 10**).

L'activité des UGTs est optimale en présence de Mg²⁺ mais elle n'en est pas strictement dépendante. La glucuroconjugaison de ces substrats permet d'augmenter leur polarité aboutissant à la formation des glucuronides généralement inactifs et non toxiques facilitant ainsi leur élimination de l'organisme par excrétion biliaire ou urinaire (**Aumont *et al.*, 2001 ; El-Bachá *et al.*, 2000 ; Fabien *et al.*, 2004 ; Hamdoune *et al.*, 1995 ; Meech and Mackenzie, 1997 ; Radomska-Pandya *et al.*, 1999 ; Radomska-Pandya *et al.*, 2005 ; Sabolovic *et al.*, 2000 ; Suleman *et al.*, 1998 ; Turgeon *et al.*, 2003**).

- **La sulfoconjugaison** : Les sulfotransférases sont des enzymes solubles localisées dans le cytosol. Généralement, la sulfoconjugaison est une voie de biotransformation et de détoxification des xénobiotiques qui aboutit à leur inactivation et leur élimination de l'organisme par excrétion biliaire ou urinaire en jouant sur deux critères : en les rendant plus hydrophiles et en évitant leur réabsorption tout en évitant leur pénétration passive à travers les membranes cellulaires (**Blanchard *et al.*, 2004 ; Tyapochkin *et al.*, 2009**). Elles permettent également de réguler l'activité biologique des hormones stéroïdiennes (17- β -œstradiol et déhydroépiandrostérone), des

hormones thyroïdiennes et des catécholamines. Pour ce faire, ces enzymes catalysent le transfert du groupement sulfate du cofacteur, 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS), au site nucléophile accepteur des composés endogènes (ex. les hormones hydroxystéroïdiennes, thyroïdiennes et glucocorticoïdes, les acides biliaires et les neurotransmetteurs) ou des composés exogènes tout en libérant l'adénosine-3',5'-biphosphate (PAP) et le produit sulfoconjugué (**figure 11**). Le site nucléophile accepteur est un groupement hydroxyle, amine, sulfhydryle ou N-oxyde des composés endogènes et exogènes (**Glatt, 2000 ; Glatt *et al.*, 2000 ; Malojčić *et al.*, 2008 ; Tyapochkin *et al.*, 2009**).

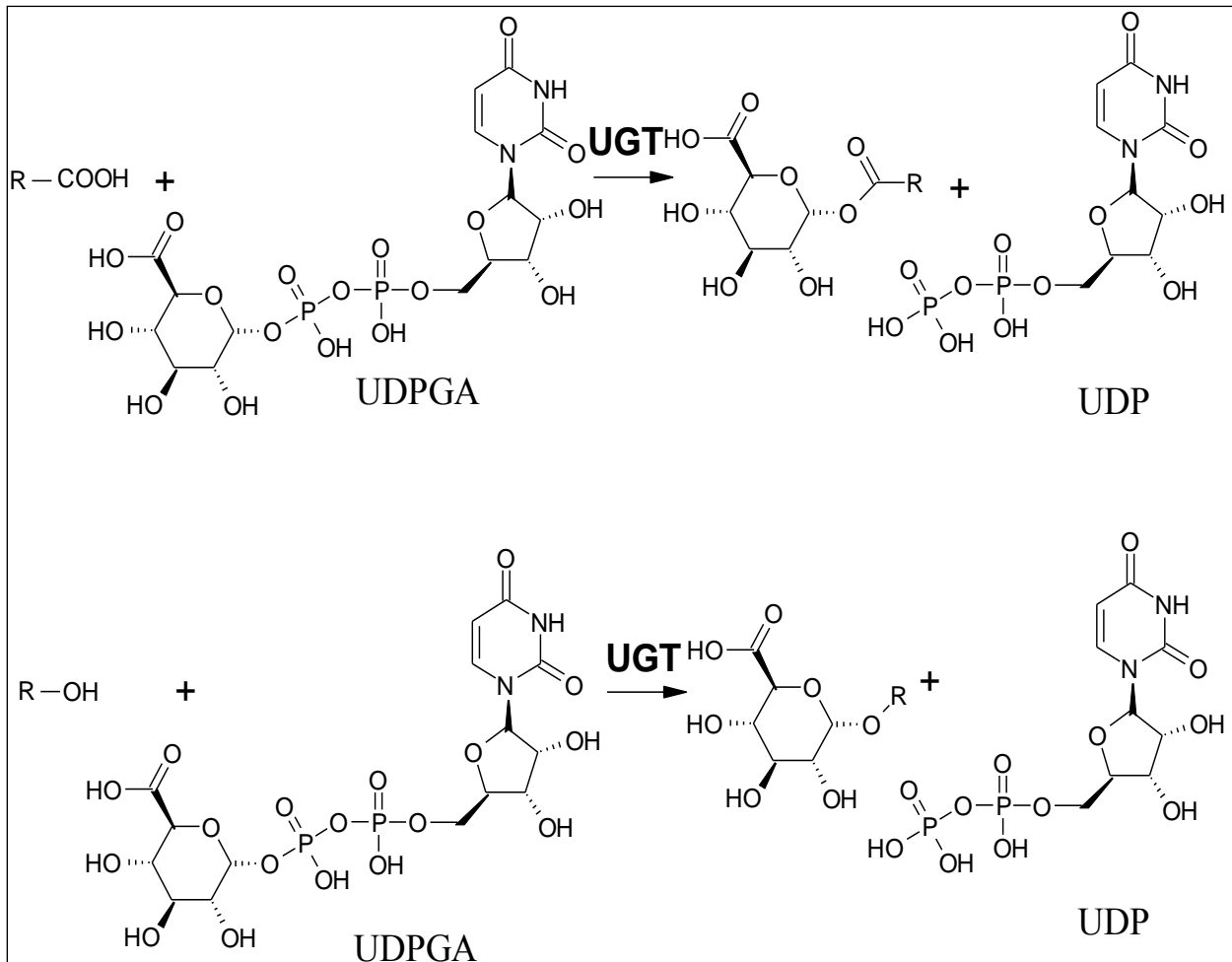


Figure 10 : Schématisation des réactions de glucuroconjugaison des substrats possédants des fonctions OH ou COOH catalysées par les UGTs. R correspondant au groupement alkyle.

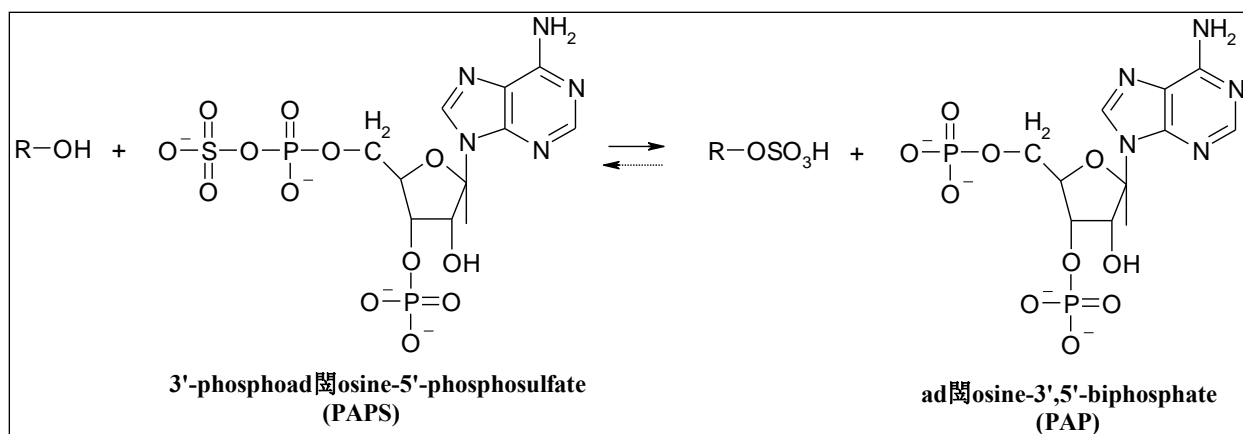


Figure 11 : Schéma de la réaction de sulfoconjugaison d'un substrat R-OH.

- **L'acétylation** : L'acétylation est une réaction enzymatique catalysée par des enzymes appelées les acétyltransférases. Ces enzymes catalysent l'introduction d'un groupe fonctionnel acétyle ($-CO-CH_3$) d'un co-substrat donneur du groupe acétyle (ex. l'acétyl-CoA) dans la fonction amine, hydroxyle ou carboxyle d'un substrat accepteur du groupe acétyle tout en substituant un atome d'hydrogène actif par un groupe acétyle (**Figure 12**) (Abo-Dalo *et al.*, 2004 ; Moserova *et al.*, 2008 ; Shaw, 1983).

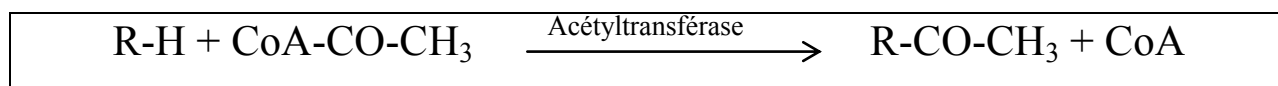


Figure 12 : Réaction d'acétylation d'un substrat (R-H) par les acétyltransférases tout en utilisant l'acétyl-CoA (CoA-CO-CH₃) comme substrat donneur du groupe acétyle.

- **La glycosylation** : Cette voie métabolique est une voie de détoxification catalysée par les UDP-glycosyltransférases localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique, la membrane du plasma et les vésicules du Golgi. Elle joue un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires. Elle permet le transfert d'un sucre à partir d'un UDP-sucrose vers les fonctions $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, $-SH$ et C-C d'un substrat aglycone (**Figure 13**). Ce dernier devient plus soluble dans l'eau (Chaturvedi *et al.*, 2011 ; Madina *et al.*, 2007 ; Trottein *et al.*, 2009).

➤ La phase d'**excrétion** permet l'élimination de la substance active de l'organisme sous forme inchangée, sous forme d'un ou de plusieurs métabolites généralement inactifs ou sous les deux formes.

L'excrétion rénale de certains médicaments ait lieu par des systèmes de sécrétion tubulaire d'anions et de cations organiques. Plusieurs groupes de transporteurs ont été identifiés dans les cellules de l'épithélium tubulaire du néphron et sont regroupés en cinq familles : deux familles de transporteurs d'anions organiques (OAT et OATP), deux familles de pompes dépendant directement d'ATP (MDR et MRP) et une famille de transporteurs de cations organiques (OCT). Les transporteurs OATs sont impliqués dans l'excrétion des médicaments comme la plupart des médicaments sont métabolisés en anions organiques. Ces types de transporteurs sont exprimés dans les tubules rénaux et le foie (**Emami Riedmaier et al., 2012 ; Ikarashi et al., 2012**).

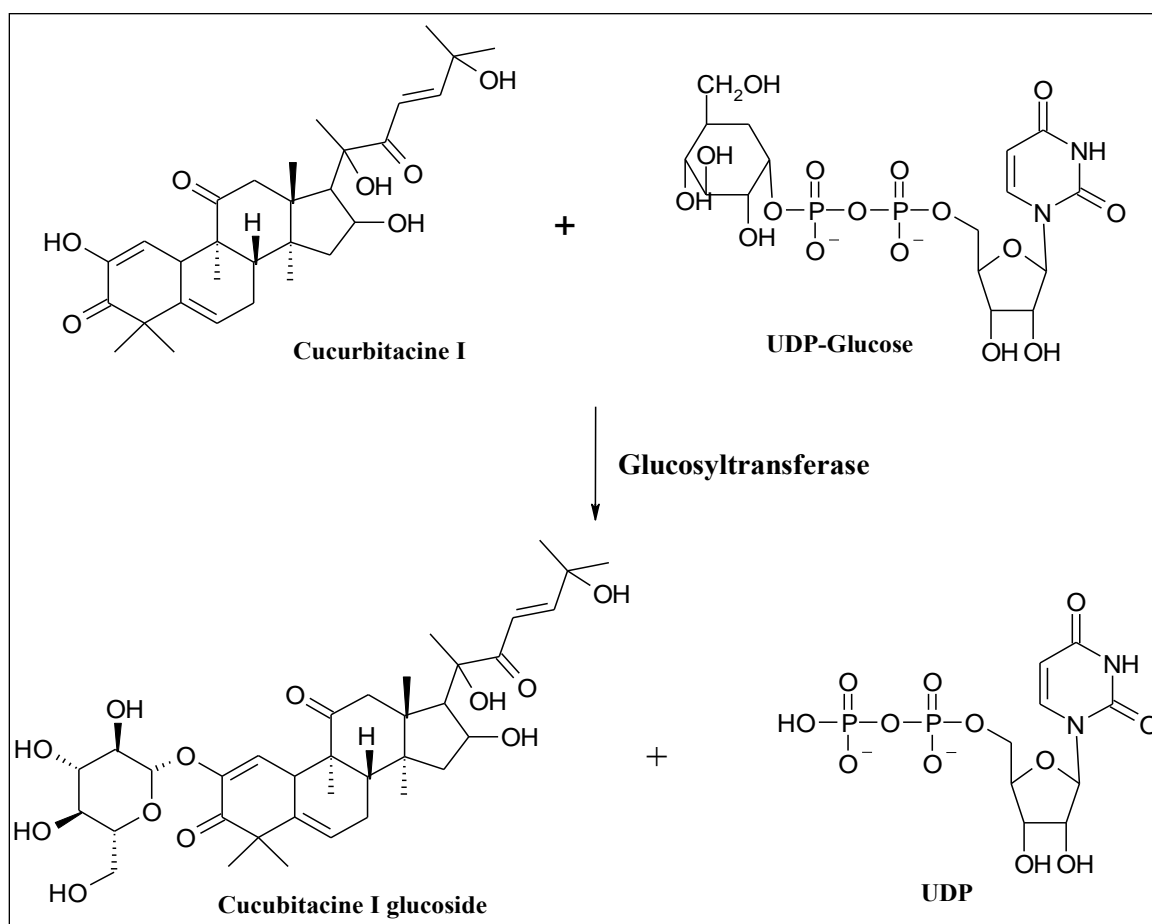


Figure 13 : Schéma représentatif de la glucosylation de la cucurbitacine I par les glucosyltransférases.

1.1.7.2 Distribution des cucurbitacines

La concentration de la cucurbitacine I solubilisée dans 5% de glucose avec 0,25% de DMSO ou sous forme micellaire arrive à la limite de détection dans le plasma après 2h et 3,5h d'administration par voie intraveineuse chez le rat, respectivement. Cependant, aucune donnée sur le devenir de cette substance n'est disponible (Molavi *et al.*, 2006).

Une autre étude a porté sur la liaison des cucurbitacines à l'albumine et son influence sur celle de la bilirubine et de l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien (Greige-Gerges *et al.*, 2007a ; Greige-Gerges *et al.*, 2007b). Les cucurbitacines B, D et E se lient à l'albumine humaine et produisent des réarrangements dans sa structure entraînant une augmentation de l'affinité de la bilirubine et de l'ibuprofène à cette protéine (Tableau 1). En revanche, la liaison de la cucurbitacine I à l'albumine ne modifie pas son affinité *vis-à-vis* de la bilirubine mais diminue sa liaison à l'ibuprofène (Tableau 1). Ces résultats supposent que la cucurbitacine I entre en compétition avec l'ibuprofène au niveau du site de liaison de l'albumine.

Les glycosyl-cucurbitacines ne présentent aucun effet sur l'affinité de ces deux substances à l'albumine. Ceci est dû à l'interaction très faible de ces composés hydrophiles avec cette protéine (Greige-Gerges *et al.*, 2007a ; Greige-Gerges *et al.*, 2007b).

Tableau 1 : Les paramètres de liaison (constantes de liaisons et nombre de sites de liaison) des interactions de la bilirubine et de l'ibuprofène avec la sérum albumine humaine en absence et en présence des cucurbitacines I, D et E, mesurés par fluorimétrie à pH 7,4.

	K_a (M^{-1})	n
Albumine-Bilirubine	$1,69 \times 10^7 \pm 0,03 \times 10^7$	$1,10 \pm 0,05$
Albumine-Bilirubine-Cuc E	$6,15 \times 10^7 \pm 0,35 \times 10^7$	$1,37 \pm 0,03$
Albumine-Bilirubine-Cuc D	$3,20 \times 10^7 \pm 0,11 \times 10^7$	$1,15 \pm 0,05$
Albumine-Bilirubine-Cuc I	$1,66 \times 10^7 \pm 0,03 \times 10^7$	$1,10 \pm 0,01$
Albumine-Ibuprofène	$2,43 \times 10^6 \pm 0,13 \times 10^6$	$1,18 \pm 0,02$
Albumine-Ibuprofène-Cuc E	$6,17 \times 10^6 \pm 0,08 \times 10^6$	$1,36 \pm 0,04$
Albumine-Ibuprofène-Cuc D	$4,38 \times 10^6 \pm 0,14 \times 10^6$	$1,34 \pm 0,01$
Albumine-Ibuprofène-Cuc I	$2,24 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$	$1,86 \pm 0,03$

1.1.7.3 Métabolisme des cucurbitacines

Trois études seulement portaient sur la biotransformation enzymatique des cucurbitacines. La première étudie la stabilité des cucurbitacines I et E dans le foie du rat (**Lorenz et al., 2005**), la deuxième, la stabilité de la cucurbitacine E dans le plasma humain (**Saade et al., 2009**) et la troisième, la transformation de la cucurbitacine D par les insectes *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte et *Diabrotica undecimpunctata howardiv* Barber (**Andersen et al., 1988**).

- La **stabilité des cucurbitacine E et I dans le foie du rat** : les cucurbitacines I et E sont rapidement métabolisés dans les extraits S9 du foie du rat mais les métabolites formés n'ont pas été identifiés (**Lorenz et al., 2005**).

- La **stabilité de la cucurbitacine E dans le plasma humain** : Les résultats de cette étude montrent qu'après 2h d'incubation avec le plasma humain, moins de 70% de la concentration initiale de la cucurbitacine E reste dans le milieu. La cucurbitacine E est hydrolysée en cucurbitacine I après 12, 24 et 48h d'incubation.

De plus, la stabilité de la cucurbitacine E augmente en présence d'EDTA, un inhibiteur spécifique de la paraoxonase, et en présence de l'albumine sérique humaine. En revanche, sa stabilité n'est pas influencée par la présence de l'ésérine qui est un inhibiteur spécifique des cholinestérases plasmatiques. Par conséquent, la paraoxonase est impliquée dans la deacétylation de la cucurbitacine E en cucurbitacine I. La liaison de la cucurbitacine E à l'albumine la protège de l'hydrolyse et le site de liaison de cette substance sur l'albumine n'est pas celui impliqué dans l'activité esterase-like de l'albumine. Les cholinestérases ne sont pas impliqués dans le métabolisme de la cucurbitacine E (**Saade et al., 2009**).

- Les **transformations métaboliques de la cucurbitacine D par les insectes** : les insectes *Diabrotica virgifera virgifera* et *Diabrotica undecimpunctata howardiv* transforment la cucurbitacine D *in vivo* en 4 métabolites, les 23,24-dihydrocucurbitacine I-2-O-D-glucoside ; 23,24-dihydrocucurbitacine D-2-O-D-glucoside ; 23,24-dihydrocucurbitacine E-2-O-D-glucoside et 23,24-dihydrocucurbitacine B-2-O-D-glucoside. Ces métabolites ainsi formés permettent l'identification de quatre voies métaboliques de cette cucurbitacine chez les insectes regroupant la glucosylation, l'acétylation, la désaturation et l'hydrogénation. Le 23,24-dihydrocucurbitacine

D-2-O-D-glucoside est le métabolite le plus abondamment formé comme il nécessite le moins de transformations enzymatiques (**Andersen et al., 1988**).

Un autre type de biotransformation, la biotransformation microbienne des xénobiotiques, est un outil polyvalent qui permet d'augmenter la diversité chimique des triterpénoïdes. Le seul défi pour une telle biotransformation est de trouver le microorganisme approprié à cette biotransformation (**Muffler et al., 2011**).

La cucurbitacine E 2-O-β-D-glucopyranoside est un glucoside triterpénoïde tétracyclique isolé de la *Citrullus colocynthis* L. Shrad et des plantes de la famille *Cucurbitaceae*. Des études sur sa biotransformation microbienne par la *Curvularia lunata* étaient réalisées du fait qu'il est abondant et afin de préparer de nouvelles molécules de cucurbitacines. Cette étude montre que la *Curvularia lunata* convertit ce glucoside triterpénoïde en quatre métabolites qui sont la cucurbitacine E, l'isomère (24*R*)- et (24*S*)-hydroxy-23,24-dihydrocucurbitacine E et le 3-acétyloxy-3-méthylbutylester de l'acide (23-27)-pentanorcucurbitacin I 22-oïque (**Figure 14**). La conversion commence par une glycolyse suivie par les biotransformations secondaires au niveau de la chaîne latérale des cucurbitacines (**Maatooq et al., 1995 ; Muffler et al., 2011 ; Parra et al., 2009**).

1.1.7.4 Excrétion des cucurbitacines

Jusqu'à ce jour aucune étude n'a été réalisée sur l'élimination des cucurbitacines de l'organisme humain ou du rat. Cependant, il a été montré que les insectes *Diabrotica virgifera virgifera* et *Diabrotica undecimpunctata howardi* accumulent et stockent les métabolites des cucurbitacines afin de se protéger des prédateurs (**Andersen et al., 1988**).

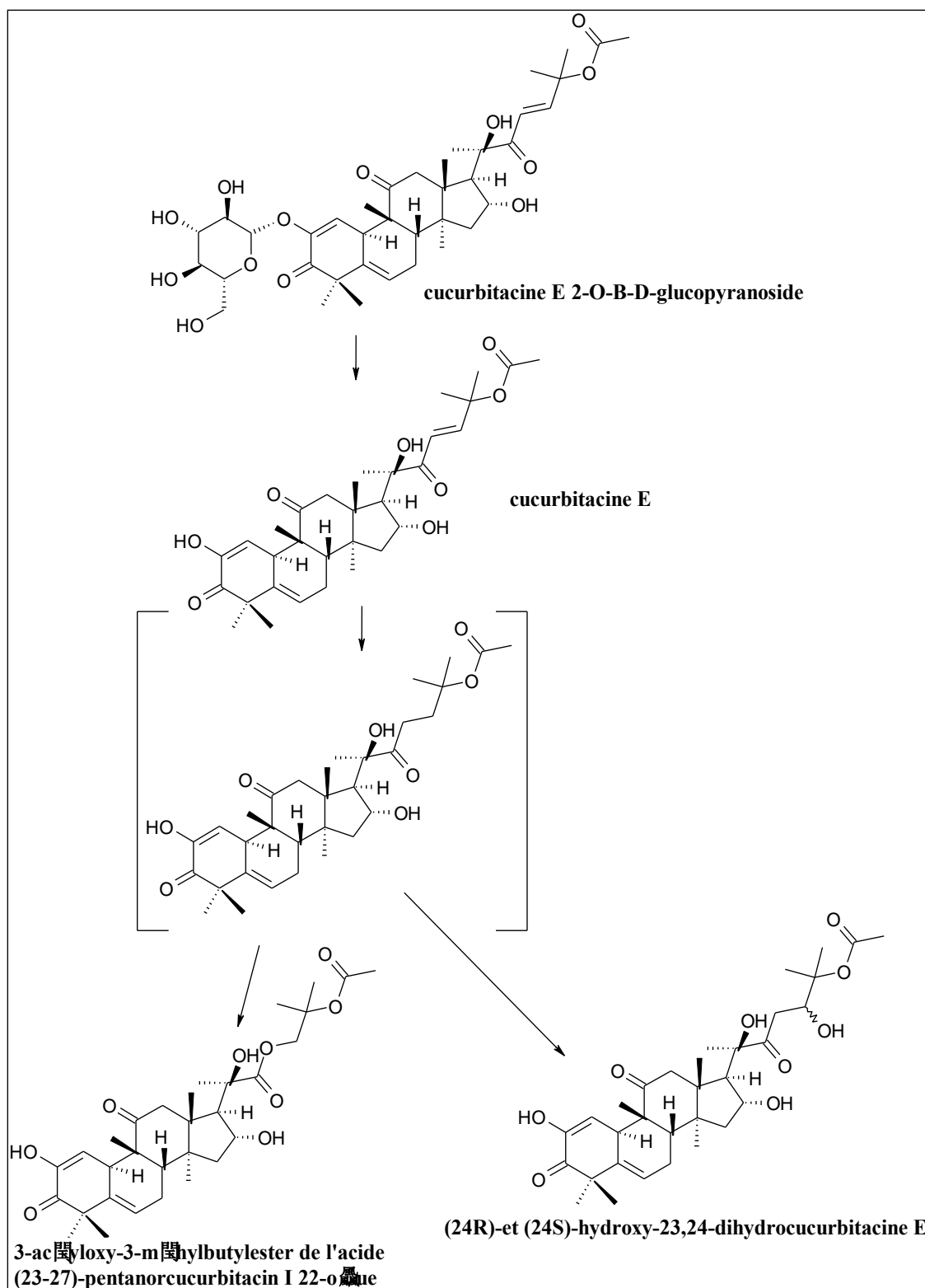


Figure 14 : Schéma représentatif de la biotransformation de la cucurbitacine E 2-O-β-D-glucopyranoside par la *Curvularia lunata* (Maatooq *et al.*, 1995).

1.2 Acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol: Généralités, structures, fonctions et biosynthèse

Durant ma thèse, nous avons choisi trois substances naturelles dont la structure est apparentée à celles des cucurbitacines afin d'étudier leur glucuronoconjugaison et de la comparer à celle des cucurbitacines. Ces substances sont l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol.

1.2.1 Généralités

L'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol sont des substances naturelles présentes dans les aliments comme l'olive et l'huile d'olive, les plantes médicinales et autres plantes. Ces substances ne sont pas toxiques même après une utilisation à long terme. Elles présentent des activités analgésiques, sédatives, hépato-protectrices, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-tumorales, hypoglycémiques, antiulcéreuses, vasorelaxantes, hypo-lipidémiques et anti-athérosclérosiques (**Liu, 1995 ; Rodríguez- Rodríguez *et al.*, 2004**).

1.2.2 Structures

L'acide oléanolique et l'acide ursolique sont des acides pentacycliques triterpénoïques et l'érythrodiol est un alcool triterpénoïque pentacyclique (**Liu, 1995 ; Rodríguez- Rodríguez *et al.*, 2004**). L'acide oléanolique et l'acide ursolique sont des isomères possédant la même masse moléculaire. Ils ne diffèrent que par la position d'un groupe méthyle au niveau de leur structure chimique (**Schneider *et al.*, 2009**). L'acide oléanolique et l'érythrodiol présentent des structures chimiques identiques. Cependant, l'érythrodiol présente un groupement alcool au lieu du groupement acide présent dans la structure de l'acide oléanolique (**Figure 15**) (**Rodríguez- Rodríguez *et al.*, 2004**).

1.2.3 Propriétés physico-chimiques

L'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol sont des composés très polaires, de faible volatilité et possèdent des masses moléculaires élevées (**Pollier and Goossens, 2012**).

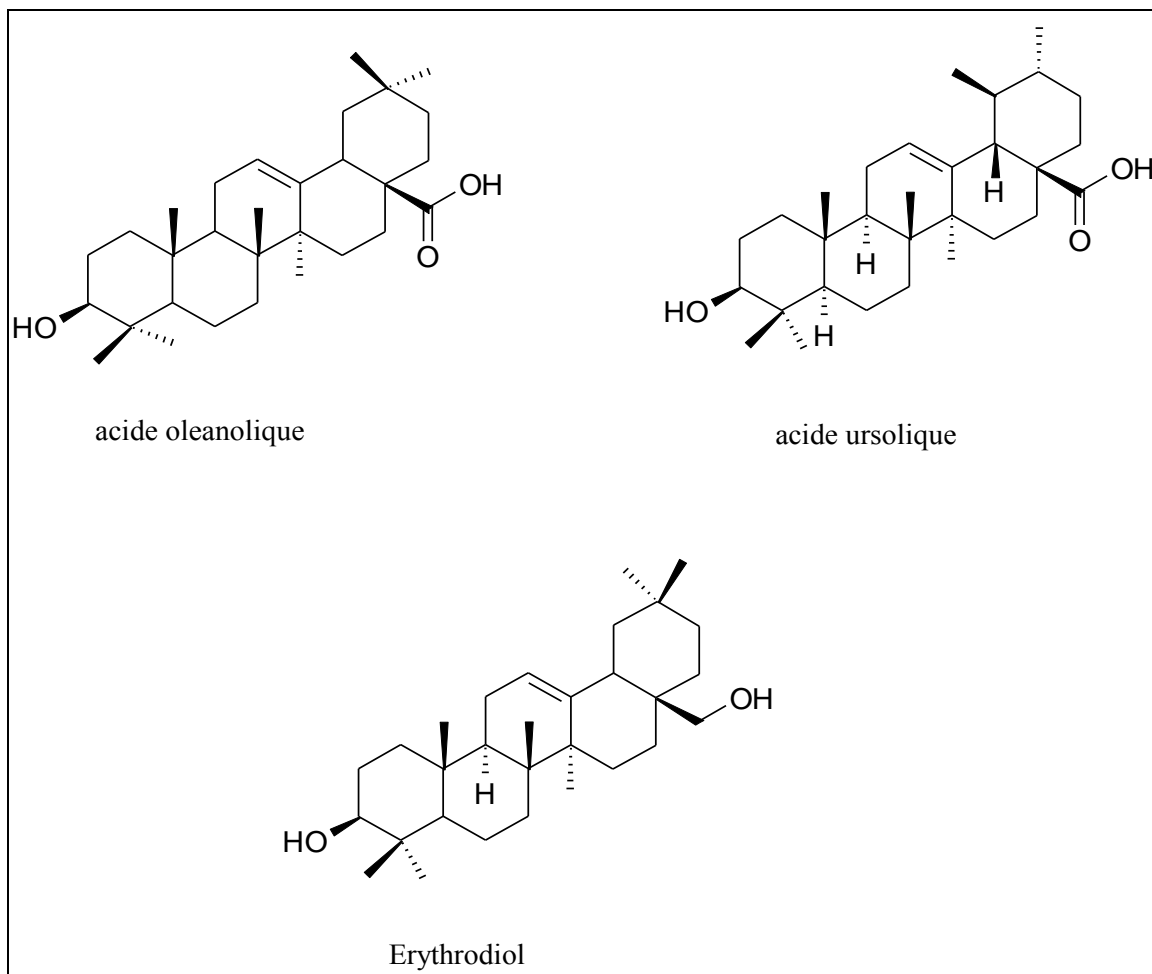


Figure 15 : Structure chimique des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol.

1.2.4 Biosynthèse

La biosynthèse des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol se produit dans les plantes médicinales ou l'olive à partir du 2,3-oxydosqualène synthétisé dans le cytosol des cellules et issu de la voie métabolique du mélavonate (**Figure 16**). Le 2,3-oxydosqualène est cyclisé par des oxydosqualène cyclases spécifiques y compris la β -amyrine synthétase donnant lieu à la formation de la β -amyrine, un produit de structure de base triterpénoïque pentacyclique de type oléanane. Ensuite, la β -amyrine est oxydée en trois étapes séquentielles au niveau C-28 par le cytochrome P450, le CYP716A12, entraînant la biosynthèse de l'acide oléanolique à partir de l'érythrodiol. Ensuite, l' α -amyrine produite, elle aussi à partir du 2,3-oxydosqualène et sous l'action de l' α -amyrine synthétase, subit trois réactions d'oxydations donnant lieu à la

biosynthèse de l'acide ursolique à partir de l'uvaol (Figure 16) (Fukushima *et al.*, 2011 ; Pollier and Goossens, 2012).

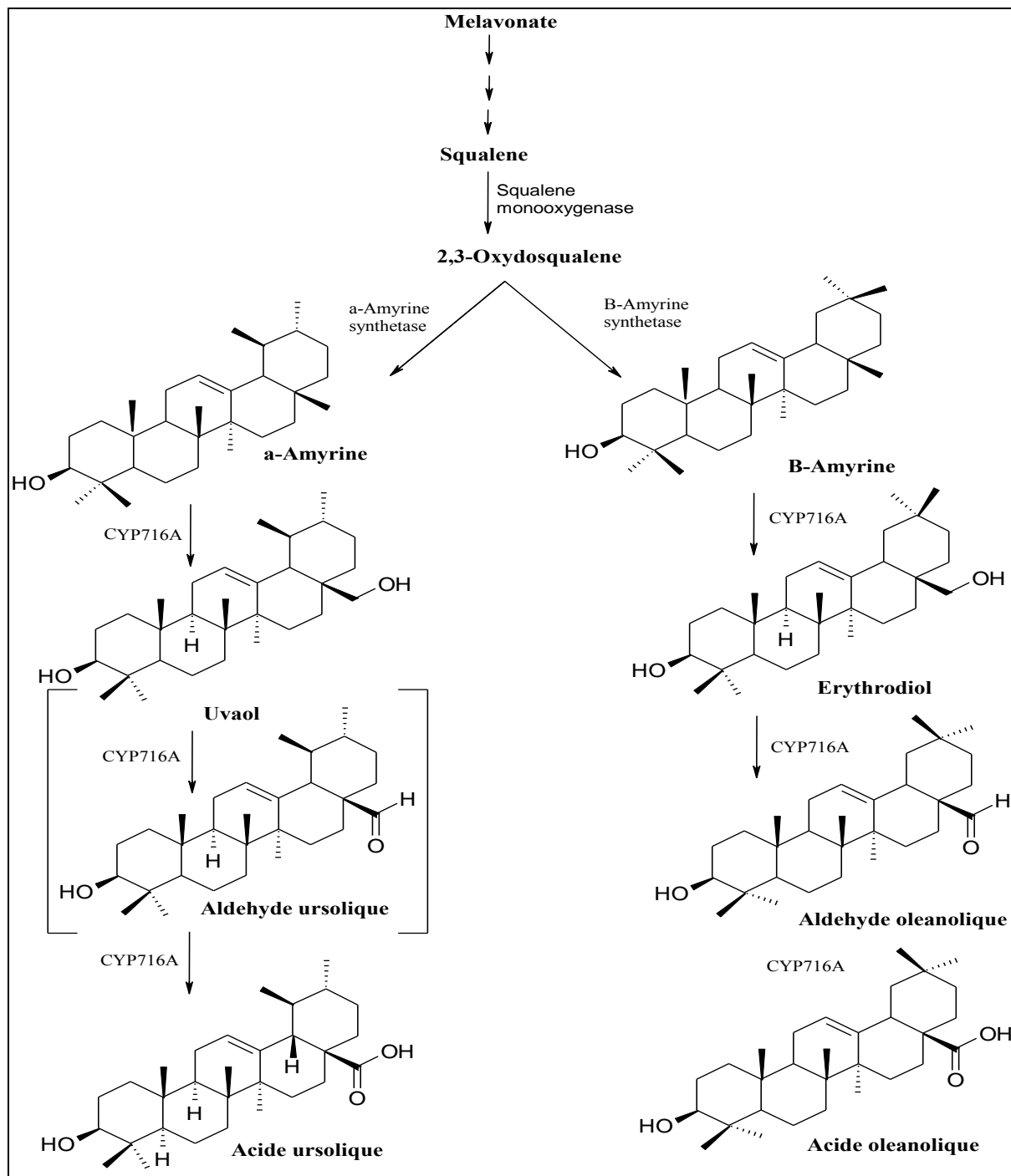


Figure 16 : Schéma représentatif de la voie de biosynthèse des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol dans les plantes.

1.2.5 Pharmacocinétique

Aucune étude n'a porté sur la biotransformation de l'acide ursolique et de l'érythrodiol chez le rat ou l'homme. Par contre une seule étude a été réalisée et a porté sur l'absorption, le métabolisme et l'excrétion de l'acide oléanolique chez le rat. Cette étude a montré que l'acide oléanolique est un composé faiblement absorbé *in vivo*. Son absorption est supposée être produite par diffusion passive. Cet acide est rapidement métabolisé en présence des microsomes hépatiques des rats et du NADPH pour donner les hydroxyl- et dihydroxyl-acide oléanolique comme métabolites. L'excrétion urinaire est très faible quelque soit l'administration par voie intraveineuse ou orale (Jeong *et al.*, 2007 ; Krüger *et al.*, 2008).

2 Substances phénoliques : acide férulique, acide caféique, parabènes, tyrosol et hydroxytyrosol

2.1 Généralités

L'acide férulique, l'acide caféique, les parabènes, le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont des composés naturels. L'acide férulique est un composé ubiquitaire se trouvant dans les parois cellulaires des plantes (Lin *et al.*, 2005 ; Mathew and Abraham, 2004). L'acide caféique se trouve dans le vin (Gülçin, 2006). Le méthylparabène se trouve dans le chicouté, le vin blanc, le vin liquoreux, le jus des fruits de passions de couleurs jaunes et la vanille Bourbon. Le propylparabène se trouve dans la plante *Stocksia brahuica*. Les autres parabènes sont préparés industriellement par estérification de l'acide *p*-hydroxybenzoïque avec l'alcool correspondant (Soni *et al.*, 2005). Le tyrosol et l'hydroxytyrosol se trouvent dans l'huile d'olive extra vierge et dans les feuilles des oliviers (Coona *et al.*, 2006 ; Ortega-Gracia and Peragón, 2010).

L'acide férulique est un puissant agent antioxydant, possédant de puissants effets bénéfiques contre le cancer, les maladies cardiovasculaires et l'arthrose (Gross, 1975 ; Indap *et al.*, 2006).

L'acide caféique est un antioxydant et présente des activités cytotoxiques contre plusieurs lignées cellulaires humaines du colon, des glandes mammaires, du col de l'utérus et des leucémies (Gomes *et al.*, 2003 ; Gross, 1975 ; Gülçin, 2006, Indap *et al.*, 2006).

Les parabènes sont utilisés comme des agents antimicrobiens dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Ce sont des composés actifs contre les bactéries Gram positives, quelques Gram négatives, les moisissures et les levures. Leur activité antimicrobienne augmente avec la longueur de la chaîne du groupement alkyl. Ils se fixent sur les récepteurs œstrogéniques et sont des œstrogénomimétiques (**Soni et al., 2005**).

Le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont de puissants agents antibactériens qui agissent contre une large gamme de bactéries Gram positives et Gram négatives (**Medina et al., 2006**). Le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont des antioxydants qui présentent plusieurs effets biologiques parmi lesquels la cardioprotection, l'anti-hypertension, l'hypoglycémie et l'anti-inflammation. Ils protègent les érythrocytes humaines contre le stress oxydatif, réduisent la production des anions super-oxydes dans les cellules promonocytaires humaines, inhibent la leucotriène B₄ et la prolifération des cellules cancérogènes en induisant leur apoptose (**Ortega-Gracia and Peragón, 2010 ; Owen et al., 2000**).

2.2 Structures

L'acide férulique, l'acide caféique, les parabènes, le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont des composés phénoliques de structure apparentée (**Figure 17**). L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) est un phénol dihydroxylé dont la structure de la chaîne latérale comprend une double liaison et une fonction acide (**Gomes et al., 2003 ; Gülçin, 2006**). L'acide férulique possède la même structure que l'acide caféique mais la fonction hydroxyle du phénol en position 2 est méthylée.

Le tyrosol est un phénol dont la chaîne latérale en position 4 est un propanol. L'hydroxytyrosol, comme son nom l'indique, possède la même structure chimique que le tyrosol et en plus un groupement hydroxyle en position 2.

L'acide *p*-hydroxybenzoïque comporte un cycle benzoïque sur lequel il y a une fonction acide en position 1 et un groupement hydroxyle en position 4. Les parabènes sont des dérivés de cet acide et diffèrent entre eux par l'alcool qui estérifie cet acide et qui peut être le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol ou le phénol (**Soni et al., 2005**).

2.3 Propriétés physico-chimiques

Les parabènes sont sous forme de poudre cristalline ou de petits cristaux incolores, inodores et sans saveur. Ils sont inertes, biodégradables et peu toxiques. Ils sont hygroscopiques et leur solubilité dans l'eau diminue avec la longueur de la chaîne du groupement alkyl. Toutefois, la résistance à l'hydrolyse dans l'eau chaude, froide ou dans les solutions acides augmente avec la longueur de cette chaîne. Ils sont stables à température ambiante et dans le milieu dont le pH est compris entre 4,5 et 7,5. Le coefficient de partition octanol/eau (K_{ow}) des parabènes augmente avec la longueur de la chaîne alkyle ainsi ceux à longues chaînes ont une tendance plus élevée à s'accumuler dans les tissus riches en lipides (Soni *et al.*, 2005).

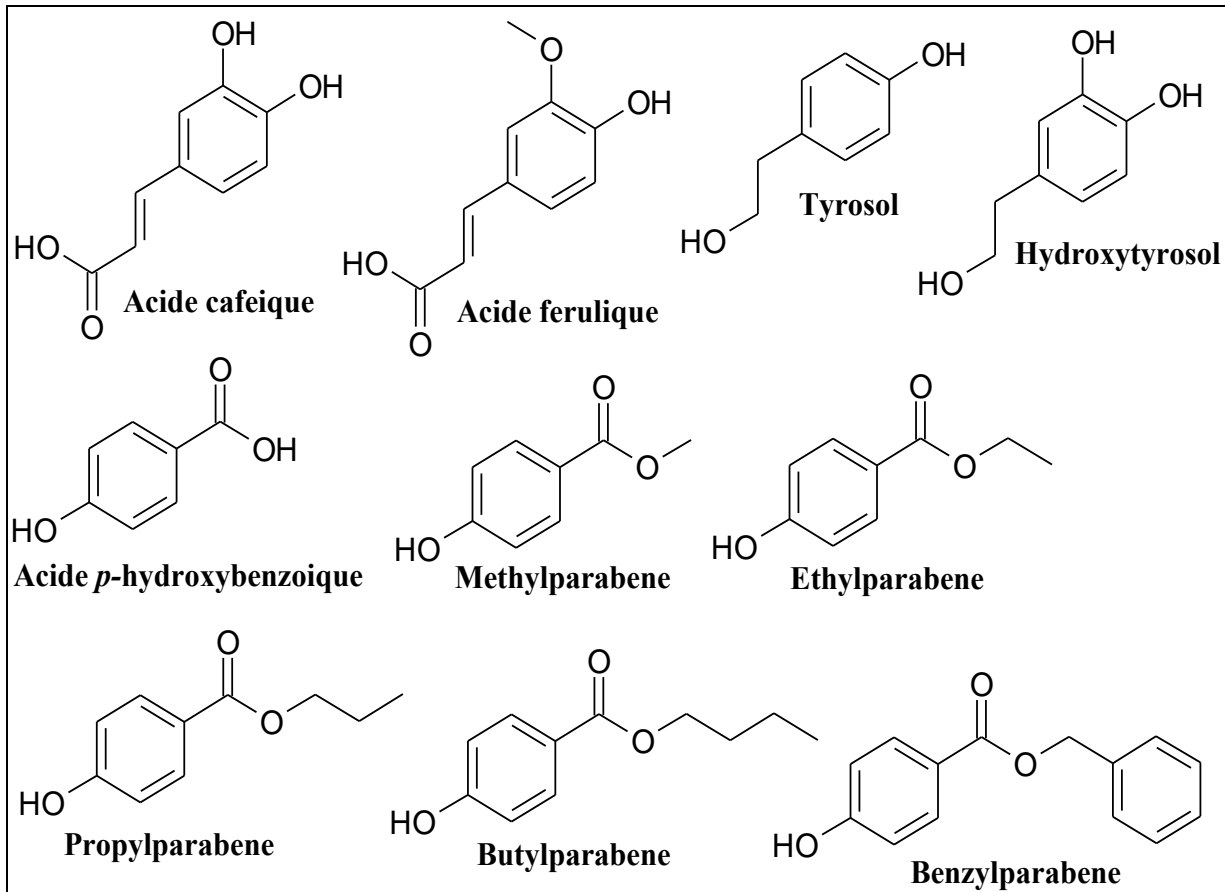


Figure 17 : Structures chimiques des acide férulique, acide caféique, acide *p*-hydroxybenzoïque, méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène, benzylparabène, tyrosol et hydroxytyrosol.

2.4 Biosynthèse

Les phénols naturels subissent deux voies de biosynthèse : la voie phénylpropanoïde à partir de la phénylalanine et la voie alcaloïde à partir de la tyramine qui contient un atome d'azote dans sa structure. La plupart des phénols sont synthétisés de l'acide *p*-coumarique qui est un dérivé de la phénylalanine (**Figure 18**) (**Chen *et al.*, 2006 ; Negishi *et al.*, 2009 ; Sircar and Mitra, 2009 ; Zhang *et al.*, 2011**).

L'acide *p*-coumarique sous l'action de l'enzyme *p*-hydroxybenzaldéhyde synthétase se transforme en *p*-hydroxybenzaldéhyde qui à son tour subit l'action de la *p*-hydroxybenzaldéhyde déshydrogénase pour donner l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**Figure 18**) (**Sircar and Mitra, 2009**).

L'acide férulique est aussi biosynthétisé à partir de l'acide *p*-coumarique. Il est formé directement à partir du coniféraldéhyde sous l'action de l'aldéhyde déshydrogénase. Le groupement méthyle est introduit dans la structure de l'acide férulique par l'enzyme caféoyl coenzyme A 3-*O*-méthyltransférase (**Figure 18**) (**Chen *et al.*, 2006 ; Negishi *et al.*, 2009**).

Le tyrosol n'est pas par contre synthétisé par la voie phénylpropanoïde mais plutôt par la voie alcaloïde. La tyrosine décarboxylase catalyse la transformation de la tyrosine en tyramine qui est le précurseur du tyrosol (**Figure 18**) (**Zhang *et al.*, 2011**).

2.5 Pharmacocinétique

L'acide férulique est rapidement absorbé, distribué et éliminé de l'organisme humain (**Qiu *et al.*, 2011**). Il subit les deux voies principales de biotransformation responsables de la détoxification des xénobiotiques de l'organisme et qui sont la glucuronoconjugaison et la sulfoconjugaison. Sa glucuronoconjugaison aboutit à la formation de deux glucuronides, l'éther *O*-glucuronide et l'ester acylglucuronide. L'UGT1A1 est la principale isoforme impliquée dans la production de ces deux métabolites suivie par l'UGT1A3. Les UGT1A6 et UGT1A8 catalysent la formation de l'éther-glucuronide tandis que les UGT1A7, UGT1A10 et UGT2B7 entraînent la formation de l'ester-glucuronide (**Li *et al.*, 2011**).

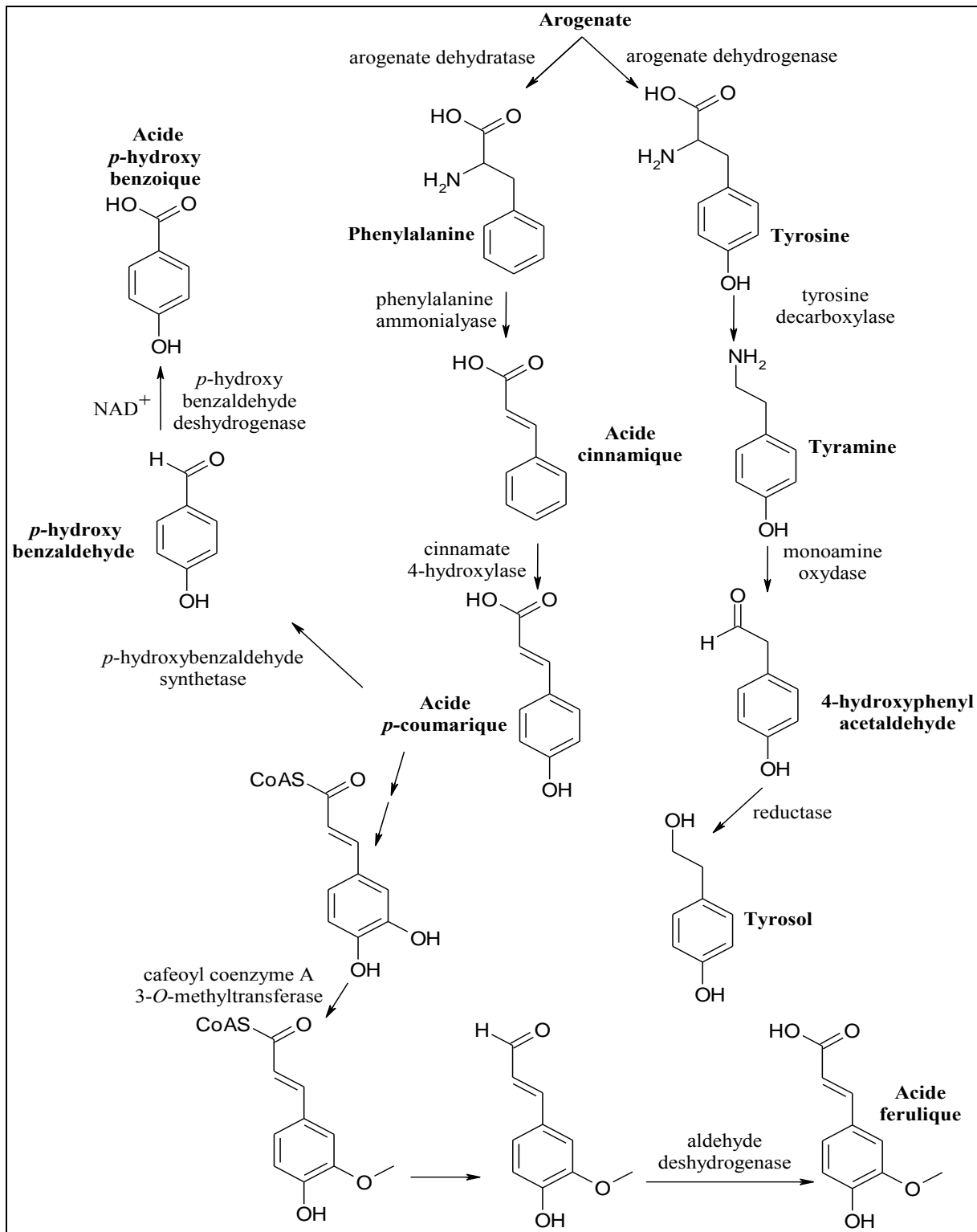


Figure 18 : Schéma représentatif de la biosynthèse des phénols naturels (tyrosol, acide *p*-hydroxybenzoïque et acide férulique) dans les plantes (Chen *et al.*, 2006 ; Negishi *et al.*, 2009 ; Sircar and Mitra, 2009 ; Zhang *et al.*, 2011).

L'acide caféique est rapidement absorbé, distribué, métabolisé et excrété chez le rat après ingestion. Il subit quatre voies métaboliques, l'isomérisation, la méthylation, la sulfoconjugaison et la glucuroconjugaison. Ces réactions permettent la production de huit métabolites qui sont les *cis*- ou *trans*-acide caféique, le 4'-*O*-glucuronide-acide caféique, le 3'-*O*-glucuronide-acide caféique, le 4'-*O*-glucuronide-acide férulique, l'acide caféique 4'-*O*-sulfate, l'acide caféique 3'-*O*-sulfate, l'acide férulique 4'-*O*-sulfate et l'acide isoférulique 3'-*O*-sulfate. Ces métabolites sont excrétés par l'urine après 1h d'ingestion et la majorité de la quantité d'acide caféique est éliminée par voie urinaire après 24h d'ingestion. L'acide caféique ne risque donc aucune accumulation dans les tissus et il est éliminé principalement par voie urinaire et à moindre mesure dans les déchets fécaux (**Omar et al., 2012**).

Les parabènes sont rapidement absorbés dans le tractus gastro-intestinal des êtres humains après leur administration par voie orale (**Golden et al., 2005 ; Jewell et al., 2007 ; Soni et al., 2005**). Leur absorption percutanée est influencée par la présence des estérases. Une absorption complète aura lieu en présence d'inhibiteur d'estérases. En absence de cet inhibiteur, la majorité de la dose du parabène pénètre sous forme d'acide *p*-hydroxybenzoïque (**Bando et al., 1997 ; Jewell et al., 2007 ; Soni et al., 2005**). Les parabènes sont activement métabolisés chez l'homme et les métabolites détectés et isolés de l'urine des hommes recevant les parabènes sont cinq : l'acide *p*-hydroxybenzoïque, le *p*-carboxyphénylesulfate (conjugaison à l'acide sulfurique), l'acide *p*-hydroxyhippurique (conjugaison à la glycine), le *p*-carboxyphényl glucuronide (éther-glucuronide) et le *p*-hydroxybenzoyl glucuronide (ester-glucuronide) (**Golden et al., 2005 ; Tsukamoto et al., 1960 ; Tsukamoto et al., 1964**). Une étude pharmacocinétique portant sur l'administration du propylparabène à un sujet volontaire a montré que 55 % de la dose administrée est excrétée sous forme de *p*-carboxyphénylesulfate, 17,4% est excrétée sous forme d'acide *p*-hydroxybenzoïque desquels 3,7 % sont glycinocconjugués et 13,7% non conjugués à la glycine et 0% excrétée sous forme de propylparabène. Les autres métabolites n'ont pas été identifiés (**Soni et al., 2005**). Les parabènes sont hydrolysés dans le plasma, les microsomes et les cytosols hépatiques humains. Les estérases sont les enzymes responsables de leur hydrolyse en acide *p*-hydroxybenzoïque. La carboxylestérase humaine (hCE1), fortement exprimée dans les microsomes hépatiques, hydrolyse les parabènes possédant une petite chaîne alcoolique tel que le méthylparabène. La carboxylestérase humaine (hCE2), fortement exprimée dans le colon, hydrolyse ceux avec une longue chaîne alcoolique tel que le butylparabène. (**Golden et al., 2005 ;**

Imai *et al.*, 2006 ; Jewell *et al.*, 2007 ; Soni *et al.*, 2005). Les parabènes sont activement sulfoconjugués par les cytosols hépatiques humains. Leur sulfoconjugaison augmente avec la longueur de la chaîne alkyle et elle est plus importante dans le cytosol hépatique que dans le cytosol cutané (Prusakiewicz *et al.*, 2007).

Le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont rapidement absorbés chez le rat. Le tyrosol subit la glucuronoconjugaison tandis que l'hydroxytyrosol subit plusieurs voies de biotransformation comme l'oxydation, la méthylation, la sulfoconjugaison, la glucuronoconjugaison et la conjugaison au glutathion (Corona *et al.*, 2006 ; Tuck *et al.*, 2002). L'hydroxytyrosol est rapidement éliminé de l'organisme dont 90% de la dose administrée est excrétée par les urines après 5h d'ingestion et 5% par les déchets fécaux (D'Angelo *et al.*, 2001).

La biotransformation des substances naturelles actives, surtout par la voie de glucuronoconjugaison, a toujours fait l'objet des études dans notre laboratoire. En fait, le resvératrol, qui est un composé naturel de structure polyphénolique (Figure 19) se trouvant dans les raisins, le vin et les cacahuètes et possédant plusieurs propriétés biologiques, a été étudié au niveau de sa glucuronoconjugaison au sein de notre laboratoire. Sa glucuronoconjugaison est évaluée par les microsomes hépatiques et intestinaux de l'homme et des différentes isoformes d'UDP-glucuronosyltransférases. Il subit activement la voie de glucuronoconjugaison par les UDP-glucuronosyltransférases des microsomes et de l'intestin de l'homme pour former les deux métabolites, 3-O- et 4'-O-glucuronides. Aucun glucuronide n'est produit en C-5. Toutefois, l'isomère *cis*-resvératrol est glucuronoconjugué plus rapidement que le *trans*-resvératrol. L'UGT1A1 permet la glucuronoconjugaison du *trans*-resvératrol, l'UGT1A6 est spécifique dans la glucuronoconjugaison du *cis*-resvératrol, les UGT1A9 et UGT1A10 permettent la glucuronoconjugaison des deux isomères et les UGT2B7 et UGT2B15 présentent une activité très faible pour le *cis*-resvératrol seulement (Aumont *et al.*, 2001 ; Sabolovic *et al.*, 2006).

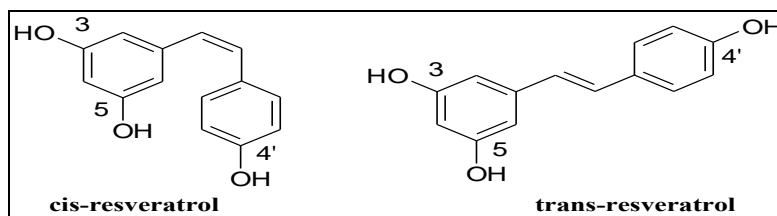


Figure 19 : Structure chimique des deux isomères *cis*- et *trans*-resvératrol.

3 Pathologies articulaires : place des chondrosarcomes

Le cartilage articulaire normal est un cartilage hyalin formant la limite des cavités articulaires. Il s'agit d'un tissu conjonctif qui recouvre les deux extrémités épiphysaires des os. Ce tissu est non vascularisé et non innervé. Sa nutrition se fait à partir du liquide synovial tandis que celle des couches les plus profondes du cartilage se fait grâce à des échanges avec l'os sous-chondral. Il permet le bon glissement entre les surfaces osseuses articulaires. C'est un tissu résistant et élastique qui permet l'amortissement des chocs et qui absorbe les pressions auxquelles il est soumis. Son élasticité revient à l'hydrophilie des protéoglycanes chargés négativement qui captent les ions Ca^{++} et Na^{++} qui, eux-mêmes attirent les molécules d'eau ; alors que sa rigidité revient au réseau des fibres de collagènes de type II. Il joue également, avec le fin film du liquide synovial qui couvre sa surface, un rôle important dans la lubrification de l'articulation **(Chevalier and Richette, 2005)**.

De point de vue anatomique, le cartilage articulaire est formé de quatre couches **(Figure 20)**:

- Une couche superficielle très dense en chondrocytes où ces derniers sont petits et plats. Les fibres de collagènes sont disposées parallèlement à la surface ce qui permet à cette zone de résister aux forces de tension. Cette couche est riche en fibronectine et pauvre en protéoglycanes.
- Une couche intermédiaire ou moyenne où les chondrocytes sont gros et sphériques et les fibres de collagènes n'ont pas une orientation particulière.
- Une couche profonde où les chondrocytes sont en colonne et les fibres de collagènes sont perpendiculaires à la surface. Cette couche est riche en protéoglycanes.
- Une couche calcifiée repose directement sur l'os et est en contact avec la lame osseuse sous chondrale. Elle est composée des fibres de collagène à orientation radiaire. Elle est pauvre en protéoglycanes et riche en calcium. Cette couche est séparée de la couche profonde par une ligne de démarcation basophile et ondulée (tide-mark) qui empêche l'entrée des vaisseaux présents dans l'os sous-chondral mais qui laisse passer certains constituants **(Chevalier and Richette, 2005)**.

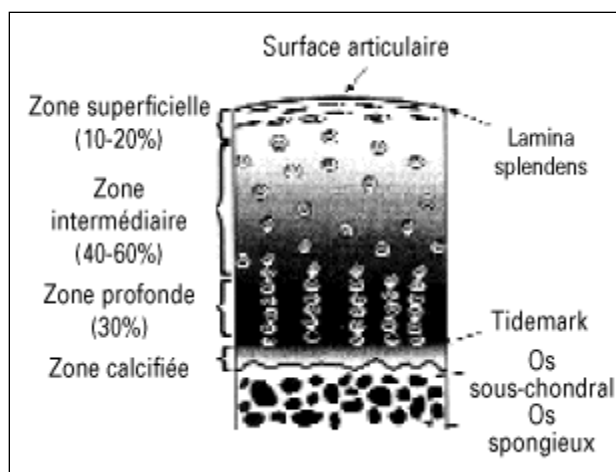


Figure 20 : Schéma d'un cartilage articulaire montrant les 4 couches : la couche superficielle (chondrocytes de forme allongée), la couche moyenne (distribution aléatoire des chondrocytes), la couche profonde (disposition en colonnette des chondrocytes), la ligne de démarcation (*tide mark*) et la couche calcifiée.

De point de vue physiologique, ce tissu est formé par un seul type de cellules arrondies, les chondrocytes, enfermées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en collagène de type II et en protéoglycanes (**Chevalier and Richette, 2005**).

Les chondrocytes sont des cellules d'origine mésenchymateuse enfermées dans des logettes appelées chondroplastes. Elles sont de forme sphérique ou ovoïdale, de 30 à 40 μm de diamètre. Dans les conditions physiologiques, ces cellules sont responsables de la totalité du métabolisme du cartilage et ont pour rôle de maintenir l'homéostasie, un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines matricielles (ex. collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines de structure), des protéases (ex. métalloprotéases, agrécanases) et des inhibiteurs de protéases (inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases). Plusieurs facteurs parmi lesquels les contraintes mécaniques et les facteurs de croissance tel que TGF β (*transforming growth factor*), FGF β (*fibroblast growth factor*) et IGF (*insulin-like growth factor*) entrent en jeu afin d'assurer cette homéostasie (**Chevalier and Richette, 2005 ; McInnes and Schett, 2011**).

Le cartilage articulaire est le siège de plusieurs pathologies inflammatoires ou tumorales. Les pathologies inflammatoires des articulations sont regroupées sous le nom d'« arthrite ». Les formes les plus fréquentes sont l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde qui est apparentée à l'arthrose mais qui affecte le corps entier, en plus des articulations. Ces deux pathologies inflammatoires sont dégénératives et elles affectent non seulement le cartilage articulaire mais

aussi l'os sous-chondral, les ligaments, la membrane synoviale et les muscles périarticulaires **(Martel-Pelletier *et al.*, 1999)**. Elles entraînent une perte des protéines de la matrice extracellulaire cartilagineuse suite à la libération des cytokines inflammatoires durant les stades tardives de la maladie induisant progressivement l'expression des enzymes protéolytiques (métalloprotéases MMPs) responsables de la dégradation du cartilage. Elles entraînent donc une détérioration des propriétés fonctionnelles et structurales du cartilage et ceci par le déséquilibre qu'elles engendrent sur la régulation entre la synthèse et la dégradation du cartilage articulaire, de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral **(Fernandes *et al.*, 2002 ; Goldring, 2000 ; Goldring and Goldring, 2004 ; Venkatesan *et al.*, 2009)**.

Le cartilage articulaire peut aussi être atteint par des pathologies tumorales malignes ou bénignes, le chondrosarcome et le chondrome, respectivement. Les chondromes et les chondrosarcomes constituent un groupe hétérogène de tumeurs, et du point de vue histologique, sont divisés en plusieurs sous-groupes.

Les chondromes sont des tumeurs cartilagineuses bénignes qui se présentent soit en chondrome solitaire, soit en chondromatose multiple. Dans le cas de multiples chondromes, environ 50% de ces tumeurs peuvent se transformer en tumeurs malignes, chondrosarcomes **(Krauspe, 1995)**. Les chondromes sont des tumeurs non vascularisées, généralement caractérisées par une diminution de la quantité des chondrocytes et touchent les os longs ou les os courts des mains et des pieds. Le chondrome regroupe plusieurs types de tumeurs : l'enchondrome, le chondrome périosté, l'enchondromatose et le chondroblastome. Ces tumeurs sont identiques du point de vue histologique mais différent par leurs sites et leurs manifestations cliniques. Ils sont traités par chirurgie uniquement **(Krauspe, 1995 ; Semenova and Bulycheva, 2007)**.

Le chondrosarcome est une tumeur osseuse maligne primitive qui se développe à partir des cellules du cartilage et qui présente 20 – 27% des tumeurs osseuses malignes. Elle touche plutôt les bras, les jambes et le bassin qui possèdent les cartilages aux os les plus volumineux comme le fémur, l'humérus et le pelvis **(Herget *et al.*, 2011 ; Murphey *et al.*, 2003)**.

Les tumeurs chondrogéniques synthétisent des quantités variables de matrice extracellulaire ressemblant à du cartilage dans les deux phénotypes bénins et malins **(Aigner, 2002)**. L'analyse protéomique effectuée par notre laboratoire montre une accumulation différentielle des

propeptides C-terminaux des procollagènes I et II dans les tumeurs malignes et bénignes, respectivement. Ces deux propeptides C-terminaux pourraient participer à la régulation de la progression tumorale, l'angiogenèse et les métastases dans les néoplasmes chondrogéniques. En fait, le propeptide C-terminal du procollagène I est relié à la vascularisation tumorale tandis que le propeptide C-terminal du procollagène II est immobilisé dans la matrice extracellulaire. Seul le propeptide C-terminal du procollagène I soluble induit la migration des cellules endothéliales favorisant par la suite l'angiogenèse et la progression tumorale. Il augmente également l'expression du VEGF et du CXCR4 dans les chondrocytes (**Vincourt *et al.*, 2010**). Le VEGF joue un rôle important dans l'angiogenèse et est en corrélation avec le grade du chondrosarcome (**Kalinski *et al.*, 2009**) tandis que le CXCR4 contribue aux métastases locales et à distance et à l'angiogenèse (**Burger and Kipps, 2006**). Le propeptide C-terminal du procollagène II immobilisé induit l'apoptose des chondrocytes primaires et des cellules endothéliales et exerce donc un effet anti-tumoral et anti-angiogénique. Par contre, quand il est sous forme soluble il augmente le VEGF et induit de façon plus intense l'expression de CXCR4 et de MMP-13 favorisant par la suite la progression tumorale et les métastases (**Vincourt *et al.*, 2010**). L'analyse protéomique révèle aussi l'augmentation spécifique du régulateur du phénotype cartilage, le matrilin-3, dont une fraction importante de cette protéine est localisée dans le cytoplasme des cellules tumorales des enchondromes et des chondrosarcomes conventionnels. Cette fraction correspond à un polypeptide matrilin-3 non parfaitement mûré bloqué dans le compartiment cytosolique et entraînant l'augmentation de l'expression du facteur de transcription chondrogénique, le *SOX9* (**Vincourt *et al.*, 2008**).

Dans mon sujet de thèse, nous nous sommes intéressés à la lignée cellulaire SW 1353 qui provient d'un chondrosarcome primaire de grade II de l'humérus droit d'une femme caucasienne de 72 ans. SW 1353 est caractérisée par une réduction du taux d'expression des gènes anaboliques des chondrocytes, par exemple, les constituants de la matrice extracellulaire du cartilage à l'exception du collagène de type VI et de la fibronectine. Elle est aussi caractérisée par une diminution partielle du taux d'expression des ARNm des enzymes qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire comme les MMPs (**Gebauer *et al.*, 2005**).

Chapitre 2 : Objectifs et stratégies expérimentaux

Chapitre 2 : Objectifs et stratégies expérimentales

Deux séries de substances font l'objet de ce mémoire :

- trois cucurbitacines (I, D et E) qui sont des composés triterpéniques polyhydroxylés cycliques d'origine végétale extraits principalement du jus de fruit de l'*Ecballium elaterium*, une plante herbacée vivace de la famille des Cucurbitacées (**Greige-Gerges et al., 2007**).
- des parabènes qui sont des esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque largement utilisés comme des agents antimicrobiens dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (**Soni et al., 2005**). Ce sont des molécules phénoliques beaucoup plus simples que les cucurbitacines qui possèdent en para un groupement méthyle, éthyle, propyle, butyle ou benzyle.

Le but du projet est double :

- 1- Etudier les voies de biotransformation de ces substances *in vitro* chez l'homme et caractériser les enzymes de métabolisme impliquées.
- 2- Mettre en évidence les propriétés cytotoxiques et pro-apoptotiques des cucurbitacines sur une lignée de cellules cancéreuses de chondrosarcome humain (SW 1353).

Pour atteindre ces objectifs :

- La biotransformation des cucurbitacines et des parabènes sera étudiée *in vitro* en considérant principalement les voies enzymatiques de phases I et II (hydroxylation, déshydrogénation, hydrolyse, glucuronoconjugaison, acétylation, glucosylation et sulfoconjugaison). Les réactions impliquées ainsi que les enzymes les catalysant seront déterminées, identifiées et caractérisées en termes cinétiques. Des substances d'origine naturelles de structure chimique apparentée aux cucurbitacines (érythrodiol, acide oléanolique, acide ursolique) et aux parabènes (acide caféique, tyrosol, hydroxytyrosol, acide férulique) seront utilisées à titre de comparaison.
- La cytotoxicité et l'action apoptotique des cucurbitacines sur la lignée SW1353 seront étudiées en appliquant l'essai MTT et la méthode TUNEL, respectivement. L'essai MTT est un essai

colorimétrique qui permet de mesurer l'absorbance du formazan, un produit de couleur violette, produit à partir de l'MTT sous l'action des enzymes actives présentes dans les cellules. La méthode TUNEL se base, quant à elle, sur la détection des coupures au niveau de l'ADN qui est un indice marquant de l'apoptose.

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Produits

3.1.1 Produits chimiques et substrats des enzymes étudiées

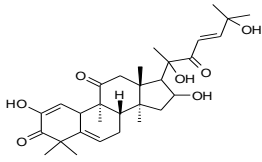
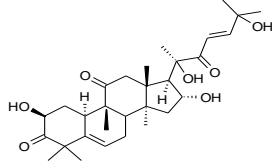
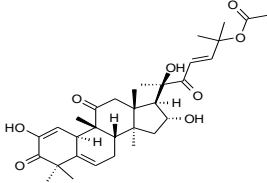
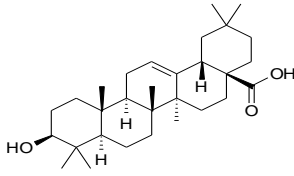
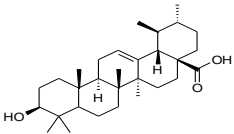
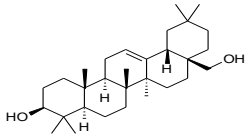
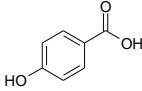
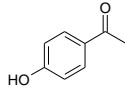
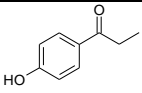
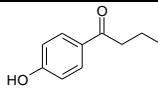
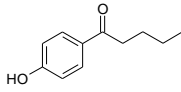
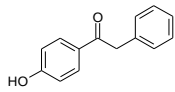
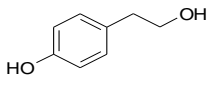
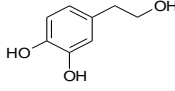
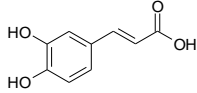
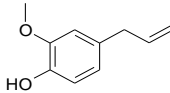
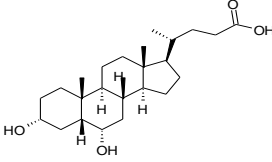
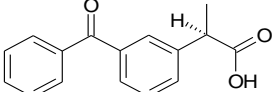
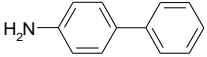

Les cucurbitacines E, D et I, le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont fournis par Extrasynthèse (Genay, France). L'acide *p*-hydroxybenzoïque (98%), les méthyl- et propyl- parabènes (99%) sont fournis par HiMedia (Mumbai, Inde). L'éthyl-, le butyl- et le benzyl- parabènes (99%) sont fournis par Fluka Biochemika, distribué par Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Le mélange de glycosyl-cucurbitacines est obtenu par extraction du jus de la plante *Ecballium elaterium* (Greige-Gerges *et al.*, 2007).

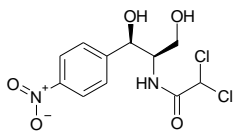
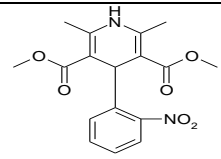
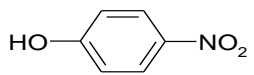
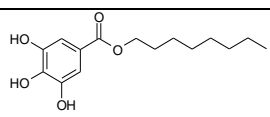
L'acide UDP-[U-¹⁴C]-glucuronique (activité spécifique 285 mCi/mmol), le [³⁵S]3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (0.289 Ci/mmol) et le UDP-[U-¹⁴C]-glucose (293 mCi/mmol) sont fournis par Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). L'acide UDP-glucuronique non radiomarqués est fourni par Sigma.

L'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'érythrodiol, l'acide caféique, le NADPH, le NAD⁺, le DTNB, la nifédipine, le 1-naphtol, le chloramphénicol, le 4-nitrophénol, le 4-aminobiphényle, l'eugénol, le (RS) kétoprofène, l'acide hyodéoxycholique, l'octylgallate, le dithiothréitol (DTT), l'acide acétique, l'ammoniaque 28 % (v/v), le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'éthanol, l'acétonitrile, la cytochalasine D, l'ITS Liquid Media Supplement Sterile-filtered (contenant un mélange d'insuline, de transferrine humaines recombinantes et de sélénite de sodium) et le thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) sont fournis par Sigma (Saint Louis, MO). Le **tableau 2** indique la structure chimique des composés utilisés.

Le *n*-butanol est fourni par Prolabo (Strasbourg, France). L'acétone, l'acide trifluoroacétique et le chloroforme sont fournis par Carlo Erba (Val de Reuil, France). Le méthanol est fourni par VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

Tableau 2 : Structure chimique des substances naturelles utilisées durant la thèse et des substrats marqueurs des enzymes utilisées pour tester le métabolisme de ces substances.

Substrat	Structure	Substrat	Structure
Cucurbitacine I		Cucurbitacine D	
Cucurbitacine E		Acide oléanolique	
Acide ursolique		Erythrodiol	
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque		Méthylparabène	
Ethylparabène		Propylparabène	
Butylparabène		Benzylparabène	
Tyrosol		Hydroxytyrosol	
Acide caféique		Eugénol	
Acide hyodéoxycholique		Kétoprofène	
4-Aminobiphényle		1-Naphtol	

Chloramphénicol		Nifédipine	
4-Nitrophénol		Octylgallate	

Le Tris-HCl et l'albumine bovine sérique (BSA) sont fournis par Euromedex (Souffelweyersheim, France). Le pyrophosphate de sodium et le MgCl₂ sont fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne). La trousse essai TUNEL, le DMEM/F12, la L-glutamine et les streptomycine/pénicilline sont des produits d'Invitrogen fournis par Fisher Scientific (Cergy-Pontoise Cédex, France).

3.1.2 Sources enzymatiques

Les microsomes hépatiques humains (MIC259299) et les fractions cytosoliques du foie humain (CYT259013) sont fournis par Biopredic (Rennes, France). Les microsomes hépatiques humains proviennent d'un mélange de 26 foies (20 hommes et 6 femmes) dont la concentration des protéines microsomales est de 25 mg/mL. Les cytosols hépatiques humains proviennent d'un mélange de 3 foies de deux hommes et une femme (47 ; 64 et 80 ans) dont la concentration en protéines est de 21 mg/mL.

Les microsomes hépatiques du rat (Sprague-Dawley) (Lot 30502) sont fournis par BD Biosciences (Woburn, MA). Ils proviennent d'un mélange d'environ 145 foies de rats dont les âges varient entre 8 à 10 semaines et dont la concentration des protéines microsomales est de 20 mg/mL.

Les UGT humaines recombinantes des familles 1A et 2B, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17, obtenues après expression dans des Supersomes® en infectant des cellules d'insecte

(BTI-TN-5B1-4) par un baculovirus recombinant, sont fournies par BD Gentest (Le Pont de Claix, France).

Les plasmas du rat sont obtenus à partir de rats du type Sprague-Dawley et de poids moyen de 270 g. Les plasmas humains sont obtenus de patients de l'hôpital de CHU-Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy.

3.1.3 Culture cellulaire

La lignée cellulaire SW1353 du chondrosarcome humain est fournie par ATCC (Molsheim, France). Elle est obtenue à partir d'un chondrosarcome primaire grade II de l'humérus droit d'une femme caucasienne âgée de 72 ans. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 contenant 10% du sérum de veau fœtal (SVF), pénicilline, streptomycine, L-glutamine et l'antibiotique plasmocin prophylactiqueTM (250 µg/mL). Le SVF est substitué par l'ITS au moins 24h avant le traitement par les cucurbitacines.

3.2 Métabolisme des substances naturelles *in vitro* chez l'homme et le rat

3.2.1 Spectre d'absorption des cucurbitacines I, D et E

Afin de déterminer les longueurs d'onde auxquelles les cucurbitacines I, D et E absorbent de façon maximale, le spectre d'absorption en UV-Vis de ces substances (1 mM) dissous dans du DMSO a été analysé par un détecteur photodiode array WatersTM 996 couplé à un HPLC Waters 2695 (Milford, MA). L'HPLC est équipé d'une colonne C18 XBridgeTM (5 µm, 4,6 mm x 150 mm; Milford, MA). Une élution isocratique est effectuée avec la phase mobile constituée de 0,05% (v/v) d'acide formique dans l'eau et de l'acétonitrile (65:35 v/v) à un flux de 1 mL/min.

3.2.2 Réactions de phase I

3.2.2.1 Hydroxylation des cucurbitacines I, D et E

La méthode expérimentale utilisée afin d'étudier l'hydroxylation des cucurbitacines est une méthode spectrophotométrique qui vise à suivre l'oxydation du NADPH en NADP^+ au cours du temps tout en mesurant l'absorbance du NADPH à la longueur d'onde de 340 nm (**Rover *et al.*, 1998**). En effet, la forme oxydée de NADP^+ et les cucurbitacines n'absorbent pas la lumière à cette longueur d'onde (**De Ruyck *et al.*, 2007 ; Martin and Blackburn, 2003**). Pour ce faire :

- Dans un volume final de 250 μl , introduire :

- 20 μg de protéines de microsomes hépatiques humains
- 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl_2
- 200 μM NADPH
- 100 μM substrat* dissous dans de l'acétonitrile

*Substrat : Nifédipine (utilisé comme substrat marqueur des cytochromes P450 des microsomes hépatiques humains), Cucurbitacine E, Cucurbitacine D et Cucurbitacine I.

Chaque essai est répété trois fois. Un blanc a été réalisé en présence d'acétonitrile.

- Incuber à 37°C pendant 30 min dans la cuve thermostatée du spectrophotomètre (Thermo Scientific* Varioskan Flash Multimode Reader).

- Suivre la diminution de l'absorbance du NADPH suite à son oxydation en NADP^+ au cours du temps.

- Calculer les équations des droites : absorbance du NADPH = $f(t)$ (temps).

Ensuite, la concentration du NADPH oxydé au cours du temps en NADP^+ est calculée suivant l'équation de Beer-Lambert : $\Delta A = \epsilon * l * c$.

avec:

ΔA = différence d'absorbance du NADPH à 340 nm entre 2 temps de mesure

ϵ = coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm de l'ordre de 6220 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (**Swetha *et al.*, 2007**)

l = longueur du trajet optique qui est de l'ordre de 1 cm

c = concentration molaire du NADPH

Le nombre de mole du NADPH dans le milieu est ensuite déduit de la concentration et l'activité enzymatique des cytochromes P450 est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\text{nombre de mole de NADPH transformé dans le milieu}}{\text{quantité de protéines en mg} \times \text{temps d'incubation en min}}$$

Une analyse par spectrométrie de masse est réalisée par la suite afin d'identifier le métabolite hydroxylé de la cucurbitacine I par les microsomes hépatiques humains. Pour ce faire :

- Dans un volume final de 100 μ l, introduire :

- 100 μ g de protéines de microsomes hépatiques humains
- 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4) ; 9,4 mM MgCl_2
- 2 mM NADPH
- 1 mM cucurbitacine I dans acétonitrile (dont le volume d'acétonitrile dans le milieu est à 0,5%)

L'essai est répété deux fois. Un blanc a été réalisé en substituant le NADPH par du tampon Tris-HCl (pH 7,4).

- Incuber 1h à 37°C et arrêter dans la glace en ajoutant 100 μ L de méthanol.

- Centrifuger les tubes à 3 000 xg pendant 10 min.

- Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes pour les analyser.

Les échantillons ont été dilués 200 fois dans du méthanol puis analysés par couplage HPLC-Q-ToF ou en introduction directe par spectrométrie de masse dans le Service Central d'Analyse du CNRS à Solaize, France.

Le couplage HPLC-Q-ToF a été réalisé en utilisant la chaîne de chromatographie liquide : Ultimate 3000 Dionex®. Deux colonnes ont été testées pour cette analyse : Eclipse XDB C18 (100 x 2,1 mm ; 3,5 μ m) et Sphinx C18RP (50 x 2 mm ; 1,8 μ m) avec un débit de 0,5 mL/min pour la première colonne et de 0,3 mL/min pour la deuxième. La température de four étant de 40°C avec un volume d'injection de 5 μ L et une longueur d'onde de détection de 237 nm. La phase mobile a été constituée des solvants A = eau et B = acétonitrile. L'élution a été réalisée en suivant un gradient d'élution (**Tableau 3**). Le spectre de masse a été alimenté avec une source d'ionisation Electrospray : microToFQII, Bruker Daltonics ®, mode d'ionisation négatif.

Tableau 3 : Gradient d'élution de la phase mobile utilisée pour l'analyse de l'hydroxylation de la Cucurbitacine I par LC/MS.

Temps (min)	%A	%B
0,0	95	5
15,0	0	100
22,0	0	100
22,1	95	5
27,0	95	5

3.2.2.2 Déshydrogénation des cucurbitacines I, D et E

La méthode expérimentale utilisée afin d'étudier l'activité de l'alcool déshydrogénase *vis-à-vis* des cucurbitacines est une méthode spectrophotométrique qui vise à suivre la formation du NADH au cours du temps tout en mesurant son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm (**De Ruyck et al., 2007**). NAD⁺ et les cucurbitacines n'absorbent pas la lumière à cette longueur d'onde. Pour ce faire

- Introduire dans un volume final de 250 µl :

- 20 µg de protéines de cytosols hépatiques humains
- 100 mM tampon sodium pyrophosphate (pH 8,8)
- 1 mM β-NAD⁺
- 1 mM substrat* / 3,2% (v/v) éthanol dissous dans l'acétonitrile

*substrat : Ethanol (substrat marqueur pour l'alcool déshydrogénase des cytosols hépatiques humains), Cucurbitacine E, Cucurbitacine D et Cucurbitacine I.

Chaque essai est répété 3 fois. Un blanc a été réalisé en présence d'acétonitrile.

- Incuber à 25°C pendant 30 min dans la cuve thermostatée du spectrophotomètre (Thermo Scientific * Varioskan Flash Multimode Reader).

- Suivre l'augmentation de l'absorbance du β-NADH à 340 nm au cours du temps.

- Calculer les équations des droites : absorbance du NADPH = f(temps) et les concentrations du NADPH formé au cours du temps selon l'équation de Beer-Lambert : $\Delta A = \varepsilon * l * c$.

3.2.2.3 Hydrolyse de la cucurbitacine E et des parabènes

3.2.2.3.1 Déacétylation de la cucurbitacine E in vitro dans les microsomes/cytosols hépatiques et le plasma de l'homme et du rat

- Droites d'étalonnages pour l'hydrolyse de la cucurbitacine E par les microsomes et les cytosols hépatiques humains et par les microsomes hépatiques du rat.

Avant d'évaluer la déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes et les cytosols hépatiques humains et par les microsomes hépatiques du rat, deux droites d'étalonnages une pour la cucurbitacine I (0,0005 ; 0,002 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,08 et 0,16 mM) et une autre pour la cucurbitacine E (0,002 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,08 ; 0,16 et 0,32 mM) ont été tracées et les équations de ces droites ont été calculées. Chaque point de ces gammes étalon a été répété 3 fois et pour chaque solution fille, 50 µL acétonitrile/méthanol/acide acétique (49,6/49,6/0,8 v/v) ont été ajoutés contenant 12,6 µM de 4-hydroxybenzophénone, utilisé comme standard interne pour toutes ces expériences. Les tubes ont été centrifugés à 8 000 xg pendant 10 min et ensuite injectées par HPLC en utilisant la phase mobile composée de 0,2% acide acétique dans l'eau/acétonitrile (60/40 v/v) (**voir paragraphe ci-dessous**). Les droites d'étalonnages ont été tracées en présentant le rapport aire cucurbitacine I ou E / aire 4-hydroxybenzophénone en fonction de la concentration de la cucurbitacine I ou E.

- Déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes ou les cytosols hépatiques humains

La déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes ou les cytosols hépatiques humains a été effectuée en testant la linéarité de la réaction en fonction du temps et de la concentration.

Afin de tester cette voie métabolique, incuber dans un volume final de 300 µL :

- 0,54 mM cucurbitacine E
- 100 µg de protéines de microsomes ou de cytosols hépatiques humains
- 100 mM du tampon Tris-HCl (pH 7,4) ; 10 mM MgCl₂.

Chaque essai est répété 3 fois.

- Incuber à 37°C et prélever 50 µL après 0 ; 1 ; 4 ; 8 ; 12 et 24h.
- Arrêter les réactions avec 50 µL acétonitrile/méthanol/acide acétique (49,6/49,6/0,8 v/v) contenant 12,6 µM de 4-hydroxybenzophénone.
- Centrifuger à 8 000 xg pendant 10 min.
- Injecter 40 µL du surnageant pour analyser par HPLC.

La phase mobile composée de 0,2% acide acétique dans l'eau/acétonitrile (60/40 v/v) a été utilisée en élution isocratique avec un débit de 1 mL/min. La détection des composés a été effectuée avec le détecteur Waters UV-Vis à la longueur d'onde 237 nm.

La même expérience a été répétée en évaluant la déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques humains et en présence du tampon Tris-HCl seul pendant la première heure d'incubation. Le volume total d'incubation est de 300 µL et des prélèvements de 40 µL ont été effectués après 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 et 60 min. Les réactions ont été arrêtées avec 40 µL acétonitrile/méthanol/acide acétique (49,6/49,6/0,8 v/v) contenant 12,6 µM de 4-hydroxybenzophénone, les tubes centrifugés à 8 000 xg pendant 10 min et 40 µL du surnageant ont été analysés par HPLC comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

- Déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques de rat

La déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques de rat Sprague-Dawley a été effectuée en testant la linéarité de la réaction en fonction du temps.

Dans un volume final de 40 µL, incuber :

- 0,5 mM de cucurbitacine E
- 280 µg de protéines de microsomes hépatiques de rats
- 100 mM du tampon Tris-HCl pH 7,4 ; 10 mM MgCl₂.

Chaque essai est répété 3 fois.

- Incuber à 37°C et arrêter la réaction après 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 et 60 min en procédant comme avec les microsomes hépatiques humains.

- Déacétylation de la cucurbitacine E par les plasmas de l'homme et du rat

La déacétylation de la cucurbitacine E a été aussi étudiée dans les plasmas de l'homme et du rat en incubant à 37°C pendant une heure, 0,54 mM de la cucurbitacine E en présence de 620 µg de protéines de plasma du rat ou 787 µg de protéines de plasma humain et 10 mM MgCl₂ et 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4) dans un volume final de 30 µL. Chaque essai est répété trois fois.

- Arrêter les réactions avec 90µL d'acétonitrile contenant 12,6 µM de 4-hydroxybenzophénone.
- Analyser par HPLC en suivant le même protocole décrit dans la déacétylation de la cucurbitacine E avec les microsomes ou cytosols hépatiques humains mais en centrifugeant à 10 000 xg pendant 1 min.

3.2.2.3.2 Hydrolyse des parabènes par les microsomes hépatiques humains

L'hydrolyse des parabènes par les carboxylestérases des microsomes hépatiques humains a été étudiée en incubant les méthyl-, éthyl-, propyl-, butyl- et benzyl-parabènes (164 µM) dissous dans du DMSO en présence de 100 µg de protéines de microsomes hépatiques humains et de 100 mM du tampon Tris-HCl (pH 7,4) à 37°C.

- Prélever 100 µL du milieu après 0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 et 60 min.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µL d'acétonitrile/méthanol/acide trifluoroacétique (49,6/49,6/0,8 v/v).
- Analyser 100 µL par HPLC avec une élution isocratique de la phase mobile constituée de méthanol/eau/acide trifluoroacétique (50/50/0.05 v/v). Le flux étant de 1 mL/min.
- Calculer la constante (K) d'hydrolyse des réactions de premier ordre pour la première heure d'incubation. (K) est déduite de la pente des droites des Log des pourcentages des parabènes en fonction du temps. En fait, $\text{Ln}(\% \text{ des parabènes restants dans le milieu}) = -K \cdot t$. Les temps de demi-vie des parabènes sont ensuite calculés d'après l'équation $t_{1/2} = \text{Ln}(2)/K = 0.693/K$.

Chaque essai est répété trois fois.

3.2.3 Réactions de phase II

3.2.3.1 Glucuronoconjugaison des cucurbitacines I, D et E, parabènes, acide oléanolique, acide ursolique, érythrodiol, acide férulique, acide caféique, tyrosol et hydroxytyrosol.

La glucuronoconjugaison des triterpènes cycliques (cucurbitacines, acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol) et des phénols (parabènes, acide férulique, acide caféique, tyrosol et hydroxytyrosol) a été déterminée selon la méthode de Bansal et Gessner (**Bansal and Gessner, 1980**). C'est une méthode radiochimique, sensible qui consiste à déterminer l'activité de la glucuronoconjugaison des microsomes de foie et des différentes isoformes d'UDP-glucuronosyltransférases (UGTs) *vis-à-vis* des différents substrats en utilisant un mélange de co-substrat radiomarqué/froid d'UDPGA. Les glucuronides radiomarqués formés sont séparés des substrats par chromatographie sur couche mince sur gel de silice, puis quantifiés après autoradiographie, grattage de la silice et comptage de la radioactivité associée. Pour ce faire, introduire dans un volume final de 40 µl :

- 50 µg de protéines (microsomes hépatiques humains ou rat ou d'UGTs)
- 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂
- 1 mM d'UDPGA froid
- 200 000 à 250 000 dpm d'UDPGA radiomarqué en ¹⁴C (285 mCi/mmol)
- 1 mM substrat* dissous dans du DMSO

Pour les parabènes et la cucurbitacine E, la glucuronoconjugaison a été testée, respectivement, en présence ou en absence de 1 et 0,5 mM de PMSF, un inhibiteur puissant de la sérine protéase (**Prouty and Goldberg, 1972**) et une étude statistique (ANOVA) a été réalisée en utilisant le logiciel STAT-VIEW 1992-98.

Chaque essai est répété deux fois. Les UGTs utilisées pour ces tests sont celles de la famille UGT1A (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10) et de la famille UGT2B (UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17).

*Substrat : DMSO (blanc), 1-Naphtol (utilisé comme substrat marqueur pour les microsomes hépatiques humains et les UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 et UGT1A9), Octylgallate (substrat marqueur pour l'UGT1A1), 4-Nitrophénol (substrat marqueur

pour l'UGT1A3), 4-Aminobiphényle (substrat marqueur pour l'UGT1A4), β -Œstradiol (substrat marqueur pour l'UGT1A10), Acide hyodéoxycholique (substrat marqueur pour l'UGT2B4), (*RS*)-Kétoprofène (substrat marqueur pour l'UGT2B7), Eugénol (substrat marqueur pour les UGT2B15 et UGT2B17), Cucurbitacine E, Cucurbitacine D, Cucurbitacine I, acide *p*-hydroxybenzoïque, méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène, benzylparabène, acide oléanolique, acide ursolique, érythrodiol, acide caféique, tyrosol ou hydroxytyrosol.

- Incuber à 37°C pendant 1h.
- Arrêter la réaction dans la glace en ajoutant 40 μ l d'alcool éthylique.
- Centrifuger à 3000 xg pendant 10 min.
- Prélever 60 μ l du surnageant et déposer les sur le milieu de la zone préabsorbante, jusqu'à 5 mm du bas de la plaque de gel de silice LK6DF (Whatman, Schleider & Schuell, Montluçon, France).
- Laisser sécher la plaque toute une nuit.
- Faire migrer sur plaque en utilisant comme phase mobile : 350 ml de *n*-butanol, 250 ml d'acétone, 90 ml d'acide acétique, 7,5 ml d'ammoniaque 28% et 300 ml d'eau distillée. La migration dure environ 4h à température ambiante.
- Sécher la plaque sous une hotte ventilée pendant environ 2h.
- Passer à l'autoradiographie en mettant la plaque en contact avec un film Kodak BioMax MR (Sigma Aldrich).
- Conserver à l'abri de la lumière dans une cassette d'exposition Kodak pendant au moins 2 jours à -20°C.
- Révéler le film Kodak et repérer l'emplacement des glucuronides sur la plaque.
- Gratter le gel de silice correspondant aux glucuronides.
- Ajouter 4,5 ml du liquide scintillant, le Fluoran Safe Ultima Gold (Courtaboeuf, France).
- Lire la radioactivité associée en utilisant un spectromètre à scintillation liquide (Packard).

Un second essai a été effectué avec la cucurbitacine I en utilisant les microsomes hépatiques du rat en présence du détergent non ionique Triton X-100 afin de perméabiliser la membrane des microsomes et rendre les substrats accessibles aux enzymes UGTs. Cet essai consiste à préincuber le Triton X-100 (0,05 mg/mL) avec les microsomes hépatiques du rat (0,05 mg) pendant 10 min à 37°C puis à procéder comme ci-dessus en appliquant la méthode de Bansal et Gessner.

3.2.3.2 Acétylation des cucurbitacines I, D et E

La méthode expérimentale suivie afin d'étudier l'acétylation des cucurbitacines par les microsomes hépatiques humains est une méthode spectrophotométrique basée sur la détermination du CoA libre avec le 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DTNB). Ce dernier permet de quantifier le nombre ou la concentration des groupes thiols (-SH) dans un échantillon. Nous avons suivi le protocole proposé par le fournisseur Sigma.

En effet, le CoA libéré possède un groupe thiol qui va réagir avec le DTNB tout en clivant son pont disulfure pour donner le 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) (**Figure 21**). Ce dernier s'ionise en dianion NTB²⁻ dans l'eau à un pH neutre ou alcalin. Le NTB²⁻ possède une couleur jaune et il est quantifié par spectrophotomètre en mesurant son absorbance à une longueur d'onde de 412 nm (**Shaw, 1975**).

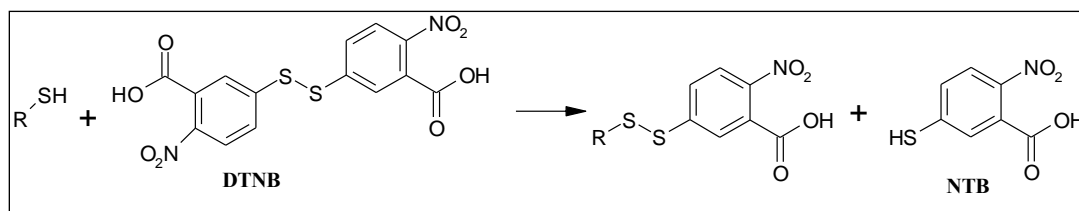


Figure 21 : Réaction de DTNB avec un substrat possédant un groupe thiol (R-SH).

La méthode analytique est réalisée comme suit :

- Dans un volume final de 250 µl, introduire :

- 20 µg de protéines de microsomes hépatiques humains
- 94 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4)
- 0,19 mM Acétyl-CoA
- 0,083 mM DTNB
- 0,005% (w/v) substrat* dissous dans du méthanol

*substrat : Chloramphénicol (substrat marqueur pour les acétyltransférases des microsomes hépatiques humains), Cucurbitacine E, Cucurbitacine D et Cucurbitacine I.

Chaque essai est répété 3 fois. Un blanc a été réalisé avec du méthanol.

- Incuber à 25°C pendant 30 min dans un spectrophotomètre thermostaté.
- Suivre l'augmentation de l'absorbance du NTB²⁻ à 412 nm pendant 30 min suite à la réaction du DTNB avec le groupe thiol du CoA.

Les équations des droites pour chaque substrat ont été calculées. Ensuite, la concentration du NTB²⁻ a été calculée suivant l'équation de Beer-Lambert. Le coefficient d'extinction du NTB²⁻ « ε » à 412 nm est de 13 600 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (**Molavi *et al.*, 2006 ; Senggunprai *et al.*, 2008**).

Le nombre de mole du NTB²⁻ dans le milieu a été ensuite déduit de la concentration et l'activité enzymatique des acétyltransférases des microsomes hépatiques humains a été calculée suivant la formule :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\text{nombre de mole de NTB2 – dans le milieu}}{\text{quantité de protéines en mg} \times \text{temps d'incubation en min}}$$

Une deuxième expérience a consisté à analyser l'acétylation de la cucurbitacine I par les enzymes des microsomes et des cytosols hépatiques humains (**Figure 22**) par spectrométrie de masse.

- Pour ce faire, introduire dans un volume final de 100 µl :

- 100 µg de protéines de microsomes ou de cytosols hépatiques humains
- 94 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4) ; 9,4 mM MgCl₂
- 2 mM Acétyl-CoA
- 1 mM cucurbitacine I dans acétonitrile (dont le volume d'acétonitrile est à 0,5% dans le milieu)

L'essai est répété deux fois. Un blanc a été réalisé en substituant l'acétyl-coenzyme A par du tampon Tris-HCl (pH 7,4).

- Incuber 1 h à 37°C et arrêter dans la glace en ajoutant 100 µL de méthanol.
- Centrifuger les tubes avec les microsomes hépatiques humains à 3 000 xg pendant 10 min et ceux avec les cytosols hépatiques humains à 13 400 xg pendant 3 min.
- Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes et analyser par spectrométrie de masse MS/MS afin de détecter la cucurbitacine I acétylée (cucurbitacine E à la rigueur) (**cf. section 3.2.2.1**).

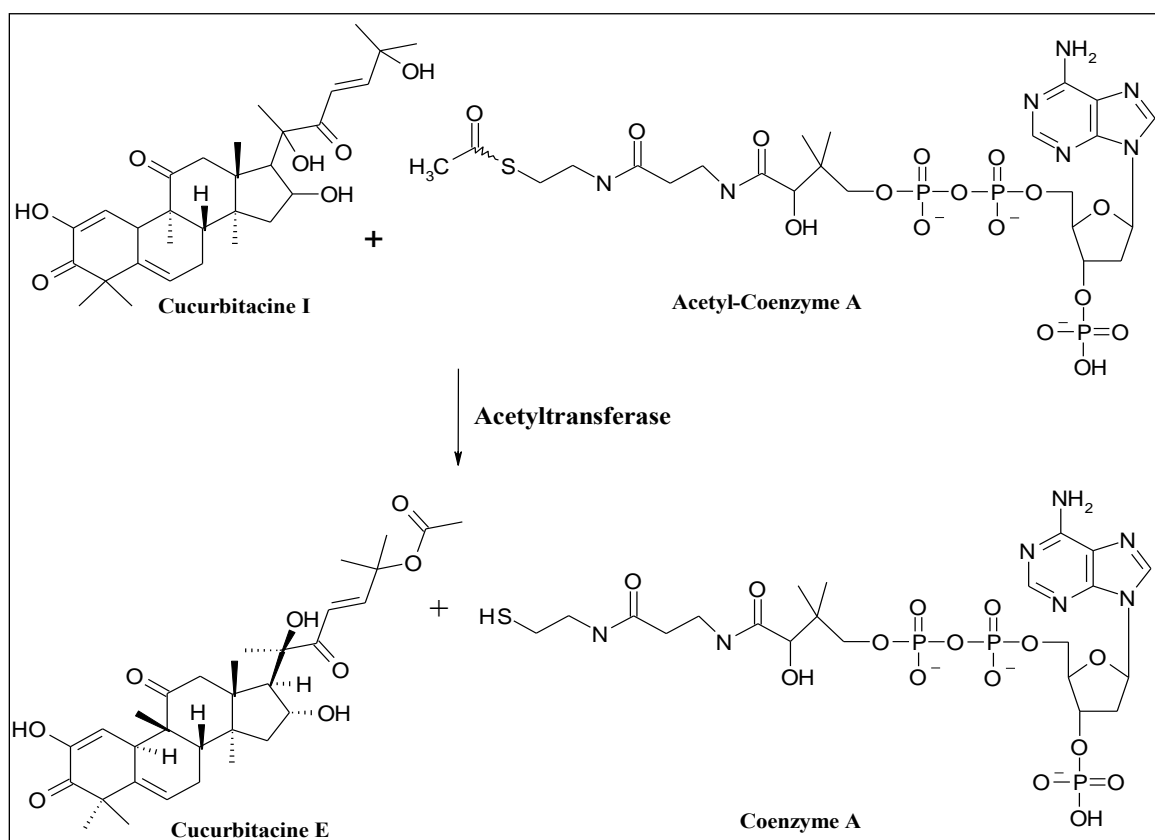


Figure 22 : Acétylation de la cucurbitacine I par l'acétyltransférase en présence de l'acétyl-coenzyme A.

Le même essai a été répété en présence et en absence du PMSF (0,5 mM) pour l'acétylation de la cucurbitacine I par les cytosols ou les microsomes hépatiques humains afin de voir si les métabolites acétylés sont hydrolysés par les estérases des microsomes hépatiques humains. Les

échantillons ont été ensuite analysés par LC-MS au laboratoire de spectrométrie de masse à la faculté des sciences de l'Université Lorraine, Nancy en utilisant un HPLC U3000 (DIONEX) couplé au spectre de masse ESI-Qq-TOF haute résolution (Bruker, Wissembourg, France). L'HPLC est équipé avec une colonne XBridge C₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 150 mm ; Milford, MA). Les échantillons ont été élués en isocratique avec la phase mobile constituée de : 0,05% acide formique dans l'eau/méthanol/acétonitrile (55/30/15 v/v) dont le flux est de 1 mL/min et la longueur d'onde de détection de 237 nm. La tension de cône d'ESI-Qq-TOF est fixée à 4500V et la température de la source à 190°C. Les données ont été collectées par le logiciel MicroTOFControl et analysées par l'analyseur des données « DataAnalysis » du logiciel Bruker (version 3.4).

3.2.3.3 *Glucosylation des cucurbitacines I, D et E*

La glucosylation des cucurbitacines a été réalisée selon la méthode de **Madina *et al.*, 2007**. Pour ce faire :

- Dans un volume final de 100 µl, introduire :

- 50 µg de protéines de microsomes ou de cytosols hépatiques humains
- 20 mM tampon Tris-HCl (pH 8)
- 1 mM UDP-glucose
- 1,5 µM (environ 300 000 dpm) UDP-[U-¹⁴C]-glucose (293 mCi/mmol)
- 0,15 mM substrat* dissous dans éthanol

*substrat : éthanol (blanc), cholestérol (substrat marqueur pour la glucosyltransférase)
Cucurbitacine E, Cucurbitacine D et Cucurbitacine I.

Chaque essai est répété 3 fois.

- Incuber à 37°C pendant 1h.

- Ajouter 800 µL d'éthylacétate et centrifuger à 13 000 xg pendant 2 min pour les cytosols et à 3 000 xg pendant 10 min pour les microsomes.

- Collecter la phase organique.

- Ajouter 4,2 mL du liquide scintillant et lire leur radioactivité par un spectromètre à scintillation liquide.

Une deuxième expérience a été réalisée en séparant les métabolites formés par chromatographie sur couche mince. Le même protocole décrit ci-dessus a été suivi mais après avoir collecté et centrifugé la phase organique après l'ajout de 800 μ L d'acétate d'éthyle,

- Evaporer la phase organique et redissoudre dans 80 μ L méthanol.

- Prélever 60 μ L et déposer les sur le milieu de la zone préabsorbante, jusqu'à 5mm du bas de la plaque de gel de silice.

- Laisser sécher toute la nuit et faire migrer en utilisant la phase mobile chloroforme/méthanol (8,5/1,5 v/v).

- Sécher la plaque puis développer la en la pulvérisant avec la solution vanilline dans acide sulfurique (1%, w/v dans 50% acide sulfurique).

- Chauffer la plaque à 110°C et visualiser les métabolites.

Une troisième expérience a consisté à analyser la glucosylation de la cucurbitacine I, considérée comme substrat type, par les microsomes et les cytosols hépatiques humains par spectrométrie de masse. Pour ce faire :

- Introduire dans un volume final de 100 μ l :

- 100 μ g de protéines de microsomes ou de cytosols hépatiques humains
- 20 mM tampon Tris-HCl (pH 8,0) ; 2 mM $MgCl_2$
- 1 mM UDP-Glucose
- 1 mM cucurbitacine I dans éthanol (dont l'éthanol a été à 1% de volume final)

L'essai est répété deux fois. Un blanc a été réalisé en substituant l'UDP-glucose par du tampon Tris-HCl (pH 8,0).

- Incuber 1h à 37°C et arrêter dans la glace en ajoutant 100 μ L de méthanol.

- Centrifuger les tubes avec les microsomes hépatiques humains à 3 000 xg pendant 10 min et ceux avec des cytosols hépatiques humains à 13 400 xg pendant 3 min.
- Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes et analyser par MS/MS (**cf. section 3.2.2.1**).

3.3.4 Sulfoconjugaison des cucurbitacines I, D et E

La sulfoconjugaison des cucurbitacines I, D et E a été déterminée selon une méthode radiochimique (**Senggunprai *et al.*, 2008**). C'est une méthode sensible qui consiste à déterminer l'activité de la sulfoconjugaison des cytosols de foie *vis-à-vis* des différents substrats en utilisant le co-substrat radiomarqué ³⁵S-PAPS. Les métabolites radiomarqués formés sont séparés des substrats par chromatographie sur couche mince sur gel de silice, puis quantifiés après autoradiographie, grattage de la silice et comptage de la radioactivité associée. Pour ce faire, introduire dans un volume final de 20 µl :

- 0,25 mg/mL correspondant à 5 µg de protéines de cytosols hépatiques humains
- 50 mM tampon tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT
- 2,12 nmol (1 357 253 dpm) ³⁵S-PAPS (0,289 Ci/mmol)
- 0,2 mM substrat* dans DMSO

Chaque essai est répété trois fois.

*Substrat : DMSO (blanc), 1-Naphtol (utilisé comme substrat marqueur pour les cytosols hépatiques humains), cucurbitacine E, cucurbitacine D et cucurbitacine I.

- Incuber à 37°C pendant 20 min.
- Arrêter la réaction dans la glace en ajoutant 10 µl d'acé tonitrile.
- Prélever 20 µl du surnageant et déposer les sur le milieu de la zone préabsorbante, jusqu'à 5 mm du bas de la plaque de gel de silice LK6DF (Whatman, Schleider & Schuell, Montluçon, France).
- Laisser sécher la plaque toute une nuit.

- Faire migrer sur plaque en utilisant la phase mobile constituée de chloroforme/méthanol/eau distillée/25% ammoniacale aqueux (60/35/7,5/0,5 v/v). La migration a été d'environ 2h 30min à température ambiante.
- Sécher la plaque sous une hotte ventilée pendant environ 2h.
- Passer à l'autoradiographie en mettant la plaque en contact avec un film Kodak BioMax MR (Sigma Aldrich).
- Conserver à l'abri de la lumière dans une cassette d'exposition Kodak pendant au moins 2 jours à -20°C.
- Révéler le film Kodak, repérer l'emplacement des métabolites sur la plaque et gratter le gel de silice correspondant.
- Ajouter 4,5 ml du liquide scintillant, le Fluoran Safe Ultima Gold (Courtaboeuf, France).
- Lire la radioactivité associée en utilisant un spectromètre à scintillation liquide (Packard).

3.2.4 Etudes cinétiques

Les constantes cinétiques apparentes (K_m et V_{max}) de la glucuronocouplage de l'acide *p*-hydroxybenzoïque et de tous les parabènes (0,05 – 10 mM) sont calculées en utilisant les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9 qui est une des principales isoformes des UGTs impliquées dans le métabolisme de ces substances en présence d'une concentration fixe en UDPGA (5 mM).

Ces constantes cinétiques sont aussi calculées pour la déacétylation de la cucurbitacine E en cucurbitacine I (0,01 – 0,15 mM) par les microsomes hépatiques humains, pour la glucuronocouplage des acides oléanolique, ursolique et érythrodiol (2,5 – 100 µM) et des cucurbitacines I, D et E (0,05 – 1 mM) en présence d'une concentration fixe en UDPGA (1 mM).

Les calculs de K_m et V_{max} ont été réalisés en traitant les données par le logiciel *SigmaPlot 9.0*, 2004.

3.3 Cytotoxicité des cucurbitacines

La cytotoxicité des cucurbitacines I, D et E ainsi que celle d'un mélange de cucurbitacines glycosylées sont évaluées en réalisant l'essai MTT sur une lignée de cellules cancéreuses de chondrosarcomes humains (SW 1353). Ensuite, l'essai TUNEL est appliqué afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces cucurbitacines et de tester leur effet apoptotique.

3.3.1 Viabilité des cellules et essai MTT

La viabilité des lignées cellulaires de chondrosarcome (SW 1353) a été testée par l'essai MTT. Les cellules ont été incubées avec le milieu de culture (DMEM/F12 + ITS + streptomycine/pénicilline + L-glutamine + plasmocin prophylacticTM (250 µg/mL)), les cucurbitacines I, D et E (0,1 ; 1 ; 10 et 100 µM), la cytochalasine D (4 µM) (contrôle positif, substance connue pour sa cytotoxicité marquée) et un mélange de cucurbitacines glycosylées (4 ou 10 µM). La présence du DMSO (0,1% en concentration finale) dans le milieu de culture est considérée comme contrôle négatif comme les cucurbitacines et la cytochalasine D sont dissoutes dans ce véhicule.

La viabilité des cellules a été testée après 6 ; 12 ; 24 ; 46 et 70h de traitement. Chaque essai est répété 3 fois. C'est un essai colorimétrique qui permet de mesurer l'activité des enzymes se trouvant dans la mitochondrie des cellules vivantes et capables de réduire le MTT (3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide, un produit de couleur jaune) en formazan, un produit dont la coloration est violette (**Edmondson *et al.*, 1988**).

Protocole :

- Répartir le même nombre de cellules (10 000 cellules/puits) dans les différents puits d'une plaque de 96 puits.
- Traiter les cellules avec les cucurbitacines I, D et E à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 et 100 µM), cytochalasine D (4 µM), mélange de cucurbitacines glycosylées (4 µM) et laisser des cellules dans le milieu de culture DMEM/F12 + ITS + streptomycine/pénicilline + (L)-glutamine en présence du DMSO (contrôle négatif).

Répéter chaque essai 3 fois, laisser incubé pendant 6 ; 12 ; 24 ; 46 et 70h et ensuite appliquer l'essai MTT comme suit :

- Aspirer le milieu des puits et ajouter 100 µL du milieu de culture (DMEM/F12 + ITS + streptomycine/pénicilline + L-glutamine) et 25 µL de la solution 5 mg/mL MTT dans du PBS après l'avoir filtrée.
- Incuber la plaque pendant 4h à 37°C à l'obscurité.
- Aspirer les milieux et solubiliser les cellules en ajoutant 100 µL de 0,04N HCl dans isopropanol.
- Lire l'absorbance du formazan au spectrophotomètre à 550 nm.

Le pourcentage des cellules vivantes est déterminé selon l'équation :

$$\frac{\text{Absorbance Essai} - \text{Absorbance blanc}}{\text{Absorbance témoin négatif} - \text{Absorbance blanc}} \times 100$$

Les valeurs IC₅₀ ont été déterminées à partir du pourcentage des cellules vivantes en fonction des Log des concentrations des cucurbitacines. L'IC₅₀ est la concentration de la substance capable d'induire 50% d'inhibition de la prolifération cellulaire.

3.3.2 Effet apoptotique et essai TUNEL

L'action apoptotique des cucurbitacines I, D et E (0,1 ; 1 et 10 µM) et d'un mélange de cucurbitacines glycosylées (4 et 10 µM) sur les chondrosarcomes de lignées SW 1353 a été étudiée par l'essai TUNEL. C'est une méthode basée sur la détection des coupures au niveau de l'ADN. Ces coupures sont identifiées par microscopie fluorescente suite à la présence des nucléotides fluorescents éthylnyl dUTP (EdUTP) incorporés à l'extrémité 3'-OH des brins des ADN endommagés par la déoxynucléotidyl terminale transférase (TDT). La présence des nucléotides fluorescents au niveau des brins d'ADNs est un marqueur de l'apoptose.

Protocole :

L'essai TUNEL a été réalisé selon les instructions du fournisseur du kit « Invitrogen » après 12 et 24h d'incubation et en présence de différents milieux : le milieu de culture composé de DMEM/F12 + ITS + streptomycine/pénicilline + (L)-glutamine tout seul ou en présence de DMSO (0,1%) (considéré comme contrôle négatif), des cucurbitacines I, D et E (0,1 ; 1 et 10 μM), d'un mélange des cucurbitacines glycosylées (4 et 10 μM), de la cytochalasine D (4 μM) (contrôle positif) et de la DNase. Chaque essai est répété 3 fois.

Etape 1 : Préparation d'un control positif

- Laver les cellules avec l'eau déionisée.
- Ajouter 100 μL de la solution DNase I dans chaque puits (3 puits) et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Laver les puits une seule fois avec l'eau déionisée et procéder à la réaction TdT.

Etape 2 : Fixation et perméabilisation des cellules

- Aspirer les milieux de culture après 12 ou 24h de traitement et rincer une fois au PBS.
- Ajouter 100 μL de la solution 4% paraformaldéhyde (un fixative) tout en couvrant chaque puits.
- Incuber la plaque à 96 puits pendant 15 min à température ambiante.
- Eliminer le fixateur et ajouter 100 μL du réactif de perméabilisation (0,25% Triton X-100 dans PBS) tout en couvrant chaque puits.
- Incuber pendant 20 min à température ambiante.
- Laver 2 fois avec l'eau déionisée.

Etape 3 : Réaction TdT

- Ajouter dans chaque puits 50 μL du tampon de la réaction TdT et étaler la solution sur toute la surface.
- Incuber pendant 10 min à température ambiante et éliminer le tampon de la réaction TdT.
- Ajouter dans chaque puits 50 μL de la réaction cocktail TdT qui contient du tampon de la réaction TdT + EdUTP + TdT.
- Etaler la solution sur toute la surface des puits et incuber pendant une heure à 37°C.

- Eliminer la réaction cocktail et laver les puits deux fois pendant 2 minutes avec 3% BSA dans PBS.

Etape 4 : Réaction Click-iT[®]

- Ajouter directement 50 μ L de la réaction cocktail Click-iT[®] contenant le tampon de la réaction Click-iT[®] + le tampon additif de la réaction Click-iT[®]. Etaler la solution sur toute la surface des puits et incuber à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante.
- Eliminer la réaction cocktail Click-iT[®] et laver chaque puits avec 3% BSA dans PBS pendant 5 min.

Etape 5 : Coloration de l'ADN

- Ajouter 100 μ L de la solution Hoechst 33342 dans chaque puits et incuber à l'obscurité pendant 15 min à température ambiante.
- Eliminer la solution Hoechst 33342 et laver deux fois chaque puits avec du PBS.
- Eliminer le PBS.
- Examiner au microscope fluorescent afin de visualiser la coupure des ADN.

Les ADN coupés dans lesquels l'EdUTP a été incorporé seront marqués en vert et la solution Hoechst 33342 marque le noyau en bleu.

Chapitre 4 : Résultats

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Métabolisme des substances naturelles *in vitro* chez l'homme et le rat

4.1.1 Elution chromatographique et spectre d'absorption des cucurbitacines I, D et E

Le spectre d'absorption UV-Vis des trois cucurbitacines I, D et E dissous dans du DMSO a été déterminé après analyse par un détecteur photodiode array couplé à l'HPLC muni d'une colonne C18 XBridge™ (5 µm, 4,6 mm x 150 mm). Dans ces conditions d'analyse et après élution isocratique d'un flux de 1 mL/min par la phase mobile constituée de 1% d'acide formique dans eau/acétonitrile (65:35 v/v), nous avons obtenu le spectre d'absorbance de ces différentes substances présentant des temps de rétention de 5,6 ; 8,2 et 29,1 min, respectivement pour les cucurbitacines D, I et E (**Figure 23**). Ces résultats suggèrent que la cucurbitacine E, qui est la forme acétylée de la cucurbitacine I, est le composé le plus hydrophobe et la cucurbitacine D est la plus hydrophile. Le caractère hydrophobe de la cucurbitacine E revient au groupement acétyle ajouté à sa chaîne latérale et qui est absent chez les cucurbitacines D et I.

Ce spectre d'absorption nous a permis aussi de déterminer la longueur d'onde maximale. Cette longueur d'onde est de 237 nm. Les cucurbitacines I et E présentent aussi un deuxième pic à la longueur d'onde 270 nm. Cependant, la longueur d'onde 237 nm reste la plus spécifique avec un pic d'intensité plus importante (**Figure 23**). Par conséquent, la longueur d'onde de 237 nm sera utilisée dans nos analyses ultérieures par HPLC.

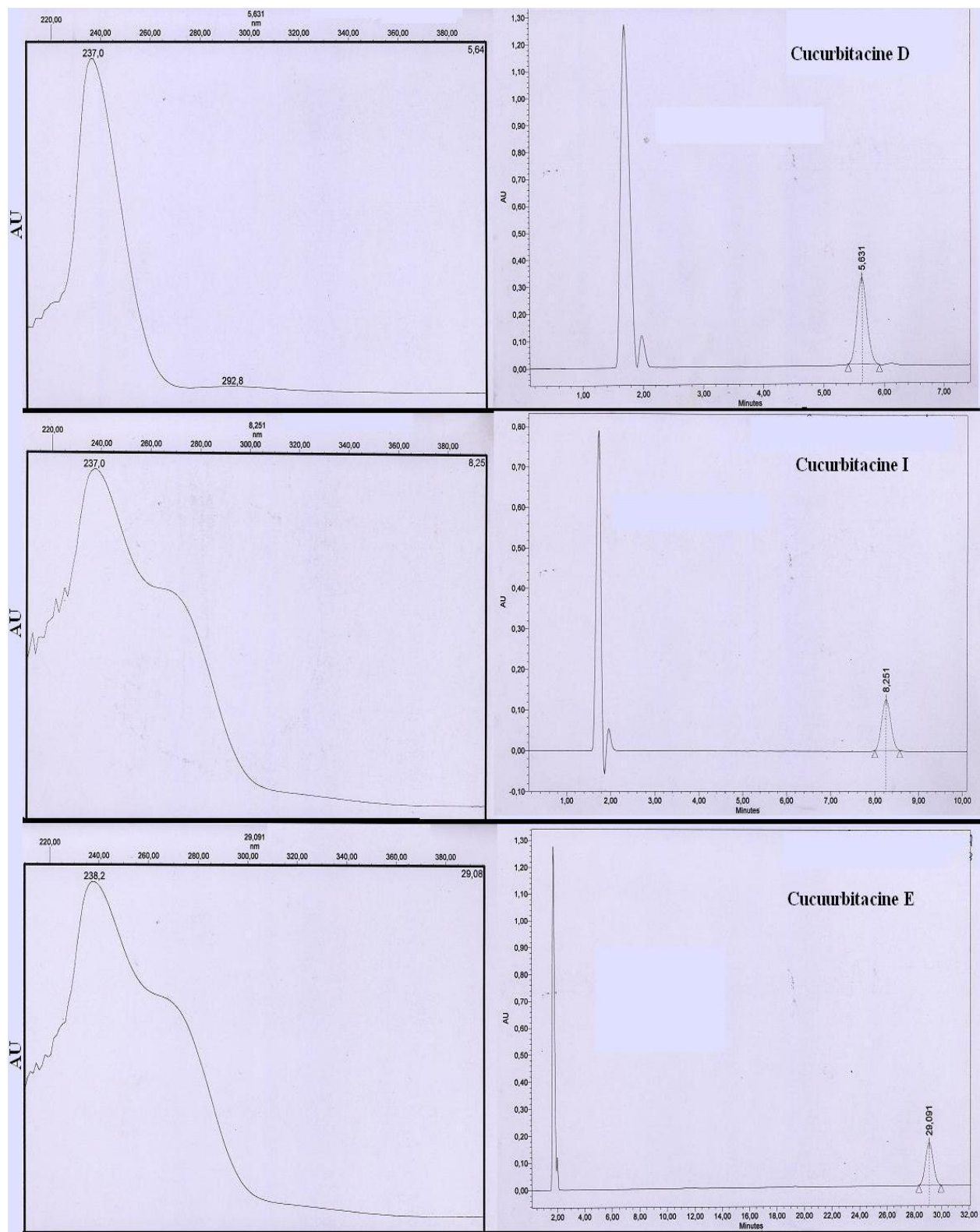


Figure 23 : Spectre d'absorption et temps de rétentions des cucurbitacines D, I et E (1 mM) dissous dans du DMSO après analyse par HPLC couplé à un détecteur photodiode array. Les cucurbitacines D, I et E présentent des temps de rétention de 5,6 ; 8,2 et 29,1 min, respectivement.

4.1.2 Réactions de phase I

4.1.2.1 Hydroxylation des cucurbitacines I, D et E par des microsomes hépatiques humains

L'hydroxylation des cucurbitacines a été étudiée en incubant ces produits avec les microsomes hépatiques humains et du NADPH à pH 7,4.

La variation de l'absorbance du NADPH a été mesurée pendant 30 min à 340 nm (**Figure 24a**). Les équations des droites pour chaque substrat ont été ensuite calculées (**Tableau 4**).

Les résultats montrent que, comme attendu, la nifédipine, utilisée comme substrat marqueur pour cette méthode, est hydroxylée avec une activité enzymatique de l'ordre de 7,25 nmol/mg protéines/min. D'autre part, les cucurbitacines I, D et E sont hydroxylées avec des activités enzymatiques beaucoup plus faibles, de l'ordre de 0,40 ; 0,60 et 0,402 nmol/mg protéines/min respectivement (**Figure 24b**). L'activité de ces enzymes *vis-à-vis* du substrat marqueur est donc environ 14 fois supérieure à celle *vis-à-vis* des cucurbitacines. Ces résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, les cucurbitacines sont très faiblement hydroxylées par les microsomes hépatiques humains.

L'hydroxylation des cucurbitacines glycosylées a été aussi testée en utilisant l'eau distillée à la place des cucurbitacines dans le blanc. Les résultats montrent que ces substances ne subissent pas cette voie de biotransformation, étant donné que nous n'avons pas eu une diminution de l'absorbance du NADPH au cours du temps.

L'analyse des produits d'hydroxylation a été ensuite réalisée par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ne montrent que le pic de masse en mode négatif correspondant à la cucurbitacine I à laquelle est ajoutée une molécule d'HCl ($m/z = 549,26$). Par contre aucun pic de masse correspondant à la cucurbitacine I hydroxylée ($m/z = 529$) ou à la cucurbitacine I hydroxylée à laquelle est ajoutée une molécule d'HCl ($m/z = 564$) n'est visible (**Figure 25**). Ces résultats confirment le très faible taux d'hydroxylation observé par la méthode enzymatique.

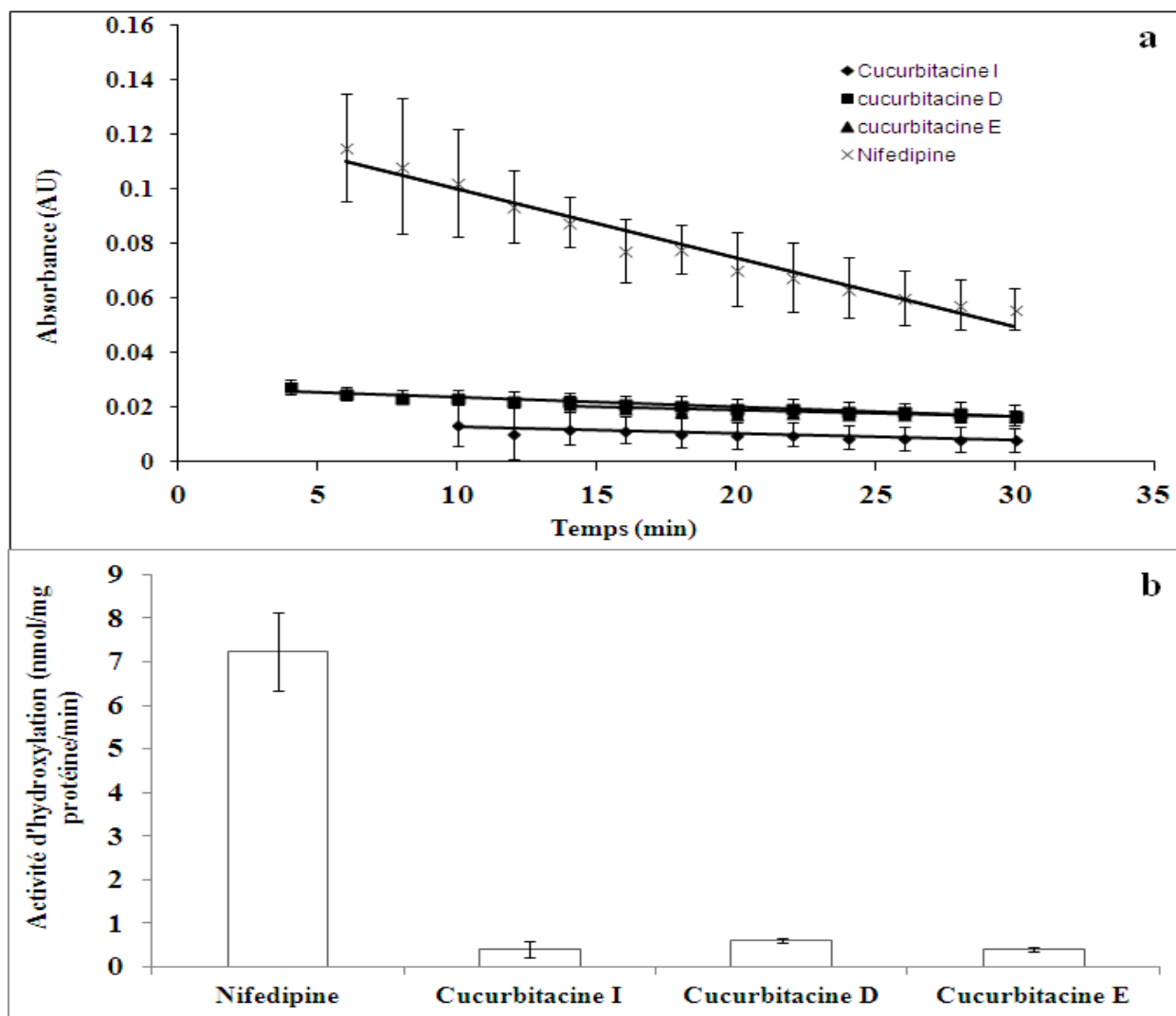


Figure 24 : (a) La variation de l'absorbance du NADPH en fonction du temps durant l'hydroxylation des cucurbitacines par les cytochromes P450 des microsomes hépatiques humains. (b) L'hydroxylation de la nifédipine et des cucurbitacines I, D et E et de la nifédipine (100 μ M) par les monooxygénases hépatiques humaines, cytochrome P450 dépendantes en présence de NADPH et du tampon Tris-HCl pH 7,4. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.

Tableau 4 : Equations des droites des absorbances du NADPH en fonction du temps après l'hydroxylation de la nifédipine et des cucurbitacines I, D et E par les microsomes hépatiques humains.

Substrat	Equation	R ²
Nifédipine	$y = -0,0036x + 0,1295$	0,9454
Cucurbitacine I	$y = -0,0002x + 0,0151$	0,8688
Cucurbitacine D	$y = -0,0003x + 0,0273$	0,9588
Cucurbitacine E	$y = -0,0002x + 0,0173$	0,8465

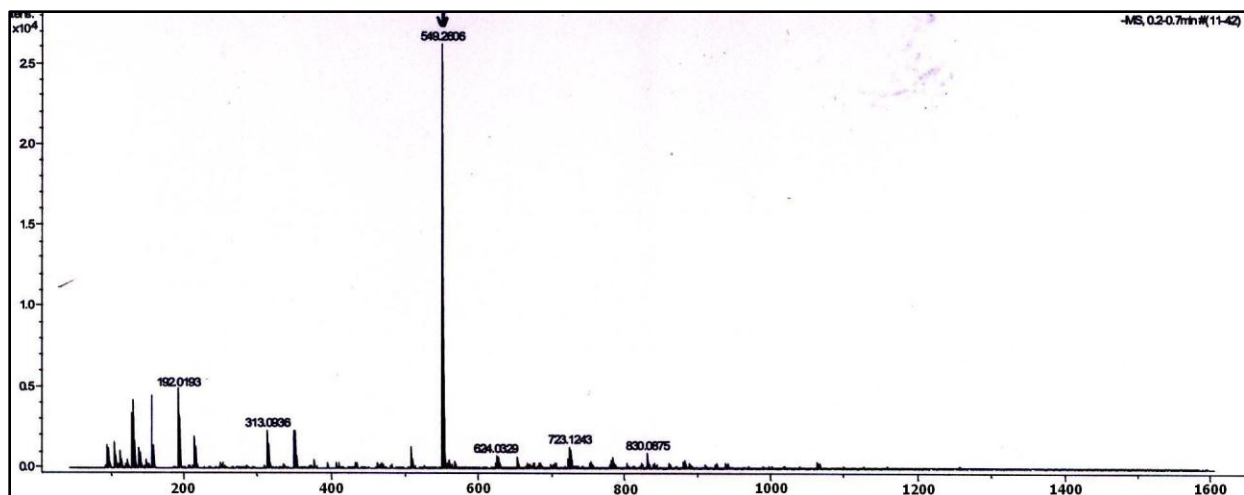


Figure 25 : Spectre de masse de l'hydroxylation de la cucurbitacine I après incubation avec les microsomes hépatiques humains en présence de NADPH à pH 7,4.

4.1.2.2 Déshydrogénation des cucurbitacines I, D et E

La déshydrogénation des cucurbitacines I, D et E a été étudiée en incubant ces produits avec les cytosols hépatiques humains en présence du NAD⁺ à pH 8,8. L'absorbance du NADH a été ensuite mesurée pendant 30 min avec la longueur d'onde de 340 nm tout en suivant la production du NADH au cours du temps.

Cette voie de déshydrogénation a très bien marché avec l'éthanol, considéré comme substrat marqueur avec une activité enzymatique de l'ordre de $3,82 \pm 0,72$ nmol/mg protéines/min. L'équation de la droite de l'absorbance de NADH produit au cours du temps est $y = -0,0019 x + 0,0024$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$ (**Figure 26**). Par contre, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'absorbance du NADH en fonction du temps dans les essais en présence des cucurbitacines. Ces résultats nous permettent de conclure que les cucurbitacines ne subissent pas cette voie métabolique chez l'homme.

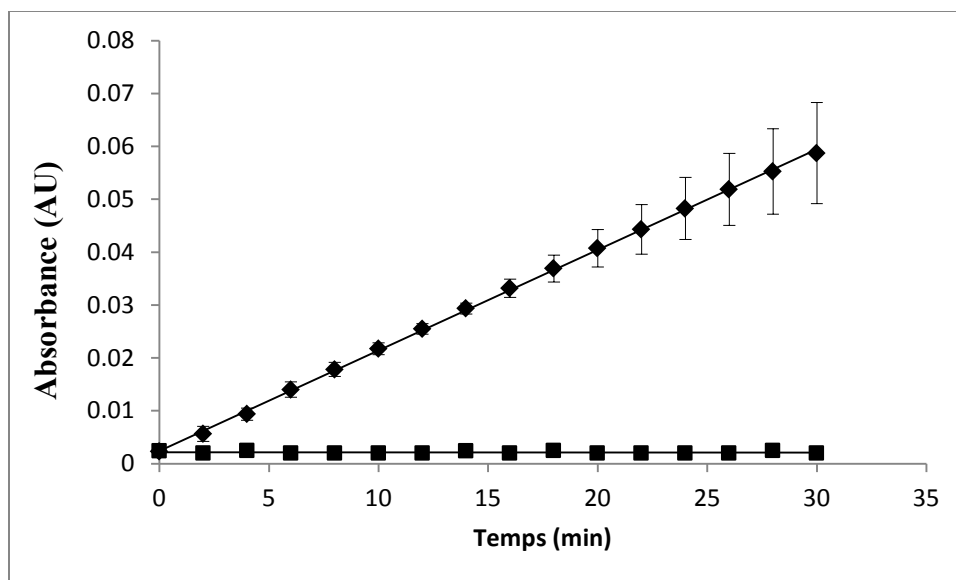


Figure 26 : L'absorbance du NADH produit en fonction du temps durant la déshydrogénation de l'éthanol 3,2% (v/v) (losange noir) et de la cucurbitacine D (rectangle noir) par 20 µg de protéines de cytosols hépatiques humains en présence du NAD⁺ et dans le tampon sodium pyrophosphate (pH 8,8). Chaque point est la moyenne ± SE de trois essais.

4.1.2.3 Hydrolyse de la cucurbitacine E et des parabènes

4.1.2.3.1 Déacétylation de la cucurbitacine E *in vitro* dans les microsomes/cytosols hépatiques et le plasma de l'homme et du rat

- Droites d'étalonnage

La cucurbitacine E est une cucurbitacine possédant un groupement acétique en position terminale. Elle est la forme acétylée de la cucurbitacine I.

Avant de réaliser la réaction de déacétylation, des droites d'étalonnage pour quantifier les cucurbitacines E et I ont été tracées à partir des chromatogrammes HPLC et les équations de ces droites ont été calculées.

L'équation de la courbe d'étalonnage de la cucurbitacine E est : $y = 97,073x - 0,3327$ et son coefficient de corrélation est $R^2 = 0,99$ (**Figure 27a**).

L'équation de la courbe d'étalonnage de la cucurbitacine I est : $y = 77,815x - 0,3087$ et son coefficient de corrélation est $R^2 = 0,99$ (**Figure 27b**).

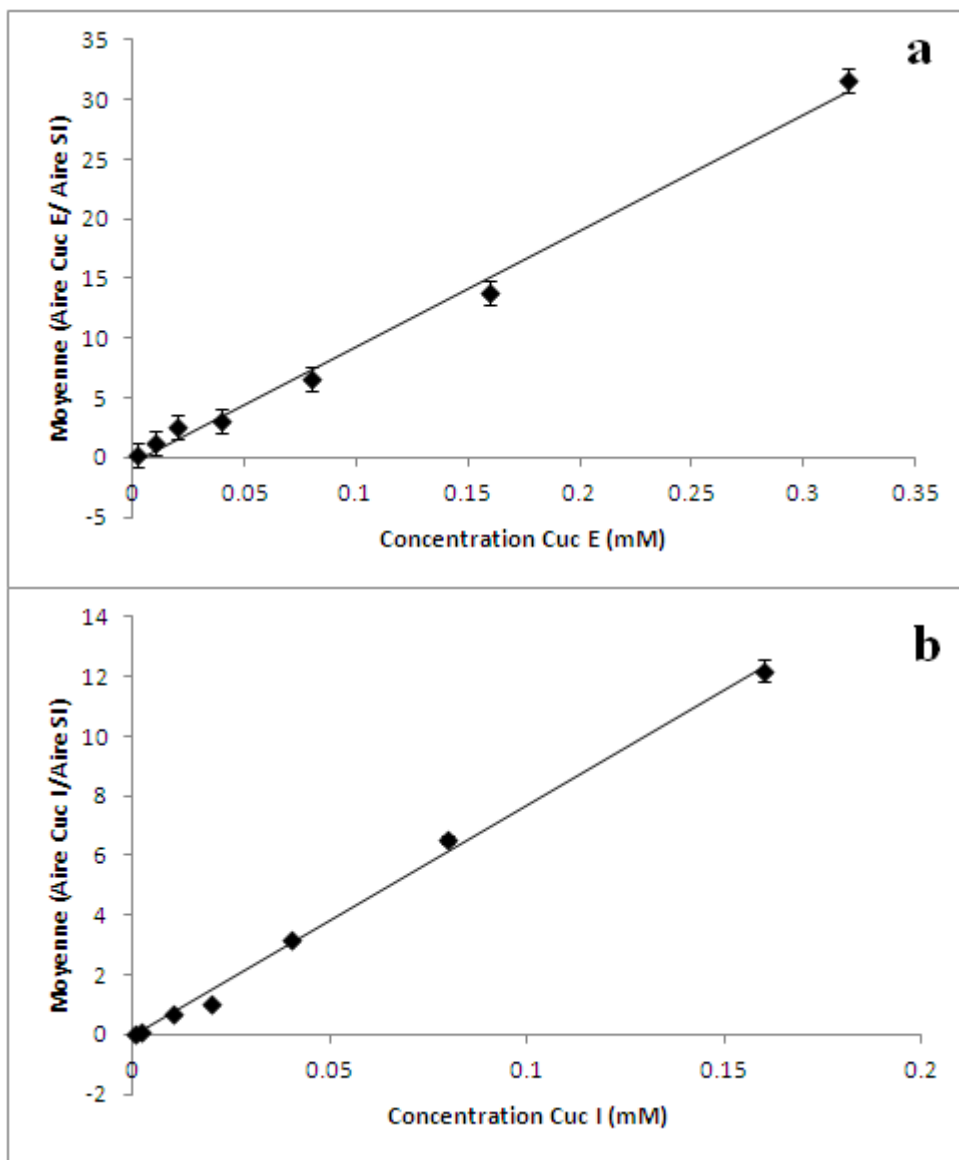


Figure 27 : Droites d'étalonnage (a) de la cucurbitacine E et (b) de la cucurbitacine I tracées en utilisant la moyenne du rapport Aire Cuc / Aire 4-hydroxybenzophénone en fonction de la concentration de la cucurbitacine appropriée. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois essais.

- Déacétylation par les microsomes et les cytosols hépatiques humains

L'hydrolyse du groupe acétyle de la cucurbitacine E engendrant la production de la cucurbitacine I a été étudiée avec les microsomes et les cytosols hépatiques humains. Les microsomes hépatiques humains montrent une activité de déacétylation 16 fois plus grande que celle des cytosols hépatiques humains après 1h d'incubation. La formation de la cucurbitacine I à partir de

la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques humains atteint une concentration de 99 μM après 1h et 4h d'incubation, alors que celle catalysée par des cytosols hépatiques humains atteint au maximum 17 μM après 12h d'incubation (**Figure 28**). Par conséquent, les estérases des microsomes hépatiques humains sont plus impliquées dans la déacétylation de cette cucurbitacine et par la suite les cinétiques de cette réaction en fonction du temps et de la concentration seront réalisées avec les microsomes du foie.

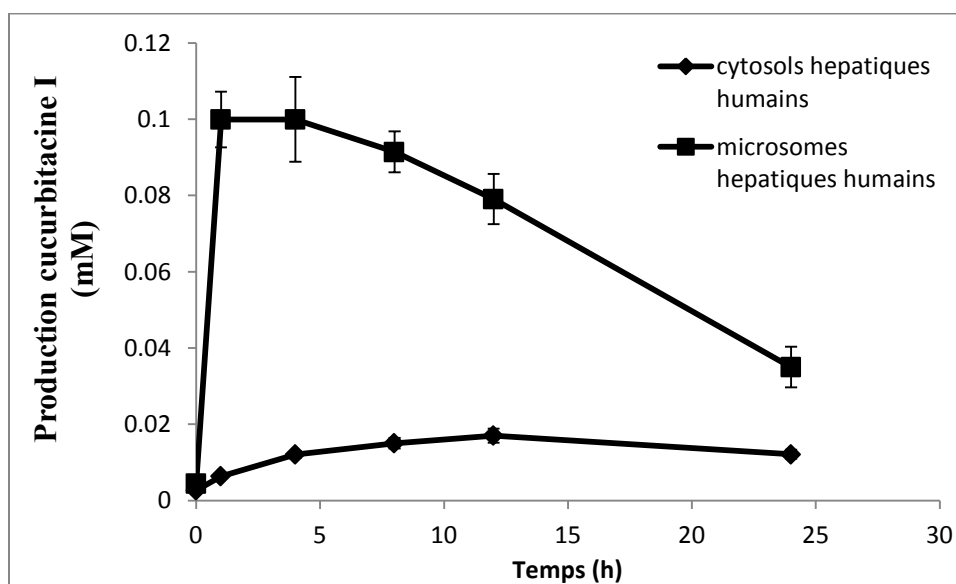


Figure 28 : Production de la cucurbitacine I après hydrolyse de la cucurbitacine E (0,54 mM) par les estérases des microsomes et des cytosols hépatiques humains après 0 ; 1 ; 4 ; 8 ; 12 et 24h d'incubation. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.

Ensuite, l'évolution de la réaction de déacétylation de la cucurbitacine E en cucurbitacine I est suivie avec les microsomes hépatiques humains pendant la première heure d'incubation tout en faisant des prélèvements après 0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 et 60 min. Cette réaction est très rapide. Elle est linéaire pendant les 10 premières minutes et atteint un palier après 20 min (**Figure 29**). La stabilité de la cucurbitacine E a été testée simultanément dans du tampon Tris-HCl. Les résultats montrent que la cucurbitacine E est stable dans le tampon pendant la première heure d'incubation (**Figure 29**).

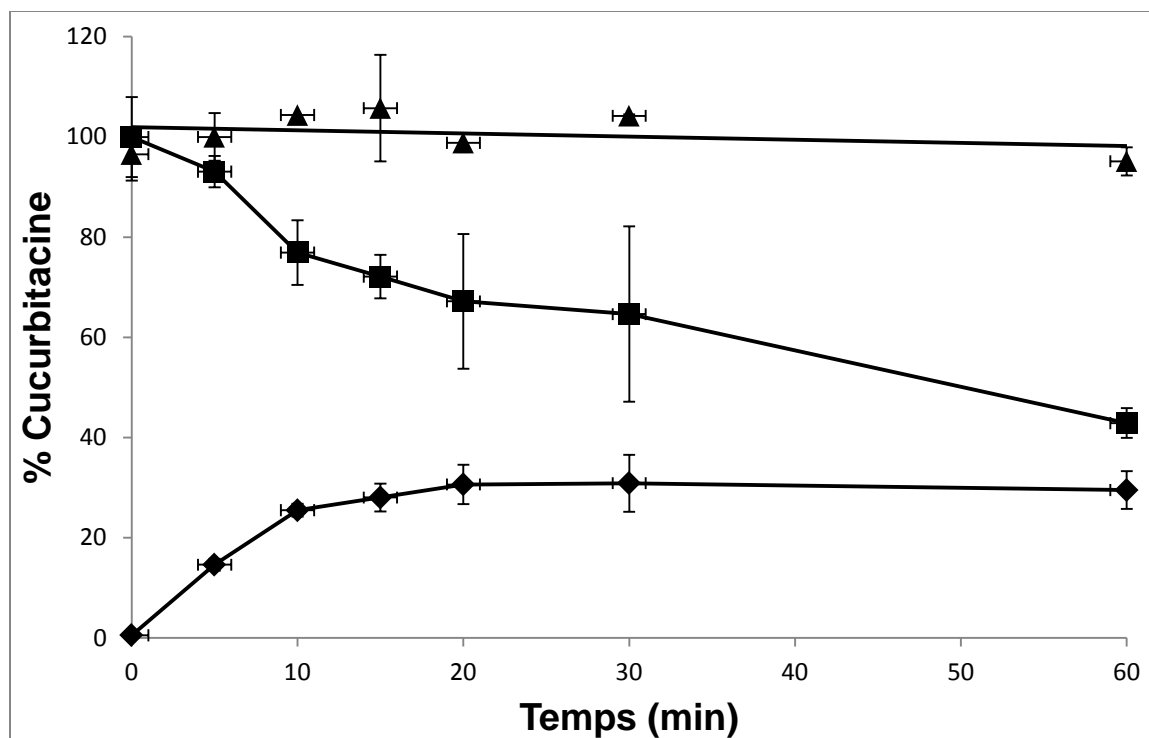


Figure 29 : Production de la cucurbitacine I après hydrolyse du groupe acétyle de la cucurbitacine E par les estérases des microsomes hépatiques humains. La cucurbitacine E (0,54 mM) a été incubée avec les microsomes hépatiques humains dans 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4) pendant 1h à 37°C. La diminution de la concentration de la cucurbitacine E (rectangles noirs) et la production de la cucurbitacine I (losanges noirs) au cours du temps sont quantifiées après séparation par HPLC. La stabilité de la cucurbitacine E après incubation avec du tampon seulement dans les mêmes conditions expérimentales est montrée (triangles noirs). Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.

Le temps de réaction de 10 min a été alors sélectionné pour étudier la déacétylation en fonction de la concentration de la cucurbitacine E (**Figure 30a**). Cette étude permet de calculer l'affinité des estérases hépatiques pour la cucurbitacine E ainsi que la vitesse maximale que peuvent atteindre ces enzymes. Afin de réaliser cette étude, des concentrations de 0 - 0,15 mM de cucurbitacine E ont été utilisées et l'activité enzymatique a été calculée pour chacune de ces concentrations. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk (**Figure 30b et c**) ont permis de calculer les constantes cinétiques de cette réaction $K_m = 22 \pm 6,3 \mu\text{M}$ et une $V_{max} = 571,34 \pm 49,14 \text{ nmol/mg protéines/min}$.

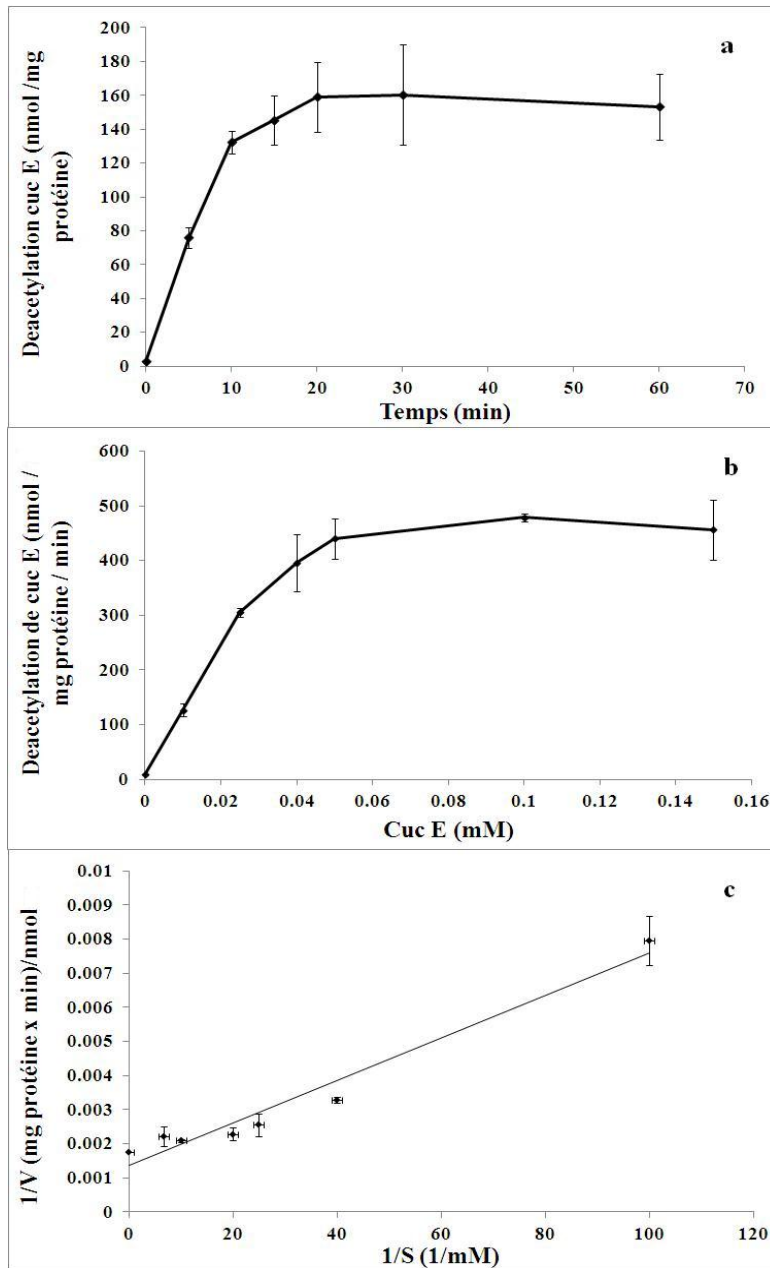


Figure 30 : Cinétiques de la réaction de déacétylation de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques humains en (a) suivant la linéarité de la réaction en fonction du temps. Les représentations graphiques de (b) Michaelis-Menten et de (c) Lineweaver-Burk de cette réaction ont permis de calculer les constantes cinétiques (K_m 22 μM , V_{\max} 571 nmol/min/mg protéine). Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SE de trois essais.

L'hydrolyse de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques des rats atteint une concentration de $14,38 \pm 0,002 \mu\text{M}$ après une heure d'incubation. Cette hydrolyse est 7 fois inférieure à celle des microsomes hépatiques humains (**Figure 31**).

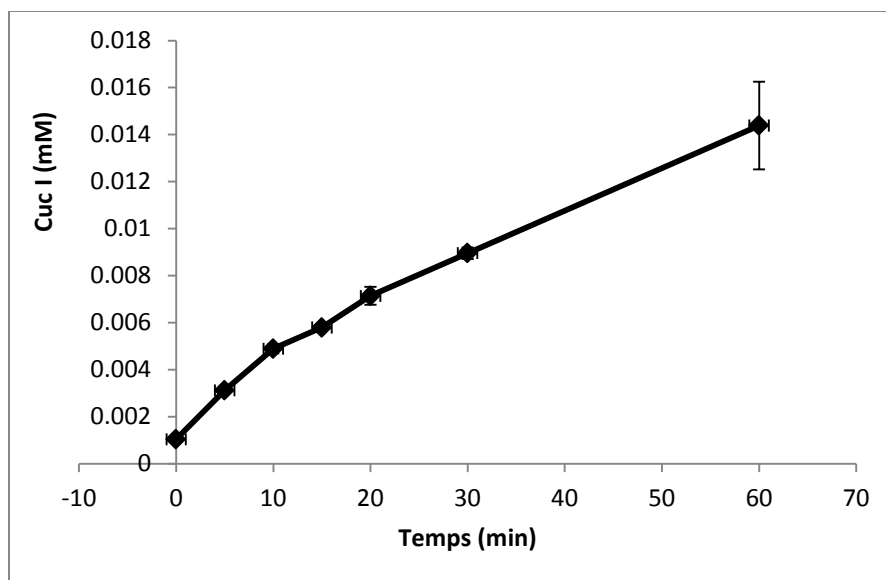


Figure 31 : Production de la cucurbitacine I après hydrolyse de la cucurbitacine E (0,54 mM) par les estérases des microsomes hépatiques du rat durant 1h d'incubation. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois essais.

La production de la cucurbitacine I après hydrolyse de la cucurbitacine E a été observée avec 620 μ g de plasma du rat suite à l'apparition du pic de la cucurbitacine I sur le chromatogramme après séparation par HPLC. Par contre, aucune hydrolyse n'a été observée avec le plasma humain (787 μ g) et avec des quantités moindres du plasma du rat. Le taux d'hydrolyse dans le plasma du rat est très faible et il n'a pas été quantifié (résultats non montrés).

A noter que les plasmas du rat et de l'homme sont analysés seuls par HPLC afin de vérifier l'absence ou la présence de la cucurbitacine I ou E. Aucun pic correspondant à ces deux cucurbitacines n'était détecté dans les plasmas.

4.1.2.3.2 Hydrolyse des parabènes par les microsomes hépatiques humains

Les méthyl-, éthyl-, propyl-, butyl- et benzyl-parabènes sont rapidement hydrolysés par les estérases des microsomes hépatiques humains. Le Log du % d'hydrolyse en fonction du temps conduit à une droite correspondant à une cinétique de premier ordre et permet la détermination de la constante de vitesse d'hydrolyse ainsi que le temps de demi-vie pour chaque parabène (**Tableau 5**). Le taux d'hydrolyse diminue avec la longueur des chaînes aliphatiques et les temps

de demi-vie varient entre 22 et 87 min pour les méthyl- et butyl-parabènes, respectivement. Le benzylparabène, qui possède une chaîne phénolique, présente une demi-vie intermédiaire de 43 min (**Figure 32**).

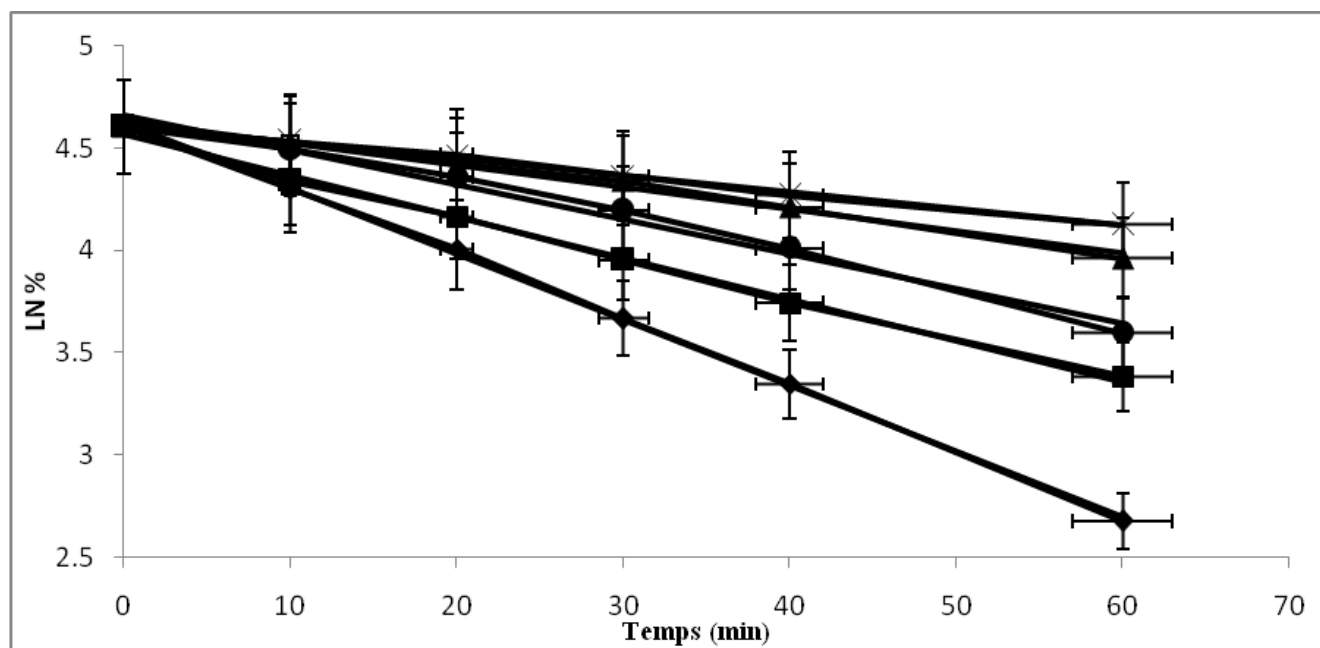


Figure 32 : Hydrolyse des parabènes (164 μM) par les estérases des microsomes hépatiques humains après incubation à 37°C avec 67 mM du tampon phosphate (pH 7,4). La cinétique d'hydrolyse de 1^{er} ordre est représentée (Log du % d'hydrolyse en fonction du temps). Méthylparabène (losanges noirs), éthylparabène (rectangles noirs), propylparabène (triangles noirs), butylparabène (x) et benzylparabène (ronds noirs). Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.

Tableau 5 : Les constantes de vitesse d'hydrolyse (K) et les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des parabènes incubés pendant une heure avec des microsomes hépatiques humains et du tampon phosphate (pH 7,4). Les constantes ont été calculées d'après les données présentées dans la **Figure 32**.

Substrat	K (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
Méthylparabène	0,032	21,65
Ethylparabène	0,02	34,65
Propylparabène	0,01	69,30
Butylparabène	0,008	86,62
Benzylparabène	0,016	43,31

4.1.3 Réactions de phase II

4.1.3.1 Glucuroconjugaison des substances triterpéniques cycliques et phénoliques

4.1.3.1.1 Glucuroconjugaison des substances triterpéniques cycliques

4.2.3.1.1.1 Glucuroconjugaison des cucurbitacines

La glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E a été évaluée avec les microsomes hépatiques d'homme (**Figure 33**) et de rat par méthode radiochimique en présence d'UDPGA froid et radioactif comme substrat donneur.

L'autoradiographie du film montre la présence dans le control négatif d'un glucuronide formé suite à la glucuroconjugaison d'un composé endogène se trouvant dans les microsomes hépatiques humains. L'intensité des tâches radiomarquées devient légèrement plus importante dans le cas des cucurbitacines. Pour le control positif, le 1-naphtol, de grosses tâches de glucuronides sont observées signalant la glucuroconjugaison active de ce substrat (**Figure 33**).

La mesure de l'activité de glucuroconjugaison des cucurbitacines par les microsomes hépatiques humains montre que cette activité varie de 18 pmol/mg protéine/min pour la cucurbitacine D à 51 et 83 pmol/mg protéine/min pour les cucurbitacines I et E, respectivement (**Figure 34**). Cette activité est bien plus faible que celle mesurée pour le 1-naphtol pris comme substrat de référence (environ 7 nmol/mg protéine/min). Pour les microsomes hépatiques de rats, nous observons une glucuroconjugaison pour les cucurbitacines I et E mais pas avec la D (**Figure 33b**, **Figure 34**). Cette glucuroconjugaison est de l'ordre de 8,76 nmol/mg protéine/min pour le 1-naphtol.

L'activation des UGTs par incubation des microsomes hépatiques de rat avec le détergent non-ionique Triton-X100 n'augmente pas cette activité (résultat non montré).

La glucuroconjugaison d'un mélange de cucurbitacines glycosylées par les microsomes hépatiques humains a été étudiée de façon similaire. Par contre, aucun glucuronide n'a été décelé.

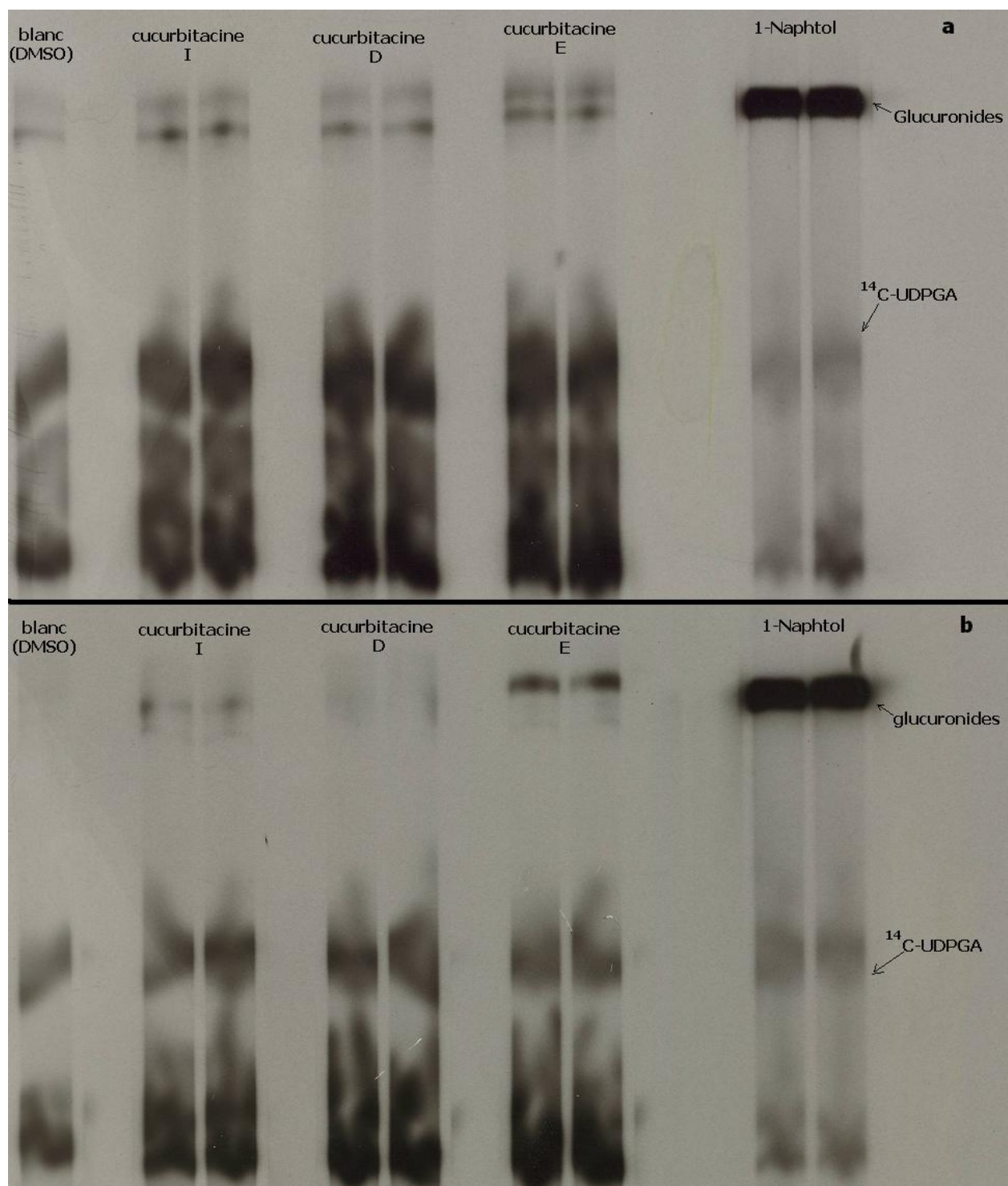


Figure 33 : Autoradiogramme d'une chromatographie sur couche mince après glucuronocouplage des cucurbitacines I, D et E (1 mM) par (a) les microsomes hépatiques humains (50 µg) et (b) les microsomes hépatiques de rats (50 µg). L'UDPGA, plus polaire que les glucuronides, ne migre presque pas sur la plaque de gel de silice. Le control négatif comprend seulement du DMSO, utilisé comme véhicule pour le 1-naphtol et les cucurbitacines. Le 1-naphtol est utilisé comme substrat marqueur des UGTs des microsomes hépatiques humains et de rat.

L'activité des différentes isoformes d'UDP-glucuronosyltransférases recombinantes humaines envers les cucurbitacines I, D et E a été testée. De la famille 1A, l'UGT1A1 est l'isoforme la plus impliquée dans la glucuroconjugaison de ces substances suivie par l'UGT1A7 et l'UGT1A10. Les UGT 1A6 et 1A8 peuvent conjuguer les cucurbitacines D et E à des taux plus faibles. La famille UGT2B, à l'exception de l'UGT2B17, semble ne pas être impliquée dans le métabolisme de ces substances (**Figure 34**). A noter que nous avons vérifié que les différentes isoformes des UDP-glucuronosyltransférases étaient actives *vis-à-vis* de leurs substrats marqueurs. Cette activité était de l'ordre de 5,57 ; 1,92 ; 4,72 et 4,19 nmol/mg protéine/min pour le 1-naphtol métabolisé par l'UGT1A6, l'UGT1A7, l'UGT1A8 et l'UGT1A9, respectivement. Elle est de 0,25 ; 0,35 ; 0,03 ; 0,11 ; 0,39 et 0,52 nmol/mg protéine/min pour l'octylgallate, le 4-nitrophénol, le 4-aminobiphényle, le β -œstradiol, l'acide hyodéoxycholique et le (*RS*)-kétoprofène, respectivement. L'eugénol est glucuroconjugué par les UGT2B15 et UGT2B17 avec des activités de 8,45 et 2,59 nmol/mg protéine/min, respectivement.

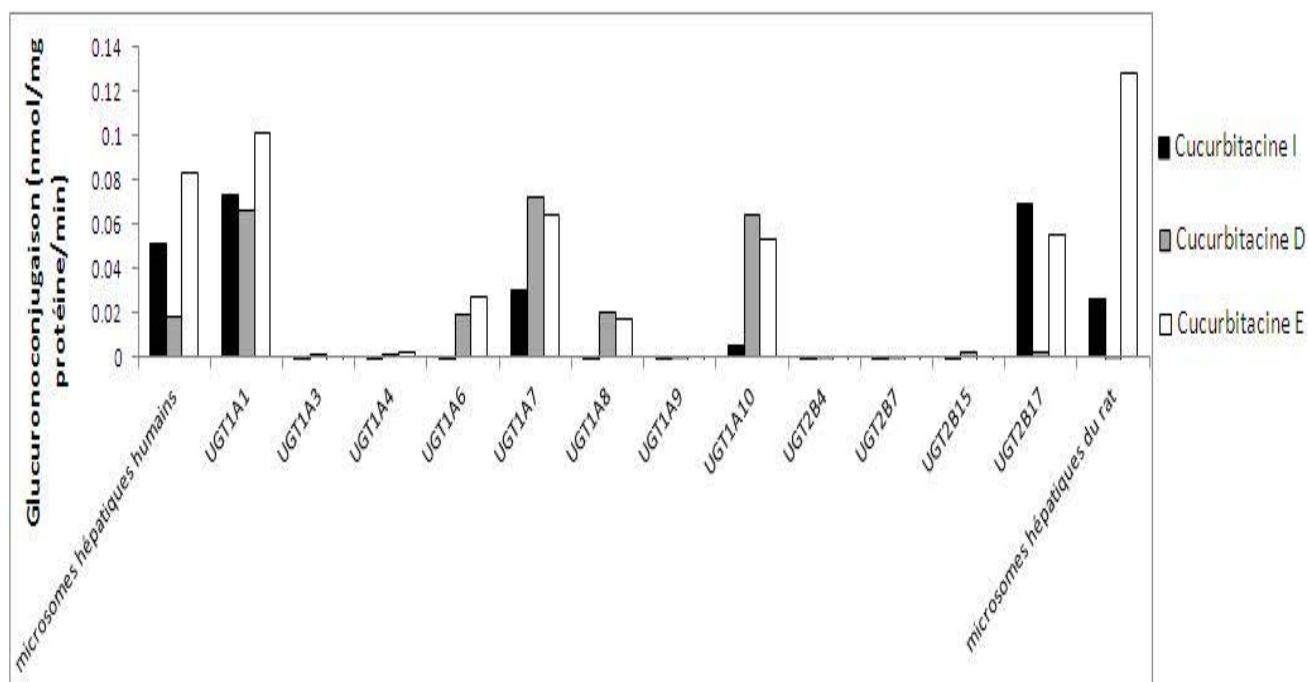


Figure 34 : Glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et par les différentes isoformes d'UGT recombinantes en présence de l'UDPGA (1 mM) et du [¹⁴C]-UDPGA à pH 7,4. Les valeurs sont la moyenne de deux essais.

Comme la cucurbitacine E est la forme acétylée de la cucurbitacine I, nous avons voulu savoir l'impact de l'hydrolyse sur la glucuroconjugaison de la cucurbitacine E en bloquant l'estérase microsomale par du PMSF. La glucuroconjugaison de la cucurbitacine E est influencée par la présence du PMSF (0,5 mM), qui est un inhibiteur puissant de la sérine protéase. Le taux de glucuroconjugaison diminue d'environ 10 fois dans les microsomes hépatiques humains après inhibition de l'hydrolyse de la cucurbitacine E et il devient environ le double dans les microsomes hépatiques de rats (**Figure 35**). Le taux de glucuroconjugaison de la cucurbitacine E en absence du PMSF le plus élevé par rapport à celui en présence de PMSF revient au fait que le PMSF inhibe l'hydrolyse de la cucurbitacine E en cucurbitacine I dans les microsomes hépatiques humains. Par conséquent, en absence du PMSF, le taux de glucuroconjugaison correspond à la somme de la glucuroconjugaison de la cucurbitacine E et de la cucurbitacine I alors qu'en présence de PMSF, il correspond à la glucuroconjugaison de la cucurbitacine E seule. Comme attendu, la glucuroconjugaison du 1-naphtol n'a pas été influencée par la présence du PMSF dans le milieu réactionnel. Le PMSF n'exerce pas donc un pouvoir inhibiteur sur l'action des UGTs.

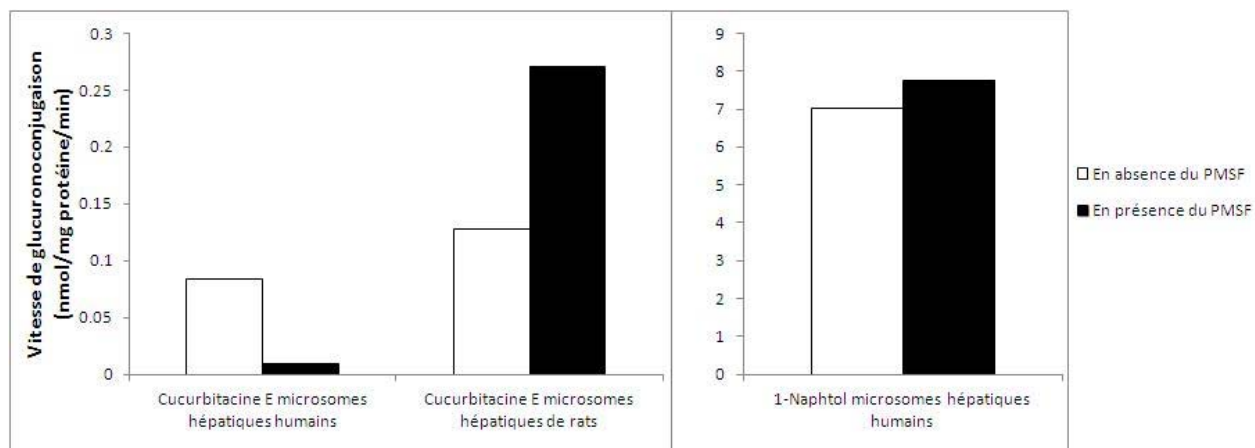


Figure 35 : Glucuroconjugaison du 1-naphtol et de la cucurbitacine E (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et de rats en présence et en absence de PMSF (0,5 mM). Les valeurs sont la moyenne de deux essais.

Des études cinétiques ont été ensuite réalisées pour la glucuroconjugaison des cucurbitacines. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk (**Figure 36**) ont

permis de calculer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} pour les cucurbitacines I, D et E. Les résultats montrent que la cucurbitacine E possède plus d'affinité pour les UGTs des microsomes hépatiques humains que les cucurbitacines D et I. Cette affinité est 27 fois plus grande que celle de la cucurbitacine D et 52 fois plus grande que celle de la cucurbitacine I. L'efficacité des enzymes dans la glucuroconjugaison des cucurbitacines (V_{max}/K_m) augmente avec l'hydrophobicité de ces substances (tableau 6).

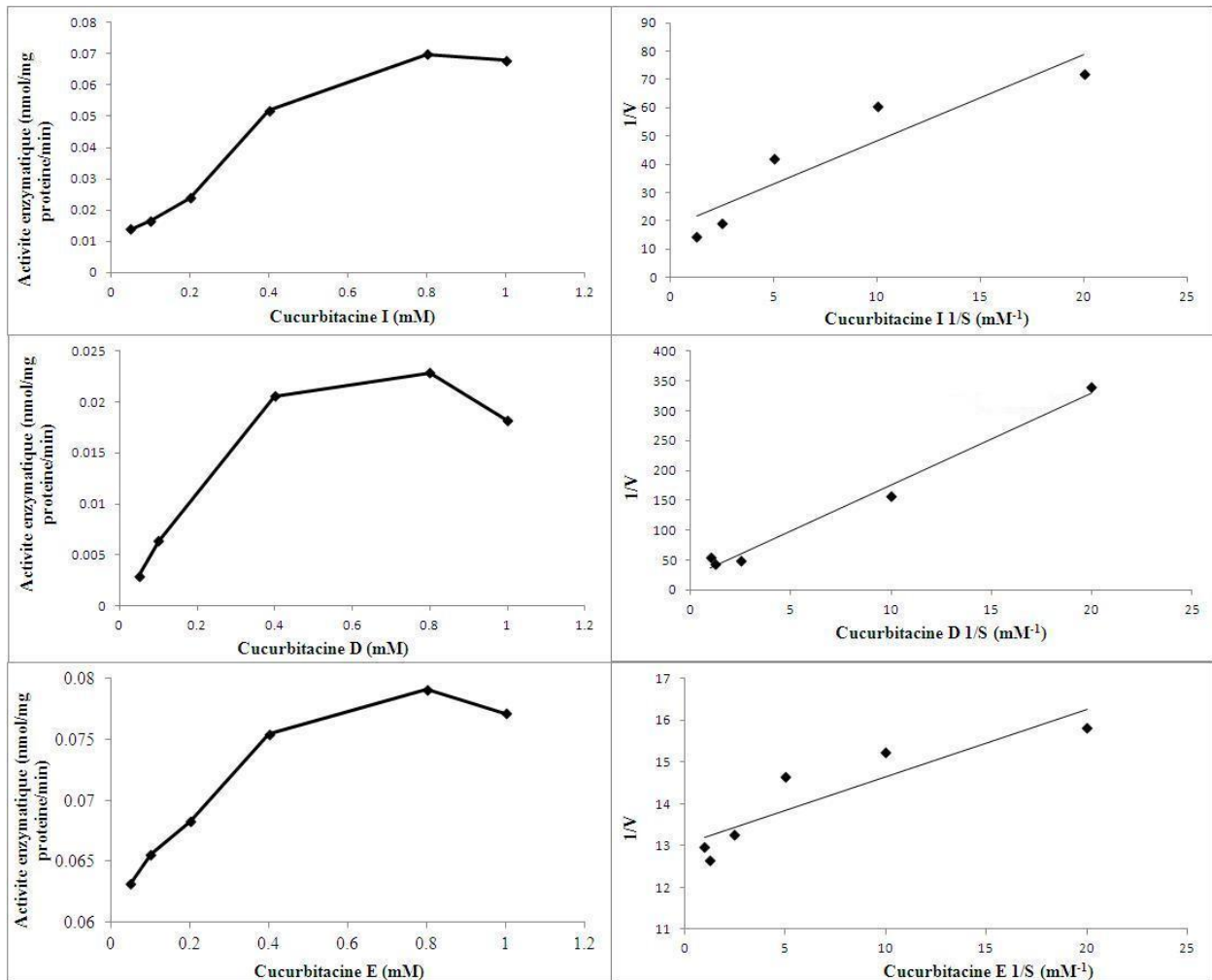


Figure 36 : Cinétiques de la réaction de glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E par les microsomes hépatiques humains. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk de cette réaction ont permis de calculer les constantes cinétiques (K_m 0,700 ; 0,370 et 0,013 mM, V_{max} 0,132 ; 0,035 et 0,077 nmol/min/mg protéine, respectivement). Les valeurs présentées sont la moyenne de deux essais.

Tableau 6 : Paramètres cinétiques de la glucuroconjugaison des cucurbitacines I, D et E par les microsomes hépatiques humains. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont calculés d'après les données de la **Figure 36**.

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (nmol/mg protéines/min)	V_{max}/K_m (nl/mg/min)
Cucurbitacine I	0,699 ± 0,289	0,1323 ± 0,031	0,189
Cucurbitacine D	0,370 ± 0,187	0,035 ± 0,008	0,095
Cucurbitacine E	0,013 ± 0,005	0,077 ± 0,003	5,715

4.2.3.1.1.2 Glucuroconjugaison de l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol

Des substances triterpéniques cycliques dont les structures sont apparentées à celles des cucurbitacines comme l'érythrodiol, l'acide oléanolique et l'acide ursolique ont été ensuite sélectionnées et leur glucuroconjugaison a été étudiée afin de la comparer à celle des cucurbitacines.

Les acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol sont glucuroconjugés par les microsomes hépatiques humains et plus particulièrement par les UGTs recombinantes humaines UGT1A1, UGT1A3 et UGT1A4. Cette glucuroconjugaison est très faible voire négligeable avec les autres UGT de la famille 1A. Les UGTs recombinantes de la famille UGT2B ne semblent pas être impliquées dans la glucuroconjugaison de ces substances à l'exception des UGT2B4 et UGT2B7 capables de glucuroconjuguer l'érythrodiol (**Figure 37**).

Des études cinétiques ont été ensuite réalisées pour leur glucuroconjugaison. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk (**Figure 38**) ont permis de calculer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} pour l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol (**tableau 7**). Les résultats montrent que l'acide ursolique possède plus d'affinité pour les UGTs des microsomes hépatiques humains que les autres substances. Cette affinité est 10 fois plus grande que celle de l'érythrodiol et 2 fois plus grande que celle de l'acide oléanolique (**tableau 7**).

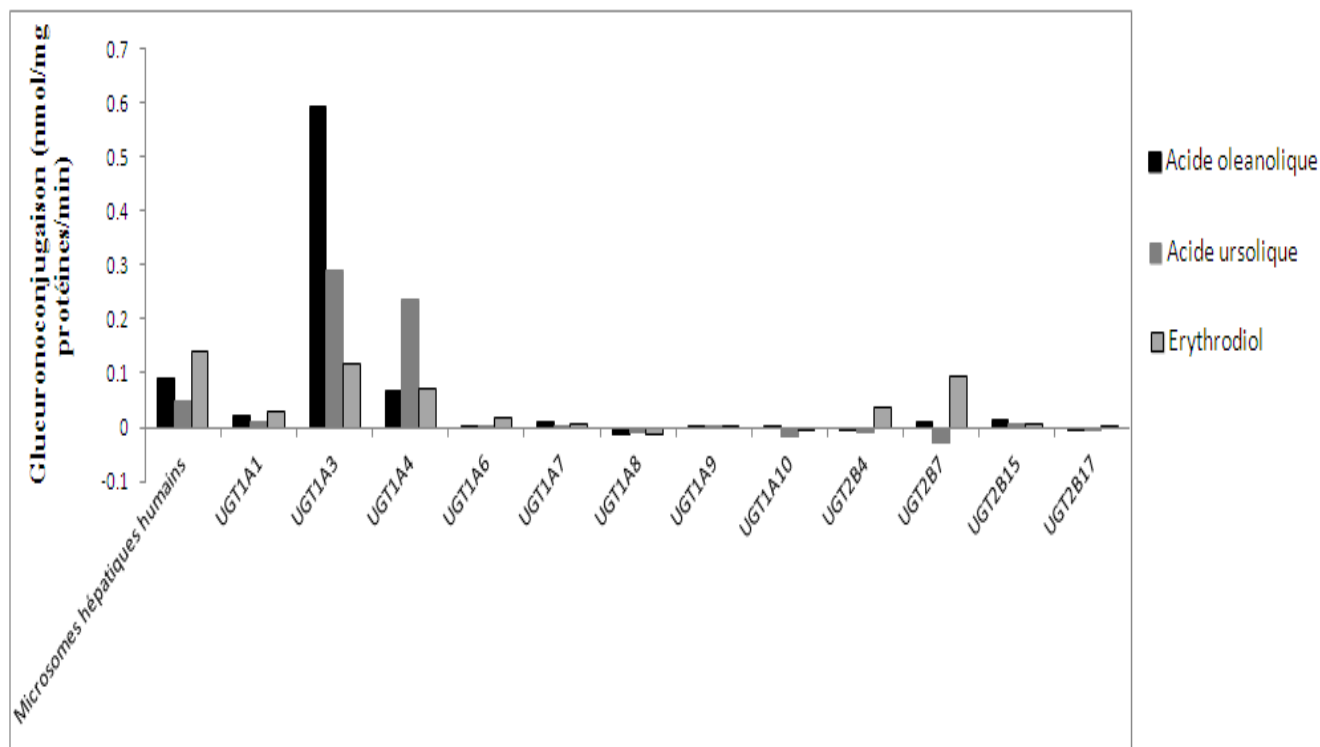


Figure 37 : Glucuronoconjugaison des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et les différentes isoformes d'UGT en présence de l'UDPGA (1 mM) et du [¹⁴C]-UDPGA à pH 7,4. Les valeurs présentées sont la moyenne de deux essais.

4.1.3.1.2 Glucuronoconjugaison des substances phénoliques

4.2.3.1.2.1 Glucuronoconjugaison de l'acide *p*-hydroxybenzoïque et des parabènes

Des substances à structure phénolique comme l'acide *p*-hydroxybenzoïque et ses dérivés les méthyl-, éthyl-, propyl-, butyl- et benzyl-parabènes ont été aussi sélectionnées dans ma thèse afin d'étudier leur glucuronoconjugaison. Les parabènes au contraire de l'acide *p*-hydroxybenzoïque sont activement glucuronoconjugués par les microsomes hépatiques humains et les isoformes des UDP-glucuronosyltransférases, les UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17 (**Figure 39**). Une incubation à pH plus acide (Tris-maléate pH 6,5) n'a pas permis d'augmenter la glucuronoconjugaison de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (résultats non montrés).

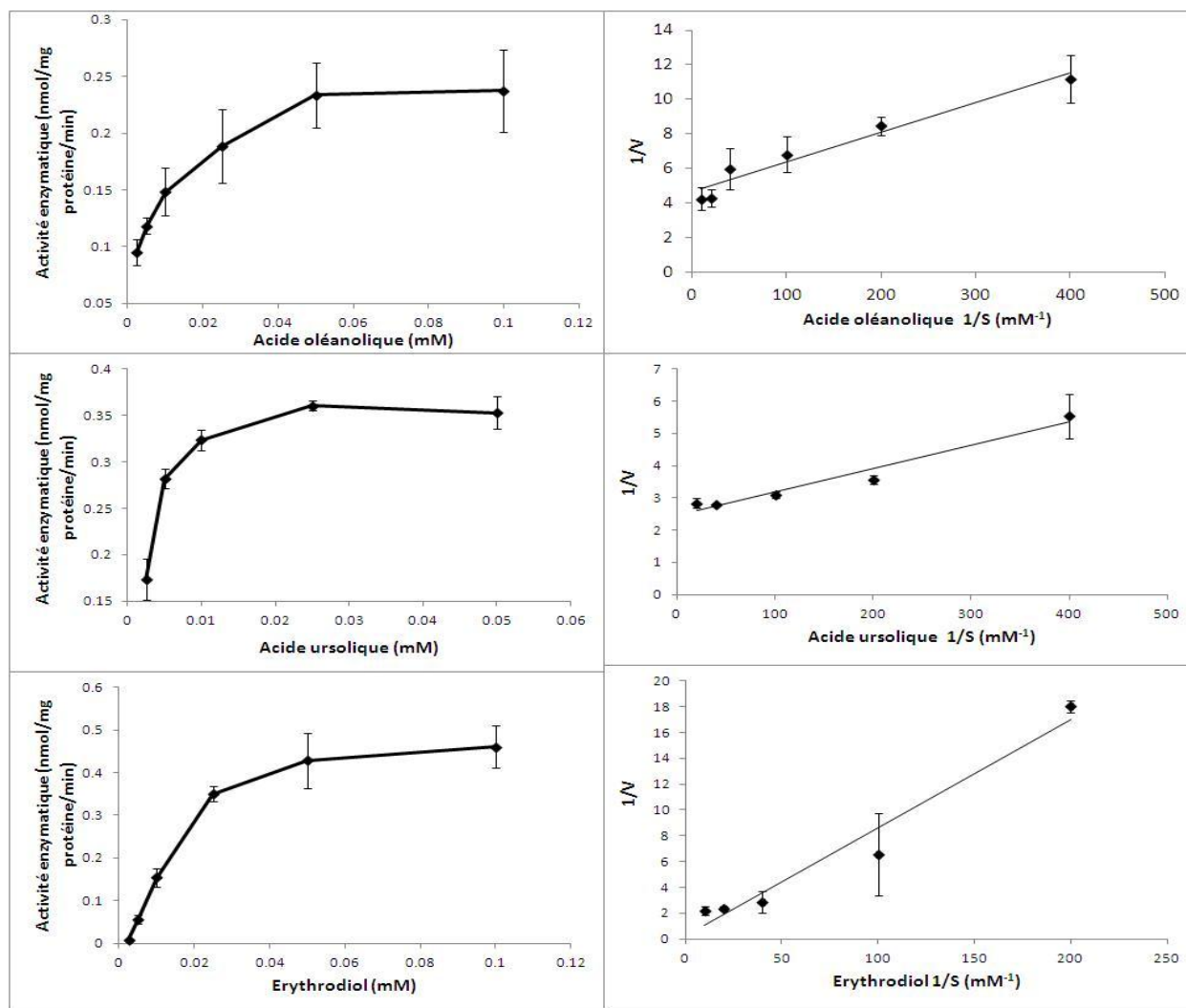


Figure 38 : Cinétiques de la réaction de glucuroconjugaison de l'acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol par les microsomes hépatiques humains. Les représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk de cette réaction ont permis de calculer les constantes cinétiques (K_m 5,3 ; 2,4 et 26,4 μM , V_{max} 0,246 ; 0,388 et 0,620 nmol/min/mg protéine, respectivement). Les valeurs présentées sont la moyenne \pm SE de trois essais.

Tableau 7 : Paramètres cinétiques de la glucuroconjugaison des acide oléanolique, acide ursolique et érythrodiol par les microsomes hépatiques humains. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été calculés d'après les données de la **Figure 38**.

Substrat	K_m (μM)	V_{max} (nmol/mg protéines/min)	V_{max}/K_m (nl/mg/min)
Acide oléanolique	$5,3 \pm 1$	$0,246 \pm 0,012$	46,41
Acide ursolique	$2,4 \pm 0,6$	$0,388 \pm 0,020$	161,67
Erythrodiol	$26,4 \pm 9,7$	$0,620 \pm 0,087$	23,48

La glucuroconjugaison de l'acide *p*-hydroxybenzoïque et des parabènes a été ensuite testée en présence de 1mM PMSF afin d'évaluer l'influence des estérases sur cette réaction enzymatique. Le PMSF ne présente à cette concentration aucune influence sur la glucuroconjugaison des 1-naphtol, acide *p*-hydroxybenzoïque, méthyl-, propyl- et butyl-parabène. Par contre, une augmentation significative est observée avec les éthyl- et benzyl-parabène en présence du PMSF (**Figure 40**).

Des études cinétiques sont alors réalisées pour leur glucuroconjugaison par les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9 étant une des isoformes les plus impliquées dans le métabolisme des parabènes. Au contraire de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, les représentations graphiques de la vitesse initiale maximale de la glucuroconjugaison des parabènes par les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9 suivent le modèle Michaelis-Menten (**Figure 41**) et ont permis de calculer les paramètres cinétiques de cette réaction (**Tableau 8**). Les calculs de K_m et V_{max} ont été réalisés en utilisant le logiciel *SigmaPlot 9.0* 2004.

La quantité de l'acide *p*-hydroxybenzoïque glucuroconjugué par les microsomes hépatiques humains est négligeable (**Figure 39**). Pour cela on n'a pas obtenu une représentation graphique correcte de la vitesse de la glucuroconjugaison en fonction des différentes concentrations de l'acide.

Plus K_m diminue, plus l'affinité des microsomes pour les substrats augmente. On remarque que K_m diminue en allant du méthyl- au propyl- parabènes puis augmente dans le cas du butylparabène. Donc l'affinité des microsomes augmente en passant du méthyl- vers le propyl-parabènes puis diminue avec le butylparabène.

Les K_m de l'UGT1A9 *vis-à-vis* du méthylparabène et du butylparabène sont supérieurs à ceux des microsomes. Par conséquent, les microsomes hépatiques humains présentent plus d'affinité pour ces substrats que l'UGT1A9. Pour les autres parabènes, les affinités sont presque identiques (**Tableau 8**).

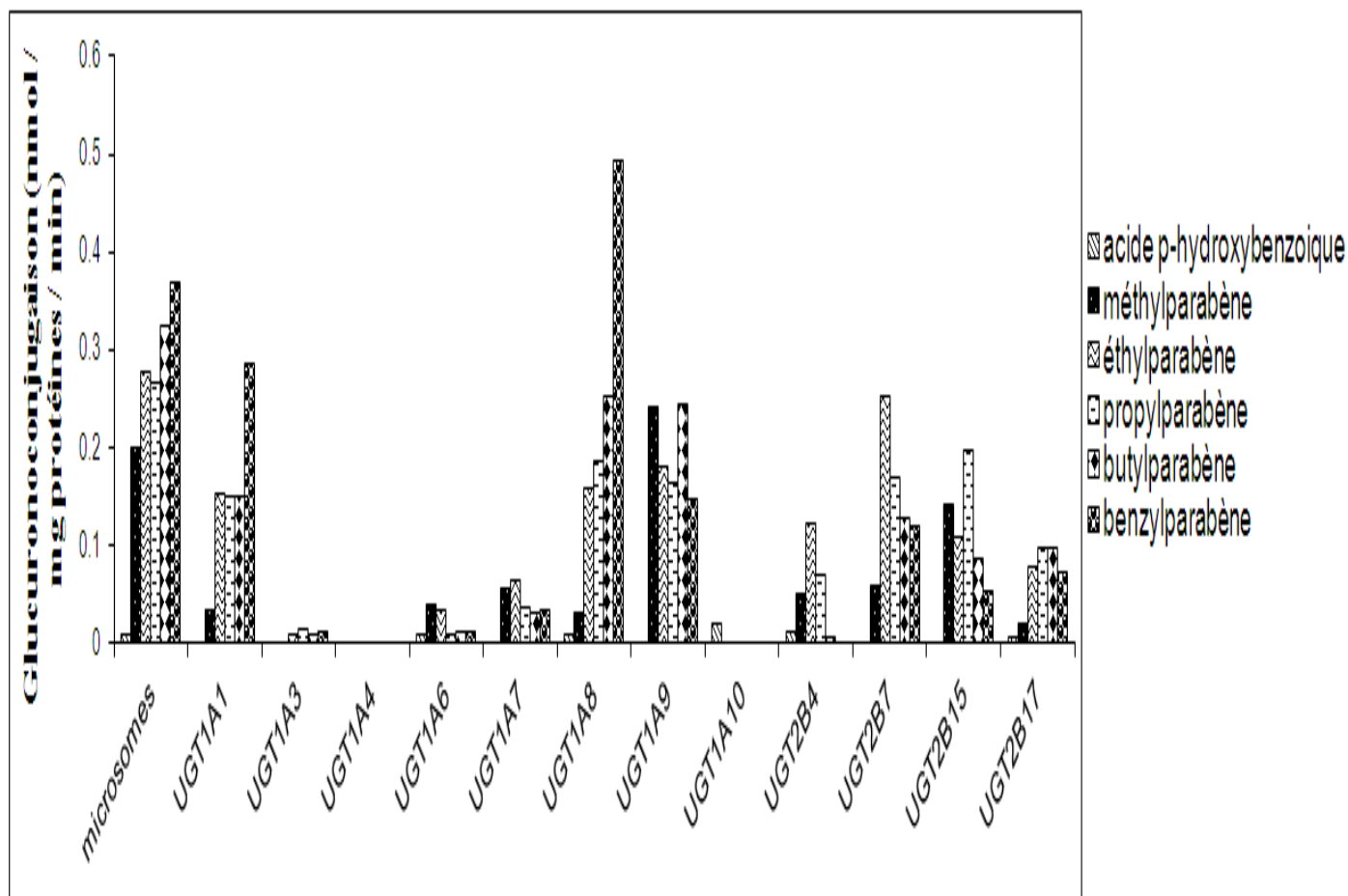


Figure 39 : Glucuroconjugaison de l'acide *p*-hydroxybenzoïque et des parabènes (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et les différentes isoformes d'UGT en présence de 100 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ et 5 mM de l'acide UDP-glucuronique. Les activités de glucuroconjugaison sont la moyenne de deux essais.

4.2.3.1.2.2 Glucuroconjugaison de l'acide caféique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol

Des substances naturelles, de structure phénolique apparentée à celle des parabènes comme le tyrosol, le 4-hydroxytyrosol et l'acide caféique, ont été sélectionnées afin d'étudier leur glucuroconjugaison et de la comparer à celle des parabènes. Les résultats montrent que ces substances sont activement glucuroconjuguées par les microsomes hépatiques humains. Les UGTs de la famille 1A sont particulièrement impliquées, plus principalement les UGT1A6 et UGT1A9 suivi par les et UGT1A10, UGT1A8, UGT1A1 et UGT1A7. L'UGT1A3 est capable de glucuroconjuguer l'acide caféique et le tyrosol mais pas le 4-hydroxytyrosol. Le 4-

hydroxytyrosol est activement glucuroconjugué par les UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17. Le tyrosol est activement glucuroconjugué par l'UGT2B17 et l'acide caféique par les UGT2B15 et UGT2B17 (**Figure 42**). Dans le cas de l'hydroxytyrosol, deux taches radioactives de glucuronides ont été repérées sur le film après migration. Ils pourraient correspondre à la formation de deux glucuronides distincts ou à celle d'un diglucuronide. Ces spots ont été moins intenses dans le cas de l'acide caféique et du tyrosol qui possèdent également plusieurs sites de glucuroconjugaison (**Figure 43**).

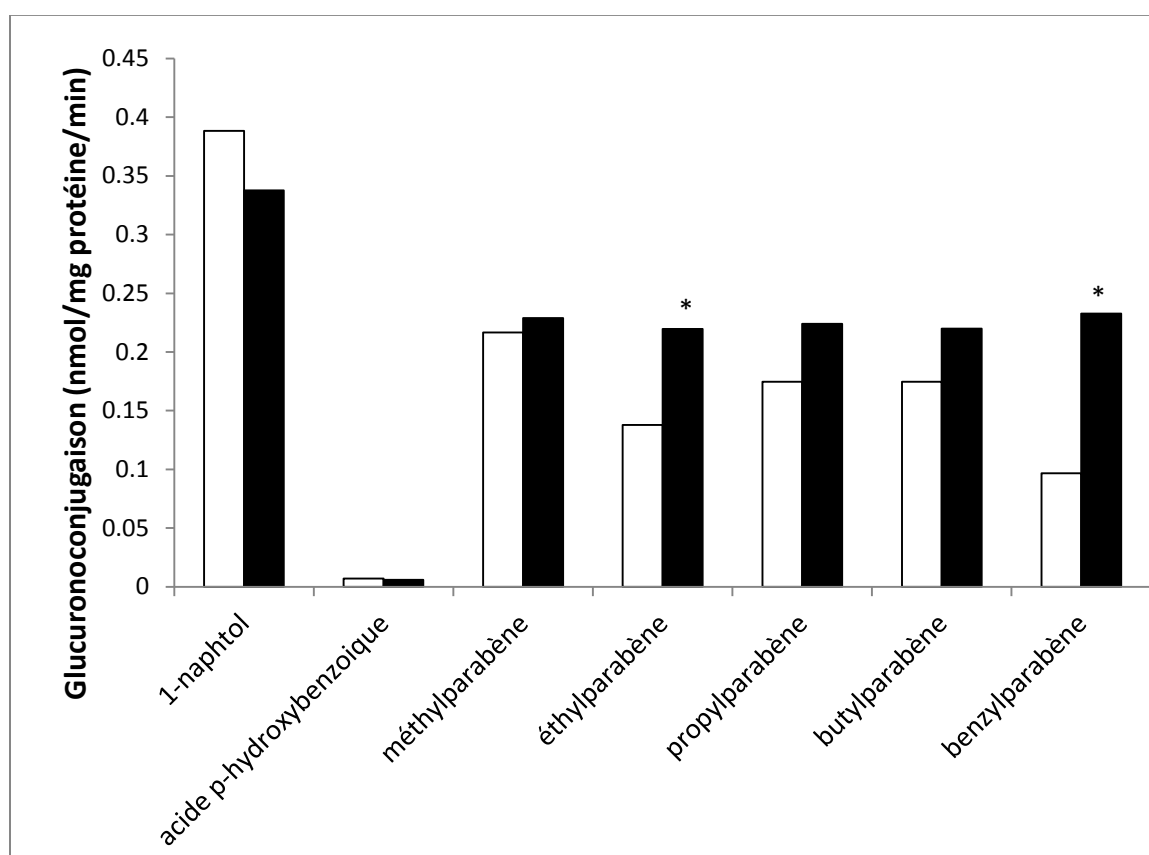


Figure 40 : Glucuroconjugaison des parabènes par les microsomes hépatiques humains en présence (noir) ou en absence (blanc) de PMSF (1 mM). Le 1-naphthol est utilisé comme control positif. Les valeurs sont la moyenne de deux essais. * $p < 0,05$, différence significative avec la glucuroconjugaison en absence de PMSF.

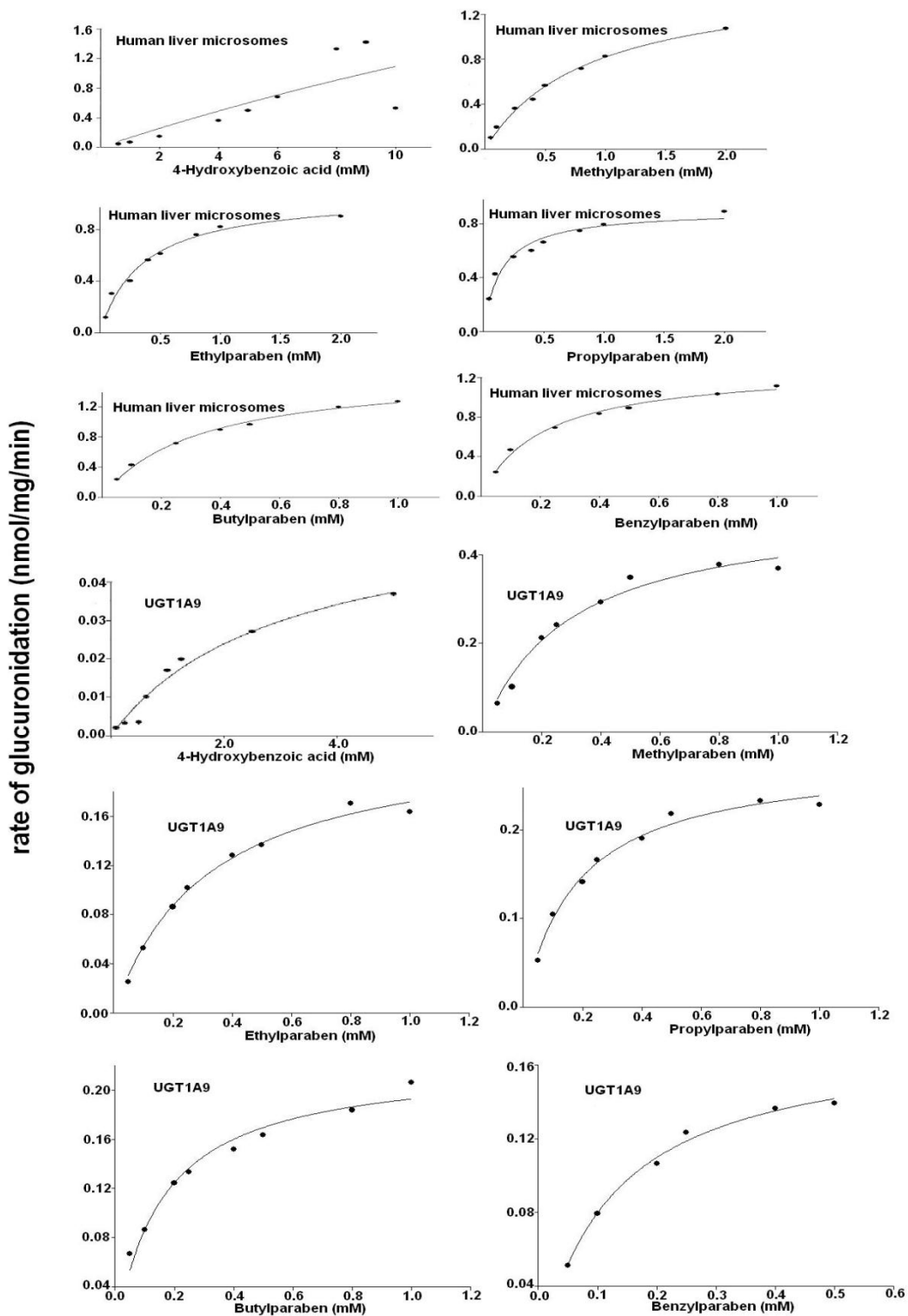


Figure 41 : Représentations graphiques des cinétiques de la glucuroconjugaison de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène et benzylparabène par les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9 à différentes concentrations de substrats. Les valeurs sont la moyenne de trois essais.

Tableau 8 : Valeurs de K_m et V_{max} de la glucuronocouplage des parabènes et de l'acide *p*-hydroxybenzoïque par les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été calculés d'après les données de la Figure 41.

Substrat	V_{max} (nmol/min/mg protéine)			K_m (mM)			V_{max} / K_m nl/min/mg protéine		
	Microsomes hépatiques humains		UGT1A9	Microsomes hépatiques humains		UGT1A9	Microsomes hépatiques humains		UGT1A9
	En présence du PMSF	En absence du PMSF		En présence du PMSF	En absence du PMSF		En présence du PMSF	En absence du PMSF	
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	0,66±0,30	0,098±0,01	0,084±0,02	39,51±21,8	8,02 ±1,17	24,12±9,73	0,017	0,012	0,003
Méthylparabène	0,70±0,02	0,62±0,01	0,98±0,12	0,23±0,02	0,298±0,02	1,28±0,25	3,08	2,08	0,76
Ethylparabène	0,41±0,01	0,51±0,01	0,26±0,01	0,18±0,02	0,28±0,02	0,21±0,04	2,29	1,85	1,19
Propylparabène	0,36±0,02	0,50±0,03	0,40±0,03	0,31±0,05	0,46±0,07	0,34±0,06	1,14	1,08	1,16
Butylparabène	0,70±0,03	0,72±0,02	0,43±0,02	0,15±0,03	0,19±0,02	0,35±0,05	4,56	3,83	1,23
Benzylparabène	0,64±0,03	0,64±0,03	0,20 ±0,01	0,097±0,02	0,13±0,02	0,18±0,04	6,57	4,74	1,14

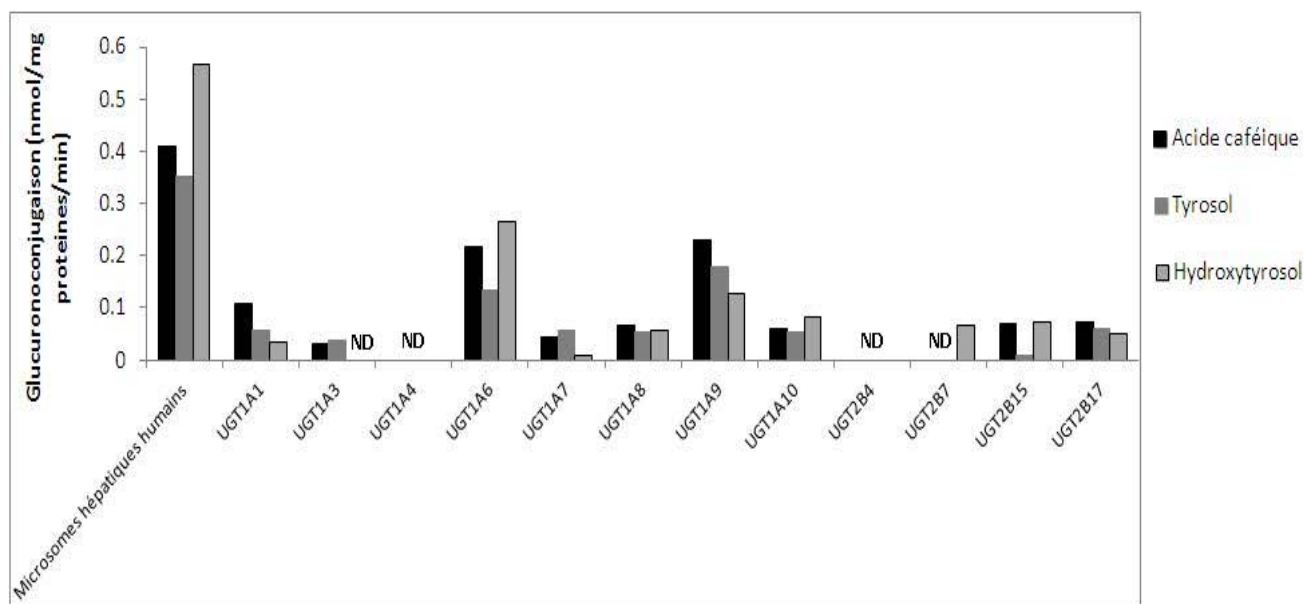


Figure 42 : Glucuroconjugaison de l'acide caféique, tyrosol et 4-hydroxytyrosol (1 mM) par les microsomes hépatiques humains et par les différentes isoformes d'UGT en présence de l'UDPGA (1 mM) et du [¹⁴C]-UDPGA à pH 7,4. Les valeurs présentées sont la moyenne des deux essais. ND = non détectable.

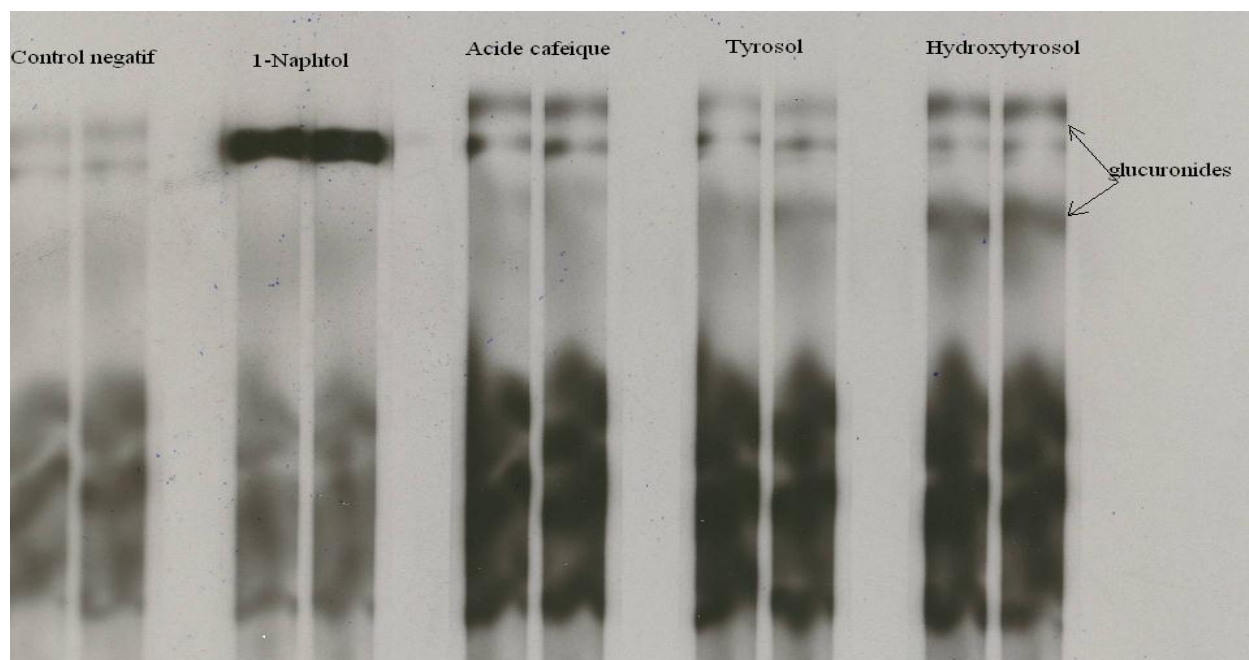


Figure 43 : Autoradiographie d'un chromatogramme après glucuroconjugaison du 1-naphtol, de l'acide caféique, du tyrosol et de l'hydroxytyrosol (1 mM) par les microsomes hépatiques humains (50 µg). L'UDPGA, plus polaire que les glucuronides, ne migre presque pas sur la plaque de gel de silice. Le contrôle négatif comprend seulement du DMSO, utilisé comme véhicule pour le 1-naphtol et les cucurbitacines. Le 1-naphtol est utilisé comme substrat marqueur des UGTs des microsomes hépatiques humains.

4.1.3.2 Acétylation des cucurbitacines I, D et E

L'acétylation des cucurbitacines I, D et E a été étudiée en incubant ces substances avec les microsomes hépatiques humains en présence de l'acétyl-CoA et du DTNB.

L'acétylation du chloramphénicol, utilisé comme substrat marqueur pour les acétyltransférases des microsomes hépatiques humains, est de 0,27 nmol/mg protéines/min. Par contre, les cucurbitacines I, D et E ne sont pas acétylées par les enzymes des microsomes hépatiques humains dans les mêmes conditions d'incubation.

L'analyse des milieux d'incubation par spectrométrie de masse montre un pic de masse en mode négatif correspondant à la cucurbitacine I à laquelle est ajoutée une molécule d'HCl ($m/z = 549,26$). Par contre aucun pic de masse correspond à la cucurbitacine I acétylée dont $m/z = 555$ ou à la cucurbitacine I acétylée à laquelle est ajoutée une molécule d'HCl et dont $m/z = 590$. Aucune différence majeure n'est obtenue entre les spectres du blanc et de l'essai où l'acétylcoenzyme A est substitué par du tampon pH 7,4 dans le blanc.

La même expérience d'acétylation après analyse par spectrométrie de masse a été répétée en présence et en absence du PMSF afin de voir si la fonction ester des métabolites acétylées est hydrolysée par les estérases des microsomes ou des cytosols hépatiques humains. De même, le spectre de masse montrait le pic de la cucurbitacine I toute seule avec les masses :

- 1) $m/z = 513,2782$ correspondant à la masse de la cucurbitacine I ionisée en mode négatif,
- 2) $m/z = 549,2587$ correspondant à la masse de la cucurbitacine I ionisée en mode négatif à laquelle est ajoutée une molécule HCl et
- 3) $m/z = 559,2825$ correspondant à la masse de la cucurbitacine I ionisée en mode négatif à laquelle est ajoutée une molécule d'acide formique HCOOH.

Cependant, aucun pic correspondant à la cucurbitacine I acétylée n'est détecté dans les deux séries d'essais en présence et en absence du PMSF (**Figure 44**).

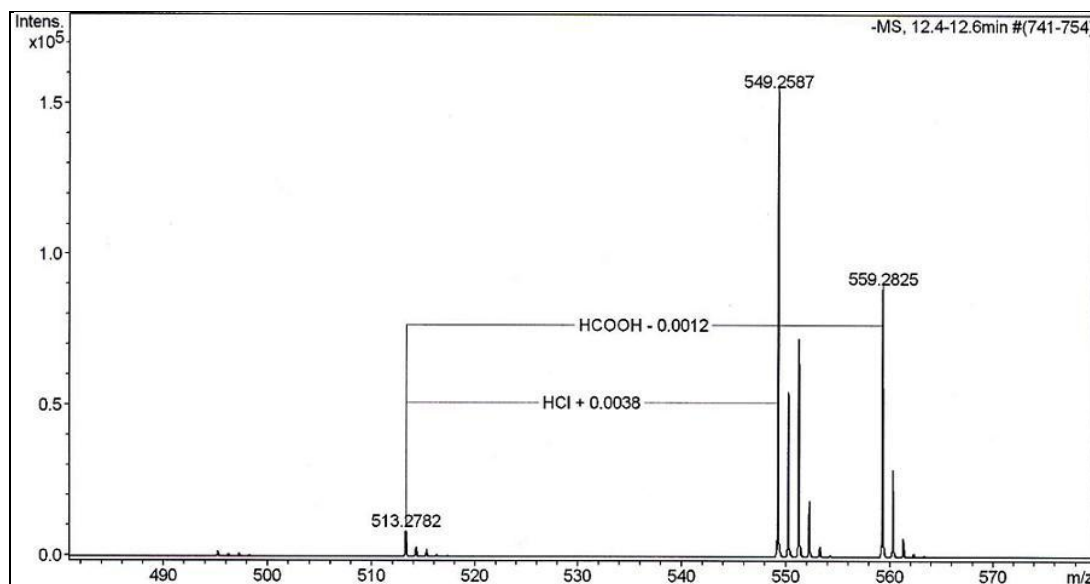


Figure 44 : Spectre de masse de l'acétylation de la cucurbitacine I par les microsomes et les cytosols hépatiques humains en présence et en absence du PMSF.

4.1.3.3 Glucosylation des cucurbitacines I, D et E

La glucosylation des cucurbitacines I, D et E par les microsomes et les cytosols hépatiques humains a été étudiée soit par méthode radioactive en présence d'UDP-glucose radiomarqué, soit après séparation des constituants du milieu par chromatographie sur couche mince (**Madina et al., 2007**). Aucun métabolite n'a été décelé dans nos conditions expérimentales (résultats non montrés).

Afin de confirmer ces résultats, une analyse de glucosylation de la cucurbitacine I, prise comme substrat type, par les microsomes ou les cytosols hépatiques humains en présence de l'UDP-glucose a été réalisée par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ne montrent que le pic de masse en mode négatif correspondant à la cucurbitacine I à laquelle est ajoutée une molécule d'HCl ($m/z = 549,26$). Par contre aucun pic de masse correspondait à la cucurbitacine I glucosylée dont $m/z = 675$ ou à la cucurbitacine I glucosylée à laquelle est ajoutée une molécule d'HCl et dont $m/z = 710$ (**Figure 45**). Aucune différence majeure n'a été obtenue entre les spectres du blanc et de l'essai.

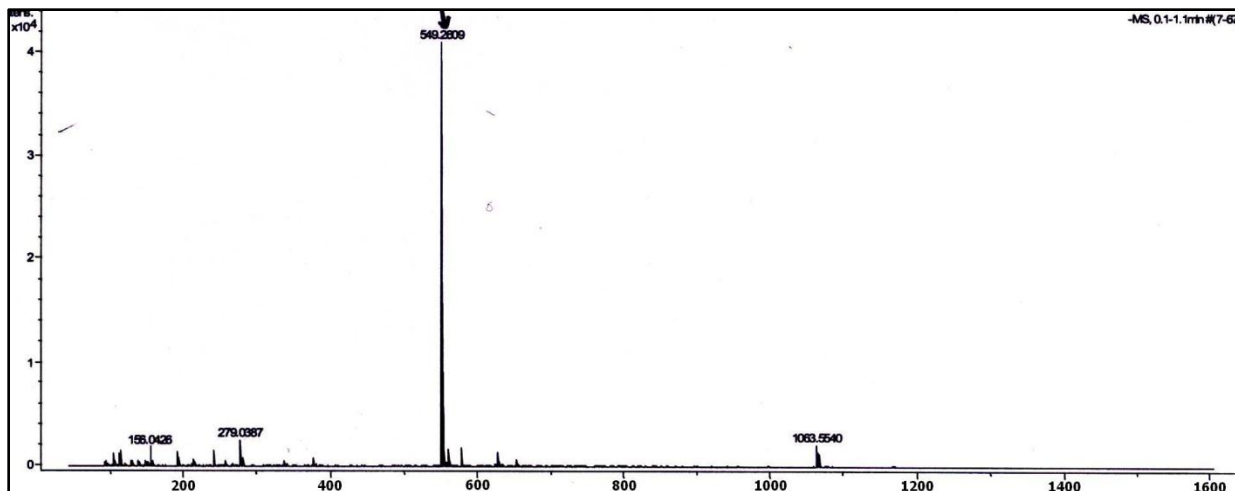


Figure 45 : Spectre de masse de la glycosylation de la cucurbitacine I par les microsomes ou les cytosols hépatiques humains.

4.1.3.4 Sulfoconjugaison des cucurbitacines I, D et E

La sulfoconjugaison des cucurbitacines I, D et E par les cytosols hépatiques humains est mesurée en présence du ^{35}S -PAPS et du DTT. Le 1-naphtol, utilisé comme substrat marqueur pour les sulfotransférases des cytosols hépatiques humains, est activement métabolisé. Son taux de conjugaison est de $0,7 \pm 0,074$ nmol/mg protéine/min. La cucurbitacine I présente le taux de sulfoconjugaison le plus élevé et qui est deux fois plus important que celui de la cucurbitacine E. La cucurbitacine D est la moins sulfonconjuguée avec un taux treize fois moins important que celui de la cucurbitacine I (**Figure 46**).

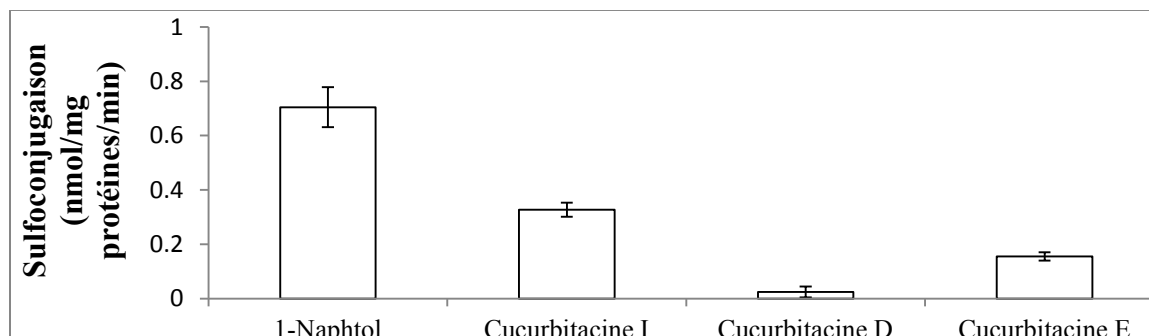


Figure 46 : Sulfoconjugaison du 1-Naphtol (substrat marqueur) et des cucurbitacines I, D et E (0,2 mM) par les protéines cytosoliques (0,25 mg/mL) et en présence du DTT (1 mM) et du tampon tris-HCl (pH 7,4). Les valeurs sont la moyenne \pm SE de trois essais.

4.2 Cytotoxicité des cucurbitacines et effet anticancéreux

Après avoir étudié la biotransformation *in vitro* des substances naturelles chez l'homme, plus particulièrement, les cucurbitacines, une étude de leur effet cytotoxique a été menée sur des lignées cellulaires cancéreuses SW 1353 de chondrosarcome. La cytotoxicité entraînant l'inhibition de la prolifération et la mortalité cellulaires a été étudiée en appliquant l'essai MTT et l'effet apoptotique de ces substances a été évalué par l'essai TUNEL.

4.2.1 Viabilité des cellules et essai MTT

La viabilité des cellules de la lignée SW 1353 de chondrosarcome a été mesurée en appliquant l'essai MTT. Cet essai a été réalisé en incubant les chondrosarcomes pendant 6 ; 12 ; 24 ; 46 et 70h en présence des cucurbitacines I, D et E aux différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 et 100 μM) afin de déterminer les valeurs « IC₅₀ ». Les valeurs IC₅₀ ont été déterminées à partir du pourcentage des cellules vivantes en fonction des Log des concentrations des cucurbitacines.

Le blanc a été considéré comme l'application de l'essai MTT en absence des cellules. Le témoin négatif est l'application de l'essai MTT en présence des cellules et du milieu de culture en présence du DMSO et en absence des cucurbitacines et de la cytochalasine D.

Les résultats montrent que la cytotoxicité des différentes cucurbitacines est dose- et temps-dépendants. Le DMSO présente un effet prolifératif important sur la lignée SW 1353 en le comparant avec le milieu de culture en absence du DMSO (résultats non montrés). Les cucurbitacines I et D (1 μM) induisent 86 et 94% de mortalité, respectivement après 46h de traitement (**Figure 47 a, b**).

La cucurbitacine E ne présente aucun effet cytotoxique à 0,1 et 1 μM (**Figure 47 c**). Les cucurbitacines I, D et E sont capables d'entraîner la mortalité totale des cellules à 10 μM et après 46h de traitement (**Figure 47 a, b et c**). La cytochalasine D (4 μM) induit la mortalité de 40 et 66% des cellules après 46 et 70h de traitement (**Figure 47 d**). Par conséquent, les deux cucurbitacines I et D présentent un effet cytotoxique plus important que celui de la cytochalasine

D. Le mélange de cucurbitacines glycosylées entraîne 51 et 90% de mortalité des cellules après 24 et 70h de traitement, respectivement (**Figure 47 d**).

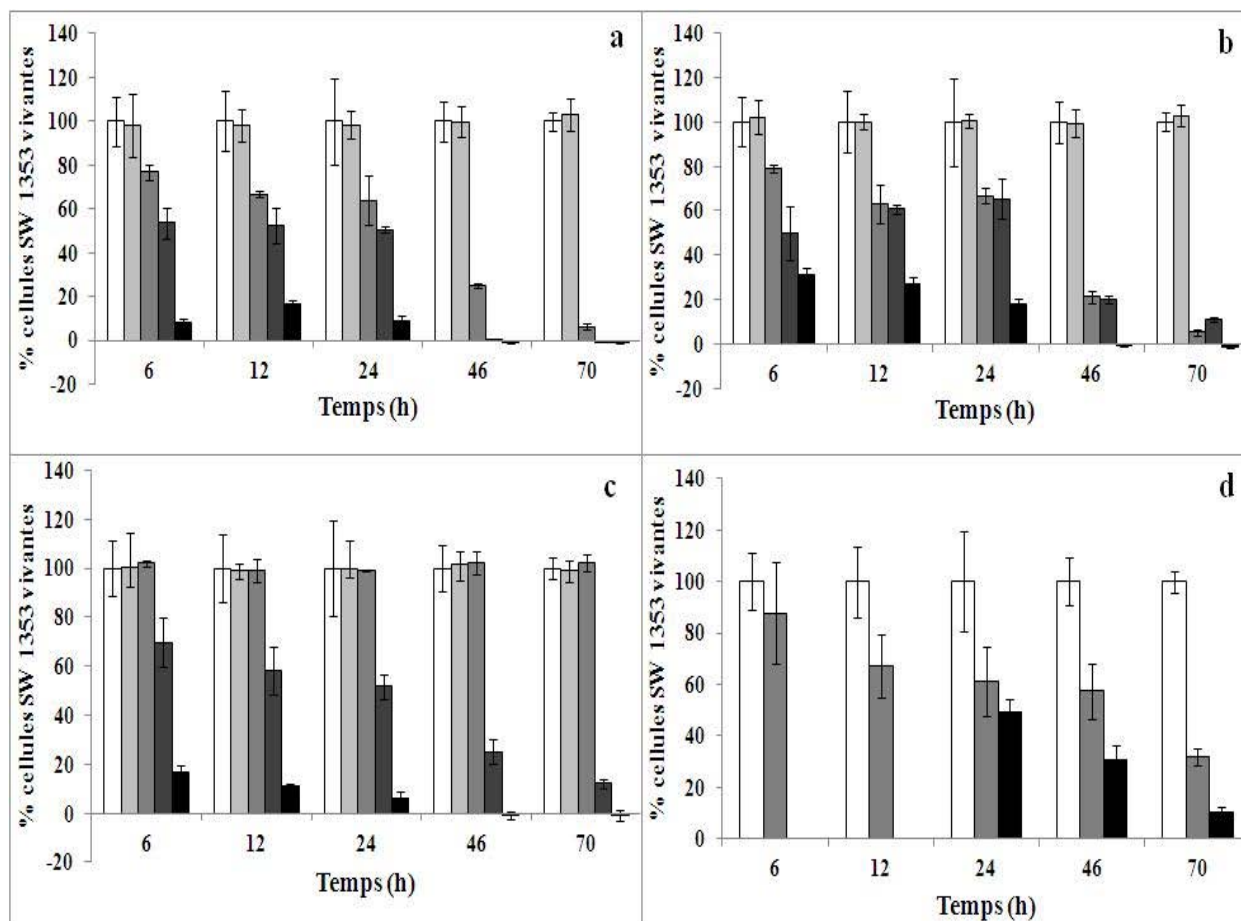


Figure 47 : Pourcentage de cellules vivantes des cellules SW 1353 évalué par l'essai MTT après 6 ; 12 ; 24 ; 46 et 70h de traitement par (a) □ 0,1; ■ 1; ■ 10 et ■ 100 µM cucurbitacine I, (b) □ 0,1; ■ 1; ■ 10 et ■ 100 µM cucurbitacine D, (c) □ 0,1; ■ 1; ■ 10 et ■ 100 µM cucurbitacine E et (d) ■ 4 µM de cytochalasine D et ■ un mélange de cucurbitacines glycosylées. Le témoin négatif □ étant pris comme l'incubation des cellules SW 1353 en présence du milieu de culture + DMSO (0,1% de concentration finale). Les pourcentages des cellules présentées sont la moyenne ± SE de trois répétitions.

Les valeurs IC_{50} qui représentent la mortalité de 50% des cellules ont été calculées d'après les valeurs de la figure 44 en traçant les droites des pourcentages des cellules vivantes en fonction des Log des concentrations des cucurbitacines pour les temps de 6 ; 12 et 24h de traitement. Les trois cucurbitacines présentent des cytotoxicités presque similaires (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Valeurs IC₅₀ (µM) des cucurbitacines I, D et E envers les chondrosarcomes SW 1353 calculées d'après les droites des « % cellules vivantes = f (Log [concentration cucurbitacine]) » pour les temps de traitement de 6 ; 12 et 24h. Les valeurs sont la moyenne ± SE de trois essais et ont été calculées d'après les données de la **Figure 47**.

Cucurbitacine	Traitement (h)		
	6	12	24
I	7,93 ± 2,86	8,31 ± 2,27	5,06 ± 1,96
D	16,48 ± 10,14	13,03 ± 3,56	13,14 ± 1,27
E	13,55 ± 6,01	12,65 ± 5,87	9,16 ± 1,53

4.2.2 Effet apoptotique et essai TUNEL

L'essai TUNEL a été réalisé dans le but de déterminer le mécanisme de cytotoxicité de ces substances sur la lignée SW 1353 tout en évaluant les coupures au niveau des ADN de ces cellules par une méthode fluorescente après l'incorporation des nucléotides EdUTP.

Par l'application de l'essai TUNEL, nous avons pu réaliser deux études : une étude quantitative dans laquelle nous avons compté le nombre de cellules apoptotiques (**Figure 48**) et une étude qualitative dans laquelle nous avons photographié les puits des cellules traitées et non traitées après le marquage fluorescent de leurs noyaux. Le marquage des noyaux est en bleu et celui des ADN coupés est en vert (**Tableau 10**). L'étude quantitative montre que les cucurbitacines I, D (0,1 µM) et E (0,1 et 1 µM) n'exercent pas une activité apoptotique sur les cellules SW 1353 après 24h de traitement. A 1 et 10 µM, environ la totalité des cellules commence le phénomène d'apoptose. Le DMSO ne présente aucun effet apoptotique sur les cellules SW 1353. Le mélange de cucurbitacines glycosylées (4 et 10 µM) et la cytochalasine D (4 µM) entraînent l'apoptose de ces cellules après 24h de traitement (**Figure 48**).

Une étude qualitative a été aussi effectuée après 12h de traitement et a montré qu'à partir de 1 µM les cucurbitacines présentent des activités apoptotiques à l'exception de la cucurbitacine E qui ne la montre qu'à 10 µM. Le mélange des dérivés glycosidiques induit également l'apoptose après 12h de traitement (**Tableau 10**).

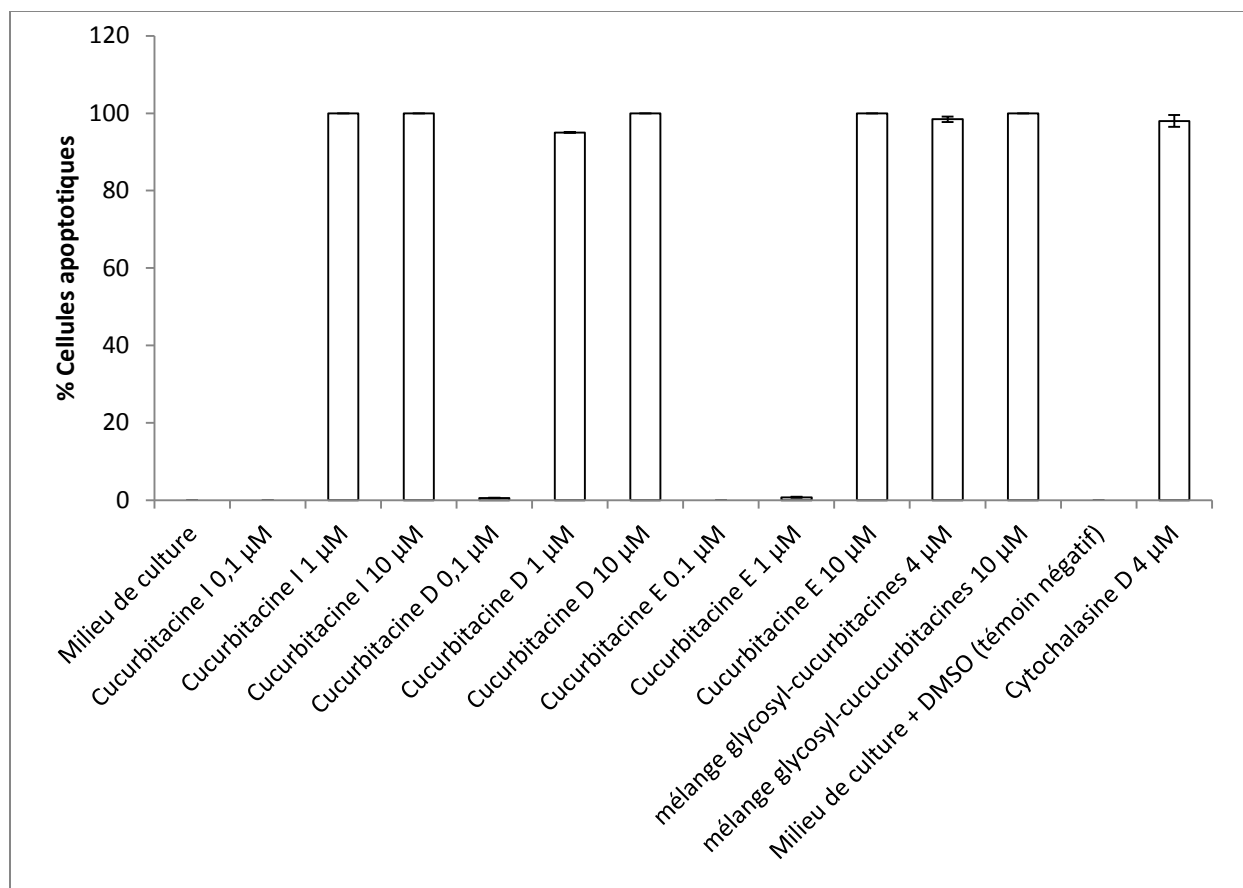
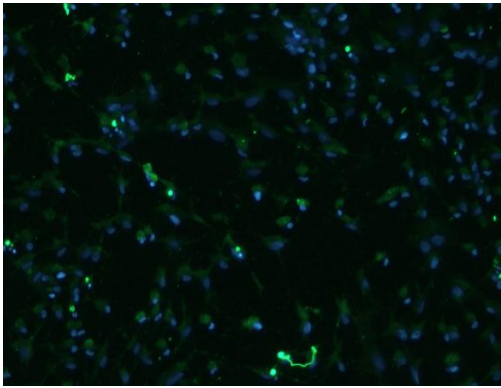
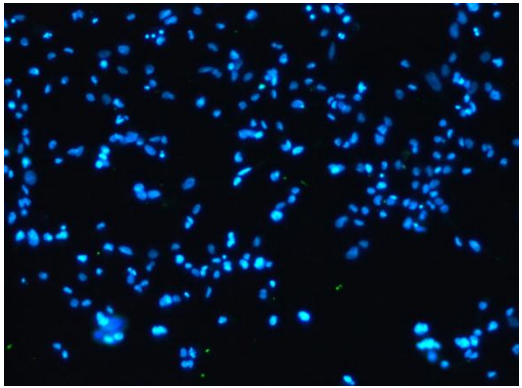
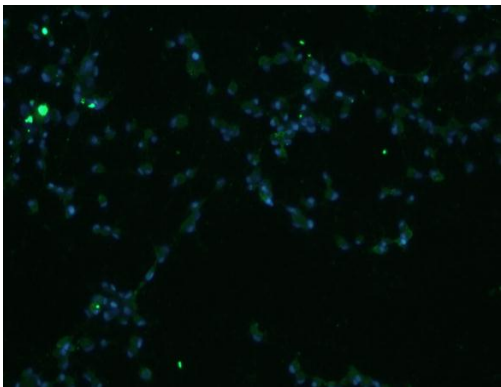
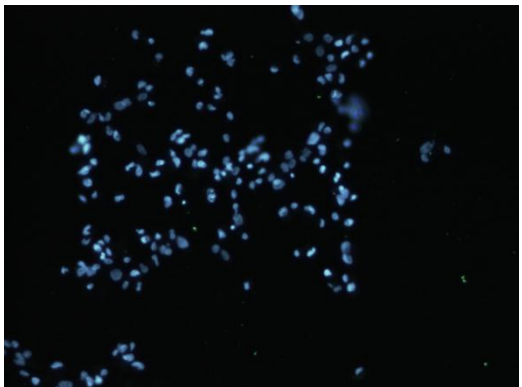
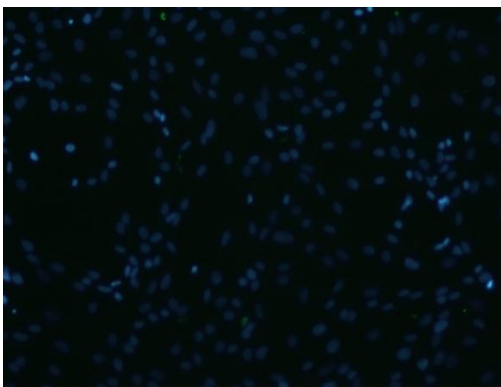
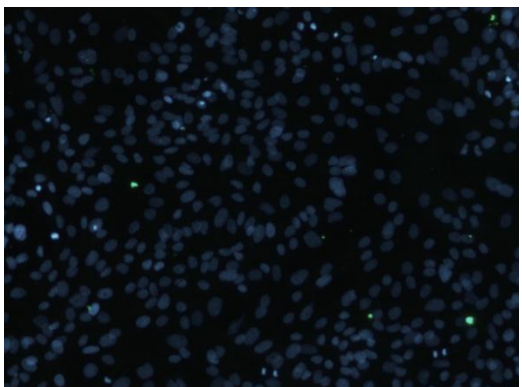
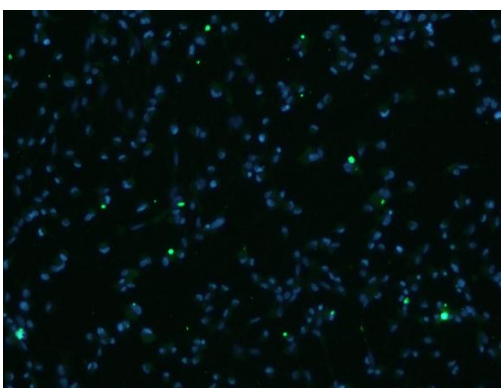
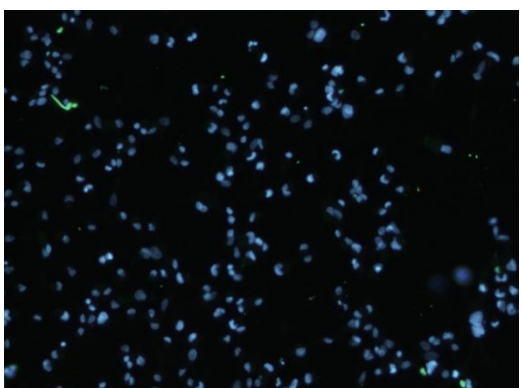
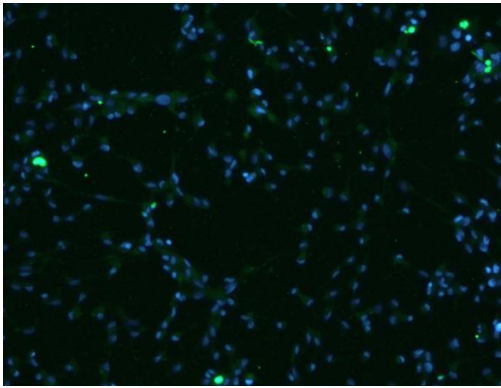
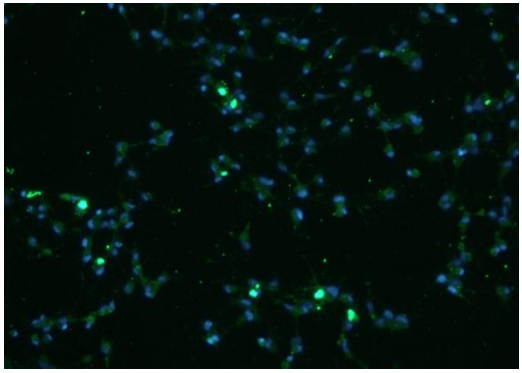
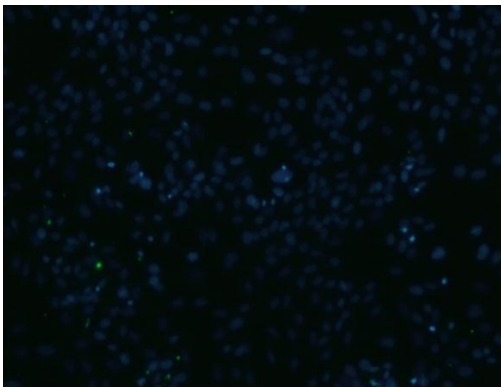
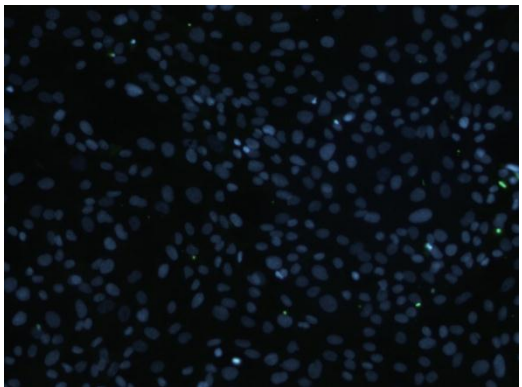
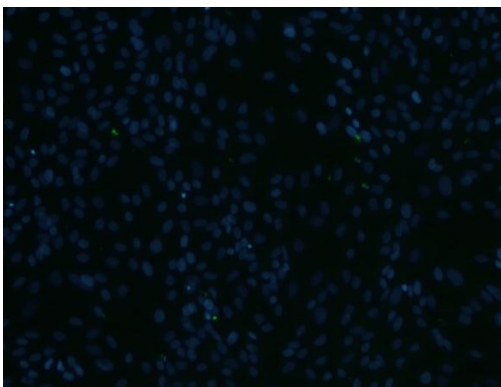
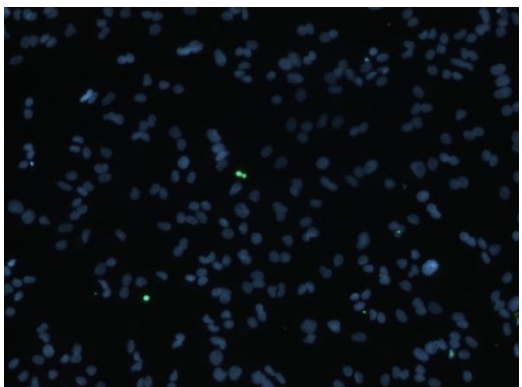
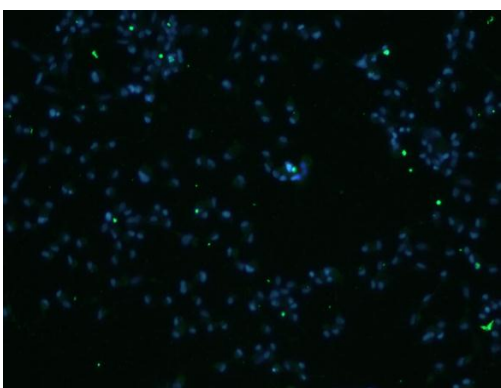
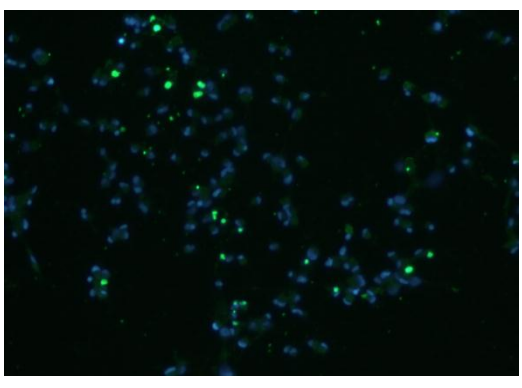


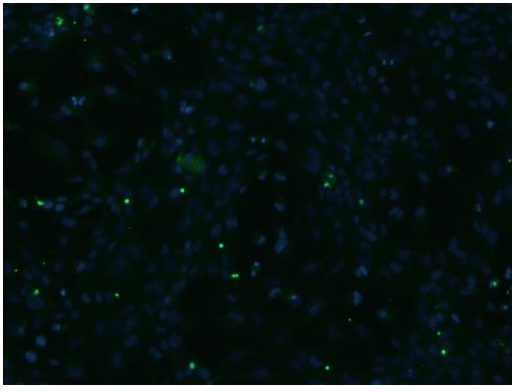
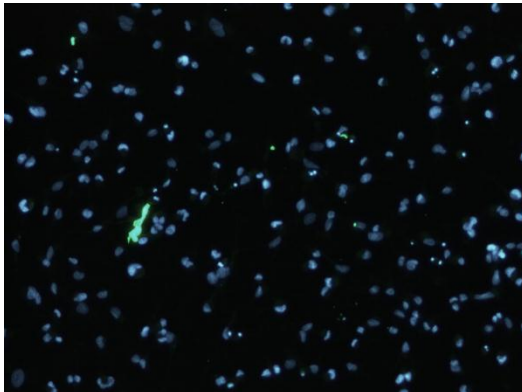
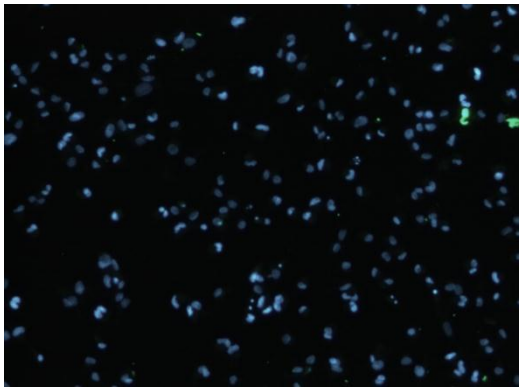
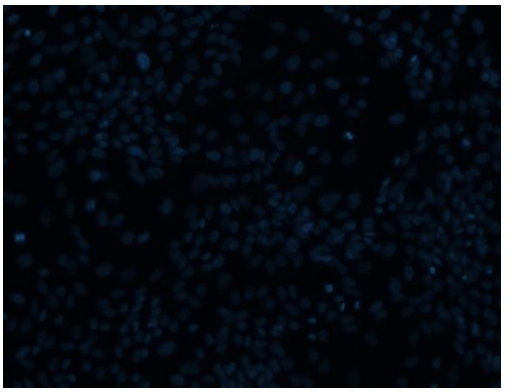
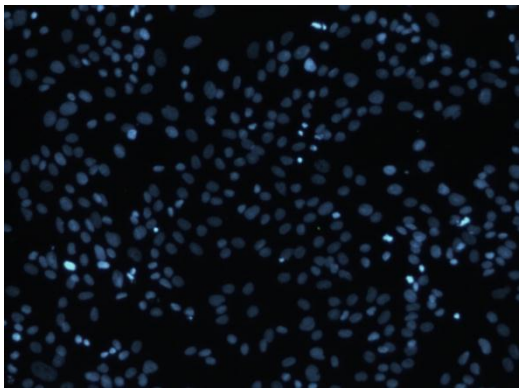
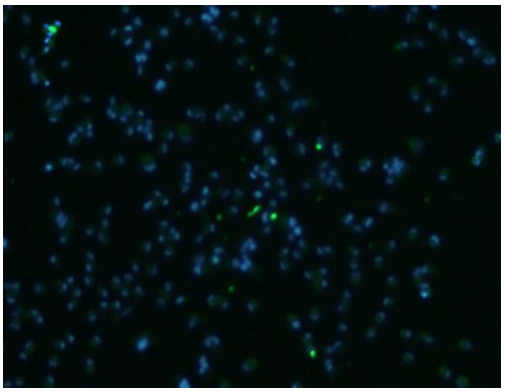
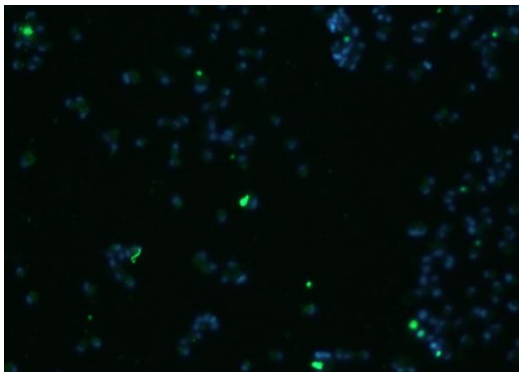
Figure 48 : Pourcentage des cellules apoptotiques calculé après l'application de l'essai TUNEL et après 24h de traitement par 0,1 ; 1 et 10 μM des cucurbitacines I, D et E, 4 et 10 μM d'un mélange de cucurbitacines glycosylées, DMSO (0,1% v/v) et 4 μM de cytochalasine D. Les valeurs sont la moyenne des trois essais.

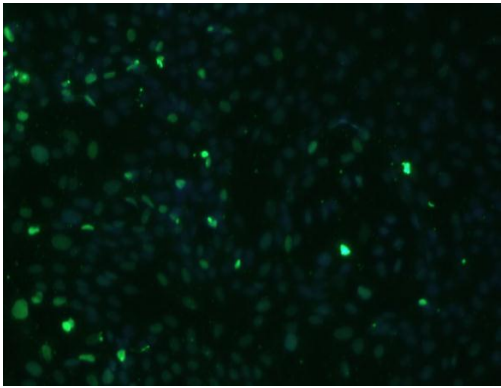
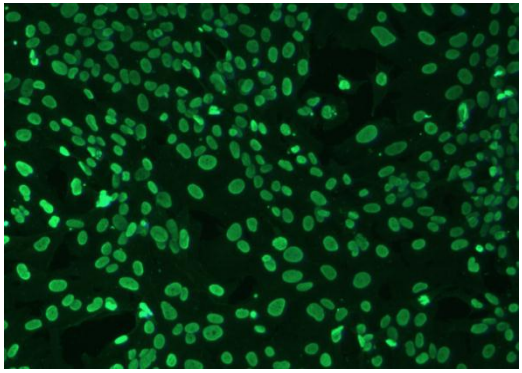
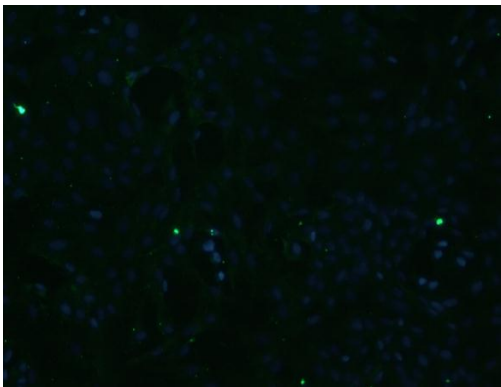
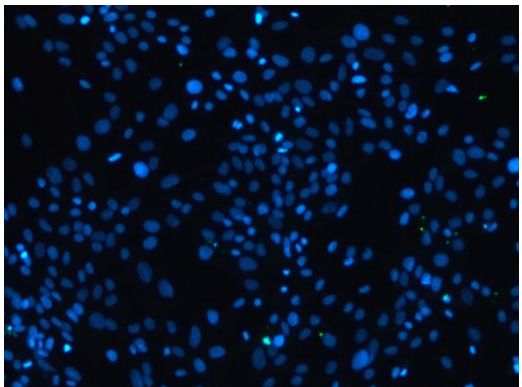
Tableau 10 : Apoptose des cellules SW 1353 évaluée par essai TUNEL et photographiée par microscopie fluorescente. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu et les coupures au niveau des ADNs sont marquées en vert.

Substrat	12 h	24h
Cuc I 0,1 μM		

<p>Cuc I 1 μM</p>		
<p>Cuc I 10 μM</p>		
<p>Cuc D 0,1 μM</p>		
<p>Cuc D 1 μM</p>		

<p>Cuc D 10 μM</p>		
<p>Cuc E 0,1 μM</p>		
<p>Cuc E 1 μM</p>		
<p>Cuc E 10 μM</p>		

<p>Cuc glyc 4 μM</p>		
<p>Cuc glyc 10 μM</p>	<p>N/A</p>	
<p>DMSO (Témoin négatif)</p>		
<p>Cytocha lasine D 4 μM</p>		

DNase		
Milieu de culture		

Chapitre 5 : Discussion

Chapitre 5: Discussion

Les plantes : source inépuisable de substances pharmacologiquement actives.

Les végétaux constituent une source principale de substances naturelles à propriétés biologiques et pharmacologiques multiples et qui ont été utilisées depuis des siècles dans le traitement de nombreuses maladies. Ces substances d'origine naturelle continuent à avoir une place majeure en pharmacologie surtout dans la recherche de nouvelles thérapeutiques afin d'améliorer les traitements disponibles sur le marché ou de développer de nouveaux traitements. En effet, leur structure chimique sert de base pour la conception de nouvelles molécules synthétiques. Ainsi, la moitié des médicaments introduits sur le marché pendant les trente dernières années dérivent directement ou indirectement de petites molécules biogéniques. Leur utilisation en pharmacologie est assez courante comme ces substances sont produites en grande quantité dans le royaume végétal et à cause de la grande diversité des molécules actives qu'on peut trouver dans la nature (Vuorelaa *et al.*, 2004). De nombreuses substances naturelles de structure chimique triterpénique ont montré un pouvoir antiprolifératif sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et leur utilisation en chimiothérapie en tant qu'agents antinéoplasiques est prometteuse. Parmi ces substances triterpéniques nous citons les membres des cycloartane, lupane, ursane, oléanane, friedelane, dammarane et cucurbitacines (Setzer and Setzer, 2003). D'autres substances naturelles, comme les phytoestrogènes qui regroupent les flavonoïdes et le resvératrol, qui sont produites à partir de l'acide cinnamique dans les plantes, (Soleas *et al.*, 1997) présentent des activités antioxydantes et sont capables de se lier au récepteur aryle hydrocarbure (AhR) et antagonisent ainsi l'effet toxique de la dioxine et des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Casper *et al.*, 1999 ; Gasiewicz and Rucci, 1991 ; Lu *et al.*, 1995). La liaison du resvératrol au récepteur AhR entraîne la diminution de l'expression de l'Il-1 β et par la suite la diminution de l'expression de la cyclooxygénase-2 (Casper *et al.*, 1999 ; Subbaramaiah *et al.*, 1999), ce qui pourrait expliquer son activité anti-inflammatoire. L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de la structure de ces substances et de leur capacité à interagir avec les biomembranes et à les pénétrer. Les trois groupes fonctionnels responsables de l'activité antioxydante des flavonoïdes et de leur capacité à piéger les radicaux libres sont la structure catéchol (*o*-dihydroxy) du noyau B, la double liaison au niveau C2-C3 conjuguée avec la fonction 4-oxo et la présence des groupements hydroxyyles en C-3, C-5 et C-7 (Montesinos *et al.*,

1995 ; Saija *et al.*, 1995). Cependant, malgré les effets bénéfiques des phytoestrogènes, qui sont des composés polyphénoliques naturels, ces substances peuvent présenter des effets toxiques chez l'homme comme ils sont des œstrogénomimétiques et peuvent entraîner des modifications directes ou indirectes des activités du récepteur œstrogénique. Les modifications sont directes suite à leur interaction avec le récepteur œstrogénique, et indirectes suite à leur interaction avec les facteurs de transcription comme le récepteur aryle hydrocarbure (AhR) ou à travers la modulation de la transcription des enzymes métaboliques essentielles dans la synthèse et le métabolisme de l'œstrogène (Shanle and Xu, 2011). La plupart des phytoestrogènes présentent cependant des affinités beaucoup plus faibles que l'œstrogène naturel *vis-à-vis* du récepteur œstrogénique (Kuiper *et al.*, 1998). Les recherches ont montré que ces substances ont une certaine cytotoxicité et inhibent la prolifération des cancers de l'ovaire, des seins et de la prostate (Zhao and Mu, 2011).

D'autres plantes ou substances naturelles, comme le millepertuis et le jus de pamplemousse à titre d'exemple, présentent des effets bénéfiques mais peuvent moduler la toxicité de certains médicaments. Le millepertuis est une plante médicinale qui possède des effets antiviraux et antibactériens et qui est aussi utilisée dans le traitement de la dépression. L'effet antidépresseur de cette plante revient à l'hypericine qui est une substance flavonoïde (Barnes *et al.*, 2001). Le millepertuis est un puissant inducteur du cytochrome P450 CYP3A4 et du transporteur P-glycoprotéine des xénobiotiques et des médicaments situé au niveau rénal (Dürr *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2001), ce qui entraîne une réduction de l'efficacité thérapeutique des médicaments utilisant cette voie métabolique, comme par exemple les agents néoplasiques (irinotecan et imatinib mésylate), le midazolam et les contraceptifs, et ceci par excès de métabolisme et une modification de leur clairance (Mannel, 2004 ; Wang *et al.*, 2001). Le jus de pamplemousse possède des effets antigénotoxiques et antitératogéniques (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2011 ; Argüelles *et al.*, 2012). Il inhibe les activités des cytochromes P450 1A1 (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2011) et 3A4 (Bressler, 2006) ralentissant par la suite le métabolisme des substances utilisant cette voie et conduisant à des risques de surdosage. Dans d'autres cas, plus rares, on observe au contraire une diminution de la concentration de substances médicamenteuses dans le sang, ce qui nuit à l'efficacité du produit (Bressler, 2006). Il inhibe également le transporteur P-glycoprotéine affectant par la suite la clairance des médicaments (Romiti *et al.*, 2004). De nombreuses substances présentes dans le pamplemousse ont été mises en cause (Hanley *et al.*,

2011) surtout les furanocoumarines dont le noyau furane se lie d'une façon irréversible sur l'apoprotéine CYP et inhibe les activités enzymatiques (**Lin et al., 2005**).

Ces études montrent que les substances d'origine naturelle qui jouissent d'un à-priori favorable peuvent présenter des effets indésirables plus ou moins importants. C'est pourquoi il est nécessaire de caractériser leurs effets et leur devenir chez l'homme.

Ce travail de thèse a porté sur deux séries de substances naturelles qui sont les cucurbitacines et les parabènes, et sur des substances de structure chimique apparentée comme l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'érythrodiol, l'acide caféique, l'acide férulique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol. Les cucurbitacines, au contraire des dérivés glycosylés, sont des substances lipophiles de structures complexes (**Gry et al., 2006**) et qui ont un goût très amer ce qui permet de protéger les plantes contre les prédateurs. Des recherches ont montré que ces composés présentent plusieurs activités anti-inflammatoires et anticancéreuses (**Bauer et al., 2009 ; Duncan et al., 1996 ; Recio et al., 2004**). Les parabènes, de leur part, sont de structures beaucoup plus simple, leur lipophilie augmente avec la longueur de la chaîne alkyle et ils sont connus pour leurs activités antimicrobiennes et antifongiques d'où leur utilisation intense dans les procédés alimentaires et les produits cosmétologiques et pharmacologiques (**Soni et al., 2005**). L'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol possèdent des structures apparentées aux cucurbitacines et présentent des activités antifongiques, anti-inflammatoires et anti-tumorales (**Liu, 1995 ; Rodríguez- Rodríguez et al., 2004**). L'acide caféique, l'acide férulique et l'hydroxytyrosol possèdent des structures phénoliques apparentées aux parabènes. Ce sont des agents antioxydants dont l'effet revient à la présence du catéchol dans leurs structures (**Gomes et al., 2003 ; Gross,1975 ; Ortega-Gracia and Peragón, 2010**). L'utilisation de ces substances naturelles chez l'homme exige d'établir leur éventuelle toxicité ainsi que leur devenir dans l'organisme. C'est dans ce contexte que ces substances ont été étudiées.

Les cucurbitacines sont des substances cytotoxiques

Les cucurbitacines ont montré de puissants effets cytotoxiques contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (**Nakashima et al., 2010**) et des effets anti-inflammatoires contre la polyarthrite rhumatoïde (**Escandell et al., 2007**). Ces effets sont principalement dus à l'inhibition

des voies STAT-3 et IKK/NF- κ B par les cucurbitacines, ce qui entraîne une diminution de l'activité de la cyclooxygénase-2 et de l'oxyde nitrique synthétase qui sont des enzymes-clés de l'inflammation (**Lee et al., 2010**).

Du fait que l'axe de recherche de notre laboratoire porte sur le cartilage articulaire et ses pathologies, nous avons sélectionné le chondrosarcome pour tester sur une lignée cellulaire (SW 1353) l'effet de trois cucurbitacines (I, D et E) et un mélange de cucurbitacines glycosylées sur ce type de cancer. Le chondrosarcome est une tumeur rare maligne qui produit du tissu cartilagineux. La chirurgie reste le seul recours pour ces patients en impasse thérapeutique. D'où la nécessité de trouver des substances naturelles qui peuvent agir contre cette tumeur ou qui augmentent la sensibilité des cellules cancéreuses au traitement. La cytotoxicité des cucurbitacines est comparée à celle d'un médicament de référence, la cytochalasine D. La cytochalasine D présente une cytotoxicité puissante due à sa capacité à altérer les microfilaments d'actine du cytosquelette et à induire l'arrêt du cycle cellulaire à la phase de transition G1-S (entre la croissance cellulaire et la phase de réplication de l'ADN) (**May et al., 1998**). Les cucurbitacines agissent de la même manière en entraînant des altérations dans le réseau des filaments d'actine du cytosquelette et en induisant l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase S (réplication de l'ADN) (**Duncan et al., 1996 ; Haritunians et al., 2008 ; Nakashima et al., 2010**). Nos résultats sur la lignée cellulaire SW 1353 montrent que les cucurbitacines I et D sont plus toxiques que la cytochalasine D comme ils entraînent une mortalité cellulaire plus importante après 46 et 70h de traitement et ceci à des doses 4 fois moins inférieures (1 μ M pour les cucurbitacines et 4 μ M pour la cytochalasine D) (**Figure 47**). Les valeurs IC₅₀ montrent que les trois cucurbitacines I, D et E présentent environ la même toxicité malgré que la cytotoxicité des cucurbitacines D et E est légèrement inférieure et la cucurbitacine D présente la moindre cytotoxicité (**Tableau 9**).

Cela peut être dû au fait que la cucurbitacine D est la moins hydrophobe des cucurbitacines étudiées. L'indice d'hydrophobicité des cucurbitacines mesuré d'après leur temps de rétention par HPLC en phase inverse, utilisant une colonne C18 et une phase mobile constituée d'acétonitrile et d'eau conduit à D < I < E (**Figure 23**). Des études réalisées par d'autres chercheurs montrent que la cytotoxicité des cucurbitacines envers la lignée cellulaire du cancer du foie humain HepG2 augmente avec leur hydrophobicité (**Bartalis and Halaweish, 2005**).

L'insaturation de la double liaison en C1-C2 dans la cucurbitacine I et la présence d'un groupement acétyle au niveau C25 dans la cucurbitacine E augmentent leur hydrophobicité et par la suite leur cytotoxicité par rapport à la cucurbitacine D. Les substances les plus hydrophobes peuvent traverser plus facilement les membranes biologiques et arrivent plus rapidement au niveau du noyau où elles peuvent manifester leurs activités cytotoxiques en induisant l'expression des protéines responsables de la programmation de la mort cellulaire.

Les cucurbitacines I, D et E entraînent l'apoptose des cellules SW1353. L'apoptose est identifiée par les coupures générées au niveau des ADN et le rétrécissement des noyaux cellulaires. Le processus d'apoptose est observé après 12h de traitement avec 1 μM des cucurbitacines I et D et 10 μM de cucurbitacine E entraînant la mortalité totale des cellules après 46h de traitement. La cucurbitacine E ne présente aucun effet cytotoxique à des concentrations plus faibles (0,1 et 1 μM). Ceci est dû au groupe acétyle qui joue un rôle protecteur (Kwan and Luesch, 2010) et qui confère à la cucurbitacine E le rôle d'une pro-drogue. La cytotoxicité observée à 10 μM peut être donc due à l'hydrolyse de la cucurbitacine E en cucurbitacine I dans les cellules.

Nos résultats ont montré que le mélange des cucurbitacines glycosylées, comme les cucurbitacines non glycosylées, entraîne l'apoptose des cellules à 4 μM après 12h. Les dérivés glycosidiques des cucurbitacines présentent donc des effets cytotoxiques et anti-inflammatoires. En effet, une étude a montré que le mélange de cucurbitacines glycosylées se trouvant dans l'extrait butanolique de la plante *Cayaponia tayuya* présente des propriétés anti-inflammatoires et sont capables d'inhiber l'expression des enzymes iNOS et COX-2 (Aquila *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus suggèrent donc que les cucurbitacines sont de puissants agents cytotoxiques. Cependant, des études supplémentaires doivent être réalisées avant l'utilisation de ces substances dans le traitement du chondrosarcome. En particulier qu'en est-il de la toxicité sur des cellules de chondromes (tumeurs bénignes) ou sur des chondrocytes qui constituent les cellules du cartilage ?

Les cucurbitacines sont essentiellement métabolisées chez l'homme par activité estérasique, glucurono- et sulfoconjugaison

Quels sont leurs paramètres pharmacocinétiques et leurs voies de biotransformation chez l'homme ? Très peu d'études ont porté sur la biotransformation des cucurbitacines chez l'homme et le rat et jusqu'à présent aucun métabolite n'a été identifié. Une seule étude a montré que la cucurbitacine E est hydrolysée en cucurbitacine I dans le plasma humain (**Saade *et al.*, 2009**). Il est donc important d'étudier et d'identifier les voies de biotransformation des cucurbitacines afin d'évaluer leur toxicité et leur accumulation chez l'homme. Par contre, il est connu depuis longtemps que ces substances subissent plusieurs voies de métabolisme chez les plantes et les insectes comme l'acétylation, l'hydrogénation, la désaturation et la glucosylation (**Andersen *et al.*, 1988**). Nous avons voulu connaître si chez l'homme ces substances étaient métabolisées. Nous avons choisi plusieurs voies de biotransformation :

- l'acétylation et la glucosylation des cucurbitacines par analogie avec ce qui se passe chez les plantes (**Andersen *et al.*, 1988**),
- l'implication de ces voies en particulier l'hydroxylation dans le métabolisme du cholestérol surtout les cytochromes P450 qui sont responsables de la transformation du cholestérol en acides biliaires et qui métabolisent les hormones stéroïdiennes (**Chiang, 1998 ; McLean *et al.*, 2012**) de structure apparentée aux cucurbitacines et
- la présence de plusieurs groupements hydroxyles ce qui rend ces substances des substrats potentiels de la glucuronoconjugaison et la sulfoconjugaison.

De façon surprenante, aucun métabolite n'a été détecté dans nos conditions expérimentales après acétylation, déshydrogénation et glucosylation des cucurbitacines. Nous avons pris soin de vérifier que nos protocoles expérimentaux étaient valides par l'inclusion dans nos essais de substrats marqueurs. Nous avons également soumis les métabolites formés à l'analyse par spectrométrie de masse. L'hydroxylation des cucurbitacines NADPH dépendante est très faible. Par contre, le groupement acétyle de la cucurbitacine E est activement hydrolysé dans les microsomes hépatiques humains et aboutit à la production de la cucurbitacine I. Cette hydrolyse permet la réduction du taux de la cucurbitacine E de 50% après 1h d'incubation avec les microsomes hépatiques humains à pH 7,4 et elle est due à l'action des estérases microsomales. En fait, il existe deux isoformes de carboxylestérases dans les microsomes et les cytosols hépatiques humains impliquées dans l'hydrolyse des xénobiotiques et des substances endogènes

chez l'homme. Ce sont la carboxylestérase 1 et la carboxylestérase 2 (**Jewell *et al.*, 2007; Ross and Crow, 2007**). Le taux d'hydrolyse de la cucurbitacine E par les microsomes hépatiques humains est environ 16 fois plus important et rapide que par les cytosols hépatiques humains durant la première heure d'incubation (39.97 ± 2.92 and 2.55 ± 0.17 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protéine, respectivement). En effet, une étude portant sur l'hydrolyse des triterpènes, plus principalement sur le ciclesonide, qui est un glucocorticoïde, montre que les estérases microsomales présentent une activité plus importante que les estérases cytosoliques (**Mutch *et al.*, 2007**). Ces résultats et les résultats obtenus dans cette étude suggèrent donc que les estérases des microsomes du foie humain sont plus impliquées que les estérases du cytosol dans l'hydrolyse des esters triterpéniques.

Chez le rat, le taux d'hydrolyse de la cucurbitacine E en cucurbitacine I dans les microsomes hépatiques et le plasma était faible par rapport aux fractions hépatiques humaines. Cette hydrolyse est observée uniquement avec des quantités en protéines microsomales et plasmatiques du rat environ 3 et 6 fois, respectivement, plus élevées que dans les microsomes humains. Malgré la quantité protéique élevée, l'hydrolyse dans les microsomes du rat était 7 fois moins importante que dans les microsomes humains. L'hydrolyse n'était pas quantifiable dans les plasmas du rat et de l'homme. Aucune hydrolyse n'a été détectée dans le plasma humain même en essayant d'augmenter la quantité de protéines dans le milieu réactionnel. Ceci est en contradiction avec l'étude qui a montré que la cucurbitacine E est activement hydrolysée en cucurbitacine I dans le plasma humain avec 70 et 20% de cucurbitacine E restant après 2 et 24h d'incubation (**Saade *et al.*, 2009**). Ceci peut s'expliquer par la présence des estérases inactives dans le plasma humain ou par la variation interindividuelle des estérases plasmatiques humaines. Tous ces résultats suggèrent que l'hydrolyse de la cucurbitacine E en cucurbitacine I est plus importante chez l'homme que chez le rat.

La présence de plusieurs groupements hydroxyles dans la structure des cucurbitacines, indique que ces substances sont des bons substrats potentiels pour les sulfotransférases et les glucuronosyltransférases. En effet, il existe une compétition des voies de sulfoconjugaison et de glucuronoconjugaison pour la même substance hydroxylée chez l'homme et le rat (**Shangari *et al.*, 2005**). Nous avons pu montrer l'existence de glucuronides et de sulfoconjugués de cucurbitacines grâce à des méthodes radiochimiques très sensibles après incubation respective

des cucurbitacines en présence de microsomes et de cytosols hépatiques d'homme. Les cucurbitacines ont été activement sulfoconjuguées et glucuronoconjuguées par les cytosols et microsomes hépatiques humains, respectivement, mais avec un taux beaucoup plus faible pour la cucurbitacine D. Ceci est peut être dû à une moindre hydrophobicité de cette cucurbitacine au site actif des UGTs. La faible hydrophobicité de la cucurbitacine D ne joue pas un rôle important puisqu'on relève une faible activité de sulfoconjugaison catalysée par des enzymes cytosolubles. Les isoformes de la famille 1A, UGT1A1, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 et UGT1A10 et l'UGT2B17 de la famille 2B sont impliquées dans leur glucuronoconjugaison. L'UGT1A4 n'est pas impliquée dans le métabolisme des cucurbitacines. Cette isoforme permet plutôt la glucuronoconjugaison des amines entraînant par la suite la production des N-glucuronides (**Green et al., 1995**). L'UGT1A1 qui métabolise surtout la bilirubine et également les acides biliaires (**Marschall et al., 2005**), est capable de conjuguer les cucurbitacines. Il est intéressant de remarquer que les UGT 1A7, 1A8 et 1A10 sont capables de métaboliser les cucurbitacines. Ces isoformes sont connues comme étant spécifiquement exprimées dans le tractus gastro-intestinal plutôt que dans le foie (**Harbourt et al., 2012**). Elles pourraient donc participer au métabolisme des cucurbitacines après ingestion par voie orale. De la famille UGT2B, seulement l'UGT2B17, connue par sa capacité de glucuronoconjuguer la testostérone (**Sten et al., 2009**), est impliquée dans la glucuronoconjugaison des cucurbitacines I et E.

Il est intéressant de noter que l'hydrolyse et la glucuronoconjugaison entrent en compétition dans la biotransformation de la cucurbitacine E dans les microsomes hépatiques de l'homme et de rat. Cette glucuronoconjugaison est différente entre l'homme et le rat. Comme nous l'avons déjà montré, la cucurbitacine E est activement hydrolysée pour donner la cucurbitacine I dans les microsomes hépatiques humains après une heure d'incubation alors qu'elle est presque stable dans les microsomes hépatiques de rat à la même quantité de protéines. L'inhibition de l'hydrolyse de cette substance chez l'homme diminue significativement son taux de conjugaison alors qu'elle l'augmente chez le rat. Chez l'homme, en absence de PMSF, le taux de glucuronoconjugaison est environ neuf fois plus élevé qu'en présence de PMSF. Ceci est dû à la glucuronoconjugaison des deux cucurbitacines E et I, cette dernière qui est produite pendant l'incubation de la cucurbitacine E avec les microsomes hépatiques humains. En présence de PMSF, la production de la cucurbitacine I est inhibée et le taux de conjugaison correspond seulement à la conjugaison de la cucurbitacine E qui doit obligatoirement s'effectuer sur les

hydroxyles des cycles triterpéniques avec difficulté. Alors qu'en absence de PMSF, l'hydroxyle terminal est plus facilement glucuroconjugué. La situation est différente chez le rat chez lequel les UGTs semblent privilégier les hydroxyles des cycles de la cucurbitacine E puisque la glucuroconjugaison de cette substance est bien plus forte que la cucurbitacine I (**Figure 34**) et que l'hydrolyse très limitée chez cette espèce ne conduit pas à la formation de cucurbitacine I de façon importante. Enfin, nous avons vérifié que le PMSF ne modifiait pas la glucuroconjugaison d'un substrat type, le 1-naphtol. Ces expériences préliminaires en présence ou non de PMSF seront reconduites suivies d'analyse en spectrométrie de masse afin d'identifier les sites de glucuroconjugaison des cucurbitacines. Le PMSF est un bon outil pour réaliser ce but.

Il est intéressant de remarquer que les substances triterpéniques cycliques de structure apparentée aux cucurbitacines comme l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol sont glucuroconjuguées presque au même taux que les cucurbitacines. Comme pour les cucurbitacines, la famille 1A est plus particulièrement impliquée avec cependant des différences importantes puisque les isoformes UGT1A3 et UGT1A4 participent à la réaction alors que l'UGT1A1 n'est que peu active envers ces substances. De la famille UGT2B, seules les UGT2B4 et UGT2B7 sont capables de glucuroconjuguer l'érythrodiol. Les UGT2B4 et UGT2B7 métabolisent les acides biliaires comme l'acide hyodéoxycholique, des stéroïdes et des phénols (**Pillot *et al.*, 1993 ; Barre *et al.*, 2007**). L'UGT1A3 est aussi capable de conjuguer l'acide chénodéoxycholique dans le foie (**Trottier *et al.*, 2006**).

D'une façon générale, les stéroïdes (stérols, acides biliaires, hormones) sont moins facilement glucuroconjugués que les substances phénoliques. Ainsi à titre d'exemple, les flavonoïdes ou le resvératrol sont extensivement glucuroconjugués chez l'homme et le rat (**Aumont *et al.*, 2001 ; Singh *et al.*, 2011**). Ces substances sont de petite taille et possèdent un centre nucléophile (phénolate) qui facilite la réaction enzymatique.

Les parabènes sont rapidement métabolisés par les estérases et les UDP-glucuronosyltransférases

Les parabènes sont des substances auxquelles l'homme est exposé quotidiennement comme ils sont largement utilisés comme des agents antimicrobiens dans les produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques. Leur utilisation est actuellement remise en cause après leur détection dans les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) et du fait qu'ils possèdent des activités œstrogénomimétiques pouvant perturber le système endocrinien (**Terasaka *et al.*, 2005**). En effet, les parabènes entrent en compétition avec le β -œstradiol pour se lier sur le récepteur œstrogénique et malgré les faibles activités endocriniennes qu'ils engendrent dues à leur faible affinité au récepteur endocrinien, des études *in vitro* ont montré que les parabènes sont capables de réduire le volume de sperme dans l'épididyme et de réduire la motilité des spermatozoïdes chez les descendants mâles. Ils entraînent aussi la prolifération des lignées cellulaires du cancer du sein qui dépendent de l'œstrogène comme les MCF-7 et ZR-75-1 (**Ge and Chang, 2006**). Les parabènes sont stables dans les cellules MCF-7 et ne subissent aucune glucuroconjugaison ou sulfoconjugaison ce qui explique leur accumulation dans ces cellules (**Dagher *et al.*, 2012**). Toutefois, les études ont montré que le risque dû à l'exposition quotidienne aux parabènes reste relativement beaucoup plus faible qu'au risque dû à l'exposition aux phytoestrogènes (**Golden *et al.*, 2005**). Le métabolisme des parabènes essentiellement par glucuroconjugaison et hydrolyse constitue un facteur important de la biodisponibilité de ces substances et de leur éventuelle toxicité.

Des études ont montré que les parabènes sont activement métabolisés dans l'organisme des animaux et de l'homme (**Soni *et al.*, 2005 ; Tsukamoto *et al.*, 1960**). Leur taux de métabolisme important revient au fait que ces substances possèdent deux groupements chimiques, hydroxyles et carboxyles, qui les rendent de bons substrats pour des enzymes multiples impliquées dans les voies de biotransformation. Les parabènes peuvent être hydrolysés en acide *p*-hydroxybenzoïque et ensuite glucuroconjugés ou bien ils peuvent être directement glucuroconjugés au niveau du groupement hydroxyle ou carboxyle donnant lieu à l'éther- ou l'ester-glucuronide, respectivement. L'éther-glucuronide des parabènes sous l'action des estérases entraîne la production de l'éther-glucuronide de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**Figure 49**). L'ester-glucuronide, sous l'action des estérases, peut être hydrolysé pour redonner l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**Figure 49**).

Nos résultats montrent que les parabènes ne sont pas stables et sont rapidement hydrolysés dans les microsomes hépatiques humains. Leur taux d'hydrolyse diminue avec la longueur de la chaîne alkyle. Le butylparabène est quatre fois moins rapidement hydrolysé que le méthylparabène. La substitution de la chaîne alkyle par un noyau benzyle comme dans le cas du benzylparabène n'augmente pas la stabilité du parabène comme il est deux fois plus rapidement hydrolysé que le butylparabène.

Une étude portant sur l'hydrolyse des parabènes dans le foie humain (**Jewell *et al.*, 2007**) a montré que leur hydrolyse dépend de la longueur de la chaîne alkyle et ceci est en accord avec nos résultats à l'exception du benzylparabène dont le taux d'hydrolyse était identique à celui du butylparabène. Cette étude a montré que les parabènes sont principalement et plutôt hydrolysés par les carboxylestérases 1 et 2 des microsomes hépatiques humains qu'avec les carboxylestérases des cytosols hépatiques humains.

Ces résultats avec les résultats de l'hydrolyse des cucurbitacines et du ciclesonide suggèrent que les estérases des microsomes hépatiques humains sont les plus impliquées dans l'hydrolyse des substances naturelles phénoliques et triterpéniques cycliques possédant une fonction ester. L'observation du taux d'hydrolyse le plus élevé dans les microsomes hépatiques humains est sûrement dû à la teneur la plus élevée des protéines carboxylestérases dans la fraction microsomale hépatique du corps humain, au fait que la carboxylestérase 1 est exprimée à des taux significativement plus élevés dans les microsomes hépatiques humains que dans les cytosols hépatiques humains (**Crow *et al.*, 2007**) et à l'absence de carboxylestérases dans le plasma humain (**Li *et al.*, 2005**).

Deux études ont montré que les parabènes sont plus stables dans le plasma humain que dans les microsomes hépatiques humains. La première étude montre que les méthyl- et éthyl-parabène ne sont pas hydrolysés alors que 50% des taux initiales des propyl-, butyl- et benzyl-parabène sont hydrolysés après 1 jour (**Abbas *et al.*, 2010**). La deuxième étude montre que les méthyl- et propyl-parabène sont stables dans le plasma humain même après 30 jours (**Ye *et al.*, 2009**). La différence dans les résultats d'hydrolyse du propylparabène entre ces deux études suggère une variation interindividuelle de l'activité des estérases dans l'hydrolyse de ces composés chez l'homme.

Dans les microsomes hépatiques humains, l'hydrolyse des parabènes peut entrer en compétition avec la glucuroconjugaison. Pour cela nous avons essayé de voir l'effet de l'inhibition de l'action des estérases sur la glucuroconjugaison de ces substances. La présence du PMSF, qui est un inhibiteur des carboxylestérases des microsomes hépatiques humains, permet seulement l'augmentation significative de la glucuroconjugaison de deux parabènes, l'éthyl- et le benzyl-parabène. Les K_m diminuent en présence du PMSF dans le cas des éthyl- et benzyl-parabène (**Tableau 8**) entraînant par la suite l'augmentation de leurs affinités aux UGTs. Ceci peut expliquer l'augmentation de la glucuroconjugaison de ces deux parabènes en présence du PMSF (**Figure 40**).

Du fait que les parabènes sont activement glucuroconjugés par les microsomes hépatiques humains, les isoformes des UDP-glucuronosyltransférases des deux familles UGT1A et UGT2B responsables de leur métabolisme ont été ensuite identifiées. Les résultats montrent que les parabènes sont de très bons substrats pour les UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17 (**Figure 39**). L'UGT1A9 est capable de métaboliser les phénols substitués comme les 4-éthyl-, 4-butyl- et 4-pentyl-phénols dont les structures sont apparentées aux parabènes (**Radomska-Pandya et al., 1999**). Les UGT1A1 et UGT1A8, qui entrent en compétition avec l'UGT1A9 dans la glucuroconjugaison des substances phénoliques (**Court, 2005 ; Fujiwara et al., 2009**), sont capables aussi de glucuroconjuguer les parabènes.

L'UGT1A6, connue par son pouvoir de glucuroconjuguer les substances phénoliques planaires comme le 1-naphtol et les hydrocarbures polycycliques aromatiques (**Bock and Köhle, 2005 ; Suleman et al., 1998**), agit faiblement sur les parabènes indiquant par la suite que l'encombrement engendré par la partie alkyle ou benzyle des parabènes affecte fortement le taux de glucuroconjugaison par cette isoforme. Les isoformes de la famille UGT2B comme les UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17 sont aussi capables de glucuroconjuguer les parabènes. L'implication de plusieurs isoformes d'UGTs dans la biotransformation des parabènes constitue une voie de désintoxication importante de ces substances et diminue le risque de leur accumulation dans les tissus humains.

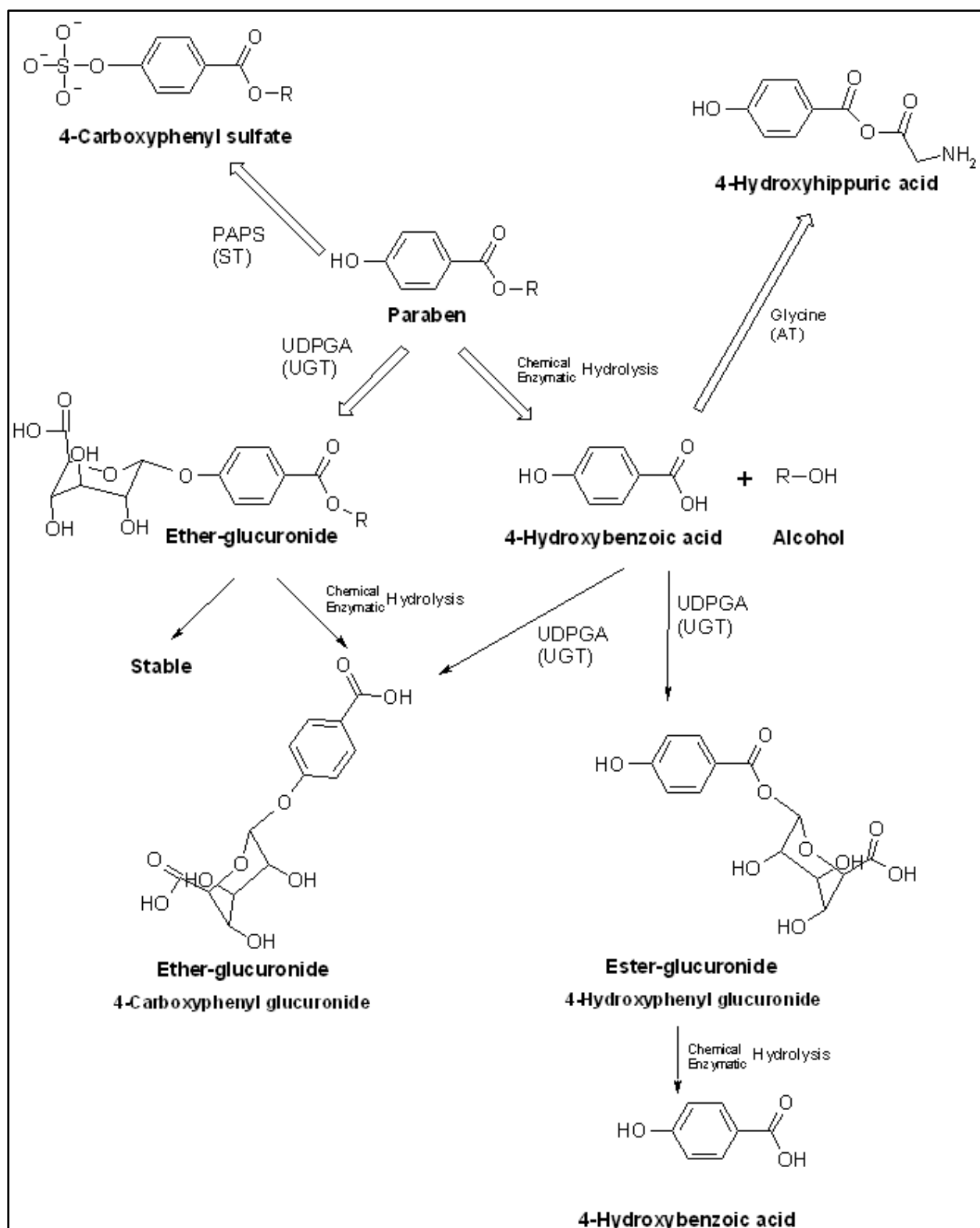


Figure 49 : Schéma représentatif des voies métaboliques pouvant être subies par les parabènes chez l'homme. Les parabènes sont principalement hydrolysés sous l'action des estérases et glucuroconjugués sous l'action des UGTs. Ils peuvent être aussi sulfoconjugués ou conjugués à la glycine.

Les éthyl-, propyl- et benzyl-parabènes présentent des affinités identiques pour les microsomes hépatiques humains et l'UGT1A9 (**Tableau 8**) suggérant que l'UGT1A9 est parmi les principales UGTs responsables de leur glucuroconjugaison. L'examen des valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max}/K_m dans les microsomes hépatiques humains montre que l'efficacité des enzymes est plus importante pour le benzylparabène qui est la substance la plus volumineuse. Ceci peut être dû à une augmentation concomitante de la lipophilie de ce composé à l'égard de l'environnement hydrophobe de la membrane microsomale du site de liaison de l'UGT.

L'acide caféique, l'acide férulique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont des substances phénoliques naturelles d'origine végétale. L'acide caféique et l'hydroxytyrosol sont des dérivés de l'acide cinnamique (dérivés acide-phénols) et appartiennent à la famille des catéchols. Ce motif caractérisé par deux hydroxyles contigus sur un cycle benzénique est responsable des propriétés antioxydantes (**Justino et al., 2006**). Ainsi l'acide férulique est capable de réduire de façon importante l'inflammation observée sur des chondrocytes arthrosiques de rat ou d'homme en inhibant la matrice métalloprotéine-1. Il possède également des propriétés anti-apoptotiques en réduisant et augmentant l'expression des gènes codant pour BAX et Bcl-2, respectivement (**Shang et al., 2009**). Les catéchols sont métabolisés par des réactions de conjugaison et plus particulièrement par glucuroconjugaison, sulfoconjugaison et par méthylation par les catéchols *O*-méthyltransférases (COMT) (**Cheng et al., 1998 ; Kurogi et al., 2012**). L'acide férulique est un métabolite méthylé de l'acide caféique. En effet, l'acide caféique se transforme en acide férulique sous l'action de l'enzyme COMT qui catalyse le transfert du groupe méthyle depuis le cofacteur S-adénosyl-L-méthionine au groupement hydroxyle de l'acide caféique (**Qin et al., 2012**). La présence de plusieurs sites de métabolisation (hydroxyles, acide carboxylique) peut être à l'origine de multiples métabolites conjugués, comme c'est le cas par exemple pour le resvératrol (**Aumont et al., 2001**), chaque métabolite étant formé par des isoformes différentes.

Nos travaux montrent que Les cucurbitacines I et D possèdent une affinité pour les UGTs qui est plus que 100 fois moindre que l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol alors que la cucurbitacine E possède une affinité 2 fois plus élevée que l'érythrodiol mais 2 et 5 fois moins que l'acide ursolique et l'acide oléanolique, respectivement. L'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol possèdent une affinité beaucoup plus élevée que les différents

parabènes pour les UGTs des microsomes hépatiques humains (par exemple K_m de l'érythrodiol est environ 7 fois moins élevé que celui du butylparabène). Les UGTs sont aussi plus efficaces dans leur glucuroconjugaison que dans la glucuroconjugaison des parabènes (V_{max}/K_m est environ 6 fois plus élevée pour l'érythrodiol que pour le butylparabène). Cette plus grande affinité pour l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol peut être expliquée par le fait, qu'au contraire des parabènes, ce sont des polyphénols, substances connues pour être facilement glucuroconjuguées.

Les UGTs de la famille 1A, surtout 1A6 et 1A9, connues pour conjuguer des phénols, sont impliquées dans le métabolisme de l'acide caféique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol. Les UGT 1A7, 1A8, 1A10, 1A1 et 1A3 sont impliquées mais à des taux moins élevés. De la famille 2B, les UGT 2B15 et 2B17 sont responsables de la biotransformation des acide caféique, tyrosol et hydroxytyrosol. Seul l'hydroxytyrosol est métabolisé par l'UGT2B7. Les mêmes isoformes de la famille 2B responsables de la glucuroconjugaison des parabènes sont impliquées donc dans la glucuroconjugaison de ces substances. Quant à l'acide férulique, il est glucuroconjugué par les isoformes de la famille UGT1A et par l'UGT2B7 de la famille UGT2B. L'UGT1A1 est la principale isoforme impliquée dans son métabolisme. Les UGT1A3, UGT1A6, UGT1A7 UGT1A8 et UGT1A10 sont aussi capables de glucuroconjuguer l'acide férulique (**Li et al., 2011**).

Deux glucuronides sont formés après la glucuroconjugaison de l'acide férulique, un éther et un ester-glucuronide qui ont été identifiés par spectrométrie de masse. Chacun fait intervenir des UGT différentes avec des paramètres cinétiques distincts (**Li et al., 2011**). Deux glucuronides (éther glucuronides aliphatique et phénolique) ont également été observés pour l'hydroxytyrosol, mais nous n'avons pas déterminé les isoformes impliquées dans la formation de chaque glucuronide.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les cucurbitacines et les parabènes sont pour la plupart des substances naturelles auxquelles les êtres humains peuvent être exposés quotidiennement par la nourriture et leur mode de vie. Si les cucurbitacines sont des molécules complexes, volumineuses et polyhydroxylées de la famille des triterpénoïdes, les parabènes sont de structures beaucoup plus simples constituées d'un unique cycle phénolique et d'un groupement ester en position para. Ces substances sont recherchées depuis longtemps pour leurs effets bénéfiques dans le domaine de la santé car elles présentent souvent des propriétés pharmacologiques d'intérêt et de nombreuses applications dans l'industrie. Elles sont cependant suspectées également de toxicité. Cette propriété, si elle semble dommageable pour l'homme, peut être mise à profit pour concevoir de nouveaux médicaments cytotoxiques comme les anticancéreux. L'objet de notre travail de thèse a été de démontrer certains effets de ces composés chez l'homme. Nous nous sommes intéressés à l'étude de leurs voies de biotransformations en particulier par glucuronocouplage et hydrolyse, ainsi que la caractérisation des enzymes impliquées. Ces informations permettent de prédire le devenir de ces substances chez l'homme. De façon complémentaire, l'effet cytotoxique des cucurbitacines a été aussi mesuré sur une lignée cellulaire cancéreuse de chondrosarcome. Cette tumeur rare maligne qui produit du tissu cartilagineux est un cancer pour lequel l'option chirurgicale est le seul recours.

Nos résultats ont montré que les cucurbitacines présentent une cytotoxicité contre la lignée cellulaire du chondrosarcome SW1353 qui est plus importante que celle de la cytochalasine D, prise comme médicament de référence. La cucurbitacine E, au contraire des cucurbitacines I et D, n'exerce ces effets cytotoxiques qu'à des doses plus élevées. Cela est sûrement dû au groupe acétyle qui confère à la cucurbitacine E un état de pro-drogue moins active. Il est donc important de connaître la cinétique de transformation de la cucurbitacine E en cucurbitacine I dans la lignée cellulaire SW1353.

Nous avons également montré que les trois cucurbitacines avaient un effet apoptotique puissant. L'ensemble de ces propriétés ouvre la voie à leur possible utilisation comme nouveaux agents anti-cancéreux. Des études doivent être entreprises en particulier pour évaluer leur mécanisme d'action, leur toxicité chez l'homme avant de pouvoir envisager leur utilisation en thérapeutique.

L'analyse du métabolisme des cucurbitacines *in vitro* dans le foie humain a montré principalement une transformation de la cucurbitacine E en cucurbitacine I catalysée par une estérase microsomale, ainsi que des réactions de sulfo- et glucurono-conjugaison. D'autre part les cucurbitacines sont très peu métabolisées par les enzymes d'hydroxylation P450 dépendantes. Elles sont glucurono- et sulfo-conjuguées, à des vitesses plus faibles que celles mesurées pour des substances phénoliques comme le 1-naphtol. Il est cependant important de savoir leur métabolisme *in vivo*. D'où la nécessité d'étudier leur pharmacocinétique *in vivo* chez le rat afin de pouvoir déterminer les paramètres d'absorption, distribution, métabolisme et élimination de l'organisme. Cette étude sera réalisée en administrant les cucurbitacines à des rats et en suivant leur devenir dans les différents compartiments.

La série de parabènes considérés dans cette étude (méthyl-, éthyl-, propyl-, butyl-, benzyl-parabènes), au contraire des cucurbitacines, est activement et rapidement métabolisée dans le foie humain par l'action combinée des estérases et des UGTs des deux familles 1A et 2B. Cependant, la nature et la longueur de la chaîne latérale hydrocarbonée influent sur la cinétique de ces réactions et donc certainement sur leur durée de vie dans l'organisme. Plusieurs isoformes d'UGTs sont impliquées dans le métabolisme des parabènes et constituent une barrière de détoxification. Ces résultats suggèrent qu'ils ne s'accumulent pas dans les tissus, ce qui prévient leur toxicité et limite leur dangerosité

La comparaison des vitesses de glucuronoconjugaison des cucurbitacines et des parabènes montre que la taille des molécules est un facteur important qui régit leur biotransformation. Les cucurbitacines, malgré la présence de plusieurs groupements hydroxyles potentiellement substrats des enzymes de conjugaison, sont peu métabolisés *in vitro*. Le caractère volumineux de ces molécules et l'accessibilité des hydroxyles aliphatiques sont sans doute un frein à leur métabolisme. Notons que la glucuronoconjugaison des substances végétales triterpéniques cycliques de structure apparentée aux cucurbitacines comme l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'érythrodiol montre une activité comparable. Au contraire les petites molécules phénoliques telles les parabènes, acide caféique, tyrosol, hydroxytyrosol ou acide férulique sont plus activement glucuronoconjuguées.

En conclusion, notre travail s'inscrit dans la caractérisation de substances d'origine naturelle qui sont une source inépuisable de candidats médicaments. En particulier nous avons montré que les cucurbitacines sont des molécules présentant des propriétés cytotoxiques et apoptotiques puissantes. Cependant de nombreux travaux sont encore nécessaires avant qu'ils ne débouchent sur la conception de nouveaux médicaments anticancéreux de structure triterpénique pour compléter l'arsenal thérapeutique, en particulier pour des patients atteints de chondrosarcomes.

Références bibliographiques

- [1] Abbas S, Greige-Gerges H, Karam N, Piet MH, Netter P and Magdalou J. Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2010; 25: 568-577.
- [2] Abdelwahab SI, Hassan LEA, Sirat HM, Yagi SMA, Koko WS, Mohan S, Taha MME, Ahmad S, Chuen CS, Narrima P and Rais MM. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Ftoterapia.* 2011; 8: 1190-1197.
- [3] Abo-Dalo B, Ndjonka D, Pinnen F, Liebau E and Lüersen. A novel member of the GCN5-related *N*-acetyltransferase superfamily from *Caenorhabditis elegans* preferentially catalyses the *N*-acetylation of thialysine [S-(2-aminoethyl)-L-cysteine]. *Biochem. J.* 2004; 384: 129-137.
- [4] Aigner T. Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton: biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants [review]. *Virchows Arch.* 2002; 441: 219-230.
- [5] Alvarez-Gonzalez I, Mojica R, Madrigal-Bujaidar E, Camacho-Carranza R, Escobar-García D and Espinosa-Aquirre JJ. The antigenotoxic effects of grapefruit juice on the damage induced by benzo(a)pyrene and evaluation of its interaction with hepatic and intestinal cytochrome P450 (Cyp) 1a1. *Food Chem. Toxicol.* 2011; 49: 807-811.
- [6] Andersen JF, Plattner RD and Weisleder D. Metabolic Transformations of Cucurbitacins by *Diabrotica Virgifera Virgifera* Leconte and *D. Undecimpunctata Howardi* Barber. *Insect Biochem.* 1988; 18: 71-77.
- [7] Aquila S, Giner RM, Recio MC, Spegazzini ED and Ríos JL. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *Journal of Ethnopharmacology.* 2009; 121: 333-337.
- [8] Argüelles N, Alvarez-González I, Chamorro G and Madrigal-Bujaidar E. Protective effect of grapefruit juice on the teratogenic and genotoxic damage induced by cadmium in mice. *J. Med. Food.* 2012; ahead of print.
- [9] Attard E. Rapid Detection of Cucurbitacins in Tissues and *in vitro* Cultures of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. *Cucurbit Genetecis Cooperative report.* 2002; 25: 71-75.
- [10] Aumont V, Krisa S, Battaglia E, Netter P, Richard T, Mérillon JM, Magdalou J and Sabolovic N. Regioselective and Stereospecific Glucuronidation of trans- and cis-Resveratrol in Human. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 393: 281-289.
- [11] Balliano G, Caputo O, Viola F, Delprino L and Cattel L. Cyclization of Squalene-2,3-epoxide to 10 α -Cucurbita-5,24-dien-3 β -ol by Microsomes from *Cucurbita Maxima* Seedlings. *Phytochem.* 1983; 22: 915-921.

- [12] Balliano G, Caputo O, Viola F, Delprino L and Cattel L. The Transformation of 10 α -Cucurbita-5,24-dien-3 β -ol into Cucurbitacin C by Seedlings of *Cucumis sativus*. *Phytochem.* 1983; 22: 909-913.
- [13] Bando H, Mohri S, Yamashita F, Takakura Y and Hashida M. Effects of Skin Metabolism on Percutaneous Penetration of Lipophilic Drugs. *Pharmaceutical Sciences.* 1997; 86: 759-761.
- [14] Banerjee S, Byrd JN, Gianino SM, Harpstrite SE, Rodriguez FJ, Tuskan RG, Reilly KM, Piwnica-Worms DR and Gutmann DH. The neurofibromatosis type 1 tumor suppressor controls cell growth by regulating signal transducer and activator of transcription-3 activity *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 2010; 70: 1356-1366.
- [15] Bansal S.K and Gessner T. A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronosyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-¹⁴C]glucuronic acid. *Anal. Biochem.* 1980; 109: 321-329.
- [16] Barnes J, Anderson LA and Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; 53: 583-600.
- [17] Barre L, Fournel-Gigleux S, Finel M, Netter P, Magdalou J and Ouzzine M. Substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B4 and UGT2B7. Identification of a critical aromatic amino acid residue at position 33. *FEBS Journal.* 2007; 274: 1256-1264.
- [18] Bartalis J and Halaweish FT. Relationship between cucurbitacins reverse-phase high performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *J. Chromatogr. B.* 2005; 818: 159-166.
- [19] Bauer R, Berganza LH, Seligmann O and Wagner H. Cucurbitacins and flavones C-glycosides from *Cayaponia tayuya*. *Phytochemistry.* 1985; 24: 1587-1591.
- [20] Bock KW and Köhle C. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Drug Metab. Rev.* 2005; 400: 55-75.
- [21] Boykin C, Zhang G, Chen YH, Zhang RW, Fan XE, Yang WM and Lu Q. Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. *British Journal of Cancer.* 2011; 104: 781-789.
- [22] Bressler R. Grapefruit juice and drug interactions. Exploring mechanisms of this interaction and potential toxicity for certain drugs. *Geriatrics.* 2006; 61: 12-18.
- [23] Burger JA and Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006; 107: 1761-1767.

- [24] Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E and Savouret JF. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. *Molecular Pharmacology*. 1999; 56: 784-790.
- [25] Chaturvedi P, Misra P and Tuli R. Sterol glycosyltransferases-the enzymes that modify sterols. *Appl Biochem. Biotechnol*. 2011; 165: 47-68.
- [26] Chen F, Reddy MSS, Temple S, Jackson L, Shadle G and Dixon RA. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal*. 2006; 48: 113-124.
- [27] Chen JC, Chui MH, Nie RL, Cordell GA and Qui SX. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep*. 2005; 22: 386-399.
- [28] Cheng Z, Rios GR, King CD, Coffman BL, Green MD, Mojarrabi B, Mackenzie PI and Tephly TR. Glucuronidation of catechol estrogens by expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A1, 1A3, and 2B7. *Toxicol. Sci*. 1998; 45: 52-57.
- [29] Chevalier X and Richette P. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. Normal joint cartilage: anatomy, physiology, metabolism, ageing. *EMC-Rhumatologie Orthopédie*. 2005; 2: 41-58.
- [30] Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci*. 1998; 3: 176-193.
- [31] Corona G, Tzounis X, Dessi MA, Deiana M, Debnam ES, Visioli F and Spence JPE. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract : Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radical Research*. 2006; 40: 647-658.
- [32] Costa EM, Lucas BL, Silva MR, Vilarinho RH, de Faria PR and Loyola AM. Mandibular periosteal (juxtacortical) chondrosarcoma. *Braz. Dent. J*. 2009; 20: 428-33.
- [33] Court MH. Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol*. 2005; 400: 104-116.
- [34] Crow JA, Borazjani A, Potter PM and Ross MK. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2007; 221: 1-12.
- [35] Dagher Z, Borgie M, Magdalou J, Chahine R and Greige-Gerges H. p-Hydroxybenzoate esters metabolism in MCF7 breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol*. 2012; ahead of print.
- [36] D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P and Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab. Dispos*. 2001; 29: 1492-1498.

- [37] Delporte C, Muñoz O, Rojas J, Ferrándiz M, Payá M, Erazo S, Negrete R, Maldonado S, San Feliciano A and Backhouse N. Pharmacological Study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. *Z. Naturforsch.* 2002; 57c: 100-108.
- [38] De Ruyck J, Famerée M, Wouters J, Perpète E.A, Preat J and Jacquemin D. Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P)H/NAD(P)⁺ as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity. *Chemical Physics Letters.* 2007; 450: 119-122.
- [39] Dinan L, Whiting P, Girault JP, Lafont R, Dhadialla TS, Cress DE, Mugat B, Antoniewski Ch and Lepesant JA. Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor. *Biochem. J.* 1997; 327: 643-650.
- [40] Dirr HW, Schabort JC and Weitz Ch. Cucurbitacin Δ^{23} -Reductase from the Fruit of *Cucurbita maxima* var. Green Hubbard. Physicochemical and Fluorescence Properties and Enzyme-Ligand Interactions. *Biochem. J.* 1986; 233: 649-653.
- [41] Duncan KKL, Duncan MDD, Alley MC and Sausville EA. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology.* 1996; 52: 1553-1560.
- [42] Dürr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Meier PJ and Fattinger K. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; 68: 598-604.
- [43] Edmondson JM, Armstrong LS and Martinez AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of Tissue Culture Methods.* 1988; 11: 15-17.
- [44] El-Bachá RS, Leclerc S, Netter P, Magdalou J and Minn A. Glucuronidation of apomorphin. *Life Sci.* 2000; 67: 1735-1745.
- [45] Enami Riedmaier A, Nies AT Schaeffeler E and Schwab M. Organic anion transporters and their implication in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2012; 64: 421-449.
- [46] Escandell JM, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M and Ríos JL. Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. *European Journal of Pharmacology.* 2006; 532: 145-154.
- [47] Escandell JM, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M and Ríos JL. Cucurbitacin R Reduces the Inflammation and Bone Damage Associated with Adjuvant Arthritis in Lewis Rats by Suppression of Tumor Necrosis Factor- α in T-Lymphocytes and Macrophages. *JPET.* 2007; 320: 581-590.
- [48] Fabien N, Desbos A, Bienvenu J and Magdalou J. Autoantibodies directed against the UDP-glucuronosyltransferases in human autoimmune hepatitis. *Autoimmun. Rev.* 2004; 3: 1-9.

- [49] Fernandes JC, Martel-Pelletier J and Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002; 39: 237-246.
- [51] Frey WA and Vallee BL. Digitalis metabolism and human liver alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; 77: 924-927.
- [52] Fujiwara R, Nakajima M, Yamanaka H and Yokoi T. Key amino acid residues responsible for the difference in substrate specificity of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A9 and UGT1A8. *Drug Metab. Dispos.* 2009; 37: 41-46.
- [53] Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, Ono E, Umemoto N, Mizutani M, Saito K and Muranaka T. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant cell. Physiol.* 2011; 52: 2050-2061.
- [54] Gasiewicz TA and Rucci G. Alpha-naphthoflavone acts as an antagonist of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor. *Mol. Pharmacol.* 1991; 40: 607-612.
- [55] Ge JH and Chang B. Estrogenic activities of parabens. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2006; 35: 650-652.
- [56] Gebauer M, Saas J, Sohler F, Haag J, Söder S, Pieper M, Bartnik E, Beninga J, Zimmer R and Aigner T. Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1 β . *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005; 13: 697-708.
- [57] Glatt H. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*. 2000; 129: 141-170.
- [58] Glatt H, Engelke ChEH, Pabel U, Teubner W, Jones AL, Coughtrie MWH, Andrae U, Falany ChN and Meinel W. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicology letters*. 2000; 112-113: 341-348.
- [59] Golden R, Gandy J and Vollmer G. A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health. *Critical Reviews in Toxicology*. 2005; 35: 435-458.
- [60] Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2000; 2: 459-465.
- [61] Goldring SR and Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2004; 427: 27-36.
- [62] Gomes CA, Girão da Cuz T, Andrade JL, Milhazes N, Borges F and Marques MPM. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J. Med. Chem.* 2003; 46: 5395-5401.
- [63] Graness A, Poli V and Goppelt-Struebe M. STAT3-independent inhibition of lysophosphatidic acid-mediated upregulation of connective tissue growth factor (CTGF) by cucurbitacin I. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 72: 32-41.

- [64] Green MD, Bishop WP and Tephly TT. Expressed human UGT1.4 protein catalyzes the formation of quaternary ammonium-linked glucuronides. *Drug Metab. Dispos.* 1995; 23: 299-302.
- [65] Greige-Gerges H, Abou Khalil R, Abou Mansour E, Magdalou J, Chahine R and Ouaini N. Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chemico-Biological Interactions.* 2007; 169: 53-62.
- [66] Greige-Gerges H, Abou Khalil R, Chahine R, Haddad C, Harb W and Ouaini N. Effect of cucurbitacins on bilirubin-albumin binding in human plasma. *Life Sciences.* 2007; 80: 579-585.
- [67] Gross D. Growth regulating substances of plant origin. *Phytochemistry.* 1975; 14: 2105-2112.
- [68] Gry J, Søborg I and Andersson HC. Cucurbitacins in Food Plants. *TemaNord.* 2006; 556: 9-67.
- [69] Guengerich FP. Cytochromes P450, Drugs, and Diseases. *Mol. Interventions.* 2003; 3: 194-204.
- [70] Guengerich FP. Cytochromes P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. *AAPS J.* 2006; 8: E101-111.
- [71] Gülçin I. Antioxydant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 2006; 217: 213-220.
- [72] Hamdoune M, Duclos S, Mounie J, Santona L, Lhuguenot JC, Magdalou J and Goudonnet H. In vitro glucuronidation of peroxisomal proliferators: 2-hethylhexanoic acid enantiomers and their structural analogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995; 131: 235-243.
- [73] Hanley MJ, Cancalon P, Widmer WW and Greenblatt DJ. The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2011; 7: 267-286.
- [74] Harbourt DE, Fallon JK, Ito S, Baba T, Ritter JK, Glish GL and Smith PC. Quantification of human Uridine-diphosphate glucuronosyl transferase 1A isoforms in liver, intestine, and kidney using nanobore liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2012; 84: 98-105.
- [75] Haritunians T, Gueller S, Zhang L, Badr R, Yin D, Xing H, Fung MC and Koeffler HP. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leukemia Research.* 2008; 32: 1366-1373.
- [76] Hatam NAR, Whiting DA and Yousif N. Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry.* 1989; 28: 1268-1271.
- [77] Herget GW, Uhl M, Opitz OG, Adler CP, Südkamp NP and Knöller S. The many faces of chondrosarcoma of bone, own cases and review of the literature with an emphasis on radiology, pathology and treatment. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* 2011; 78: 501-509.

- [78] Ikarashi R, Shibasaki K and Yamaguchi A. Immunohistochemical studies of organic anion transporters and urate transporter 1 expression in human salivary gland. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2012; ahead of print.
- [79] Imai T, Tekatani M, Shii M, Hosokawa M and Chiba K. Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug metabolism and disposition*, 2006; 34: 1734-1741.
- [80] Indap MA, Radhika S, Motiwale L and Rao KVK. Inhibitory effect of cinnamoyl compounds against human malignant cell line. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006; 44: 216-220.
- [81] Jayaprakasam B, Seeram NP and Nair MG. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters*. 2003; 189: 11-16.
- [82] Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Ji HY, Yoo SD, Choi WR, Lee SM, Han CK and Lee HS. Dose linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rat. *Biopharm. Drug Dispos*. 2007; 28: 51-57.
- [83] Jewell C, Bennet P, Mutch E, Ackermann C and Williams FM. Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochemical Pharmacology*. 2007; 74: 932-939.
- [84] Jewell C, Prusakiewicz JJ, Ackermann C, Payne NA, Fate G, Voorman R and Williams FM. Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 225: 221-228.
- [85] Justino GC, Correlá CF, Mira L, Borges Dos Santos RM, Martinho Simões JA, Silva AM, Santos C and Gigante B. Antioxidant activity of a catechol derived from abietic acid. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54: 342-348.
- [86] Kalinski T, Sel S, Kouznetsova I, Ropke M and Roessner A. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in cartilage tumors. *Pathol. Res. Pract*. 2009; 205: 339-345.
- [87] Kragh-Hansen U, Chuang VTG and Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull*. 2002; 25: 695-704.
- [88] Krauspe R. Chondroma, Chondroblastoma and chondromyxoid fibroma. *Orthopade*. 1995; 24: 29-36.
- [89] Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, Müller WE, Karas M, Schubert-Zsilavecz M and Abdel-Tawab M. Metabolism of Boswellic acids in vitro and in vivo. *D.M.D*. 2008; 36: 1135-1142.
- [90] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998; 139: 4252-4563.

- [91] Kurogi K, Alazizi A, Liu MY, Sakakibara Y, Suiko M, Sugahara T and Liu MC. Concerted actions of the catechol *O*-methyltransferase and the cytosolic sulfotransferases SULT1A3 in the metabolism of catecholic drugs. *Biochemical Pharmacology*. 2012; ahead of print.
- [92] Kwan JC and Luesch H. Weapons in disguise —Activating mechanisms and protecting group chemistry in nature. *Chem. Eur. J.* 2010; 16: 13020-13029.
- [93] Lee DH, Iwanski GB and Thoennissen NH. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *TheScientificWorldJournal*. 2010; 10: 413-418.
- [94] Lee DH, Thoennissen NH, Goff C, Iwanski GB, Forscher C, Doan NB, Said JW and Koeffler P. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer Letters*. 2011; 306: 161-170.
- [95] Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P and Lockridge O. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* 2005; 70:1673-1684.
- [96] Li X, Shang L, Wu Y, Abbas S, Li D, Netter P, Ouzzine M, Wang H and Magdalou J. Identification of the human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of the phytochemical ferulic acid. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2011; 26: 341-350.
- [97] Lin FH, Lin JY, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Grichnik JM, Zielinski J and Pinnell SR. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamin C and E and doubles its photoprotection of skin. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 125: 826-832.
- [98] Lin HL, Kent UM and Hollenberg PF. The grapefruit juice effect is not limited to cytochrome P450 (P450) 3A4: evidence for bergamottin-dependent inactivation, heme destruction, and covalent binding to protein in P450s 2B6 and 3A5. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 313: 154-164.
- [99] Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995; 49: 57-68.
- [100] Liu T, Zhang M, Zhang H, Sun C and Deng Y. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2008; 265: 1225-1232.
- [101] Lorenz PR, Lippmann F, Dürrling K, Solf M and Geissler J. Pharmaco-toxicological and clinical studies with colocynth pulp extracts (Extr. *Colocynthis fructus*). *Arzneimittelforschung*. 2005; 55: 621-663.
- [102] Lu YF, Santostefano M, Cunningham BD, Threadgill MD and Safe S. Identification of 39-methoxy-49-nitroflavone as a pure aryl hydrocarbon (Ah) receptor antagonist and evidence for more than one form of the nuclear Ah receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 316: 470-477.

- [103] Lui VWY, Yau DMS, Wong EYL, Ng YK, Lau CPK, Ho Y, Chan JPL, Hong B, Ho K, Cheung CS, Tsang CM, Tsao SW and Chan ATC. Cucurbitacin I elicits anoikis sensitization, inhibits cellular invasion and *in vivo* tumor formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 2085-2094.
- [104] Maatooq G, El-Sharkawy S, Afifi MS and Rosazza JPN. Microbial transformation of cucurbitacin E 2-O- β -D-glucopyranoside. *Journal of Natural Products*. 1995; 58: 165-171.
- [105] Madina BR, Sharma LK, Chaturvedi P, Sangwan RS and Tuli R. Purification and physico-kinetic characterization of 3 β -hydroxy specific sterol glucosyltransferase from *Withania somnifera* (L) and its stress response. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1774: 392-402.
- [106] Malojčić G, Owen RL, Grimshaw JPA, Brozzo MS, Dreher-Teo H and Glockshuber R. A structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfuryl transfer by aryl sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS*. 2008; 105: 19217-19222.
- [107] Mannel M. Drug interactions with St John's wort: mechanisms and clinical implications. *Drug Saf*. 2004; 27: 773-797.
- [108] Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Fickert P, Diczfalusy U, Gumhold J, Silbert D, Fuchsbichler A, Benthin L, Grundström R, Gustafsson U, Sahlin S, Einarsson C and Trauner M. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology*. 2005; 129: 476-485.
- [109] Martel-Pelletier J, Alaaeddine N and Pelletier JP. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*. 1999; 4: 694-703.
- [110] Martin PAW, Blackburn M, Schroder RFW, Matsuo K and Li BW. Stabilization of Cucurbitacin E-glycoside, a Feeding Stimulant for Diabroticite Beetles, Extracted from Bitter Hawkesbury Watermelon. *Journal of Insect Science*. 2002; 2: 19.
- [111] Mathew S and Abraham TE. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2004; 24: 59-83.
- [112] May JA, Ratan H, Glenn JR, Lösche W, Spangenberg P and Heptinstall S. GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on normal cytoskeletal assembly. *Platelets*. 1998; 9: 227-232.
- [113] McLean KJ, Hans M and Munro AW. Cholesterol, an essential molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Soc. Trans*. 2012; 40: 587-593.
- [114] McInnes IB and Schett Georg. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med*. 2011; 365: 2205-2219.

- [115] Medina E, de Castro A, Romero C and Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oil and other plant oil: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 4954-4961.
- [116] Meech R and Mackenzie PI. UDP-Glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 26913-26917.
- [117] Molavi O, Shayeganpour A, Somayaji V, Hamdy S, Brocks DR, Lavasanifar A, Kwon GS and Samuel J. Development of a Sensitive and Specific Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Quantification of Cucurbitacin I (JSI-124) in Rat Plasma. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2006; 9: 158-164.
- [118] Momma K, Masuzawa Y, Nakai N, Chujo M, Murakami A, Kioka N, Kiyama Y, Akita T and Nagao M. Direct interaction of Cucurbitacin E isolated from *Alsomitra macrocarpa* to actin filament. *Cytotechnology.* 2008; 56: 33-39.
- [119] Montesinos MC, Ubeda A, Terencio MC, Payá M and Alcaraz MJ. Antioxidant profile of mono- and dihydroxylated flavones derivatives in free radical generating systems. *Z. Naturforsch C.* 1995; 50: 552-560.
- [120] Moserova M, Kotrbova V, Rupertova M, Naiman K, Hudecek J, Hodek P, Frei E and Stiborova M. Isolation and partial characterization of the adduct formed by 13-hydroxyellipticine with deoxyguanosine in DNA. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2008; 29: 728-732.
- [121] Muffler K, Leipold D, Scheller MC, Haas C, Steingroewer J, Bley T, Neuhaus, HE, Mirata MA, Schrader J and Ulber R. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry.* 2011; 46: 1-15.
- [122] Murphey MD, Walker EA, Wilson AJ, Kransdorf MJ, Temple HT and Gannon FH. From the archives of the AFIP. Imaging of primary chondrosarcoma: Radiologic-pathologic correlation. *RadioGraphics.* 2003; 23: 1245-1278.
- [123] Mutch E, Nave R, McCracken N, Zech K and Williams FM. The role of esterases in the metabolism of ciclesonide to desisobutyryl-ciclesonide in human tissue. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 73: 1657-1664.
- [124] Nakashima S, Matsuda H, Kurume A, Oda Y, Nakamura S, Yamashita M and Yoshikawa M. Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2010; 20: 2994-2997.
- [125] Negishi O, Sugiura K and Negishi Y. Biosynthesis of vanillin via ferulic acid in *Vanilla planifolia*. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 9956-9961.
- [126] Ochi M, Moriyama K, Ohmae K, Fukuyama Y, Nihei K and Kubo I. Sweet and bitter constituents of *Wilbrandia* species. *Food Chemistry.* 2009; 115: 61-65.

- [127] Oh H, Mun YJ, Im SJ, Lee SY, Song HJ, Lee HS and Woo WH. Cucurbitacins from *Trichosanthes kirilowii* as the inhibitory components on tyrosinase activity and melanin synthesis of B16/F10 melanoma cells. *Planta Med.* 2002; 68: 832-833.
- [128] Omar MH, Mullen W, Stalmach A, Auger C, Rouanet JM, Teissedre PL, Caldwell ST, Hartley RC and Crozier A. Absorption, disposition, metabolism, and excretion of [3-¹⁴C] caffeic acid in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 5205-5214.
- [129] Ortega-Gracia F and Peragón J. Phenol metabolism in the leaves of the olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 12440-12448.
- [130] Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B and Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer.* 2000; 36: 1235-1247.
- [131] Pan MH, Yang JR, Tsai ML, Sang S and Ho CT. Anti-inflammatory effect of *Momordica grosvenori* Swingle extract through suppressed LPS-induced upregulation of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Journal of Functional Food.* 2009; 1: 145-152.
- [132] Park BK, Pirmohamed M and Kitteringham NR. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmac. ther.* 1995; 68: 385-424.
- [133] Parra A, Rivas F, Garcia-Granados A and Martinez A. Microbial Transformation of Triterpenoids. *Mini-Reviews in Organic Chemistry.* 2009; 6: 307-320.
- [134] Peters RR, Farias MR and Ribeiro-do-Valle RM. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Med.* 1997; 63: 525-528.
- [135] Peters RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, de Brum-Fernandes AJ, Farias MR and Ribeiro-do-Valle RM. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sciences.* 1999; 64: 2429-2437.
- [136] Peters RR, Krepsky PB, Siqueira-Junior JM, da Silva Rocha JC, Bezerra MM, de Albuquerque Ribeiro R, de Brum-Fernandes AJ, Farias MR, da Rocha FAC and Ribeiro-do-Valle RM. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. *Life Sciences.* 2003; 73: 2185-2197.
- [137] Pillot T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Lafaurie C, Radomska A, Burchell B, Siest G and Magdalou J. Glucuronidation of hyodeoxycholic acid in human liver. *The Journal of Biological Chemistry.* 1993; 268: 25636-25642.
- [138] Pollier J and Goossens A. Oleanolic acid. *Phytochemistry.* 2012; 77: 10-15.

- [139] Prouty W and Goldberg A. Effect of protease inhibitors on protein breakdown in *Escherichia coli*. *Chem. Metab. Macromol.* 1972; 247: 3341-3352.
- [140] Prusakiewicz JJ, Harville HM, ZHANG Y, ACKERMANN Ch and VOORMAN RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology.* 2007; 232: 248-256.
- [141] Qin JC, Zhang YM, Lang CY, Yao YH, Pan HY and Li X. Cloning and functional characterization of a caffeic acid O-methyltransferase from *Trigonella foenum-graecum* L. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39: 1601-1608.
- [142] Qiu XJ, Huang X, Chen ZQ, Ren P, Huang W, Qin F, Hu SH, Huang J, He J, Liu ZQ and Zhou HH. Pharmacokinetic study of the prokinetic compounds meranzin hydrate and ferulic acid following oral administration of Chaihu-Shuang-San to patients with functional dyspepsia. *Journal of Ethnopharmacology.* 2011; 137: 205-213.
- [143] Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E and Mackenzie PI. Structural and functional studies of UDP-Glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev.* 1999; 31: 817-899.
- [144] Radomska-Pandya A, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S and Magdalou J. Structure of UDP-glucuronyltransferases in membranes. *Methods Enzymol.* 2005; 400: 116-147.
- [145] Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M and Ríos JL. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Medica.* 2004; 70: 414-420.
- [146] Remacle J, Fowler S, Beaufay H and Berthet J. Ultrastructural localization of cytochrome b₅ on rat liver microsomes by means of hybrid antibodies labeled with ferritin. *The Journal of Cell Biology.* 1974; 61: 237-240.
- [147] Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Piétu G, Robert A, Redeuilh G, Bracke M, Gespach C and Attoub S. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) – and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res.* 2005; 65: 195-202.
- [148] Rodríguez-Rodríguez R, Dolores Herrera M, Perona JS and Ruiz-Gutiérrez V. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in "orujo" olive oil, on rat aorta. *British Journal of Nutrition.* 2004; 92: 635-642.
- [149] Romiti N, Tramonti G, Donati A and Chieli E. Effects of grapefruit juice on the multidrug transporter P-glycoprotein in the human proximal tubular cell line HK-2. *Life Sci.* 2004; 76: 293-302.
- [150] Ross MK and Crow JA. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *J. Biochem. Mol. Tox.* 2007; 21: 187-196.
- [151] Saade M, Magdalou J, Ouaini N and Greige-Gerges H. Stability of Cucurbitacin E in Human Plasma: Chemical Hydrolysis and Role of Plasma Esterases. *Biopharm. Drug Dispos.* 2009; 30: 389-397.

- [152] Sabolovic N, Magdalou J, Netter P and Abid A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells. Identification of the UDP-glucuronosyltransferases UGT1A6, 1A3 and 2B7. *Life Sci.* 2000; 67: 185-196.
- [153] Sabolovic N, Humbert AC, Radominska-Pandya A and Magdalou J. Resveratrol is efficiently glucuronidated by UDP-glucuronosyltransferases in the human gastrointestinal tract and in Caco-2 cells. *Biopharm. Drug Dispos.* 2006; 27: 181-189.
- [154] Sabolovic N, Heurtaux T, Humbert AC, Krisa S and Magdalou J. cis- and trans-Resveratrol are glucuronidated in rat brain, olfactory mucosa and cultured astrocytes. *Pharmacology.* 2007; 80: 185-192.
- [155] Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F and Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine.* 1995; 19: 481-486.
- [156] Schabort JC and Teijema HL. The Role of Cucurbitacin Δ^{23} -Reductase in the Breakdown Pathway of Toxic Bitter Principles in *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry.* 1968; 7: 2107-2110.
- [157] Schneider P, Hosseiny SS, Szczotka M, Jordan V and Schlitter K. Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. *Phytochemistry Letters.* 2009; 2: 85-87.
- [158] Schwartz HM, Biedron SI, Von Holdt MM and Rehm S. A Study of Some Plant Esterases. *Phytochemistry.* 1964; 3: 189-200.
- [159] Semenova LA and Bulycheva IV. Chondromas (enchondroma, periosteal chondroma, enchondromatosis). *Arkh. Patol.* 2007; 69: 45-48.
- [160] Senggunprai L, Yoshinari K, Shimada M and Yamazoe Y. Involvement of ST1B Subfamily of Cytosolic Sulfotransferase in Kynurenine Metabolism to Form Natriuretic Xanthurenic Acid Sulfate. *JPET.* 2008; 327: 789-798.
- [161] Setzer WN and Setzer MC. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 2003; 3: 540-556.
- [162] Shang L, Qin J, Chen LB, Liu BX, Jacques M and Wang H. Effects of sodium ferulate on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009; 36: 912-918.
- [163] Shangari N, Chan TS and O'Brien PJ. Sulfation and glucuronidation of phenols: implications in coenzyme Q metabolism. *Methods in Enzymol.* 2005; 400: 342-359.
- [164] Shanle EK and Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 2011; 14: 6-19.

- [165] Shaw WV. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1983; 14: 1-46.
- [166] Shibuya M, Adachi Sh and Ebizuka Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron.* 2004; 60: 6995-7003.
- [167] Singh R, Wu B, Tang L and Hu M. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform-dependent regioselectivity of glucuronidation of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 7452-7464.
- [168] Siqueira JM Jr, Peters RR, Gazola AC, Krepsky PB, Farias MR, Rae GA, de Brum-Fernandes AJ and Ribeiros-Valle RM. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sciences.* 2007; 80: 1382-1387.
- [169] Sircar D and Mitra A. Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. *Journal of Plant Physiology.* 2009; 166: 1370-1380.
- [170] Smit HF, van den Berg AJJ, Kroes BH, Beukelman CJ, Quarles van Ufford HC, van Dijk H and Labadie RP. Inhibition of T-Lymphocyte proliferation by cucurbitacins from *Picrohiza scrophulariaeflora*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 1300-1302.
- [171] Sohl ChD, Cheng Q and Guengerich FP. Chromatographic Assays of Drug Oxidation by Human Cytochrome P450 3A4. *Nature Protocols.* 2009; 4: 1252-1257.
- [172] Soleas GJ, Diamandis EP and Goldberg DM. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* 1997; 11: 287-313.
- [173] Soni MG, Carabin IG and Burdock GA. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology.* 2005; 43: 985-1015.
- [174] Sten T, Bichlmaier I, Kuuranne T, Leinonen A, Yli-Kauhala J and Finel M. UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B7 and UGT2B17) display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly. *Drug Metab. Dispos.* 2009; 37: 417-423.
- [175] Sturm S and Stuppner H. Analysis of Cucurbitacins in Medicinal Plants by High-Pressure Liquid Chromatography- Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* 2000; 11: 121-127.
- [176] Subbaramaiah K, Michaluart P, Chung WJ, Tanabe T, Telang N and Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1999; 889: 214-223.

- [177] Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J and Minn A. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurones and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 358: 63-67.
- [178] Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D and Sebt SM. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene.* 2005; 24: 3236-3245.
- [179] Takahashi N, Yoshida Y, Sugiura T, Matsuno K, Fujino A and Yamashita U. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *International Immunopharmacology.* 2009; 9: 508-513.
- [180] Terasaka S, Inoue A, Tanji M and Kiyama R. Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicology Letters.* 2005; 163: 130-141.
- [181] Trottein F, Shaffer L, Ivanov S, Paget Ch, Vendeville C, Groux-Degroote S, Lee S, Krzewinski-Recchi MA, Head SR, Gosset Ph and Delannoy Ph. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconj J.* 2009; 26: 1259-1274.
- [182] Trottier J, Verreault M, Grepper S, Monté D, Bélanger G, Kaeding J, Caron P, Inaba TT and Barbier O. Human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A3 enzyme conjugates chenodeoxycholic acid in the liver. *Hepatology.* 2006; 44: 1158-1170.
- [183] Tsukamoto H and Terada S. Metabolic Fate of p-Hydroxybenzoic Acid and its Derivatives in Rabbit (1). *Chem. Pharm. Bull.* 1960; 8: 1066-1070.
- [184] Tsukamoto H and Terada S. Metabolic Fate of p-Hydroxybenzoic Acid and its Derivatives in Rabbit (4). *Chem. Pharm. Bull.* 1964; 12: 765-769.
- [185] Tuck KL, Hayball PJ and Stupans I. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *J Agric. Food Chem.* 2002; 50: 2404-2409.
- [186] Turgeon D, Carrier JS, Chouinard S and Bélanger A. Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics. *Drug Metab. Dispos.* 2003; 31: 670-676.
- [187] Tyapochkin E, Cook PF and Chen G. *para*-Nitrophenyl Sulfate Activation of Human Sulfotransferase 1A1 Is Consistent with Intercepting the E'PAP Complex and Reformation of E'PAPS. *The Journal of Biological Chemistry.* 2009; 284: 29357-29364.
- [188] Vail RB, Homann MJ, Hanna I and Zaks A. Preparative Synthesis of Drug Metabolites using Human Cytochrome P450s 3A4, 2C9 and 1A2 with NADPH-P450 Reductase Expressed in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2005; 32: 67-74.

- [189] Venkatesan N, Barré L, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S and Ouzzine M. Modulation of xylosyltransferase-I expression provides a mechanism regulating glycosaminoglycan chain synthesis during cartilage destruction and repair. *FASEB J.* 2009; 23: 813-822.
- [190] Venkatesan N, Barré L, Bourhim M, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S and Ouzzine M. Xylosyltransferase-I rates glycosaminoglycan synthesis during the pathogenic process of human osteoarthritis. *PLoS ONE.* 2012; 7: e34020.
- [191] Vincourt JB, Vignaud JM, Lionneton F, Sirveaux F, Kawaki H, Marchal S, Lomazzi S, Plénat F, Guiemin F, Netter P, Takigawa M, Mainard D and Magdalou J. Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulating of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis & Rheumatism.* 2008; 58: 2798-2808.
- [192] Vincourt JB, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda B, Lionneton F, Sirveaux F, Netter P, Plénat F, Mainard D, Vignaud JM and Magdalou J. C-Propetides of procollagens I α 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res.* 2010; 70: 4739-4748.
- [193] Vuorelaa P, leinonenb M, Saikkuc P, Tammela P, Rauhad JP, Wennberge T and Vuorela H. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Cuur. Med. Chem.* 2004; 11: 1375-1389.
- [194] Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ and Hall SD. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 70: 317-326.
- [195] Witkowski A and Konopa J. Binding of the cytotoxic and antitumor triterpenes, cucurbitacins, to glucocorticoid receptors of HeLa cells. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1981; 674: 246-255.
- [196] Yamada T, Morisseau C, Maxwell JE, Argiriadi MA, Christianson DW and Hammock BD. Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 23082-23088.
- [197] Yang L, Wu S, Zhang Q, Liu F and Wu P. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap 37). *Cancer Lett.* 2007; 256: 267-278.
- [198] Ye X, Wong LY, Jia LT, Needham LL and Calafat AM. Stability of the conjugated species of environmental phenols and parabens in human serum. *Environ. Int.* 2009; 35: 1160-1163.
- [199] Yuan G, Wahlqvist ML, He G, Yang M and Li D. Natural Products and Anti-Inflammatory Activity. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2006; 15: 143-152.

[200] Zhang JX, Ma LQ, Yu HS, Zhang H, Wang HT, Qin YF, Shi GL and Wang YN. A tyrosine decarboxylase catalyzes the initial reaction of the salidroside biosynthesis pathway in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Cell. Rep.* 2011; 30: 1443-1453.

[201] Zhao E and Mu Q. Phytoestrogen biological actions on mammalian reproductive system and cancer growth. *Sci. Pharm.* 2011; 79: 1-20.

Annexe 1 : Publication 1

Regular Article

Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man

Suzanne ABBAS¹, Hélène GREIGE-GERGES², Nancy KARAM³,
Marie-Hélène PIET¹, Patrick NETTER¹ and Jacques MAGDALOU^{1,*}

¹UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy-1, School of Medicine, Vand oeuvre-l es-Nancy, France

²Faculty of Sciences-2, Lebanese University, Jdaidet el-Matn, Lebanon

³University of Saint-Esprit de Kaslik, Faculty of Sciences and Computer Engineering, Jounieh, Lebanon

Full text of this paper is available at <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>

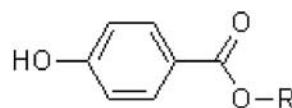
Summary: Parabens (alkyl esters of 4-hydroxybenzoic acid) are widely used as preservatives in drugs, cosmetic products, and foodstuffs. Safety concerns have recently increased due to the potential health risks associated to exposure to large amounts of these substances. Biotransformation of parabens mainly includes hydrolysis of the ester bond and glucuronidation reactions. The hydrolysis and glucuronidation of a series of six parabens differing by the nature of the alkyl group were investigated in human liver microsomes and plasma, and the major human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms involved in the reaction were identified. Methyl- and ethylparaben were stable in human plasma, with 95% of the initial concentration remaining after 24 h. On the other hand, propyl-, butyl- and benzylparaben concentrations decreased by 50% under similar conditions. In contrast, rapid hydrolysis was measured with human liver microsomes depending on the alkyl chain length, with $t_{1/2}$ varying from 22 min for methylparaben to 87 min for butylparaben. All parabens were actively glucuronidated by liver microsomes, in comparison to 4-hydroxybenzoic acid. They were mainly substrates of human recombinant UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17. In conclusion, the parabens were readily metabolized in human liver through esterase hydrolysis and glucuronidation by several UGT isoforms. These results suggest that these parabens do not accumulate in human tissue.

Keywords: Parabens; 4-hydroxybenzoic acid; hydrolysis; esterases; glucuronidation; UDP-glucuronosyltransferases; man

Introduction

Parabens (alkyl esters of 4-hydroxybenzoic acid) are natural or synthetic compounds that have been extensively used since the 1920s in the cosmetic, pharmaceutical, and food industries for their very effective antimicrobial activity.¹⁾ They differ from each other by the nature of the alkyl moiety (**Fig. 1**). Because methyl- and propylparaben can be found in plants, a series of parabens with increasing alkyl chain length and presenting improved antimicrobial properties²⁾ has been prepared chemically at low cost.

Man is daily exposed to these substances from a large array of consumer products, and they are considered to



R = -H	4-Hydroxybenzoic acid
R = -CH ₃	Methylparaben
R = -CH ₂ -CH ₃	Ethylparaben
R = -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Propylparaben
R = -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Butylparaben
R = -C ₆ H ₅	Benzylparaben

Fig. 1. Chemical structure of the parabens used in the study

Received; February 3, 2010, Accepted; September 6, 2010, J-STAGE Advance Published Date; October 1, 2010

*To whom correspondence should be addressed: Jacques MAGDALOU, UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy-1, School of Medicine, BP 184, F-54505 Vandoeuvre-l es-Nancy, Cedex, France. Tel. +33-383-68-38-73, Fax. +33-383-68-39-59, E-mail: Jacques.Magdalou@medecine.uhp-nancy.fr

This work was supported by a grant from C edre (n o6 S F10/L41).

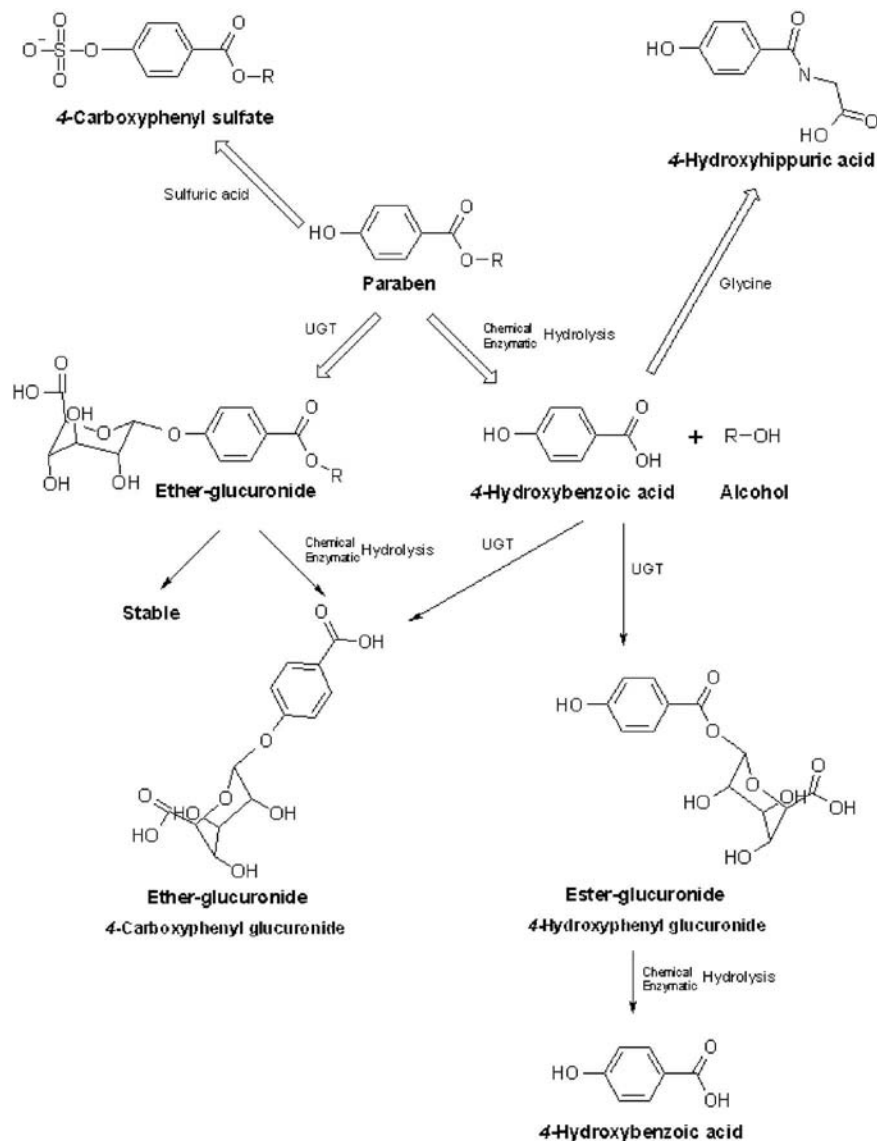


Fig. 2. Metabolic routes for parabens in man

Parabens are mainly metabolized through hydrolysis supported by esterases and through glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (UGT) using UDP-glucuronic acid (UDPGA). They can also produce sulfoconjugates by sulfotransferase (ST) using 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) as the sulfate donor substrate, or 4-hydroxyhippuric acid by amino acid transferase (AT) using glycine as the donor substrate.

be safe. Several toxicity studies of these compounds have been carried out in animals and in man; no marked toxicity was found as they are rapidly absorbed, metabolized and excreted from the body.¹⁾ However, recent reports indicated that parabens could act as endocrine modulators or disruptors with a moderate estrogenic activity which could lead to possible undesirable effects on human health. Moreover, parabens-containing antiperspirants have been suspected of increasing breast cancer incidence. The detection in small quantities of non-metabolized parabens in human breast tumors³⁾ may suggest that the substances could accumulate over time in tissues and induce toxic effects.^{4,5)}

Parabens are extensively metabolized. They are mainly hydrolyzed to 4-hydroxybenzoic acid in mammals, which is thereafter conjugated with sulfate, glucuronide or glycine (**Fig. 2**) prior to being excreted in urine.⁶⁻⁸⁾ Esterases are efficient in the hydrolysis of parabens to 4-hydroxybenzoic acid.^{9,10)} In man, parabens can also be excreted as glucuronides and sulfate conjugates.¹⁾ The metabolic profile is strongly dependent on the exposure route. Indeed, paraben glucuronides have been used as urinary biomarkers of exposure in man, rather than 4-hydroxybenzoic acid, which is a nonspecific metabolite of all parabens.¹¹⁾

Glucuronidation reactions are supported by the multi-

genic family of enzymes the UDP-glucuronosyltransferases (UGT).¹² They catalyze the binding of glucuronic acid from a high-energy donor, UDP- α -D-glucuronic acid, onto structurally unrelated substances with a nucleophilic acceptor group (hydroxyl, carboxylic acid, thiol or amine) leading to the formation of hydrophilic β -glucuronides that are excreted in urine and bile.^{13,14} Up to nineteen UGT isoforms have been identified in humans and are classified into families 1 and 2 based on sequence identity.¹⁵ Cloning of their cDNA and subsequent heterologous expression of the recombinant proteins have revealed distinct but overlapping substrate selectivity.

This study was focused on the *in vitro* hydrolysis and glucuronidation in plasma and in liver microsomes of a series of six parabens commonly used in the industry. The main UGT isoforms involved in the formation of paraben glucuronides were identified. The impact of the nature of the alkyl group on the metabolism of parabens was also investigated. The results obtained indicated that the parabens are actively hydrolyzed or glucuronidated in liver microsomes by several UGTs belonging to families 1A and 2B.

Methods

Chemicals and materials: 4-Hydroxybenzoic acid, methylparaben, propylparaben, bilirubin, and EDTA were purchased from Himedia (Mumbai, India). Ethylparaben, propylparaben, butylparaben, benzylparaben and octylgallate were obtained from Fluka Biochemika, USA. UDP-[U-¹⁴C]-glucuronic acid (specific activity 285 mCi/mmol) was purchased from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). UDP-glucuronic acid, maleic acid, 1-naphthol, ketoprofen, 4-nitrophenol, 4-aminobiphenyl, eugenol, hyodeoxycholic acid, phenylmethanesulfonyl-fluoride (PMSF) and dimethyl sulfoxide were from Sigma Aldrich, (Saint Louis, MO). Trifluoroacetic acid was from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France) and methanol from Prolabo HiPerSolv CHROMANORM, (Strasbourg, France). Plasma samples were prepared by centrifugation of citrated venous blood and obtained from healthy adult subjects at Notre Dame de Secours Hospital, (Jbeil, Lebanon).

Enzyme sources: Human serum albumin (essentially fatty acid free) was obtained from Sigma-Aldrich. Human liver microsomes (pool of 21 livers from men and women) were purchased from Biopredic (Rennes, France). The recombinant human UGT isoforms UGT1A1 and UGT1A3 were purchased from InVitrogen, (Illkirch, France), whereas UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15, and UGT2B17 were obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) and used according to the recommendations of the suppliers. All these UGT isoforms were expressed in insect cells (Super-

somes) infected with the corresponding UGT gene-inserted baculovirus. The activity of these enzymes was measured using marker substrates: 1-naphthol for UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, and UGT1A9; octylgallate for UGT1A1; 4-nitrophenol for UGT1A3; 4-aminobiphenyl for UGT1A4; hyodeoxycholic acid for UGT2B4; ketoprofen for UGT2B7 and eugenol for UGT2B15 and UGT2B17. Protein concentration was determined by Bradford's method.¹⁶

Stability of parabens in human plasma and liver microsomes: The degradation of parabens into 4-hydroxybenzoic acid was studied at 37°C in 67 mM phosphate buffer (pH 7.4), in human plasma, in albumin solution (580 μ M) dissolved in phosphate buffer (pH 7.4), and in human liver microsomes (100 μ g) in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The stability study of parabens in human plasma was approved by the Committee on the Ethics of Research in Human Experimentation at the Lebanese University. Informed consent for participation in the study was obtained from all individuals. Plasma samples were prepared by centrifugation of citrated venous blood obtained from healthy male (n = 9) subjects aged between 25 and 35 years at Notre Dame de Secours Hospital, Jbeil, Lebanon. A preliminary analysis of each plasma sample by HPLC was performed to ensure the absence of parabens in these samples. Three pools were prepared: each one was a mixture of three plasma samples. The stability of each paraben was studied separately in each of these three pools.

The concentration of parabens dissolved in dimethyl sulfoxide was maintained at 164 μ M in all incubations. At appropriate time intervals (0, 1, 6, 24 h), samples (100 μ L) of the reaction medium were taken and analyzed by HPLC¹⁰ modified as described below. The HPLC apparatus (Thermo Finnigan, Saint Jose, CA) consisted of a degasser unit (Spectra System SCM1000), a pump (Spectra system P 2000, Saint Jose, CA) coupled to a C18, 5 μ m, 150 \times 4.6 mm (BDS, Thermo, UK), a UV-visible detector (Spectra System UV1000) and a computer workstation. Elution was performed either with a gradient of acetonitrile-tetrahydrofuran-isopropanol (80/80/20, v/v) in water, or in isocratic conditions with methanol, water, and trifluoroacetic acid (50:50:0.05 v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Quantitation was carried out from standard curves obtained with increasing amounts of internal standards as follows. Benzylparaben was the internal standard for the assay of methylparaben, propylparaben for the assay of ethylparaben, ethylparaben for the assays of propylparaben and butylparaben, and methylparaben in the assay of benzylparaben. The method was validated in terms of linearity, repeatability and limit of detection. Calibration curves were constructed by plotting the paraben/standard paraben area ratio against the concentration of paraben in μ g/mL, and the linear relationships were evaluated by regression analysis

with the least-squares method. The equations were drawn from eight concentrations and the experiments were repeated six times. The lower limits of detection were 250, 170, 300, 500 and 550 ng/ml, respectively, in the assays of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben. Linearity of each assay was obtained in the concentration range 1–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The values of the intercept on ordinates were close to zero. The correlation coefficients ranged from 0.96 to 0.9996 ($n = 6$). The RSD values were lower than 5%.

The same experiment was repeated in human liver microsomes in similar conditions to those described above. The reaction was terminated by adding one volume of acetonitrile:methanol:trifluoroacetic acid (49.6:49.6:0.8 v/v) after 0, 10, 20, 30, 40 and 60 min, and 100- μL samples of the medium were withdrawn in order to determine the kinetic profile for hydrolysis of the substrates. The assays were repeated three times. The first-order rate constants (K) were calculated during the first 60 min of incubation from the slopes of linear plots of the logarithm of the percentages of paraben remaining against time. The corresponding half-life was obtained from the equation: $t_{1/2} = 0.693/K$. Triplicate samples were analyzed, and the mean value of the rate constant was calculated.

Glucuronidation assay: Glucuronidation of paraben and 4-hydroxybenzoic acid by human liver microsomes and recombinant UGT was performed by a modified method of Bansal and Gessner.¹⁷ Briefly, enzyme proteins (50 μg of protein) were added to the reaction medium (final volume of 40 μL) composed of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 [or 50 mM Tris-Maleate (pH 6.5), 5 mM MgCl_2] and 1 mM paraben or 4-hydroxybenzoic acid dissolved in dimethyl sulfoxide. The reaction was initiated by the addition of 0.1 mM UDP-glucuronic acid and UDP-[U-¹⁴C]-glucuronic acid (250,000 cpm) and was performed at 37°C for 1 h. A control was simultaneously run using dimethyl sulfoxide instead of the parabens. Assays were also run in the presence of 1 mM PMSF, a serine protease inhibitor that inhibits the carboxylesterase activity.^{19,20} Every assay was repeated twice. The reaction was terminated by the addition of ice-cold ethanol (40 μL). After centrifugation of the reaction mixture at 3,000 $\times g$, an aliquot (60 μL) of the supernatant fraction was applied to an LK6DF silica gel-coated thin-layer chromatography plate (Whatman, Schleicher & Schuell, Montluçon, France) and then developed with a solution containing *n*-butanol, acetone, acetic acid, aqueous 28% (v/v) ammoniac, and water (35:25:9:0.75:30 v/v). After separation by thin-layer chromatography, the plate was dried for 2 h and then put in contact with Kodak BioMax MR Film (Sigma Aldrich) and stored in the dark for at least two days at -20°C. The glucuronides were spotted on the plate, the corresponding gel zone was scraped, and the radioactivity as-

sociated was measured with a Packard spectrometer, using Fluoran Safe Ultima Gold (Courtaboeuf, France) as the scintillation cocktail.

Statistical evaluation of the effect of PMSF on glucuronidation of parabens was performed using STATVIEW 1992–98 software.

Identification of the structure of paraben glucuronide: The structure of the glucuronide formed was established by LC-MS using benzylparaben as the model substrate. Glucuronide was produced by incubation of 3 mM benzylparaben in the presence or absence of 1 mM PMSF with 100 μg of human liver microsomes or 20 μg of UGT1A9, 5 mM UDP-glucuronic acid, 5 mM saccharolactone, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 10 mM MgCl_2 in a final volume of 200 μL for 1 and 2 h at 37°C. A control was performed without UDP-glucuronic acid. The reactions were terminated by addition of 20 μL 6 M HCl and the reaction mixtures were centrifuged at 8,000 $\times g$ to remove proteins; the supernatant was processed by HPLC.

The supernatant (20 μL) resulting from the incubation described above was injected in HPLC apparatus which consisted of a U3000 (DIONEX) coupled to an ESI-Qq-TOF high-resolution mass spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). The HPLC apparatus was equipped with an XBridge C₁₈ column (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm; Milford, MA). The mobile phase consisted of methanol, water, and trifluoroacetic acid (50:50:0.05 v/v), and isocratic elution was carried out at a flow rate of 1 ml/min. The cone voltage of the ESI-Qq-TOF was set at 4500 V and the temperature of the source was 190°C. Data were collected by MicroTOFControl software and analyzed by DataAnalysis using Bruker software (version 3.4).

Kinetic studies: Apparent kinetic constants, K_m and V_{max} , for glucuronidation of parabens and 4-hydroxybenzoic acid were determined using SigmaPlot 9.0 2004 software by varying the concentration of the acceptor substrates (0.05 to 10 mM) with a constant concentration of UDP-glucuronic acid (5.0 mM). Incubation assay conditions were selected to insure linearity of the reaction *versus* time and enzyme concentration. When liver microsomes were used, kinetics were performed with or without PMSF (1.0 mM).

Results

Stability of parabens in human plasma, albumin solution and liver microsomes: Parabens were completely stable in buffer at pH 7.4. None of them showed any disappearance even after 24 h of incubation at 37°C (data not shown). A preliminary analysis of the human plasma by HPLC was performed to ensure the absence of parabens in the samples. Stability of parabens in human plasma depended on the structure of the side chain. Methylparaben and ethylparaben were almost completely

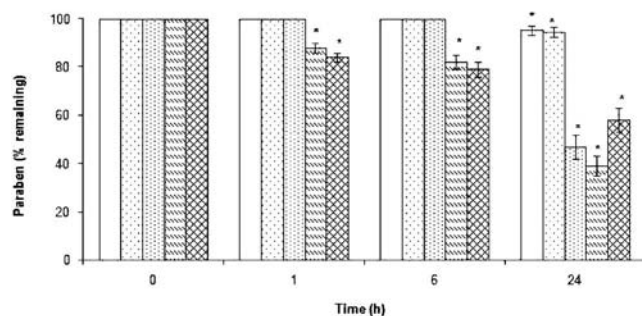


Fig. 3. Time course for disappearance of parabens in human plasma

Parabens (164 μ M) were incubated for 1–24 h at 37°C. At each time interval, the percentage of paraben remaining was measured upon separation HPLC. (□) methylparaben, (▤) ethylparaben, (▥) propylparaben, (▦) butylparaben, and (▧) benzylparaben. Values are the means of triplicate experiments. * $p < 0.05$, when compared with values at time 0 h.

stable. After 24 h of incubation, the residual methylparaben and ethylparaben concentrations represented, respectively, 95% and 94.4% of the initial methylparaben and ethylparaben concentrations in human plasma (**Fig. 3**). Although propylparaben was stable in the first 6 h of incubation in human plasma (**Fig. 3**), the residual propylparaben concentration represented $47.0 \pm 5.0\%$ of the initial concentration in human plasma after 24 h of incubation. In contrast, disappearances of butylparaben and benzylparaben were detected after the first hour of incubation (**Fig. 3**) and were time-dependent, leading to a roughly 50% decrease in concentration after 24 h.

The stability of each paraben was studied also in albumin solution (580 μ M) at pH 7.4. HPLC analysis of aliquots taken from mixtures at 1 and 6 h showed that the parabens were not hydrolyzed. After 24 h of incubation, less than 15% of the initial paraben concentrations had disappeared (data not shown).

The hydrolysis of parabens in human liver microsomes occurred more rapidly than in plasma, and the rate decreased as a function of the chain length (**Fig. 4**). The hydrolysis rate followed first-order kinetics, thus allowing the determination of hydrolysis rate constants and half-lives. The half-lives varied from 22 min for methylparaben to 87 min for butylparaben (**Table 1**); benzylparaben was hydrolyzed at an intermediate rate, with a half-life of 43 min.

Identification of benzylparaben glucuronides by liquid chromatography-mass spectrometry: **Figure 5** shows a typical electrospray spectrum in the positive ion mode obtained with benzylparaben glucuronide formed by human liver microsomes. Pseudo-molecular ions were observed at m/z 91.05, 251.07, 267.09 and 427.10 and were attributed to toluene, benzylparaben (sodium salt), phenyl-glucuronate and benzylparaben glucuronide (sodium salt), respectively. The

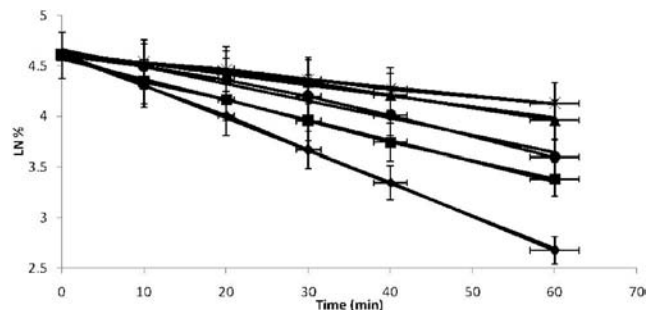


Fig. 4. Pseudo-first-order rate kinetics for the hydrolysis of parabens in human liver microsomes

Parabens were incubated as reported in the legend of **Figure 3**. (♦) Methylparaben, (■) ethylparaben, (▲) propylparaben, (×) butylparaben, and (●) benzylparaben. Values are the means of triplicate experiments.

Table 1. Hydrolysis rate constants (K) and half lives ($t_{1/2}$) of parabens in human liver microsomes

Substrate	K (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
Methylparaben	0.032	21.65
Ethylparaben	0.02	34.65
Propylparaben	0.01	69.3
Butylparaben	0.008	86.62
Benzylparaben	0.016	43.31

Hydrolysis rate constants (K) and half lives ($t_{1/2}$) of parabens in 67 mM phosphate buffer saline (pH 7.4) and with human liver microsomes calculated during the first 60 min of incubation. Constants are calculated from data presented in **Figure 4**.

same glucuronide spectrum was obtained after the incubation of the medium in the presence of PMSF. The results indicated the formation of a benzylparaben-4-O-glucuronide.

Glucuronidation of 4-hydroxybenzoic acid and parabens by human liver microsomes and recombinant human UGT isoforms: In order to identify the UGT isoforms that catalyze the glucuronidation reaction, 4-hydroxybenzoic acid and a series of parabens were incubated with 12 human UGTs, including 8 UGT1A subfamily and 4 UGT2B subfamily isoforms in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 10 mM MgCl_2 (**Fig. 6**). The functionality of the recombinant proteins was previously checked with marker substrates. As judged by glucuronidation activity, UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15, and UGT2B17 showed higher capacities than the other UGT isoforms examined (**Fig. 6**). UGT1A8 and UGT1A1 showed higher activity toward the benzylparaben than the other parabens with an aliphatic chain, whereas UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15, and UGT2B17 showed a lesser or similar activity toward benzylparaben (**Fig. 6**). Finally, UGT1A3, UGT1A4 and UGT1A10 showed a very low activity.

Effect of phenylmethanesulfonyl fluoride on the

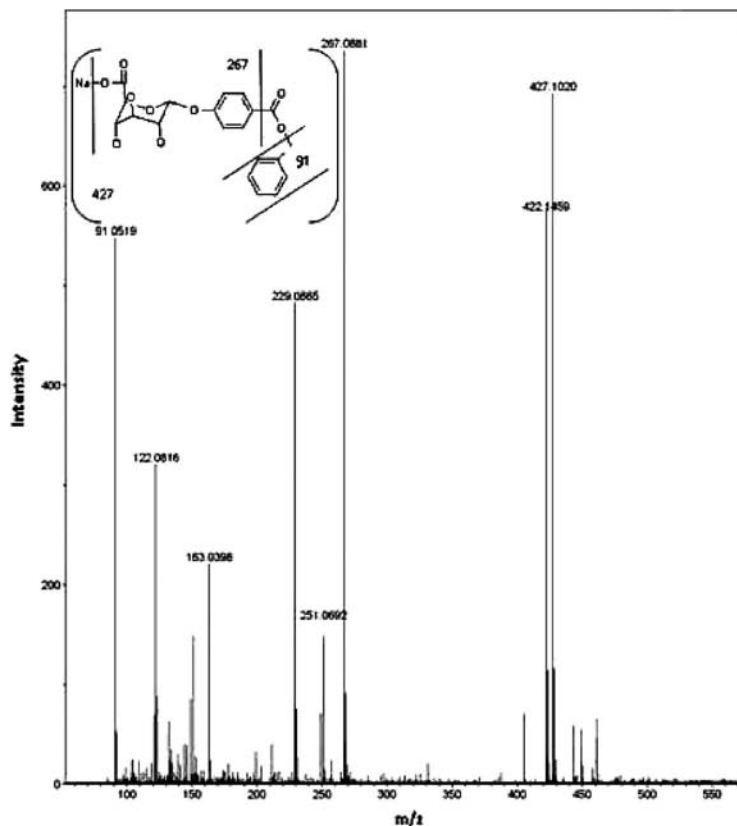


Fig. 5. ESI-Qq-TOF mass spectrum analysis of benzylparaben-glucuronide

The glucuronide was produced by incubation of liver microsomes with 3 mM benzylparaben in the presence of 5 mM UDP-glucuronic acid. Fragmentation of the metabolite was obtained after isolation by HPLC. Inset shows the fragmentation map of the glucuronide.

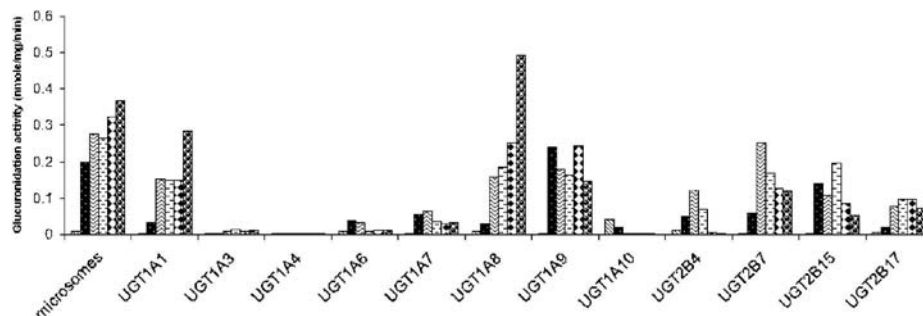


Fig. 6. Glucuronidation of 4-hydroxybenzoic acid and parabens by human liver microsomes and recombinant human UGT

The compounds (1 mM) were incubated in 100 mM Tris-HCl and 10 mM MgCl₂ (pH 7.4) in the presence of 5 mM UDP-glucuronic acid for 1 h at 37°C. Each assay was repeated twice. The glucuronidation activities shown in this figure are the means of two assays performed with human liver microsomes and recombinant human UGT1A or recombinant human UGT2B. All isoforms were active, using marker substrates as indicated in Methods. (□) 4-hydroxybenzoic acid, (■) methylparaben, (▨) ethylparaben, (▤) propylparaben, (▥) butylparaben, and (▧) benzylparaben.

glucuronidation of parabens: Parabens are esters of 4-hydroxybenzoic acid which can be hydrolyzed by esterases prior to glucuronidation. As carboxylesterases are present in human liver microsomes,¹⁰ we studied the influence of PMSF (1.0 mM), a strong serine protease inhibitor of carboxylesterase,¹⁸ on paraben glucuronidation. As expected, glucuronidation of 1-naphthol was not af-

fected (**Fig. 7**). 4-Hydroxybenzoic acid and methyl-, propyl- and butylparaben glucuronidations were not significantly affected by PMSF; however, ethyl- and benzylparaben glucuronidation activities significantly increased by 59.2% and 140.7%, respectively in the presence of PMSF (**Fig. 7**).

Similar experiments were performed with UGT1A9.

Addition of PMSF did not significantly change or even slightly decrease the glucuronidation activity (results not shown). These results indicate the absence of esterase activity in the recombinant enzyme preparation.

Kinetics of paraben glucuronidation by human liver microsomes and by recombinant UGT1A9:

Kinetic analysis was performed for glucuronidation of parabens by human liver microsomes in the absence or presence of 1 mM PMSF. Representative plots of glucuronidation rate versus substrate concentration showed typical Michaelis-Menten kinetics (data not shown), which led to the calculation of the apparent kinetic constants K_m and V_{max} (Table 2). However, 4-hydroxybenzoic acid is a very poor substrate of microsomal or recombinant UGTs compared to parabens; this fact was evident when 4-hydroxybenzoic acid failed to reach saturating conditions, even with high concentrations (10 mM), thus leading to uncertainty in

the determination of its kinetic constants. The large error bar measured from repeated determinations underlines the difficulty in determining this parameter due to the very low velocity measured (Table 2). On the other hand, substrate inhibition was observed for 10 mM parabens, except for methylparaben (results not shown).

The affinity of enzyme fractions toward parabens was much higher than that measured with 4-hydroxybenzoic acid. On the other hand, K_m values decreased with benzylparaben which has the bulkiest structure. Inhibition of the esterase activity by PMSF did not change the K_m constants for parabens (Table 2).

Kinetic analysis was also performed on UGT1A9 as a model enzyme catalyzing the glucuronidation of parabens. The reaction was performed without PMSF, as addition of the inhibitor did not significantly change the glucuronidation rate. Here also, affinity toward 4-hydroxybenzoic acid was low when compared to the series of parabens.

Discussion

Parabens are largely used as preservatives in cosmetics, drugs and foodstuffs due to their efficient antibacterial properties. Potential health risks in man as a result of regular exposure have recently been suggested, although these substances have been considered safe because their extensive metabolism prevents them from accumulating in tissues. The possible estrogenic hazard of parabens is still a much-debated question. Such a hazard may, however, be affected by the metabolism and elimination rates of these substances, which are dose, route and species dependent.^{1,4,21} The aim of this work was to better characterize the *in vitro* biotransformation in man of a series of parabens commonly used in industry. Attention was paid to the hydrolysis and glucuronidation reactions, which are the main metabolic pathways in man. These processes are catalyzed by the multifamilies of esterases and UGTs. In particular, the contribution of UGT isoenzymes has never been assessed.

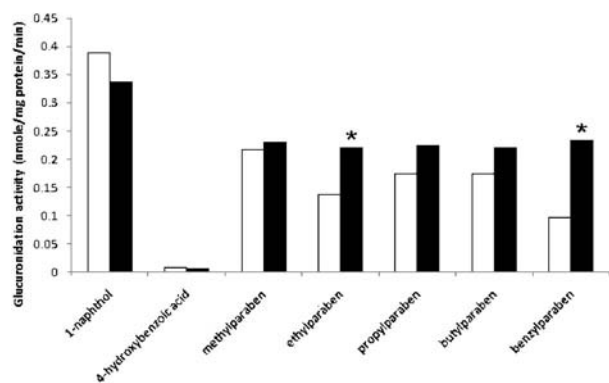


Fig. 7. Effect of PMSF on the glucuronidation rate of 1-naphthol, 4-hydroxybenzoic acid and parabens by human liver microsomes.

1-Naphthol, 4-hydroxybenzoic acid and parabens were incubated as reported in the legend of Figure 6 in the presence (■) or absence (□) of the esterase inhibitor (1 mM PMSF). The values are the mean of two assays for each substrate. * $p < 0.05$, significantly different from values obtained without PMSF.

Table 2. Kinetic analysis for glucuronidation of 4-hydroxybenzoic acid and parabens by human liver microsomes and human liver recombinant UGT1A9

Substrate	V_{max} (nmol/min/mg total protein)			K_m		mM UGT1A9	V_{max}/K_m (nl/min/mg total protein)		
	Human liver microsomes		UGT1A9	Human liver microsomes			Human liver microsomes		
	In the presence of PMSF	In the absence of PMSF		In the presence of PMSF	In the absence of PMSF		In the presence of PMSF	In the absence of PMSF	UGT1A9
4-Hydroxybenzoic acid	0.66 ± 0.30	0.098 ± 0.01	0.084 ± 0.02	39.51 ± 21.8	8.02 ± 1.17	24.12 ± 9.73	0.017	0.012	0.003
Methylparaben	0.70 ± 0.02	0.62 ± 0.01	0.98 ± 0.12	0.23 ± 0.02	0.298 ± 0.02	1.28 ± 0.25	3.08	2.08	0.76
Ethylparaben	0.41 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.21 ± 0.04	2.29	1.85	1.19
Propylparaben	0.36 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.46 ± 0.07	0.34 ± 0.06	1.14	1.08	1.16
Butylparaben	0.70 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.35 ± 0.05	4.56	3.83	1.23
Benzylparaben	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.097 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.04	6.57	4.74	1.14

Surprisingly, parabens were rather stable in plasma, especially methyl- and ethylparaben. Hydrolysis accounted for 50% of the initial dose, however, for the other compounds after one day. Our results were consistent with those of Ye *et al.*,²⁵⁾ who reported that methylparaben was stable in human plasma, even after 30 days. On the other hand, they also found that propylparaben was stable in similar conditions. This result was different from our study, in which propylparaben was found to be 50% hydrolyzed after one day (**Fig. 3**), suggesting the importance of inter-individual esterase activity variation in the hydrolysis of these compounds in humans.

Human plasma contains many esterases, such as butyrylcholinesterase, paraoxonase, acetylcholinesterase and albumin,^{22,23)} that can be involved in paraben hydrolysis. We found, however, that albumin, which is known to possess esterase activity,²⁴⁾ was not involved in the hydrolysis of the series of parabens at physiological concentration (580 μ M).

In contrast to the situation in plasma, parabens were not stable in human liver microsomes. They were rapidly hydrolyzed, but their hydrolysis rate constants decreased linearly according to the length of the alkyl chain when human liver microsomes were used. Butylparaben was 4-times less rapidly hydrolyzed than methylparaben. The introduction of a benzyl ring found in benzylparaben did not enhance the stability compared to that of the other compounds. The results obtained were in accordance with those reported by Jewell *et al.*,¹⁰⁾ except those for benzylparaben, whose hydrolysis rate they found to be similar to that measured for butylparaben, but with high inter-individual variations. These authors^{9,10)} showed that parabens were mainly hydrolyzed to 4-hydroxybenzoic acid by microsomal carboxylesterases 1 and 2.

In liver microsomes, hydrolysis competed with glucuronidation for the metabolism of parabens. PMSF noticeably inhibits human liver microsomal carboxylesterase activities, which are involved in xenobiotic hydrolysis.^{19,20)} The addition of PMSF to liver microsomes showed that the inhibitor was able to modulate the glucuronidation activity of two parabens. It did not affect 4-hydroxybenzoic acid, methyl-, propyl- and butylparaben glucuronidation, whereas, it increased the glucuronidation of ethyl- and benzylparaben. **Table 2** shows that there is a decrease in K_m values for ethyl- and benzylparabens in the presence of PMSF. This result indicates that the affinity of human liver microsomes for these two compounds increased in the presence of PMSF. This can explain the significant increase of glucuronidation rate of these two parabens in the presence of PMSF in **Figure 7**.

The data also suggest that the formation of the 4-O-glucuronide of parabens accounted for most of the glucuronidation activity measured, as 4-hydroxybenzoic acid resulting from the hydrolysis was glucuronidated at

a very low rate and presented a K_m value about 5 times higher than that measured for the parabens. On the other hand, incubation performed at pH 6.5 in maleate buffer, which is known to increase the stability of acylglucuronides formed,²⁴⁾ did not enhance the production of 4-hydroxybenzoic acid glucuronides (not shown). Indeed, the LC-MS experiment clearly identified the biosynthesis of an ether 4-hydroxyglucuronide after incubation with human liver microsomes.

We next determined the human UGT1A and UGT2B isoforms able to glucuronidate parabens. Parabens were substrates of both UGT1A and UGT2B families, among those, UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 were the most efficient. UGT1A9 is one of the major isoforms in liver that metabolizes a wide array of substances, e.g., drugs, steroids, bile acids, fatty acids, and dietary constituents. Radominska-Pandya *et al.*,¹³⁾ reported that substituted phenols, such as 4-ethyl-, 4-butyl-, and 4-pentylphenols, whose structures are comparable to those of parabens were glucuronidated by UGT1A9. UGT1A8 and UGT1A1, which also compete with UGT1A9 toward phenolic substances,^{26,27)} could also glucuronidate parabens. On the other hand, UGT1A6, which is known to metabolize planar phenolic substances such as naphthols or polycyclic aromatic hydrocarbons,^{28,29)} was poorly active with parabens, thus indicating that the bulkiness of the alkyl/benzyl moiety strongly affected the glucuronidation rate by this isoform. UGT2B isoforms as UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 were also able to catalyze the glucuronidation of parabens. The multiplicity of the UGT isoforms involved in the biotransformation of parabens constitutes a powerful detoxification barrier. This overlapping substrate specificity may efficiently counteract the possible changes in UGT specific isoform activity due to genetic polymorphism or induction/repression after drug exposure, thus suggesting that these compounds may be considered as safe molecules in humans.

Apparent K_m values measured with UGT1A9 for ethyl-, propyl- and benzylparaben were similar to those found with human liver microsomes, thus suggesting this isoform was one of the main UGTs responsible for glucuronidation of these substances. Examination of the apparent K_m and V_{max}/K_m values in liver microsomes revealed that the enzyme efficiency increased for the bulkier substance, benzylparaben. This was probably due to a concomitant increase in lipophilicity of this compound in regard to the hydrophobic microsomal membrane environment of the UGT binding site.^{30,31)}

In conclusion, this study shows that parabens are extensively metabolized in human liver microsomes by the combined action of esterases and UGT of families 1A and 2B. Compared to 4-hydroxybenzoic acid, parabens were good substrates of UGT. Altogether, this active biotrans-

formation is likely to prevent the accumulation of these molecules in man and thus prevent their possible toxicity.

Acknowledgments: The help of Dr Virginie Lattard (UMR 7561) is gratefully appreciated. We thank also Francois Dupire (University of Nancy-1) for his contribution in the mass spectrometry analysis.

References

- Soni, M., Carabin, I. and Burdock, G.: Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.*, **43**: 985–1015 (2005).
- Murrell, V. G. and Vincent, J. M.: Esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. V. Bacteriostatic action of n-alkyl 4-hydroxybenzoates. *J. Soc. Chem. Ind.*, 69: 109–113 (1950).
- Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J. and Pope, G. S.: Concentration of parabens in human breast tumors. *J. Appl. Toxicol.*, **24**: 5–13 (2004).
- Golden, R., Gandy, J. and Vollmer, G.: A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit. Rev. Toxicol.*, **35**: 435–458 (2005).
- Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M. and Kiyama, R.: Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoyl-phenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicol. Lett.*, **163**: 130–141 (2005).
- Tsukamoto, H. and Terada, S.: Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit (1). *Chem. Pharm. Bull.*, **8**: 1066–1070 (1960).
- Tsukamoto, H. and Terada, S.: Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit (2). *Chem. Pharm. Bull.*, **10**: 86–90 (1962).
- Tsukamoto, H. and Terada, S.: Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit (4). *Chem. Pharm. Bull.*, **12**: 765–769 (1964).
- Jewell, C., Prusakiewicz, J. J., Ackermann, C., Payne, N. A., Fate, G., Voorman, R. and Williams, F. M.: Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **225**: 221–228 (2007).
- Jewell, C., Bennett, P., Mutch, E., Ackermann, C. and Williams, F. M.: Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochem. Pharmacol.*, **74**: 932–939 (2007).
- Ye, X., Bishop, A. M., Reidy, J. A., Needham, L. L. and Calafat, A. M.: Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ. Health Perspect.*, **114**: 1843–1846 (2006).
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Roy-Chowdhury, J., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. K. and Nebert, D. W.: The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, **7**: 255–269 (1997).
- Radomska-Pandya, A., Czernik, P., Little, J., Battaglia, E., and Mackenzie, P.: Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Rev.*, **31**: 817–899 (1999).
- Turgeon, D., Carrier, J., Chouinard, S. and Belanger, A.: Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics. *Drug Metab. Dispos.*, **31**: 670–676 (2003).
- Mackenzie, P. I., Bock, K. W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J. O., Owens, I. S. and Nebert, D. W.: Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharm. Genomics*, **15**: 677–685 (2005).
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248–254 (1976).
- Bansal, S. K. and Gessner, T.: A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronosyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-¹⁴C]glucuronic acid. *Anal. Biochem.*, **109**: 321–329 (1980).
- Prouty, W. and Goldberg, A.: Effects of protease inhibitors on protein breakdown in *Escherichia coli*. *Chem. Metab. Macromol.*, **247**: 3341–3352 (1972).
- Yamaori, S., Fujiyama, N., Kushihara, M., Kimura, T., Yamamoto, I., Sone, T., Masakazu, I., Ohshima, T., Matsumura, K., Oda, M. and Watanabe, K.: Involvement of human blood arylesterases and liver microsomal carboxylesterases in nafamostat hydrolysis. *Drug Metab. Pharmacokin.*, **21**: 147–155 (2006).
- Cherif, S. and Gargouri, Y.: An organic-solvent-tolerant esterase from turkey pharyngeal tissue. *Biores. Technol.*, **101**: 3732–3736 (2010).
- Frederiksen, H., Taxvig, C., Hass, U., Vinggaard, A. M. and Nellemann, C.: Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicol. Sci.*, **106**: 376–383 (2008).
- Lindegardh, N., Davies, G. R., Hien, T. T., Farrar, J., Singhasivanon, P., Day, N. P. J. and White, N. J.: Rapid degradation of oseltamivir phosphate in clinical samples by plasma esterases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**: 3197–3199 (2006).
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P. and Lockridge, O.: Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.*, **70**: 1673–1684 (2005).
- Georges, H., Presle, N., Buronfosse, T., Fournel-Gigleux, S., Netter, P., Magdalou, J. and Lapicque, F.: *In vitro* stereoselective degradation of carprofen glucuronide by human serum albumin. Characterization of sites and reactive amino acids. *Chirality*, **12**: 53–62 (2000).
- Ye, X., Wong, L. Y., Jia, L. T., Needham, L. L. and Calafat, A. M.: Stability of the conjugated species of environmental phenols and parabens in human serum. *Environ. Int.*, **35**: 1160–1163 (2009).
- Fujiwara, R., Nakajima, M., Yamanaka, H. and Yokoi, T.: Key amino acid residues responsible for the difference in substrate specificity of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A9 and UGT1A8. *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 41–46 (2009).
- Court, M. H.: Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol.*, **400**: 104–116 (2005).
- Suleman, F. G., Abid, A., Gradinaru, D., Daval, J. L., Magdalou, J. and Minn, A.: Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Bioche.*

- Biophys.*, **358**: 63–67 (1998).
- 29) Bock, K. W. and Köhle, C.: UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Drug Met. Rev.*, **400**: 55–75 (2005).
- 30) Meech, R. and Mackenzie, P. I.: Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **24**: 907–915 (1997).
- 31) Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S. and Ouzzine, M.: Insights on membrane topology and structure-function of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Rev.*, **42**: 154–161 (2010).

Annexe 2 : Publication 2

Regular Article

Identification of the Human UDP-glucuronosyltransferase Isoforms Involved in the Glucuronidation of the Phytochemical Ferulic Acid

Xiaojun Li^{1,2}, Liang SHANG¹, Yaohua WU², Suzanne ABBAS², Dong Li², Patrick NETTER², Mohamed OUZZINE², Hui WANG¹ and Jacques MAGDALOU^{2,*}

¹Pharmacology Department of Basic Medical College, Wuhan University, Wuhan, China

²UMR 7561 CNRS-Nancy Université, School of Medicine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Full text of this paper is available at <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>

Summary: Ferulic acid (FA), a member of the hydroxycinnamate family, is an abundant dietary antioxidant that may offer beneficial effects against cancer, cardiovascular disease, diabetes, osteoarthritis and Alzheimer's disease. In this study, evidence for sulfation and glucuronidation of FA was investigated upon incubation with human liver microsomes and cytosol. Two main glucuronides, M1 (ether O-glucuronide) and M2 (ester acylglucuronide), were formed with a similar affinity (apparent K_m 3.53 and 5.15 mM, respectively). A phenol sulfoconjugate was also formed with a higher affinity (K_m 0.53 mM). Identification of the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms involved in FA glucuronidation was investigated with 12 human recombinant enzymes. FA was mainly glucuronidated by UGT1A isoforms and by UGT2B7. UGT1A4, 2B4, 2B15 and 2B17 failed to glucuronidate the substance. Examination of the kinetic constants revealed that FA was mainly glucuronidated by UGT1A1 at the two nucleophilic groups. UGT1A3 was able to glucuronidate these two positions with the same, but low, efficiency. UGT1A6 and 1A8 were involved in the formation of the ether glucuronide only, whereas UGT1A7, 1A10 and 2B7 preferentially glucuronidated the carboxyl group. Moreover, octyl gallate, a marker substrate of UGT1A1, competitively inhibited FA glucuronidation mediated by this isoform. Altogether, the results suggest that FA glucuronidation is primarily mediated by UGT1A1.

Keywords: glucuronidation; sulfation; UDP-glucuronosyltransferase; recombinant human UGT; ferulic acid; kinetics, man

Introduction

Ferulic acid [FA, (3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid)] is widely distributed in plants and constitutes a bioactive ingredient of many staple foods such as grain bran, whole-grain foods, citrus fruits, banana, coffee, orange juice, eggplant, bamboo shoots, beetroot, cabbage, spinach and broccoli.¹⁾ The quantity of FA intake through the consumption of cereals, vegetables, fruits, coffee and juices may reach 150–250 mg/day.¹⁾ Furthermore, FA has been approved as an additive antioxidant and food preservative in Japan.^{2,3)} Sodium ferulate is used in China for treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases.⁴⁾ FA has been suggested to possess pharmacological activity as an anti-inflammatory and⁵⁾ anti-oxidant,²⁾ to afford protection against beta-amyloid peptide toxicity *in vivo*,⁶⁾ and to improve sperm viability and motility in both fertile and

infertile men.⁷⁾ FA biotransformation has been studied in rats.^{8–11)} The studies showed that after administration of FA in the diet, the substance was quickly absorbed in the stomach as the free form and then conjugated mainly in liver as sulfate and glucuronide conjugates.¹¹⁾ The pharmacokinetics of FA in humans has not been well documented. Kern *et al.*¹²⁾ reported that most of the FA detected in urine and plasma was present as conjugates (feruloylglycine and/or glucuronides) after ingestion of FA from wheat bran. Virgili *et al.*¹³⁾ showed that 92% of ingested FA was excreted in the urine as free FA and its glucuronic/sulfate conjugates after consumption of 2.4 mg free FA from French maritime pine bark extract. More recently, Wong *et al.*¹⁴⁾ reported that FA and other structurally related hydroxycinnamic acids were actively glucuronidated and sulfated in the human liver and intestine before being excreted in urine. These reactions are catalyzed by the UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and

Received; December 22, 2010, Accepted; February 28, 2011

J-STAGE Advance Published Date: March 14, 2011, doi:10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-125

*To whom correspondence should be addressed: Jacques MAGDALOU, UMR 7561 CNRS-Nancy Université, Faculté de Médecine, BP 184, F54505 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex, France. Tel. +33-383-683-973, Fax. +33-383-683-959, E-mail: Jacques.magdalou@medecine.uhp-nancy.fr

the sulfotransferases, respectively. UGTs are a multigenic family of enzymes, mainly expressed in endoplasmic reticulum, that bind glucuronic acid from a high energy donor (UDP-glucuronic acid) onto nucleophilic groups such as phenol, amine, thiol or carboxylic acid.^{15,16} To date, 21 UGT isoforms have been identified in humans.¹⁷ On the other hand, the soluble forms of sulfotransferases attach a sulfate moiety from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) to the phenol or amine group of various drugs and other xenobiotics. As is also the case for UGT, sulfotransferases lead to the formation of hydrophilic conjugates that are easily excreted from the body into urine. Competition between these two conjugation pathways for the same phenolic or amine substrate occurs frequently, thus providing an efficient detoxication route to clear the substance from the body. Here we provide a detailed study on the glucuronidation and sulfation of FA using human liver microsomes and cytosol as the source of enzymes. The formation of two glucuronides (an ether and an acyl-glucuronide) and one sulfate conjugate of FA was identified. Screening of the glucuronidation reaction with human recombinant UGT isoforms indicated that UGT1A1 was the main enzyme involved in that process.

Methods

Materials: FA (sodium salt, $\geq 98\%$) was purchased from Chongqing Yaoyou Pharmaceuticals Co., Ltd (Chongqing, China). D-Saccharic acid 1,4-lactone; UDP-glucuronic acid trisodium salt (UDPGA); DL-dithiothreitol; and 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (lithium salt hydrate) (PAPS) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). [³⁵S]PAPS, 1–3 Ci/mmol, 0.5 mCi/ml, 100 μ Ci was purchased from PerkinElmer (Norwalk, Connecticut, USA). Pooled human liver microsomes (Batch MIC259299, 26 livers: 20 male and 6 female) and human liver cytosol (Batch CYT259013, 3 livers: 2 male and 1 female) were purchased from Biopredic International (Rennes, France). Recombinant human UGT supersomes (1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15 and 2B17) expressed in baculovirus-infected cells were purchased from BD Biosciences (Woburn, Massachusetts, USA). All the other chemicals and reagents were of the highest grade commercially available.

Identification of FA glucuronidation: The incubation mixture (100 μ l) contained human liver microsomes (50 μ g protein); 2.5 mM UDPGA; 10 mM MgCl₂; 10 mM D-saccharic acid 1,4-lactone; 10 mM FA and 50 mM Tris-maleate buffer (pH 6.5). There was a 5-min preincubation step at 37°C before the reaction was started by addition of UDPGA. After 1 h of incubation at 37°C, the reaction was terminated by the addition of 10 μ l of 6 N HCl, followed by centrifugation at 10,000 *g* for 10 min to precipitate the protein and collect the supernatant for analysis of the conjugates. Control incubations were concomitantly run without UDPGA. Identification of the chemical structure of

the glucuronides was performed by LC/MS/MS using a U3000-Dionex and Bruker micrOTOF-Q instrument with a 5- μ m Apollo C-18 column (4.6 \times 250 mm) (Delta Technical Products Company, Des Plaines, Illinois, USA). Detection was carried out at 320 nm with a 30-min gradient. Solvent A was 0.1% aqueous acetic acid solution and solvent B was acetonitrile. The gradient system was A-B (v/v) = 84/16 (0–4 min) \rightarrow A-B = 70/30 (20 min) \rightarrow A-B (v/v) = 84/16 (30 min). The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min. Mass spectra were recorded using electrospray ionization (ESI) in the negative mode with active focus, scanning from 50 to 3000 m/z. The ion spray voltage was 4500 VDS, the end plate offset 500 VDS, collision cell RF 150 Vpp, nebulizer 1.0 bar, source temperature 190°C and dry gas flow 4.0 l/min.

Analysis of glucuronides by HPLC-UV: HPLC analysis was carried out with a Waters 2965 pump and 486 tunable absorbance detector. The column, mobile phase, gradient and flow rate were identical to those used for LC/MS/MS. Linear calibration curves for quantification of the glucuronides were derived from the peak areas of metabolites of the external standard FA, using standard solutions of FA (0.1–100 μ M). The correlation coefficient for the standard curve was above 0.99.

Sulfation assay and kinetic analysis: Sulfation activities were determined from the radioactivity associated with the metabolites obtained with [³⁵S]PAPS as a sulfate donor after thin-layer chromatography as described previously^{18,19} with slight modification. A typical incubation mixture (20 μ l) consisted of 50 mM Na-acetate buffer (pH 5.4), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 100 μ M [³⁵S]PAPS (0.5 Ci/mmol), 10.5 μ g cytosol protein and various FA concentrations ranging from 0.01 to 5 mM. The reaction was initiated by addition of [³⁵S]PAPS and terminated by addition of 20 μ l of ice-cold methanol after incubation at 37°C for 15 min. A control determination was conducted in the absence of FA. The reaction rate was shown to be linear for 15 min. Part (20 μ l) of the reaction mixture was spotted on a thin-layer plate (thin-layer chromatography aluminum plate silica gel 60 F254, 250 μ m; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The metabolites were developed with a solvent system of chloroform-methanol-water-25% ammonia aqueous (60:35:7.5:0.5 v/v). The plates were developed for 2 h, with a solvent front of approximately 18 cm. The chromatogram was then removed from the chamber and air-dried for 15 min. The plate was placed in contact with Kodak XB-1 film (Eastman Kodak, Rochester, New York, USA) for 2 days. After development, each spot corresponding to the metabolite was scraped into a vial containing 4.5 ml Ultima-Gold scintillation cocktail (PerkinElmer, Norwalk, Connecticut, USA). The radioactivity level was measured with a 1900 CA Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (Packard Instrument Company, Downers Grove, Illinois, USA).

Kinetic analysis with human liver microsomes and recombinant human UGTs:

The incubation was performed as previously described with FA (0.1–12.5 mM) in Tris-maleate buffer (50 mM, pH 6.5). The mixture was pre-incubated for 5 min at 37°C before the reaction was started by addition of a fixed UDPGA concentration (2.5 mM). After 1 h or 2 h incubation at 37°C, the reaction was terminated by the addition of 10 µl of 6 N HCl, followed by centrifugation at 10,000 *g* for 10 min to obtain the supernatant for HPLC analysis. All reaction rates were shown to be linear for 2 h. A control determination was conducted in the absence of UDPGA. The apparent kinetic parameters K_m and relative V_{max} were determined using the SigmaPlot 10.0 program (Systat Software, San Jose, CA).

Relative expression of the UGT isoforms by Western blotting:

Glucuronidation activities were adjusted by the relative levels of the UGT isoforms and expressed as relative glucuronidation activities. UGT protein levels were determined by Western blotting following a previously published procedure.²⁰ Visualization and expression level quantification were performed as previously described.²¹ Proteins (1 µg) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and probed with the anti-C-terminal peptide anti-UGT1A6 as described previously.²² The resulting immunocomplexes were visualized using a Western blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and exposed on Kodak XB-1 film. The relative levels of UGT1A isoforms were determined by their integrated optical densities using the program Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan). The expression of UGT1A3 was designated as the basal UGT1A expression level and all UGTs were compared with UGT1A3.

Inhibition by octyl gallate of FA glucuronidation by recombinant UGT1A1:

Octyl gallate, a typical substrate of UGT1A1,^{23,24} was used as an inhibitor of FA glucuronidation. The inhibitory potency and the type of inhibition observed were determined. For this purpose, the FA glucuronidation activity of human liver microsomes and UGT1A1 was measured in the presence of 1 µM to 1 mM octyl gallate dissolved in dimethylsulfoxide. IC₅₀ values were determined by nonlinear regression (curve fit) using Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). In addition, the inhibition kinetics of FA glucuronidation by octyl gallate with recombinant UGT1A1 was investigated. Glucuronidation of FA (concentrations ranging from 0.1 to 1 mM) was measured in the presence of octyl gallate (0, 0.01, 0.05 and 0.10 mM). Incubations were run as previously described.

Results

Identification of FA glucuronidation: On incubation of FA with human liver microsomes in the presence of UDPGA and separation of the metabolite by HPLC, two

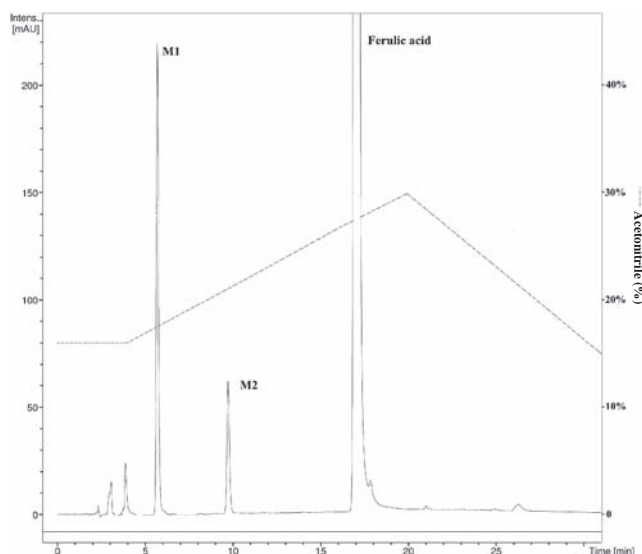


Fig. 1. Chromatogram of the HPLC resolution of the reaction products after incubation of ferulic acid with human liver microsomes

Ferulic acid (10 mM) was incubated with human liver microsomes (50 µg protein) and 2.5 mM UDPGA. The peaks corresponding to the two glucuronides M1 and M2 and ferulic acid were eluted on a C-18 column using an acetonitrile gradient and were detected at 320 nm. The gradient system was A-B (v/v) = 84/16 (0–4 min) → A-B = 70/30 (20 min) → A-B (v/v) = 84/16 (30 min).

polar metabolites, designed M1 and M2, could be eluted (Fig. 1). Molecular ions $[M-H]^-$ of the two metabolites were collected and analyzed by mass spectrometry (Fig. 2). The molecular ions $[M-H]^-$ of both M1 and M2 were m/z 369, indicating the addition of a glucuronic acid moiety (176) to FA (m/z 193). The only significant difference between the MS/MS spectra of M1 and M2 was the presence of an m/z 178 peak in the M1 spectrum, but not in that of M2. After removal of the glucuronic acid moiety from M1, the methyl group can be lost before or after the loss of the CO₂ moiety. But for M2, the methyl group can only be lost after the loss of the CO₂ moiety. We presumed that glucuronic acid was conjugated with the 4-hydroxy group of FA to form M1. This result was further supported by examination of the water solubility of the M1 glucuronide, which was higher than that of M2 (higher retention time). The presence of the free carboxylic acid in M1 was responsible for this behavior.

Sulfation of FA: The phenol group of FA is prominent and is able to be sulfated by cytosolic sulfotransferase.²⁵ Indeed, when FA was incubated with the cytosolic fraction in the presence of ³⁵S-radiolabeled PAPS, a radioactive, polar sulfate metabolite was formed that was not present in the control experiment (Fig. 3). This result was further confirmed using an HPLC-UV method (data not shown).

Kinetics of glucuronidation and sulfation of FA by human liver microsomes and cytosol: The optimal pH values for the glucuronidation and sulfation reactions were determined by performing incubation at

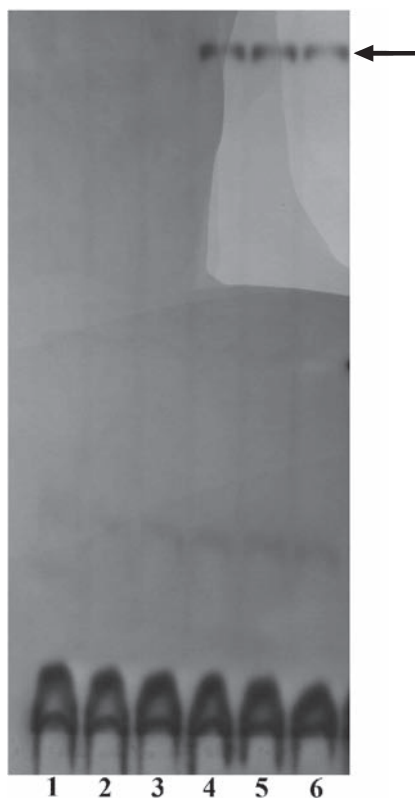


Fig. 3. Radiochromatogram after incubation of ferulic acid with human liver cytosol

1, 2, and 3 are controls without ferulic acid; 4, 5, and 6 are assays with PAPS (100 μ M [35 S]PAPS, 0.5 Ci/mmol). The arrow indicates the sulfoconjugate of ferulic acid.

Table 1. Apparent kinetic constants of ferulic acid glucuronidation and sulfation in human liver microsomes and cytosol

Pathway		K_m (mM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m (nL/min/mg)
Glucuronidation	M1	3.53 \pm 0.36	961.48 \pm 38.81	272.37
	M2	5.15 \pm 0.38	498.84 \pm 16.63	96.86
Sulfation		0.53 \pm 0.08	259.21 \pm 11.72	498.08

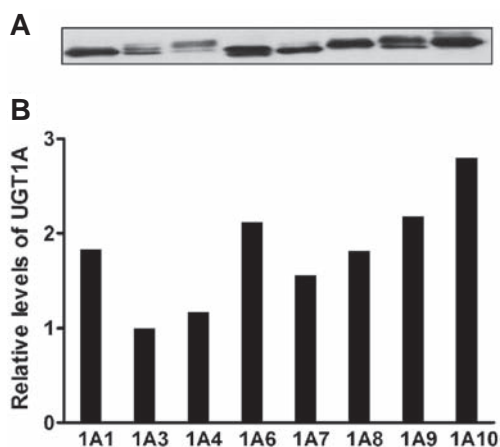


Fig. 4. Relative expression levels of UGT1A proteins

(A) Human liver recombinant UGTs (1 μ g protein) were processed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis and probed with an antibody directed against the UGT1A family. (B) The expression of UGT1A3 was designated as the basal UGT1A expression level.

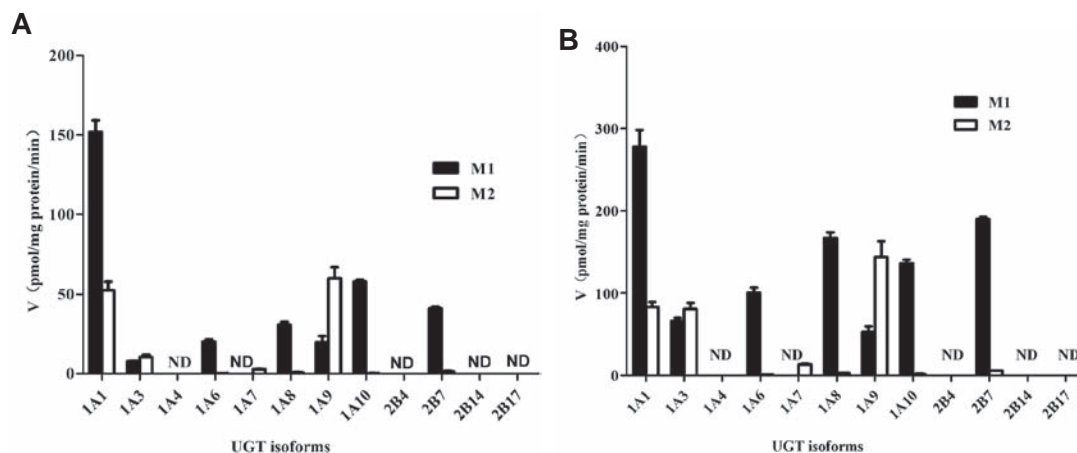


Fig. 5. Glucuronidation of ferulic acid with human recombinant UGT isoforms

Ferulic acid (A, 1.0 mM; B, 10 mM) was incubated with the protein fractions (50 μ g) in the presence of 2.5 mM UDPGA. Activity values are the means \pm S.E. of triplicate determinations. N.D. Not detectable; limit of detection was 0.011 nmol glucuronide.

1A9, 1A10 and 2B7 could glucuronidate FA at higher rates, although regioselectivity was observed for some of them. UGT1A6, UGT1A10 and UGT2B could not form any significant amount of acylglucuronide (M2). Isoforms such as UGT1A3 and 1A9 could glucuronidate the two

nucleophilic groups to various extents. Production of M1 glucuronide proceeded generally at a higher rate than that of M2. From the series examined, it was clear that UGT1A1 was by far the main enzyme involved in FA glucuronidation.

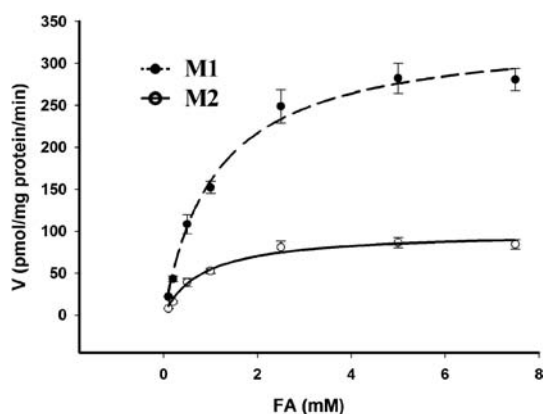
Table 2. Kinetic parameters of ferulic acid glucuronidation mediated by recombinant UGT isoforms

UGT	Apparent K_m (mM)		Relative V_{max} (pmol/min/mg protein)		V_{max}/K_m (nL/min/mg)	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
1A1	1.11 ± 0.15	0.83 ± 0.13	337.05 ± 13.57	99.04 ± 4.55	303.73	119.76
1A3	13.00 ± 2.32	14.70 ± 1.48	149.38 ± 15.93	199.42 ± 12.45	11.49	13.57
1A6	7.16 ± 0.38	5.87 ± 0.68	174.14 ± 4.78	1.45 ± 0.08	24.31	0.25
1A7	N.D.	6.15 ± 0.58	N.D.	20.41 ± 0.87	N.D.	3.32
1A8	8.70 ± 0.80	4.17 ± 0.54	301.63 ± 13.24	3.77 ± 0.20	34.69	0.90
1A9	2.50 ± 0.40	2.47 ± 0.50	72.74 ± 4.58	229.37 ± 21.70	29.10	92.94
1A10	2.49 ± 0.21	1.04 ± 0.36	207.04 ± 6.97	0.99 ± 0.12	83.11	0.95
2B7	6.32 ± 0.35	6.90 ± 1.25	314.75 ± 8.45 ^a	9.38 ± 0.84 ^c	49.80	1.36

Relative V_{max} = Apparent V_{max} /Relative level of UGT1A isoform.

^a V_{max} value not adjusted to relative UGT.

ND, activity not detectable.

**Fig. 6. Kinetics of ferulic acid (FA) glucuronidation by recombinant UGT1A1**

The incubation mixture (100 μ l) contained UGT1A1 (50 μ g protein), 2.5 mM UDPGA, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM D-saccharic acid 1,4-lactone and ferulic acid (0.1–7.5 mM) in 50 mM Tris-maleate buffer (pH 6.5). Activity values were the means \pm S.E. of triplicate determinations.

Apparent kinetic constants for glucuronidation of FA mediated by human recombinant UGTs: The kinetic parameters of the active recombinant UGTs for production of M1 and M2 glucuronides are shown in Table 2. The V_{max} values reported were calculated taking into account the relative expression level of each recombinant UGT isoform. Typical glucuronidation velocity curves for recombinant UGTs are shown in Figure 6, with UGT1A1 as an example. All the UGTs followed Michaelis-Menten kinetics. In terms of K_m , UGT1A1 exhibited the highest affinity for FA, whichever nucleophilic group was glucuronidated. UGT1A9 and 1A10 also presented low K_m values for both groups. The affinity of UGT1A3 for FA was the lowest of the UGT series. Even though no major differences in K_m were measured between glucuronidation of the phenolic group and glucuronidation of the carboxylic

acid group for a given isoform, important variations were observed in terms of V_{max} . As mentioned above, production of M1 glucuronide proceeded generally at a higher rate compared to that of M2. The V_{max} values for UGT1A10, 1A6, 1A8 and 2B7 for the production of M1 were 30 to 200 times higher than those for M2.

Inhibition of FA glucuronidation by octyl gallate: In human liver microsomes, octyl gallate inhibited the formation of M1 and M2 with similar IC_{50} values of $91.9 \pm 13.2 \mu M$ and $85.5 \pm 10.5 \mu M$, respectively (Fig. 7A). With recombinant UGT1A1, octyl gallate inhibited the formation of M1 and M2 with IC_{50} values of $117.4 \pm 15.3 \mu M$ and $20.4 \pm 4.0 \mu M$, respectively (Fig. 7B). These data showed that the inhibition of the formation of the acylglucuronide species (M2) was much more potent than that of the ether glucuronide (M1).

The mode of inhibition and the inhibition kinetic constants of UGT1A1 were determined in the presence of various concentrations of FA and octyl gallate. Octyl gallate exerted a typical competitive inhibition of FA glucuronidation, whichever glucuronide was considered (Fig. 8A, B). Fitting the data to the enzyme competitive inhibition equation, K_i values of 472.6 and 42.0 μM were obtained for the production of M1 and M2 glucuronides, respectively. These data showed that inhibition of the formation of the acylglucuronide was much stronger than that of the ether glucuronide.

Discussion

FA (sodium salt) is one of the most abundant phenolic compounds in the human diet. It belongs to the family of hydroxycinnamic acids. Interestingly, the structure of curcumin (diferuloyl methane), which is a very promising anticancer polyphenolic substance, contains two FA molecules bound together, thus suggesting the prominent role of FA in anticancer activity. The substance is used in traditional Chinese medicine and is well known to possess various

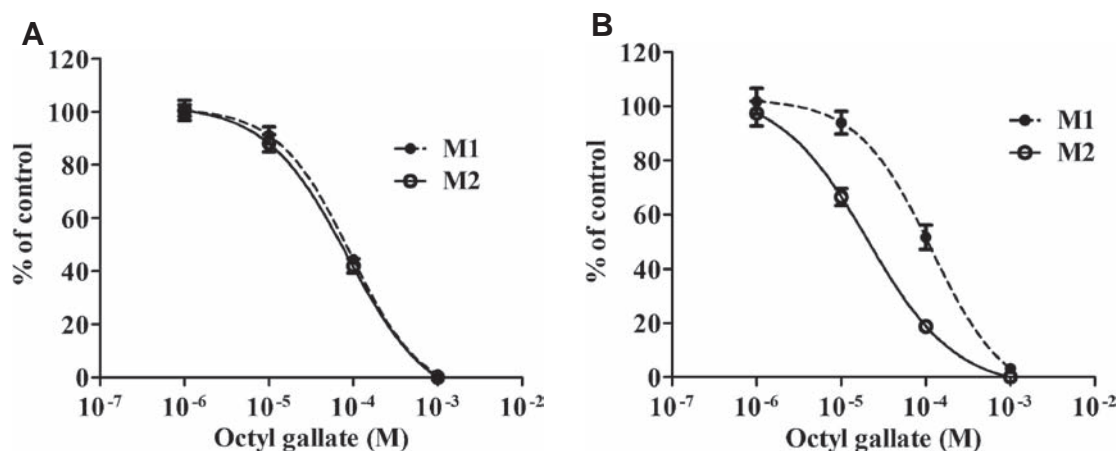


Fig. 7. Inhibition of ferulic acid glucuronidation by octyl gallate

Human liver microsomes (50 μ g protein, A) or UGT1A1 (50 μ g protein, B) was incubated with ferulic acid (1.0 mM) in the presence of octyl gallate (10^{-6} to 10^{-3} M). Values are means \pm S.E. of triplicate determinations and are expressed as percentage activity remaining by comparison to the control run without octyl gallate. IC_{50} values were calculated as described in the text.

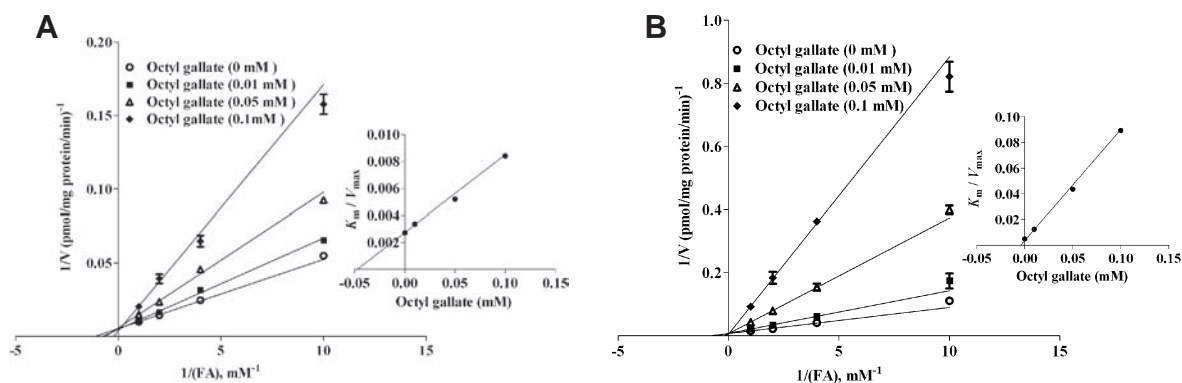


Fig. 8. Inhibition by octyl gallate of ferulic acid glucuronidation mediated by human recombinant UGT1A1

UGT1A1 (50 μ g protein) was incubated with ferulic acid (0.1, 0.25; 0.50, 1.0 mM) in the presence of octyl gallate (0, 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} M). Insets show the secondary plots taken from the reciprocal plots. Values are means \pm S.E. of triplicates. A, M1 formation; B, M2 formation.

therapeutic activities. It is found in many plants, especially in the roots of *Angelica sinensis* (danggui), which is particularly used for its beneficial effect on osteoarthritis of the joints. Indeed, a recent study in our laboratory indicated that the anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptosis properties of FA in animal models of osteoarthritis were responsible for a significant reduction of cartilage degradation.²⁶⁾ These data provided a basis for the design of new treatments for osteoarthritis. Therefore, it is important to determine the biotransformation pathways of FA in humans. The pharmacokinetics of FA in rats suggests that the drug is rapidly absorbed and leads to sulfate and glucuronide metabolites.¹¹⁾ Our study provides evidence that FA is actively glucuronidated and sulfated *in vitro*. Examination of the chemical structure of FA suggests that the two nucleophilic groups, carboxylic acid and phenol, are likely targets of glucuronidation, while the phenolic group can be sulfated. Indeed, upon incubation with human liver

microsomes and cytosol, two types of metabolites were observed. Examination of the apparent kinetic constants revealed that the affinity of FA for sulfotransferases in terms of K_m was 10-fold higher than that for UGT. It is well known from the literature that sulfotransferases often compete with UGT for the same phenolic group, but with a much lower K_m .²⁷⁾ Sulfotransferases are considered to be high affinity, but low capacity, enzymes due to the limited availability of the sulfate donor, PAPS, in contrast to UGTs, which present a lower affinity but have a higher capacity to glucuronidate drugs due to the unlimited supply of UDP-glucuronic acid from glucose.²⁸⁾ Conjugation of FA may be dose dependent, as very high doses of FA may saturate the conjugation enzymes, leading to accumulation of free FA in plasma and urine.^{1,9,10)} These results suggest that sulfoconjugates would be formed at low concentrations of FA, while glucuronides are the main metabolites at higher concentrations.

As expected from the presence of two nucleophilic groups, incubation of FA with human liver microsomes led to the formation of two glucuronide species whose structure established by mass spectrometry unambiguously revealed the presence of an ether glucuronide and an ester glucuronide. Enzyme efficiency expressed as V_{\max}/K_m indicated that glucuronidation at the phenolic group was preponderant compared to that at the carboxylic acid moiety. Compared to phenylglucuronide, acylglucuronides from carboxylic drugs are electrophilic species known to be unstable at physiological pH. They undergo spontaneous hydrolysis to the parent drug as well as intramolecular rearrangement leading to β -glucuronidase-resistant 2-, 3-, and 4-*O*-acyl isomers.²⁹⁾ In addition, acylglucuronides bind covalently to endogenous macromolecules such as albumin.³⁰⁾ In our assay, glucuronidation of FA was performed at pH 6.5. This value, which was found to be optimal for both glucuronidation of the phenolic and carboxylic acid moieties, allows the stabilization of the acylglucuronide formed.

Interestingly, Zhang *et al.*⁸⁾ reported the formation of a third glucuronide, a diglucuronide, resulting from glucuronidation at both the phenolic and the carboxyl groups in rats *in vivo*. Diglucuronide formation has been reported for substances bearing multiples nucleophilic groups, such as bilirubin³¹⁾ or benzo(a)pyrene.³²⁾ Attempts to characterize such an FA metabolite under our experimental conditions were unsuccessful. Furthermore, MS analysis of the HPLC peaks generated upon incubation of FA with human liver microsomes in the presence of UDPGA did not reveal the formation of diglucuronide. A very low concentration of this diglucuronide formed with human liver microsomes or the failure to separate and detect this hydrophilic metabolite are plausible explanations. On the other hand, Wong *et al.*¹⁴⁾ reported the formation of a single FA glucuronide, corresponding to the M1 metabolite, only. The use of a liver S9 subcellular fraction as the enzyme source, which is a diluted preparation of microsomes in cytosol, may explain why the formation of the minor M2 metabolite was not observed.

A series of human recombinant UGTs was used in the current study in order to determine the isoforms involved in FA glucuronidation. The data took into account the different expression levels of each isoform by the aid of an antibody engineered in our laboratory raised against the common C-terminal end of UGT1A proteins.²²⁾ FA glucuronidation was catalyzed by UGT1A isoforms predominantly. Except for UGT2B7, the UGT2B family was not involved in the biotransformation. UGT2B7 presents broad substrate specificity, as it is able to glucuronidate aliphatic alcohols, phenols and carboxylic acids.³³⁾ It actively participates in the biotransformation of structurally unrelated endogenous substances such as steroid hormones, fatty acids or drugs (morphine, carboxylic nonsteroidal anti-inflammatory drugs, all-*trans* retinoic acid, zidovudine). The affinity of UGT2B7

toward the two nucleophilic groups of FA was similar. However, the phenol group was glucuronidated at a much higher rate compared to the carboxylic acid moiety, thus suggesting that *O*-glucuronide was mainly formed by the isoform. On the other hand, UGT2B4, which presents a narrow substrate specificity but shares with UGT2B7 common substrates such as the bile acid hyodeoxycholic acid and catechol estrogens,³³⁾ failed to glucuronidate FA. Among the UGT1A family, UGT1A1 was the most active in terms of FA glucuronidation at both nucleophilic positions. This conclusion was further demonstrated by the highest enzyme efficiency calculated for this isoform, along with the competitive inhibition observed with octyl gallate, a marker substrate of this isoform.^{23,24)} Interestingly, the inhibition was found to be competitive when the formation of the two FA glucuronides was considered, but the inhibition of the acylglucuronide was 10 fold more effective than that of the ether glucuronide. This difference is likely to alter the production of the two metabolites in the presence of an inhibitor. In addition, UGT1A1 is mainly involved in the glucuronidation of toxic endogenous bilirubin. Glucuronidation of the substance by this isoform constitutes the obligatory pathway for detoxication. Consequently, several drugs that are glucuronidated by UGT1A1 can compete with bilirubin for the same isoform, leading to the production of high levels of unconjugated bilirubin, which can lead to undesirable effects.³⁴⁾

UGT1A9 could glucuronidate FA efficiently both at the phenolic and carboxylic acid groups. UGT1A9 is one of the major UGT isoforms in humans. The enzyme catalyzes a wide variety of structurally unrelated substances, including drugs, dietary constituents, fatty acids, steroids and bile acids leading to the formation of *O*-, acyl- or *N*-glucuronides.³⁵⁾ UGT1A7, 1A8 and 1A10 share very high amino acid similarity (93–95%) and exhibit overlapping substrate specificity with UGT1A9; however, UGT1A8 and 1A10 glucuronidated FA at both nucleophilic groups, but UGT1A7 could not form the acylglucuronide. UGT1A8 and 1A10 are mainly expressed in extrahepatic tissues, particularly intestine,³⁶⁾ and these, along with UGT1A1, 1A6, 1A9 and 1A10 that are also expressed, should participate in the glucuronidation of FA when included in the diet.

As expected, UGT1A6, which exhibits a strict substrate specificity toward phenols,²²⁾ was involved in glucuronidation at the phenolic group, whereas the carboxylic acid moiety of FA was far less glucuronidated by this isoform. On the other hand, UGT1A4, whose substrate specificity is restricted to amines,³⁷⁾ could not glucuronidate FA. UGT1A3 is highly homogenous with UGT1A4, but glucuronidates a larger range of substrates,³⁷⁾ including FA at the two nucleophilic groups. We recently found that His40 in the UGT1A3 sequence is substituted with Pro40 in UGT1A4 and is responsible for this difference in specificity.²²⁾

In conclusion, this work details for the first time the metabolic route of an abundant natural bioactive substance via the sulfation and glucuronidation pathways *in vitro* in human liver. The data show that several UGT1A family members and UGT2B7 contribute to the glucuronidation of FA. Interestingly, UGT1A8 and UGT1A10 are mainly expressed in the gastrointestinal tract and are expected to metabolize FA in that organ when given orally. On the other hand, UGT1A9 and particularly UGT1A1 are actively involved in the FA glucuronidation reaction in human liver.

Acknowledgments: We thank Jean-Baptiste Vincourt for technical assistance in the realization of this work, and the mass spectrometry facility of Nancy University (F. Dupire) is acknowledged for performing the mass spectrometry analysis of the FA glucuronides.

References

- Zhao, Z. H. and Moghadasian, M. H.: Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.*, **109**: 691–702 (2008).
- Graf, E.: Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, **13**: 435–448 (1992).
- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T. and Iseki, K.: In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.*, **114**: 466–471 (2009).
- Wang, B. H. and Ou-Yang, J. P.: Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **23**: 161–172 (2005).
- Sakai, S., Kawamata, H., Kogure, T., Mantani, N., Terasawa, K., Umatake, M. and Ochiai, H.: Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators Inflamm.*, **8**: 173–175 (1999).
- Yan, J. J., Cho, J. Y., Kim, H. S., Kim, K. L., Jung, J. S., Huh, S. O., Suh, H. W., Kim, Y. H. and Song, D. K.: Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.*, **133**: 89–96 (2001).
- Zheng, R. L. and Zhang, H.: Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radic. Biol. Med.*, **22**: 581–586 (1996).
- Zhang, J. L., Zhang, G. D. and Zhou, T. H.: Metabolism of ferulic acid in rats. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **7**: 49–58 (2005).
- Rondini, L., Peyrat-Maillard, M. N., Marsset-Baglieri, A. and Berset, C.: Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 3037–3041 (2002).
- Zhao, Z., Egashira, Y. and Sanada, H.: Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. *J. Nutr.*, **133**: 1355–1361 (2003).
- Zhao, Z., Egashira, Y. and Sanada, H.: Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *J. Nutr.*, **134**: 3083–3088 (2004).
- Kern, S. M., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A. and Garcia-Conesa, M. T.: Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6050–6055 (2003).
- Virgili, F., Pagana, G., Bourne, L., Rimbach, G., Natella, F., Rice-Evans, C. and Packer, L.: Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**: 1249–1256 (2000).
- Wong, C. C., Meinel, W., Glatt, H. R., Barron, D., Stalmach, A., Steiling, H., Crozier, A. and Williamson, G.: In vitro and in vivo conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans. *J. Nutr. Biochem.*, **21**: 1060–1068 (2010).
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F. and Nebert, D. W.: The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, **7**: 255–269 (1997).
- Burchell, B. and Coughtrie, M. W.: UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem. Ther.*, **43**: 261–289 (1989).
- Rowbotham, S. E., Illingworth, N. A., Daly, A. K., Veal, G. J. and Boddy, A. V.: Role of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in 13-cis retinoic acid metabolism in humans. *Drug Metab. Dispos.*, **38**: 1211–1217 (2010).
- Senggunprai, L., Yoshinari, K., Shimada, M. and Yamazoe, Y.: Involvement of ST1B subfamily of cytosolic sulfotransferase in kynurenine metabolism to form natriuretic xanthurenic acid sulfate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **327**: 789–798 (2008).
- Yoshinari, K., Nagata, K., Shiraga, T., Iwasaki, K., Hata, T., Ogino, M., Ueda, R., Fujita, K., Shimada, M. and Yamazoe, Y.: Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of rabbit hydroxysteroid sulfotransferase AST-RB2. *J. Biochem.*, **123**: 740–746 (1998).
- Gagné, J. F., Montminy, V., Belanger, P., Journault, K., Gaucher, G. and Guillemette, C.: Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol. Pharmacol.*, **62**: 608–617 (2002).
- Villeneuve, L., Girard, H., Fortier, L. C., Gagne, J. F. and Guillemette, C.: Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**: 117–128 (2003).
- Li, D., Fournel-Gigleux, S., Barre, L., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J. and Ouzzine, M.: Identification of aspartic acid and histidine residues mediating the reaction mechanism and the substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferases 1A. *J. Biol. Chem.*, **282**: 36514–36524 (2007).
- Senafi, S. B., Clarke, D. J. and Burchell, B.: Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem. J.*, **303**: 233–240 (1994).
- Radomska-Pandya, A., Czernik, P. J., Little, J. M., Battaglia, E. and Mackenzie, P. I.: Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Rev.*, **31**: 817–899 (1999).
- Negishi, M., Pedersen, L. G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y. and Pedersen, L. C.: Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **390**: 149–157 (2001).
- Shang, L., Qin, J., Chen, L. B., Liu, B. X., Jacques, M. and Wang, H.: Effects of sodium ferulate on human osteoarthritic chondrocytes and osteoarthritis in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **36**: 912–918 (2009).
- Burchell, B. and Coughtrie, M. W.: Genetic and environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation. *Environ. Health Perspect.*, **105** Suppl 4: 739–747

- (1997).
- 28) Liu, L. and Klaassen, C. D.: Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **139**: 128–134 (1996).
- 29) Georges, H., Presle, N., Buronfosse, T., Fournel-Gigleux, S., Netter, P., Magdalou, J. and Lopicque, F.: In vitro stereoselective degradation of carprofen glucuronide by human serum albumin. Characterization of sites and reactive amino acids. *Chirality*, **12**: 53–62 (2000).
- 30) Georges, H., Jarecki, I., Netter, P., Magdalou, J. and Lopicque, F.: Glycation of human serum albumin by acylglucuronides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of the series of phenylpropionates. *Life Sci.*, **65**: PL151–PL156 (1999).
- 31) Peters, W. H. and Jansen, P. L.: Microsomal UDP-glucuronyltransferase-catalyzed bilirubin diglucuronide formation in human liver. *J. Hepatol.*, **2**: 182–194 (1986).
- 32) Bock, K. W., Gschaidmeier, H., Seidel, A., Baird, S. and Burchell, B.: Mono- and diglucuronide formation from chrysene and benzo(a)pyrene phenols by 3-methylcholanthrene-inducible phenol UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1). *Mol. Pharmacol.*, **42**: 613–618 (1992).
- 33) Barré, L., Fournel-Gigleux, S., Finel, M., Netter, P., Magdalou, J. and Ouzzine, M.: Substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B4 and UGT2B7. Identification of a critical aromatic amino acid residue at position 33. *FEBS J.*, **274**: 1256–1264 (2007).
- 34) Sorich, M. J., Smith, P. A., McKinnon, R. A. and Miners, J. O.: Pharmacophore and quantitative structure activity relationship modelling of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) substrates. *Pharmacogenetics*, **12**: 635–645 (2002).
- 35) Omura, K., Nakazawa, T., Sato, T., Iwanaga, T. and Nagata, O.: Characterization of N-glucuronidation of 4-(5-pyridin-4-yl-1H-[1,2,4]triazol-3-yl) pyridine-2-carbonitrile (FYX-051): a new xanthine oxidoreductase inhibitor. *Drug Metab. Dispos.*, **35**: 2143–2148 (2007).
- 36) Mojarrabi, B. and Mackenzie, P. I.: Characterization of two UDP-glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**: 704–709 (1998).
- 37) Green, M. D., King, C. D., Mojarrabi, B., Mackenzie, P. I. and Tephly, T. R.: Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab. Dispos.*, **26**: 507–512 (1998).

Annexe 3 : Différentes catégories et sources des cucurbitacines

Catégorie	Source	Effet
Cucurbitacine A	<i>Cucumis (Cucurbitaceae)</i>	-----
Cucurbitacine B	Plusieurs espèces de <i>Cucurbitaceae</i>	anti-inflammatoire, hépatoprotecteur
Cucurbitacine C	<i>Cucumis sativus (Cucurbitaceae)</i>	inhibe la croissance de <i>Phytophthora cactorium</i> ⁴
Cucurbitacine D	Ubiquitaire	cytotoxicité envers plusieurs lignées cancéreuses de cellules humaines (poumon, colon, prostate, sein, système nerveux central etc.)
Cucurbitacine E	Racine de <i>Wilbrandia erbacteata (Cucurbitaceae)</i>	inhibiteur de l'adhésion cellulaire, puissant inhibiteur de la croissance du cancer de prostate (explants), puissant anti-appétant pour l'altise ⁵
Cucurbitacine F	<i>Elaeocarpus dolichostylus (Elaeocarpaceae)</i>	cytotoxicité contre cellules humaines tumorales, antagoniste des hormones stéroïdiennes des insectes
Cucurbitacines G et H	Racine de <i>Wilbrandia erbacteata (Cucurbitaceae)</i>	----
Cucurbitacine I	<i>Ecbalium Elaterium (Cucurbitaceae)</i>	cytotoxicité contre cultures de cellules humaines HeLA et KB, anti-appétant pour l'altise
Cucurbitacines J et K	<i>Iberis amara (Brassicaceae)</i>	cytotoxicité contre cellules humaines HeLA et KB
Cucurbitacines O, P et Q	<i>Brandegea bigelovii (Cucurbitaceae)</i>	cytotoxicité contre les cellules tumorales humaines KB du nasopharynx
Cucurbitacines R, S et T	R : Racines de <i>Trichosanthes</i> , S : <i>Kirilowii</i> , <i>Bryonia dioica</i> et T : des fruits du <i>Colocynthis vulgaris (Cucurbitaceae)</i>	----
Divers	<i>Cucurbitaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Russula lepida (champignon)</i>	anti-inflammatoire, anticancéreux

⁴ *Phytophthora cactorium* est un parasite ubiquiste, principalement retrouvé dans les régions tempérées. Il est responsable de pourritures racinaires, de pourriture des fruits, de chancre, de flétrissements et de mildious sur feuilles. Il ne présente pas de spécificité d'hôte mais sa pathogénicité varie d'un hôte à l'autre.

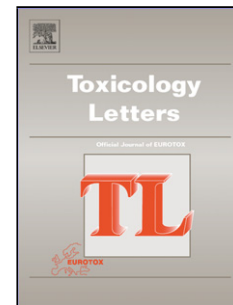
⁵ L'altise est un insecte qui parasite de nombreuses plantes potagères à la fin du printemps.

Annexe 4 : Publication 3

Accepted Manuscript

Title: The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver

Authors: Suzanne Abbas, Jean-Baptiste Vincourt, Lamice Habib, Patrick Netter, Hélène Greige-Gerges, Jacques Magdalou



PII: S0378-4274(12)01387-2
DOI: doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.014
Reference: TOXLET 8157

To appear in: *Toxicology Letters*

Received date: 12-10-2012
Revised date: 16-11-2012
Accepted date: 19-11-2012

Please cite this article as: Abbas, S., Vincourt, J.-B., Habib, L., Netter, P., Greige-Gerges, H., Magdalou, J., The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver, *Toxicology Letters* (2010), doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.014

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Highlights

- Cucurbitacins I, D and E cytotoxicity toward chondrosarcoma was investigated.
- All cucurbitacins showed a very strong cytotoxicity and induced apoptosis.
- Cucurbitacins biotransformation *in vitro* in human liver was investigated.
- Cucurbitacin were glucuronidated by several UGTs isoforms at a very low extent.
- Cucurbitacin E was hydrolyzed by microsomal esterases leading to cucurbitacin I.

Accepted Manuscript

The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver¹

Suzanne Abbas^a, Jean-Baptiste Vincourt^a, Lamice Habib^b, Patrick Netter^a, Hélène Greige-Gerges^b and Jacques Magdalou^{a*}.

^a UMR 7561 CNRS-Université Lorraine, School of Medicine, 9 Avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vand oeuvre-l es-Nancy, France.

Suzanne Abbas: suziabbas@yahoo.com

Jean-Baptiste Vincourt: Jean-Baptiste.Vincourt@medecine.uhp-nancy.fr

Patrick Netter: patrick.netter@medecine.uhp-nancy.fr

Jacques Magdalou: Jacques.Magdalou@medecine.uhp-nancy.fr

^b Bioactive Molecules Research Group, Faculty of Sciences-2, Lebanese University, Jdaidet el-Matn, Lebanon.

Lamice Habib: lamice.habib@yahoo.fr

Hélène Greige-Gerges: hgreige@ul.edu.lb

Corresponding author:

Suzanne Abbas

UMR 7561 CNRS-Université Lorraine, School of Medicine, BP 184

F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex

France

Tel. (33) 383 68 54 23

Fax (33) 383 68 54 09

E-mail: suziabbas@yahoo.com

¹ **Abbreviations:** FCS, Fetal Calf Serum); ITS, Insulin, transferrin and sodium selenite; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; TdT, Terminal deoxynucleotidyl transferase; UDP, uridine diphosphate; UDPGA, uridine 5'-diphosphoglucuronic acid.

ABSTRACT

Cucurbitacins are a class of natural compounds known for their numerous potential pharmacological effects. The purpose of this work was to compare the cytotoxicity of three cucurbitacins I, D, E on the chondrosarcoma SW 1353 cancer cell line and to investigate their biotransformation in man. Cucurbitacins I and D showed a very strong cytotoxicity, which was higher than that of cytochalasin D, used as a drug reference. Almost 100% of the cells were apoptotic as observed by DNA fragmentation (TUNEL assay) after 12h with cucurbitacins I and D (1 μ M) and cucurbitacin E (10 μ M). In terms of IC_{50} values, cucurbitacins I and E presented a higher toxicity compared to that of cucurbitacin D (MTT assay). Cucurbitacin E was readily hydrolyzed by human hepatic microsomes, leading to cucurbitacin I (K_m 22 μ M, V_{max} 571 nmol/mg proteins/min). On the other hand, the three cucurbitacins were hydroxylated at a very low extent, but they were sulfated and glucuronidated. In terms of V_{max}/K_m , the cucurbitacin E was the best substrate of UDP-glucuronosyltransferases. This study shows that cucurbitacins I, D and E present a potent cytotoxic activity toward the chondrosarcoma SW 1353 cell line and are metabolized as sulfate and glucuronide conjugates.

Keywords: Cucurbitacin, glucuronidation, sulfation, hydroxylation, cytotoxicity, chondrosarcoma.

1. Introduction

Cucurbitacins are a family of highly oxygenated triterpenoids characterized by tetracyclic cucurbitane nucleus skeleton: the 19-(10→9 β)-abeo-10 α -lanost-5-ene (Chen et al., 2005; Seger et al., 2005). They are natural compounds found mainly in *Cucurbitaceae* and in large varieties of plants families (Chen et al., 2005; Dirr et al., 1986). Cucurbitacin synthesis in plants is initiated by the cucurbitadienol synthase (Shibuya et al., 2004). The primary cucurbitacins synthesized are cucurbitacins E and B that possess an acetyl function at C25 (Fig. 1) (Gry et al., 2006). The other cucurbitacins are produced due to several metabolic reactions as hydrogenation by cucurbitacin Δ^{23} -reductase, deacetylation by cucurbitacin acylesterases, hydroxylation, dehydrogenation and isomerization reactions (Dirr et al., 1986; Gry et al., 2006; Schabert and Teijema, 1968). Those reactions lead to more than 20 different species of cucurbitacins that differ from each other by their hydroxylation at C-2, -3, -19, -24, the presence of a double bond between C-1 and C-2 or between C-23 and C-24, the acetylation of the C-25 hydroxy group and the presence of a ketone function at C-3 (Chen et al., 2005).

Cucurbitacins are of great interest for their pharmacological use because of their numerous biological activities. They show cytotoxicity toward a large number of human cancer cell lines such as human colon, breast, lung, central nervous system, prostate, nasopharynx (Balliano et al., 1983; Chen et al., 2005; Duncan et al., 1996; Jayaprakasam et al., 2003) by inhibiting the Jak/Stat3 pathway (Blaskovich et al., 2003; Sun et al., 2005) or by disrupting the actin and vimentin networks in cytoskeleton (Duncan et al., 1996). They are also known for their anti-inflammatory, anti-pyretic, analgesic, hepato-protective, anti-HIV and antioxidants activities (Chen et al., 2005; Escandell et al., 2007; Jayaprakasam et al., 2003; Peters et al., 1999; Siqueira et al., 2007).

Cucurbitacins E, D and I are the most studied cucurbitacins as they are among the most abundant in plants. Cucurbitacin E is the acetylated form of cucurbitacin I (Fig. 1) (Chen et al., 2005). So far, two studies have been reported, only focused on the metabolism of cucurbitacins E and I. The first study reported that cucurbitacins E and I were rapidly metabolized in S9-supernatants of rat liver, but without attempting to identify the metabolites formed (Lorenz et al., 2005). The second reported the *in vitro* hydrolysis of

cucurbitacin E into cucurbitacin I in human plasma by paraoxonase (Saade et al., 2009). The metabolic pathway of cucurbitacins is still unclear. Therefore, it is necessary to bring additional information on the biotransformation of cucurbitacins in man. Particularly, the presence of several hydroxyl groups on the molecules suggests that they are potential substrates of UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases.

In this work, a systematic comparative study of the cytotoxicity against the human bone chondrosarcoma cell lines, SW 1353 has been measured. Chondrosarcomas are rare malignant cartilage tumors divided into subgroups based on their matrix composition and cellular behavior. These tumors exhibit degradation of cartilage matrix composition and organization by displaying high water content and peripheral enchondral ossification (Murphey et al., 2003). They still have no cures, and surgery remains the main form of treatment (Herget et al., 2011). With the aim to develop new therapeutic drugs against this cancer with poor diagnosis, the cytotoxicity potency of cucurbitacins on the chondrosarcoma cell line SW 1353 has been investigated.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Cucurbitacins I, D and E were purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France). UDP-[U-¹⁴C]-glucuronic acid (specific activity 285 mCi/mmol) and [³⁵S]3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (0.289 Ci/mmol) were purchased from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). UDP-glucuronic acid, 1-naphthol, nifedipine, 4-nitrophenol, 4-aminobiphenyl, eugenol, *RS*-ketoprofen, hyodeoxycholic acid, octylgallate, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), cytochalasin D, phenylmethionyl sulfonylfluoride (PMSF), ITS Liquid Media Supplement Sterile-filtered (containing recombinant human insulin, human transferrin and sodium selenite), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), acetic acid, acetonitrile, ammoniac (25% v/v) and dimethyl sulfoxide were from Sigma Aldrich, (Saint Louis, MO). Acetone and chloroform were from Carlo Erba (Val de Reuil, France), *n*-butanol from Prolabo (Strasbourg, France), Tris-HCl from Euromedex (Souffelweyersheim, France), MgCl₂ from Merck (Darmstadt, Germany) and methanol from VWR (Fontenay-

sous-Bois cedex, France). TUNEL assay kit, DMEM/F12, L-glutamin and streptomycin/penicillin were products of Invitrogen purchased from Fischer Scientific (Cergy-Pontoise Cédex, France).

2.2. Enzyme sources

Human liver microsomes (pool of 26 livers from 20 men and 6 women) and human liver cytosols (pool of 3 livers from 2 men and one woman, 47-64-80 years old) were purchased from Biopredic (Rennes, France). Rat liver microsomes (pool of 145 Sprague Dawley male rats liver, 8-10 weeks of age) were obtained from BD Biosciences (Woburn, MA). Recombinant human UDP-glucuronosyltransferase isoforms of the family 1A and 2B, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17, whose cDNA has been expressed in the baculovirus-infected insect cell system (BD Supersome™, BD Biosciences) were also used.

2.3. Human chondrosarcoma SW 1353 cell line source

Human chondrosarcoma SW 1353 cell line was purchased from ATCC (Molsheim, France) from a primary grade II chondrosarcoma of the right humerus obtained from a 72 years old Caucasian female. Cells were cultured in DMEM/F12 medium containing 10% FCS (Fetal calf serum), penicillin, streptomycin, L-glutamine and antibiotic plasmocin prophylactic™ (250 µg/mL). At least 24h before treatment, FCS was substituted by ITS to stop cell proliferation.

2.4. MTT assay

Mortality of chondrosarcoma cell line SW 1353 by cucurbitacins I, D and E was investigated by the colorimetric MTT assay (Edmondson et al., 1988). Cells were divided in a 96-well plate (10,000 cells/well) in culture medium (DMEM/F12 + ITS + streptomycin/penicillin + L-glutamine + plasmocin prophylactic™ (250 µg/mL)) for 24h

then treated for 6; 12; 24; 46 and 70h with different concentrations of cucurbitacins I, D and E (0.1; 1; 10 and 100 μM) in 0.1% (v/v) dimethyl sulfoxide. Cytochalasin D (4 μM) was used as a drug reference. Blank was also measured in absence of cells. Cells in culture medium and DMSO (0.1% v/v) in absence of drugs were considered as a negative control. Every assay was repeated three times. For the colorimetric MTT assay, 25 μL MTT, a soluble tetrazolium salt solution, (5mg/mL in PBS), was added to the wells containing 100 μL medium in absence of drugs. Plates were incubated for 4h at 37°C in the dark. Cells were then solubilized by adding 100 μL of 0.04N HCl in isopropanol and formazan absorbance was recorded at 550 nm by using a multiskan EX spectrophotometer (Helsinki, Finland). Cell growth percentage was calculated as $(\text{mean of test well} - \text{mean of blank well}) \times 100 / (\text{mean of control wells} - \text{mean of blank wells})$.

Data plots of the percentage of viable SW 1353 cells determined by the MTT assay after 6, 12 and 24h exposure of SW 1353 cells with cucurbitacins I, D and E as a function of cucurbitacin concentrations were drawn. IC_{50} values (concentration in cucurbitacin that decreases cell viability by 50 %) were obtained from the data plots % viable cells *versus* Log cucurbitacin concentration.

2.5. TUNEL assay

Apoptosis of chondrosarcoma cell line SW 1353 generated by cucurbitacins I, D and E was investigated by Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay according to Click-it® TUNEL kit supplier instructions (Invitrogen). This assay is based on DNA fluorescent staining after the incorporation of modified dUTPs by TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzyme at the 3'-OH ends of fragmented DNA. Cells were divided in a 96-well plate (10,000 cells/well) in culture medium (DMEM/F12 + ITS + streptomycin/penicillin + L-glutamine + plasmocin prophylactic™ (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) for 24h then treated for 12 and 24h with dimethyl sulfoxide or different concentrations of cucurbitacins I, D and E (0.1; 1 and 10 μM). Cytochalasin D (4 μM) was used as a positive control. DNase was used as a control for the detection of DNA breakage. Cells in culture medium in absence of drugs were considered as a negative control. Each assay was repeated three times.

2.6. Hydroxylation assays

Hydroxylation of cucurbitacins I, D and E was performed according to the manufacturer's instructions by a spectrophotometric method that follows the absorbance of NADPH at the wavelength 340 nm (Rover et al., 1998). Hydroxylation activity was measured using 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 200 μM NADPH, 100 μM of cucurbitacins I, D or E dissolved in acetonitrile in a final volume of 250 μL. Acetonitrile instead of cucurbitacins was used in control assays. Nifedipine (100 μM) was used as a marker substrate of human liver cytochromes P450. Each assay was a triplicate. Reaction was initiated by the addition of 20 μg of human liver microsomes. Mediums were incubated at 37°C in a thermostated spectrophotometer (Thermo Scientific* Varioskan Flash Multimode Reader). The decrease in absorbance of NADPH was recorded for 30 min. Hydroxylation activity was calculated using 6,220 L.mol⁻¹.cm⁻¹ as the molar extinction coefficient of NADPH (Swetha et al., 2007). Non-specific activity was corrected by subtracting the control absorption from the assay absorption.

2.7. Deacetylation assay of cucurbitacin E

Stability of cucurbitacin E was investigated in human liver microsomes for the first 24h. 0.54 mM cucurbitacin E were incubated at 37°C with 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ in a 300 μL final volume and 100 μg of proteins were added to initiate reaction. Reactions were done in triplicate. 40 μL were withdrawn from medium after 0; 1; 4; 8; 12 and 24h and reactions stopped in ice by adding 40 μL acetonitrile/methanol/acetic acid (49.6/49.6/0.8 v/v) containing 25.2 μM 4-hydroxybenzophenone (internal standard I.S.), then centrifuged at 8,000 xg for 10 min. Supernatants (40 μL) were analyzed by HPLC Waters 2695 coupled to Waters 486 UV-Vis detector (Milford, MA). Elution was performed in isocratic conditions with 0.2% acetic acid in water/acetonitrile (60/40 v/v) at a flow rate of 1 mL/min. Wavelength detection was set at 237 nm from the absorption spectrum using photodiode array

detector WatersTM 996 coupled to HPLC Waters 2695 equipped with C18 XBridgeTM (5 μ m, 4.6 mm x 150 mm) (Milford, MA).

Kinetic analyses were then performed and incubation assay conditions were selected to insure linearity of the reaction *versus* time and cucurbitacin E concentration. Apparent kinetic constants, K_m and V_{max} , for cucurbitacin E deacetylation were determined using SigmaPlot 9.0 software by varying the concentrations of cucurbitacin E with constant concentration of proteins. Assays were carried out as described above in function of time (0; 5; 10; 15; 20; 30 and 60 min) or by incubating cucurbitacin E (0; 0.01; 0.025; 0.04; 0.05; 0.1 and 0.15 mM) with 100 μ g human liver microsomes in a final volume of 40 μ L.

Cucurbitacin E stability was also evaluated in the same conditions in the presence of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4); 10 mM MgCl₂ in a final volume 40 μ L for the first hour of incubation.

Quantitation was carried out from calibration curve constructed by plotting cucurbitacin E or I/I.S. area ratio against the concentration of cucurbitacin E (0.002-0.16 mM) or I (0.0005-0.16 mM). A same protocol described above was performed on calibration curved.

2.8. Glucuronidation assay

Glucuronidation of cucurbitacins I, D and E by human and rat liver microsomes or by the different human recombinant isoforms of UDP-glucuronosyltransferases was performed by a modified method of Bansal and Gessner (1980). The activity of the recombinant enzymes was previously checked by the same method with marker substrates: octylgallate for UGT1A1, 4-aminobiphenyl for UGT1A4, 1-naphthol for UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 and UGT1A9, β -estradiol for UGT1A10, hyodeoxycholic acid for UGT2B4, *RS*-ketoprofen for UGT2B7, eugenol for UGT2B15 and UGT2B17. Briefly, enzyme proteins (50 μ g of protein) were added to the reaction medium (final volume of 40 μ l) composed of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ and 1 mM cucurbitacins I, D or E, 1-naphthol, nifedipine, octylgallate, 4-nitrophenol, 4-aminobiphenyl, β -estradiol, hyodeoxycholic acid, *RS*-ketoprofen or eugenol dissolved in dimethyl

sulfoxide. The reaction was initiated by the addition of 1 mM UDP-glucuronic acid, 0.39 mM UDP-[U-¹⁴C]-glucuronic acid (5.67 KBq), and performed at 37°C for 1h. Controls were simultaneously run using dimethyl sulfoxide instead of cucurbitacins and substrate markers. Each assay was repeated twice. An assay was simultaneously run with cucurbitacin E and 1-naphthol in presence of PMSF (0.5 mM) and human liver microsomes. The reaction was terminated by the addition of ice-cold ethanol (40 µl). After centrifugation of the reaction mixture at 3,000 xg, an aliquot (60 µl) of the supernatant fraction was applied to an LK6DF silica gel-coated thin layer chromatography plate (Whatman, Schleicher & Schuell, Montluçon, France), then developed with the solution containing *n*-butanol, acetone, acetic acid, aqueous 25 % (v/v) ammoniac, and water (35:25:9:0.75:30 v/v). After separation by thin layer chromatography, the plate was dried for 2 hours then put in contact with Kodak BioMax MR Film (Sigma Aldrich) and stored in the dark for at least two days at -20°C. The glucuronides were spotted on the plate, the corresponding gel zone was scraped, and the radioactivity associated was measured with a Packard spectrometer, using Fluoran Safe Ultima Gold (Courtaboeuf, France) as the scintillation cocktail.

Apparent kinetic constants, K_m and V_{max} , for glucuronidation of cucurbitacins I, D and E were determined using SigmaPlot 9.0 software by varying the concentration of the acceptor substrates (0.05 to 1 mM) with a constant concentration of UDP-glucuronic acid (1 mM). Incubation assay conditions were selected to insure linearity of the reaction *versus* time and enzyme concentration.

2.9. Sulfation assay

Sulfating activities of cucurbitacins I, D and E by sulfotransferases of human liver cytosols were determined by a radiochemical method using [³⁵S]PAPS as a sulphate donor and after separating metabolites by thin layer chromatography (Senggunprai et al., 2008). Briefly, incubation mixture consisted of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 5 µg of human liver cytosol protein and 0.2 mM cucurbitacin or 1-naphthol dissolved in dimethyl sulfoxide in the final volume of 20 µl. 1-Naphthol is used as a substrate marker for human liver sulfotransferases. A control in triplicate was

simultaneously run using dimethyl sulfoxide instead of cucurbitacin or 1-naphthol. Every assay was repeated three times. The reaction was initiated by the addition of 0.106 mM ^{35}S -PAPS (0.289 Ci/mmol) and performed at 37°C for 20 min. The reaction was terminated by the addition of 10 μl ice-cold acetonitrile. After mixing, an aliquot of 20 μl of the supernatant fraction was applied to an LK6DF silica gel-coated thin layer chromatography plate (Whatman, Schleicher & Schuell, Montluçon, France), then developed with the solution containing chloroform, methanol, water, and aqueous 25 % (v/v) ammoniac (60:35:7.5:0.5 v/v). After separation by thin layer chromatography, the plate was dried for 2 hours then put in contact with Kodak BioMax MR Film (Sigma Aldrich) and stored in the dark during two days at -20°C. The sulfates were spotted on the plate, the corresponding gel zone was scraped, and the radioactivity associated was measured with a Packard spectrometer, using Fluoran Safe Ultima Gold (Courtaboeuf, France) as the scintillation cocktail.

3. Results

3.1. Cucurbitacin toxicity

3.1.1.MTT assay

The viability of the chondrosarcoma SW 1353 cell line was investigated by MTT assay after addition in the culture medium of 0; 0.1; 1; 10 and 100 μM cucurbitacins I (Fig. 2a), D (Fig. 2b) and E (Fig.2c) for 6; 12; 24; 46 and 70h. It was compared with that measured after cytochalasin D addition (Fig. 2d). The presence of dimethyl sulfoxide (0.1 % v/v) in the culture medium led to a 2 to 2.5 fold increase in cell viable number, when compared to that observed in the culture medium in which the solvent was omitted (data not shown). Whatever the cucurbitacin used and time of exposure, the lowest concentration (0.1 μM) did not induce any significant decrease. A similar result was found for 1.0 μM with cucurbitacin E, whereas a same concentration of cucurbitacins I and D decreased the percentage of viable cells by 20 %. Cucurbitacin I (10 μM) after 46h exposure led to 100 % cell mortality, whereas a similar result was obtained with 100 μM cucurbitacins E and D. Cytochalasin D at 4 μM , used as a drug reference, induced 40 and 66% of cells

mortality after 46 and 70h of treatment, respectively (Fig. 2d); whereas, cucurbitacins I and D at a lower concentration (1 μM) induced about 86 and 94% of cells mortality after 46 and 70h of treatment, respectively (Fig. 2 a, b, d). Thus, cucurbitacins I and D showed more cytotoxicity than cytochalasin D after 46h of treatment.

To compare the cytotoxicity of the three cucurbitacins, the concentration of cucurbitacins I, D and E that induced a mortality of 50 % of SW 1353 cells was calculated from plotting the percentage of viable cells *versus* Log cucurbitacin concentrations after 6; 12 and 24h of treatment (Table 1). The results indicated that cucurbitacin I and E with the lowest IC_{50} values presented a high toxicity compared to that of cucurbitacin D.

3.1.2. TUNEL assay

This assay was carried out in order to evaluate the presence of fragmented DNAs in apoptotic SW 1353 cancer cells after 12 and 24h of treatment with cucurbitacins E, D and I (0.1; 1 and 10 μM). Cytochalasin D (4 μM) and DNase were used as a positive control. A quantitative analysis was carried out after 24h of treatment showing the percentage of non-apoptotic chondrosarcoma SW 1353 cancer cells as a function of the concentration of compounds (Fig. 3a). On the other hand, a qualitative analysis with fluorescent radiographies of treated cells taken after 12h (Fig. 3b, radiographies 3, 6, 8, 9) and 24h (Fig. 3b, radiographies 1, 2, 4, 5, 7) of treatment was carried out. The results showed that cytochalasin D, cucurbitacins I, D (1-10 μM) and E (10 μM) induced almost complete apoptosis after 12h of treatment by the appearance of fragmented DNA (green labeled) and shrinking of nuclei (blue labeled) (Fig. 3b). Cucurbitacin E (0.1 and 1 μM) and dimethyl sulfoxide didn't show any apoptotic effect even after 24h of treatment (Fig. 3a, b).

3.2. Cucurbitacins I, D and E metabolism

3.2.1. Hydroxylation of cucurbitacins I, D and E by human liver microsomes

Cucurbitacins I, D and E were incubated with human liver microsomes in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 in order to evaluate their hydroxylation *in vitro* in man. The

functionality of the liver microsomes was simultaneously checked with nifedipine as a marker substrate. Consumption of NADPH for nifedipine hydroxylation was very fast compared to that observed with cucurbitacins I, D and E (slopes of -0.0025; -0.0002; -0.0003 and -0.0002, respectively) (Fig. 4a). A negligible corresponding hydroxylation activity was measured with cucurbitacins I, D and E (0.40; 0.60 and 0.40 nmol/mg protein/min, respectively), when compared to that for nifedipine (8 to 12.5 times greater) with a value of 7.25 nmol/mg protein/min (Fig. 4b).

3.2.2. Deacetylation of cucurbitacin E

Cucurbitacin E is the acetylated form of cucurbitacin I (Fig. 1). The ester bond hydrolysis leading to cucurbitacin I production was investigated in human liver microsomes. Retention times of cucurbitacin I, cucurbitacin E and 4-hydroxybenzophenone (IS) were of 4.74 ± 0.052 ; 5.5 ± 0.026 and 13.26 ± 0.056 min, respectively, in our HPLC elution conditions. Cucurbitacin E was rapidly hydrolyzed and hydrolysis leading to cucurbitacin I production reached its maximum at the first hour of incubation where only 43% of cucurbitacin E initial concentration remained (Fig. 5). Hydrolysis rate became then slower and 39% of cucurbitacin E remained after 24h of incubation (data not shown). Cucurbitacin E stability was then studied in Tris-HCl buffer (pH 7.4) for the first hour and results showed that it remains stable during this time of incubation (Fig. 5).

Kinetic study in function of time for cucurbitacin I production by cucurbitacin E hydrolysis was monitored for the first hour of incubation to assess reaction linearity in function of time. Reaction was linear for the first 10 min of incubation (Fig. 6a). This time was selected to determine the reaction kinetic parameters using different concentrations of cucurbitacin E. Reaction was linear from 0 up to 0.04 mM of cucurbitacin E, and then reached saturation at 0.1 mM (Fig. 9b). Representative plots of cucurbitacin E deacetylation rate *versus* substrate concentration showed typical Michaelis-Menten kinetics (Fig. 6b), which led to the calculation of the apparent kinetic constants K_m (0.022 ± 0.0063 mM) and V_{max} (571.34 ± 49.14 nmol/mg protein/min).

3.2.3. Glucuronidation of cucurbitacins I, D and E by human and rat liver microsomes

Cucurbitacins I, D and E were incubated with human/rat liver microsomes and with different UGTs isoforms in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ in order to evaluate their glucuronidation *in vitro* in man and in rat. The functionality of UGT was simultaneously checked with marker substrates. All enzymes were active toward their marker substrates. 1-Naphthol glucuronidation by human liver microsomes, rat liver microsomes, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8 and UGT1A9 was about 7; 8.76; 5.57; 1.92; 4.72 and 4.19 nmol/mg protein/min, respectively. Octylgallate, 4-nitrophenol, 4-aminobiphenyl, β -estradiol, hyodeoxycholic acid and *RS*-ketoprofen glucuronidation by UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A10, UGT2B4 and UGT2B7 was about 0.25; 0.35; 0.03; 0.11; 0.39 and 0.52 nmol/mg protein/min. UGT2B15 and UGT2B17 glucuronidation activity toward eugenol was about 8.45 and 2.59 nmol/mg protein/min, respectively. UGT activity of human and rat liver microsomes measured with cucurbitacins was much lower than that of the marker substrates (Fig. 7). In human liver microsomes, the UGT activity varied from 18 pmol/mg protein/min with cucurbitacin D to 51 and 83 pmol/mg protein/min with cucurbitacins I and E, respectively. UGT activity of rat liver microsomes was 26 and 128 pmol/mg protein/min with cucurbitacin I and E, respectively and no metabolites were detected with cucurbitacin D. UGT1A1 was the most isoform of UDP-glucuronosyltransferases 1A family implicated in the three cucurbitacins metabolism, followed by UGT1A7, 1A10, 1A6 and 1A8. On the other hand, the UDP-glucuronosyltransferases 2B family isoforms, except UGT2B17, were not involved in their biotransformation (Fig. 7).

We, then, studied the impact of hydrolysis of cucurbitacin E in human liver microsomes on its glucuronidation rate after inhibition of the microsomal esterase by PMSF, a serine protease inhibitor. Glucuronidation of cucurbitacin E was obviously affected by the presence of PMSF (0.5 mM). Its rate was reduced by 9 times in human liver microsomes (Fig. 8). In the absence of PMSF, an important rate of cucurbitacin E is converted into cucurbitacin I, and the glucuronidation rate corresponds to the glucuronidation of these two substances which increased the glucuronidation rate. The glucuronidation activity was not affected by 0.5 mM of PMSF as the 1-naphthol glucuronidation remained the same in absence and in presence of PMSF (Fig. 8).

3.2.4. Kinetics of cucurbitacins I, D and E glucuronidation by human liver microsomes

The kinetic parameters of the UGTs of human liver microsomes for cucurbitacins I, D and E glucuronidation are shown in Table 2. The glucuronidation velocity curves followed Michaelis-Menten kinetics (Fig. 9). In terms of K_m , human liver microsomes exhibited the highest affinity for cucurbitacin E. V_{max}/K_m values revealed that the enzyme efficiency increased with cucurbitacin hydrophobicity (Table 2).

3.2.5. Sulfation of cucurbitacins I, D and E by human liver cytosol

Sulfation activity of the three cucurbitacins by the sulfotransferases of human liver cytosol was studied in presence of ^{35}S -PAPS and DTT. The marker substrate, 1-naphthol, was actively sulfated and the sulfation rate was of 0.7 ± 0.074 nmol/mg protein/min. Sulfation rate varied from 0.02 with cucurbitacin D to 0.15 and 0.33 nmol/mg protein/min with cucurbitacins E and I, respectively (Fig. 10).

4. Discussion

Cucurbitacins are natural compounds known for their numerous potent pharmaceutical effects. They have shown cytotoxic effects on several cancer cell lines (Nakashima et al., 2010) and anti-inflammatory activities on rheumatoid arthritis (Escandell et al., 2007). These effects are mainly due to their strong inhibition of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription-3) and of IKK/NF- κ B pathways leading to a decrease in the activity of key inflammatory enzymes, such as cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase (see for review Lee et al., 2010). In this work, we tested the cytotoxicity of three cucurbitacins on the chondrosarcoma SW 1353 cell line which was compared to that of the model drug, cytochalasin D. This compound is a potent disruptor of cytoskeletal actin microfilaments which causes cell cycle arrest at G1-S transition phase (May et al., 1998). Previous studies showed that the cucurbitacins D, E and I act almost the same way as cytochalasin D leading to S-phase cell cycle arrest (Haritunians et al., 2008) and morphological changes by causing alterations in the cytoskeletal actin

microfilament network (Duncan et al., 1996; Nakashima et al., 2010). Our results showed that, at a lesser concentration, cucurbitacins I and D presented a higher toxicity than cytochalasin D, leading to more cell mortality after 46 and 70h of treatment. Cucurbitacins concentrations that induce the mortality of 50% of SW 1353 cells were measured (Table 1) and showed that the cucurbitacins I E present higher toxicity than that of cucurbitacin D. This is probably due to the cucurbitacin D lower hydrophobicity compared to that for cucurbitacins I and E. Hydrophobicity index of cucurbitacins measured by reverse-phase high performance liquid chromatography on a C-18 column with aqueous acetonitrile as the mobile phase led to $D < I < E$. Bartalis and Halaweish (2005; 2011) reported that hydrophobicity of cucurbitacins was related with their cytotoxicity toward HepG2 cells. Unsaturation of C1C2 bond in cucurbitacin I and acetylation of C25 hydroxyl group in cucurbitacin E (Fig. 1) increase hydrophobicity. Data reported in Table 1 are in accordance with this statement.

Cucurbitacins D, E and I also led to SW 1353 apoptosis generating DNA fragmentation and cellular nuclei shrinkage. The apoptosis process was observed after 12h of treatment leading to almost complete cells death after 46h of incubation at 1 and 10 μM , except cucurbitacin E which showed no mortality or apoptosis at 1 μM . Altogether, these results suggest that cucurbitacins are potent cytotoxic drugs on the SW 1353 cell line. However, more studies are required before the use of these substances for treatment of chondrosarcoma in man may be envisaged. Particularly, the pharmacokinetics parameters and the biotransformation pathways of the cucurbitacins may be known.

Few studies have been focused on the biotransformation of cucurbitacins in man and rat. No metabolites have been identified until now. We have previously shown that cucurbitacin E was hydrolyzed to cucurbitacin I in human plasma and that the remaining cucurbitacin E concentration detected was less than 70 and 20% after 2 and 24h of incubation (Saade et al., 2009). In plants and insects, it is known that these substances undergo acetylation, hydrogenation, desaturation and glucosylation (Andersen et al., 1988). Therefore, we tried to study the biotransformation of cucurbitacins *via* reactions of phase I (hydroxylation and deacetylation) and phase II (glucuronidation and sulfation) using liver microsomes or cytosol as the enzyme source.

Cucurbitacins I, D and E hydroxylation occurred at a very low extent in human liver microsomes. In plants, hydroxylation occurs on C-18, C-19 or C-24 catalyzed by cucurbitacin NADPH dependent C18-hydroxylase, C19-hydroxylase and C24-hydroxylase (Schabort and Teijema, 1968; Schabort, 1978). Thus, cucurbitacins J or K are obtained after the hydroxylation of cucurbitacin I on C-24 and cucurbitacins G or H are obtained after hydroxylation of cucurbitacin D on C-24 (Gry *et al.*, 2006). Cucurbitacins A and N are the C19-hydroxylated forms of cucurbitacins B and D, respectively (Schabort, 1978).

Cucurbitacin E deacetylation leading to cucurbitacin I formation was readily detected in human liver. For the first hour of incubation, cucurbitacin E was stable in presence of Tris-HCl (pH 7.4) buffer and its rate was reduced to approximately the half in presence of human liver microsomes. This reduction was due to esterases action on the ester function of cucurbitacin E. The two major carboxylesterase isoforms present in human liver microsomes and cytosols are carboxylesterases 1 and 2. These enzymes are involved in hydrolysis of esterified xenobiotics and endogenous substrates (Jewell *et al.*, 2007; Ross and Crow, 2007). The carboxylesterase activities investigated in the liver subcellular fractions showed that the rate of cucurbitacin E hydrolysis was faster and 15 times higher in microsomal fractions than in cytosolic fractions for the first hour of incubation (39.97 ± 2.92 and 2.55 ± 0.17 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, respectively, data not shown). In a study focused on ciclesonide, a glucocorticosteroid compound possessing a triterpene ester structure, hydrolysis by human liver and lung microsomal and cytosolic esterases showed that the microsomal enzymes had greater activities than those expressed in cytosol, and that the liver fractions had greater activities than the lung fractions (Mutch *et al.*, 2007). These results, along with those obtained with cucurbitacins in this study; suggest that microsomal esterases are more active in triterpene esters hydrolysis than the corresponding cytosolic enzymes.

The cucurbitacins I, D and E contain several hydroxyl groups that are potential sites for sulfation and glucuronidation by the sulfotransferases and UDP-glucuronosyltransferases. Activity was low, compared to that of the marker substrate 1-naphthol. Indeed, glucuronidation and sulfoconjugation are known to be major metabolic pathways of phenolic substances in man and rat (Shangari *et al.*, 2005). The presence of aliphatic

hydroxyl groups on the cucurbitacin molecules may explain their low glucuronidation activity for these conjugating enzymes, when compared to plant-derived phenols or flavonoids (Aumont et al., 2001; Singh et al., 2011). From the UGT1A family, UGT1A1 was the main isoform responsible of cucurbitacin glucuronidation followed by UGT1A7 and UGT1A10. UGT1A6 and 1A8 are also capable of glucuronidating cucurbitacins but at a lower extent. The UGT1A1, which mainly glucuronidate bilirubin, can also glucuronidate bile acids (Marschall et al., 2005). UGT1A7, 1A8 and 1A10 play a role in cucurbitacin glucuronidation. These isoforms are rather expressed in the gastrointestinal tract than in liver (Harbourt et al., 2012) and can participate to cucurbitacin metabolism after their oral ingestion. From the UGT2B family, only, UGT2B17 which catalyzes testosterone glucuronidation (Sten et al., 2009) could glucuronidate cucurbitacins I and E. The inhibition of cucurbitacin E hydrolysis by PMSF decreased dramatically the glucuronidation rate in human liver microsomes. This can refer to the production of cucurbitacin I after incubation of cucurbitacin E with human liver microsomes in the absence of PMSF. The glucuronidation rate in human microsomes corresponds then to the sum of cucurbitacin I and E glucuronidation. In presence of PMSF which blocks the esterase, only the aliphatic hydroxyl groups on the triterpene moiety are available for glucuronidation with a low rate. In absence of PMSF, the hydrolysis makes an additional hydroxyl group available on the aliphatic end chain, which apparently is much prone to glucuronidation.

5. Conclusion

In conclusion, our results show that cucurbitacins D, E and I present a potent cytotoxicity toward the chondrosarcoma SW 1353 cancer cell line and they are metabolized by conjugation reactions. More work is needed to determine the fate of these compounds in man before to consider their utilization on a therapeutic basis.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by a CEDRE grant n° 75/2010, by Lebanese National Council for Scientific Research (Ref. 02-04-09) and by the Ligue Régionale contre le Cancer.

References

Andersen, J.F., Plattner, R.D., Weisleder, D., 1988. Metabolic transformations of cucurbitacins by *Diabrotica Virgifera Virgifera* Leconte and *D. Undecimpunctata Howardi* Barber. *Insect Biochem.* 18, 71-77.

Aumont, V., Krisa, S., Battaglia, E., Netter, P., Richard, T., Mérillon, J.M., Magdalou, J., Sabolovic, N., 2001. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Arch. Biochem. Biophys.* 393, 281-289.

Balliano, G., Caputo, O., Viola, F., Delprino, L., Cattel, L., 1983. The transformation of 10 α -cucurbita-5,24-dien-3 β -ol into cucurbitacin C by seedlings of *Cucumis sativus*. *Phytochem.* 22, 909-913.

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

Bartalis, J., Halaweish, F.T., 2005. Relationship between cucurbitacins reverse-phase high performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 159-166.

Bartalis, J., Halaweish, F.T., 2011. In vitro studies of cucurbitacins on HepG2 and HSC-T6 liver cell lines. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 19, 2757-2766.

Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sefti, S.M., 2003. Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a selective Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* 63, 1270-1279.

Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., Qiu, S.X., 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 22, 386-399.

Dirr, H.W., Schabert, J.C., Weitz, C., 1986. Cucurbitacin Δ^{23} -reductase from the fruit of *Cucurbita maxima* var. Green Hubbard. Physicochemical and fluorescence properties and enzyme-ligand interactions. *Biochem. J.* 233, 649-653.

Duncan, K.L.K., Duncan, M.D., Alley, M.C., Sausville, E.A., 1996. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1553-1560.

Edmondson, J.M., Armstrong, L.S., Martinez, A.O., 1988. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J. Tissue Cult Methods.* 11, 15-17.

Escandell, J.M., Recio, M.C., Manez, S., Giner, R.M., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.L., 2007. Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in Lewis rats by suppression of Tumor Necrosis Factor- α in T-Lymphocytes and Macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 581-590.

Gry, J., Søborg, I., Andersson, H.C., 2006. Cucurbitacins in food plants. TemaNord. 556, 9-67.

Harbourt, D.E., Fallon, J.K., Ito, S., Baba, T., Ritter, J.K., Glish, G.L., Smith, P.C., 2012. Quantification of human Uridine-diphosphate glucuronosyl transferase 1A isoforms in liver, intestine, and kidney using nanobore liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 84, 98-105.

Haritunians, T., Gueller, S., Zhang, L., Badr, R., Yin, D., Xing, H., Fung, M.C., Koeffler, H.P., 2008. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. Leuk. Res. 32, 1366-1373.

Herget, G.W., Uhl, M., Opitz, O.G., Adler, C.P., Südkamp, N.P., Knöller, S., 2011. The many faces of chondrosarcoma of bone, own cases and review of the literature with an emphasis on radiology, pathology and treatment. Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech. 78, 501-509.

Jayaprakasam, B., Seeram, N.P., Nair, M.G., 2003. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. Cancer Lett. 189, 11-16.

Jewell, C., Bennett, P., Mutch, E., Ackermann, C., Williams, F.M., 2007. Inter-individual variability in esterases in human liver. Biochem. Pharmacol. 74, 932-939.

Lee, D.H., Iwanski, G.B., Thoennissen, N.H., 2010. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. TheScientificWorld J. 10, 413-418.

Lorenz, P.R., Lippmann, F., Dürrling, K., Solf, M., Geissler, J., 2005. Pharmacotoxicological and clinical studies with colocynth pulp extracts (Extr. *Colocynthis fructus*). *Arzneim. Forsch.* 55, 621-663.

Marschall, H.U., Wagner, M., Zollner, G., Fickert, P., Diczfalusy, U., Gumhold, J., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Benthin, L., Grundström, R., Gustafsson, U., Sahlin, S., Einarsson, C., Trauner, M., 2005. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology*. 129, 476-485.

May, J.A., Ratan, H., Glenn, J.R., Lösche, W., Spangenberg, P., Heptinstall, S., 1998. GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on normal cytoskeletal assembly. *Platelets*. 9, 227-232.

Murphey, M.D., Walker, E.A., Wilson, A.J., Kransdorf, M.J., Temple, H.T., Gannon, F.H., 2003. From the archives of the AFIP. Imaging of primary chondrosarcoma: Radiologic-pathologic correlation. *RadioGraph*. 23, 1245-1278.

Mutch, E., Nave, R., McCracken, N., Zech, K., Williams, F.M., 1997. The role of esterases in the metabolism of ciclesonide to desisobutyryl-ciclesonide in human tissue. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1657-1664.

Nakashima, S., Matsuda, H., Kurume, A., Oda, Y., Nakamura, S., Yamashita, M., Yoshikawa, M., 2010. Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 2994-2997.

Peters, R.R., Saleh, T.F., Lora, M., Patry, C., de Brum-Fernandes, A.J., Farias, M.R., Ribeiro-do-Valle, R.M., 1999. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sci.* 64, 2429-2437.

Ross, M.K., Crow, J.A., 2007. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *J. Biochem. Mol. Tox.* 21, 187-196.

Rover, L.Jr., Fernandes, J.C.B., de Oliveira Neto, G., Kubota, L.T., Katekawa, E., Serrano, S.H.P., 1998. Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Anal. Biochem.* 260, 50-55.

Saade, M., Magdalou, J., Ouaini, N., Greige-Gerges, H., 2009. Stability of cucurbitacin E in human plasma: chemical hydrolysis and role of plasma esterases. *Biopharm. Drug Dispos.* 30, 389-397.

Schabort, J.C., 1978. Cucurbitacin 19-hydroxylase in *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry.* 17, 1062-1064.

Schabort, J.C., Teijema, H.L., 1968. The role of cucurbitacin Δ^{23} -reductase in the breakdown pathway of toxic bitter principles in *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry.* 7, 2107-2110.

Seger, C., Sturm, S., Mair, M.E., Ellmerer, E.P., Stuppner, H., 2005. ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). *Magn. Reson. Chem.* 43, 489-491.

Senggunprai, L., Yoshinari, K., Shimada, M., Yamazoe, Y., 2008. Involvement of ST1B Subfamily of Cytosolic Sulfotransferase in Kynurenine Metabolism to Form Natriuretic Xanthurenic Acid Sulfate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 789-798.

Shangari, N., Chan, T.S., O'Brien, P.J., 2005. Sulfation and glucuronidation of phenols: implications in coenzyme Q metabolism. *Methods in Enzymol.* 400, 342-359.

Shibuya, M., Adachi, S., Ebizuka, Y., 2004. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron.* 60, 6995-7003.

Singh, R., Wu, B., Tang, L., Hu, M., 2011. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform-dependent regioselectivity of glucuronidation of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7452-7464.

Siqueira, J.M.Jr., Peters, R.R., Gazola, A.C., Krepsky, P.B., Farias, M.R., Rae, G.A., de Brum-Fernandes, A.J., Ribeiro-do-Valle, R.M., 2007. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sci.* 80, 1382-1387.

Sten, T., Bichlmaier, I., Kuuranne, T., Leinonen, A., Yli-Kauhaluoma, J., Finel, M., 2009. UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B7 and UGT2B17 display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly. *Drug Metab. Dispos.* 37, 417-423.

Sun, J., Blaskovich, M.A., Jove, R., Livingston, S.K., Coppola, D., Sefti, S., 2005. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene.* 24, 3236-3245.

Swetha, V.P., Basu, A., Phale, P.S., 2007. Purification and characterization of 1-naphthol-2-hydroxylase from carbaryl-degrading *Pseudomonas* strain C4. J. Bacteriol. 189, 2660-2666.

Accepted Manuscript

Fig. 1. Chemical structure of the cucurbitacins I, D and E used in this study.

A, cucurbitacin I; B, cucurbitacin D; C, cucurbitacin E. Compared to cucurbitacin D, cucurbitacin I and E present a double bond between C1-C2. The terminal hydroxyl group is acetylated in cucurbitacin E.

Fig. 2. Viability of the SW 1353 cells upon exposition to cucurbitacins by the MTT assay.

Percentage of viable cells SW 1353 after 6, 12, 24, 46 and 70h of treatment by □, negative control with dimethyl sulfoxide (0.1% v/v) (a) □, 0.1 μM; ■¹, 1 μM; ■², 10 μM and ■³, 100 μM cucurbitacin I, (b) □, 0.1 μM; ■¹, 1 μM; ■², 10 μM and ■³, 100 μM cucurbitacin D, (c) □, 0.1 μM; ■¹, 1 μM; ■², 10 μM and ■³, 100 μM cucurbitacin E and (d) ■, cytochalasin D (4 μM). Values are the means of assays performed in triplicates Means ± SE.

Fig. 3. Apoptosis induction of SW 1353 cells upon exposition to cucurbitacins by the TUNEL assay.

(a) Percentage of non-apoptotic SW 1353 cells after TUNEL assay application for 24h of treatment with cucurbitacins I, D, E (0.1; 1 and 10 μM), dimethyl sulfoxide (DMSO), DNase and cytochalasin D (4 μM). Values are the mean of triplicate experiments Means ± SE. (b) Photography by fluorescent microscopy of SW 1353 cells after TUNEL assay application of incubations with: (1) culture medium for 24h, (2) DNase for 24h, (3) cytochalasin D for 12h, (4) dimethyl sulfoxide for 24h, (5) cucurbitacin E, 1 μM for 24h, (6) cucurbitacin E, 10 μM for 12h, (7) cucurbitacin I, 0.1 μM for 24h, (8) cucurbitacin I, 10 μM for 12h and (9) cucurbitacin D, 1 μM for 12h. Cells nuclei are blue (DAPI) labeled and fragmented DNAs in apoptotic cells are green labeled. Red arrows indicate apoptotic cells.

Fig. 4. Hydroxylation of cucurbitacins by human liver microsomes.

Human liver microsomes were incubated with 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ in presence of 200 μM NADPH and nifedipine or cucurbitacin (100 μM) for 30 min at 37°C. (a), NADPH absorbance variation *versus* time, X, nifedipine; ◆, cucurbitacin I; ■, cucurbitacin D; ▲, cucurbitacin E. (b), Corresponding hydroxylation activities. Values are the means of assays performed in triplicates Means ± SE.

Fig. 5. Production of cucurbitacin I after hydrolysis of the acetyl group of cucurbitacin E in human liver microsomes.

Cucurbitacin E (0.54 mM) was incubated with human liver microsomes in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ (■) for 1 hour at 37°C. At different time intervals, a part of the incubation medium was removed. The decrease in cucurbitacin E concentration (■) and the corresponding cucurbitacin I formation (◆) were quantitated after separation by HPLC. (▲) indicates the stability of cucurbitacin E when incubated in the buffer alone under the same conditions. Values are the mean ± SE of assays performed in triplicate.

Fig. 6. Kinetics of cucurbitacin E deacetylation by human liver microsomes.

The linearity of the deacetylation reaction was monitored *versus* time (a). Michaelis-Menten representation of the reaction (b) and corresponding double reciprocal plot presentation (c) allowed the determination of the apparent kinetic constants (K_m 22 μM, V_{max} 571 nmol/min/mg protein). Values are the mean ± SE of assays performed in triplicate.

Fig. 7. Glucuronidation of cucurbitacins by liver microsomes and by different human recombinant UGT isoforms belonging to family 1A and 2B.

Cucurbitacins I, D and E (1 mM) were incubated with human and rat liver microsomes, or with membrane fractions expressing a human recombinant UGT isoform, in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂ in presence of 1 mM UDP-glucuronic acid and ¹⁴C-

UDP-glucuronic acid for 1 hour at 37°C. ■, cucurbitacin I; □, cucurbitacin D; □, cucurbitacin E. The glucuronidation activities are the means of two assays. ND, not detectable.

Fig. 8. Effect of PMSF on the glucuronidation rate of 1-naphthol and cucurbitacin E by human liver microsomes.

1-Naphthol and cucurbitacin E were incubated as reported in Fig. 7 in the presence (■) and absence (□) of the esterase inhibitor (0.5 mM PMSF). The values are the means of two assays.

Fig. 9. Kinetics of cucurbitacins I, D and E glucuronidation by human liver microsomes.

Cucurbitacins I, D and E (0.05 – 1 mM) were incubated as described in Fig.7. Michaelis-Menten representation of the reaction and corresponding double reciprocal plot presentation allowed the determination of the apparent kinetic constants (K_m 0.699; 0.370; 0.013 mM, V_{max} 0.132; 0.035; 0.077 nmol/min/mg protein, respectively). Activity values are the means of two assays.

Fig. 10. Sulfation of 1-naphthol, cucurbitacin I, D and E by human liver cytosol.

1-Naphthol and cucurbitacins I, D and E (0.2 mM) were incubated with human liver cytosol in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂ in presence of 1 mM DTT and 2.12 nmol ³⁵S-PAPS for 1 hour at 37°C. The sulfation activities are the means ± SE of a triplicate.

Table 1. Concentrations (μM) values of cucurbitacins I, D and E that induce the mortality of 50% of SW 1353 chondrosarcoma cell lines deduced from the percentage of viable cells *versus* Log cucurbitacin concentrations curves after 6; 12 and 24h of treatment. Values are deduced from Fig. 2 and are the means \pm SE of a triplicate.

Cucurbitacin	Treatment (h)		
	6	12	24
I	7.93 \pm 2.86	8.31 \pm 2.27	5.06 \pm 1.96
D	16.48 \pm 10.14	13.03 \pm 3.56	13.14 \pm 1.27
E	13.55 \pm 6.01	12.65 \pm 5.87	9.16 \pm 1.53

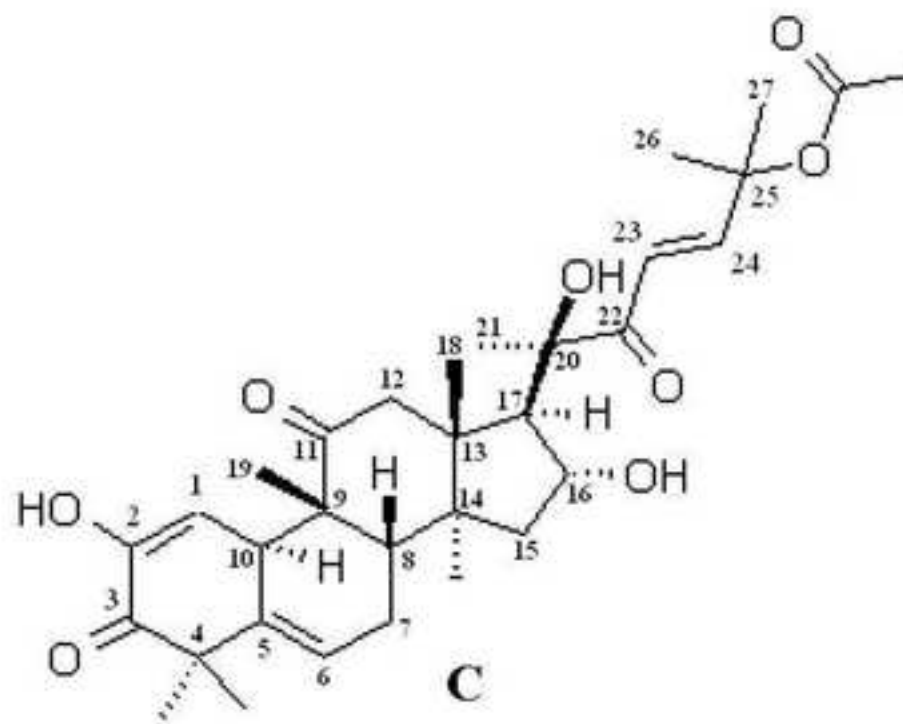
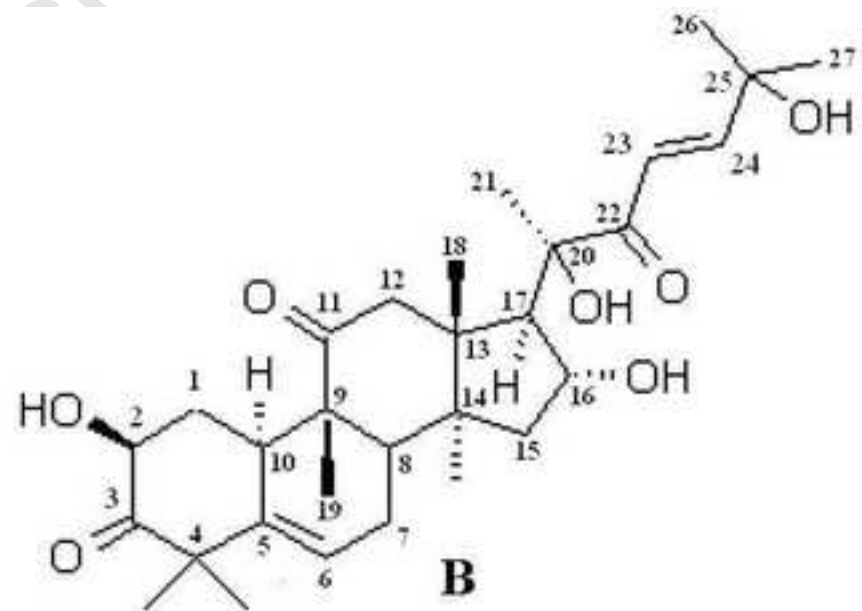
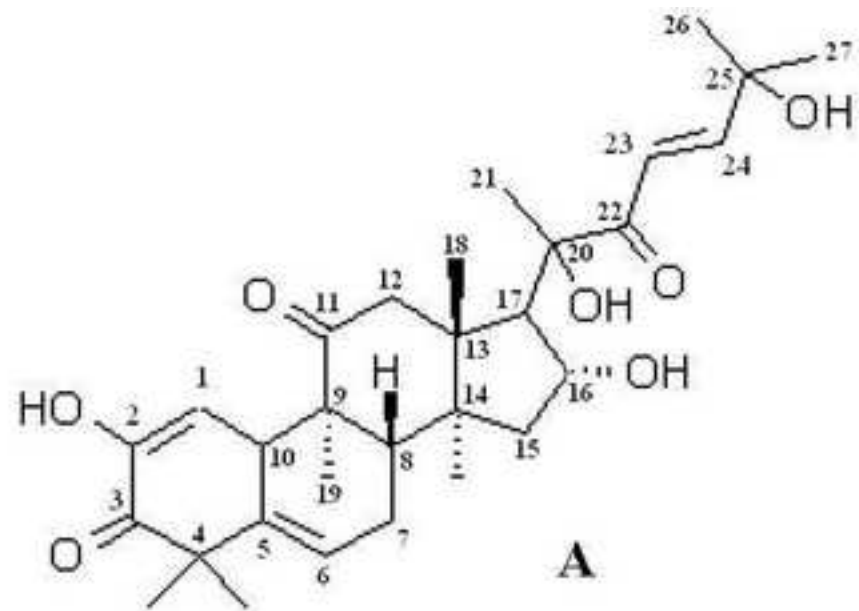
Accepted Manuscript

Table 2. Kinetic parameters for glucuronidation of cucurbitacins I, D and E by human liver microsomes calculated from Fig. 8.

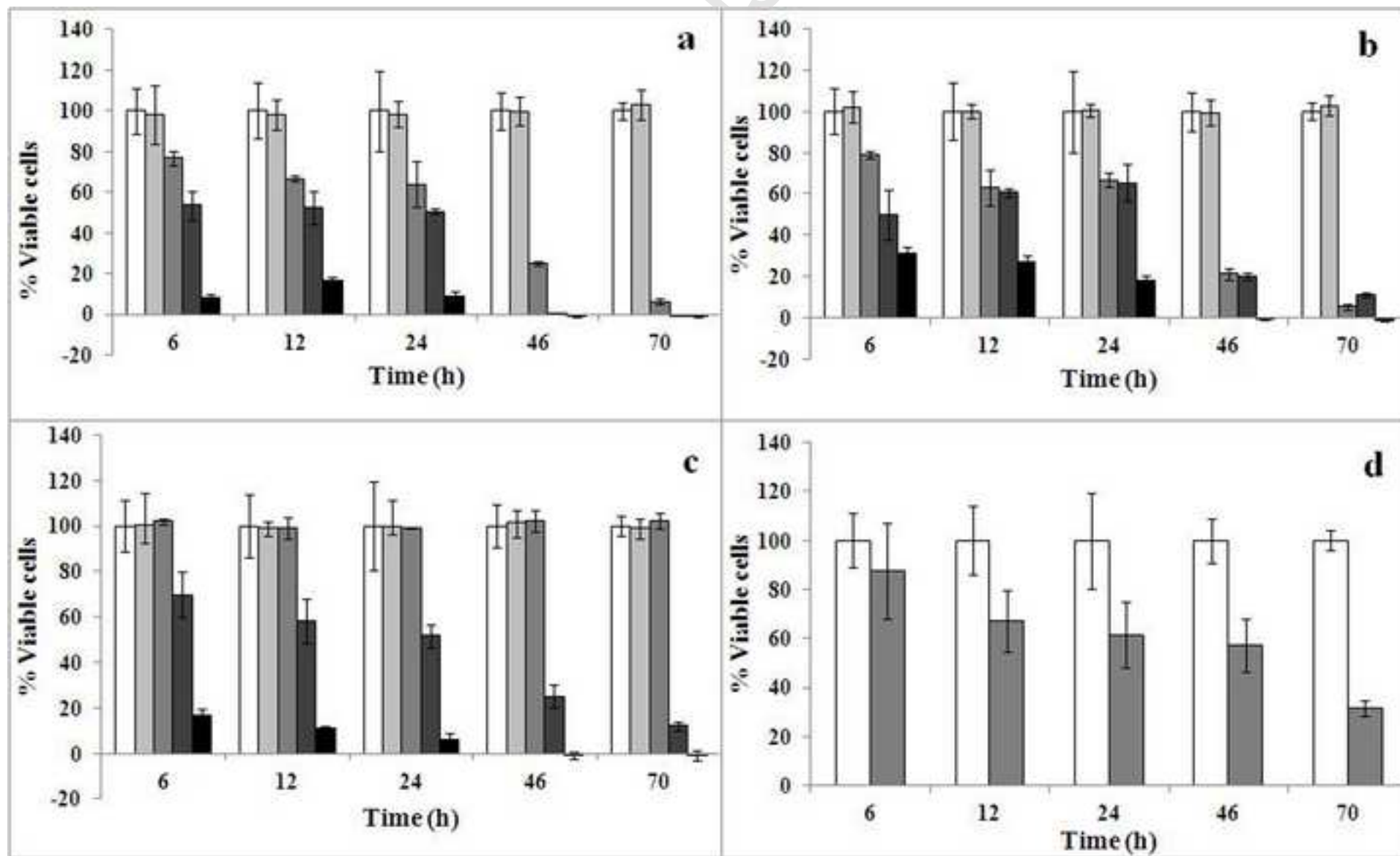
Substrate	K_m (mM)	V_{max} (nmol/mg protein/min)	V_{max}/K_m (nl/mg/min)
Cucurbitacin I	0.70 ± 0.29	0.13 ± 0.03	0.19
Cucurbitacin D	0.37 ± 0.19	0.03 ± 0.01	0.09
Cucurbitacin E	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.01	5.71

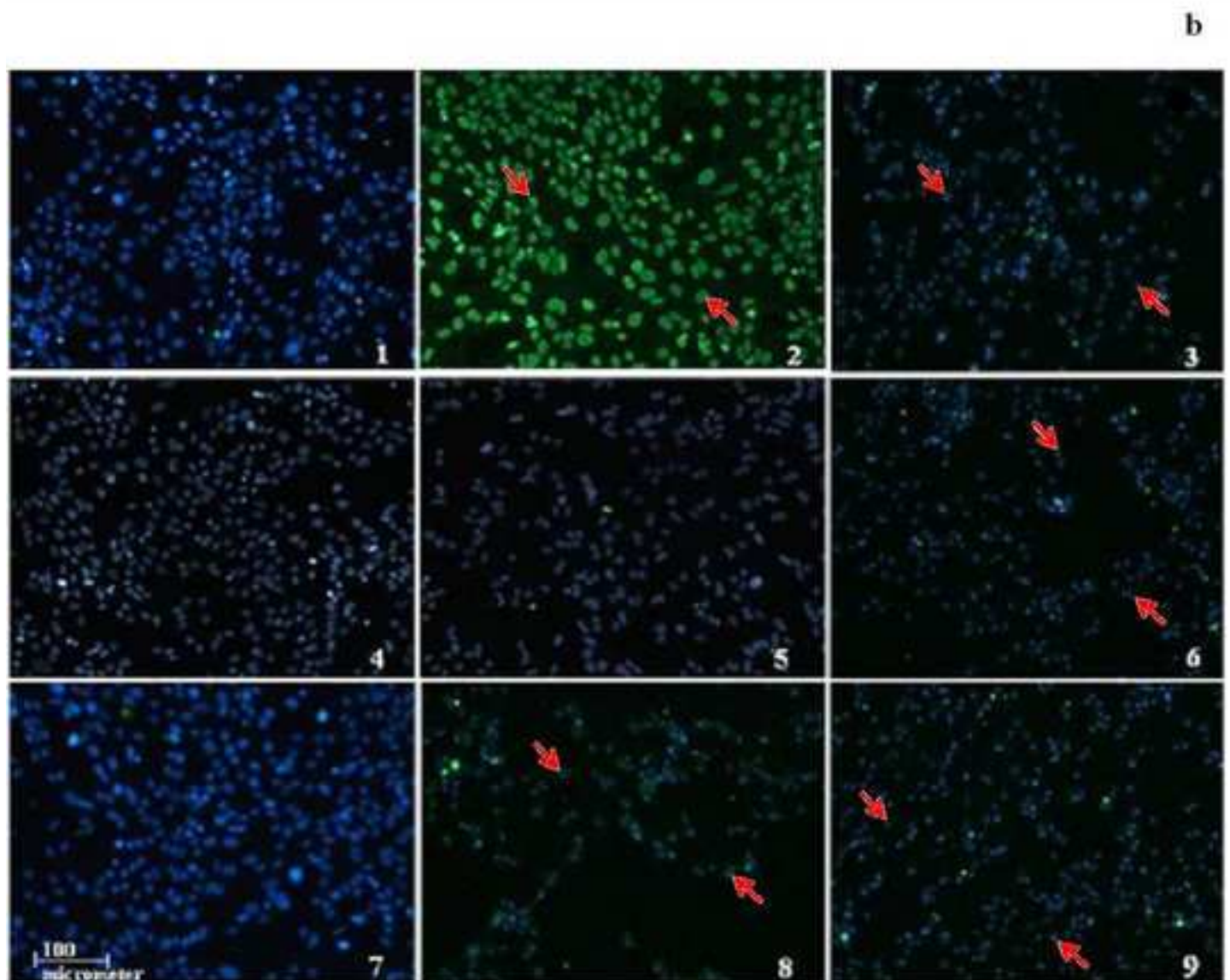
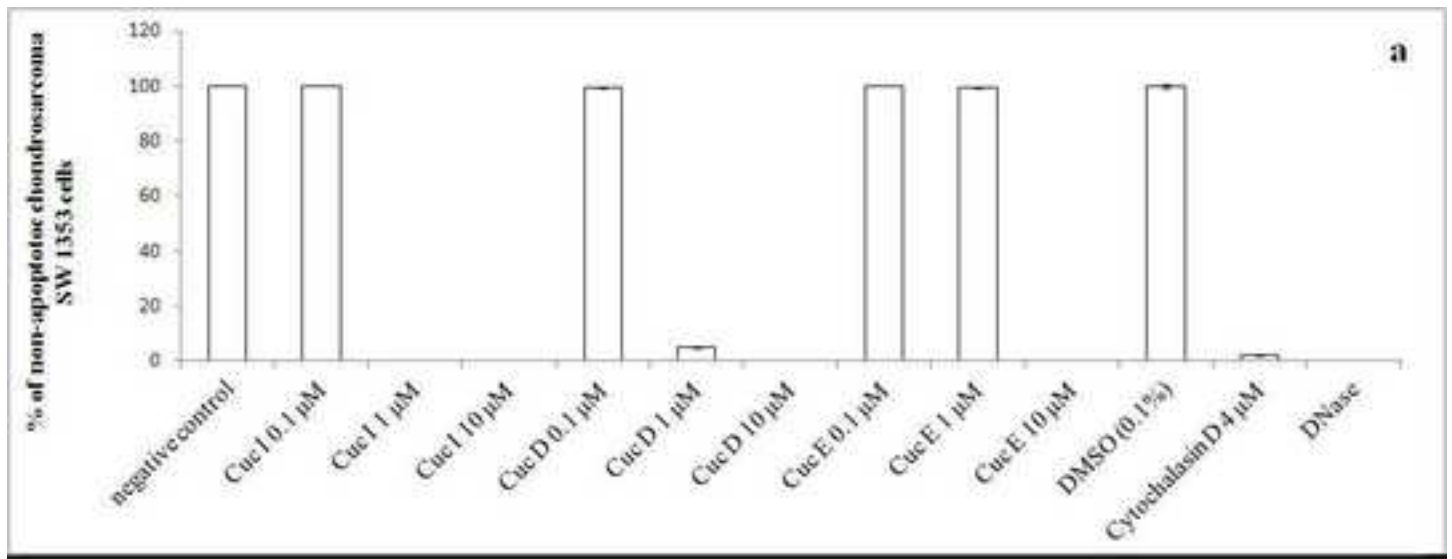
Accepted Manuscript

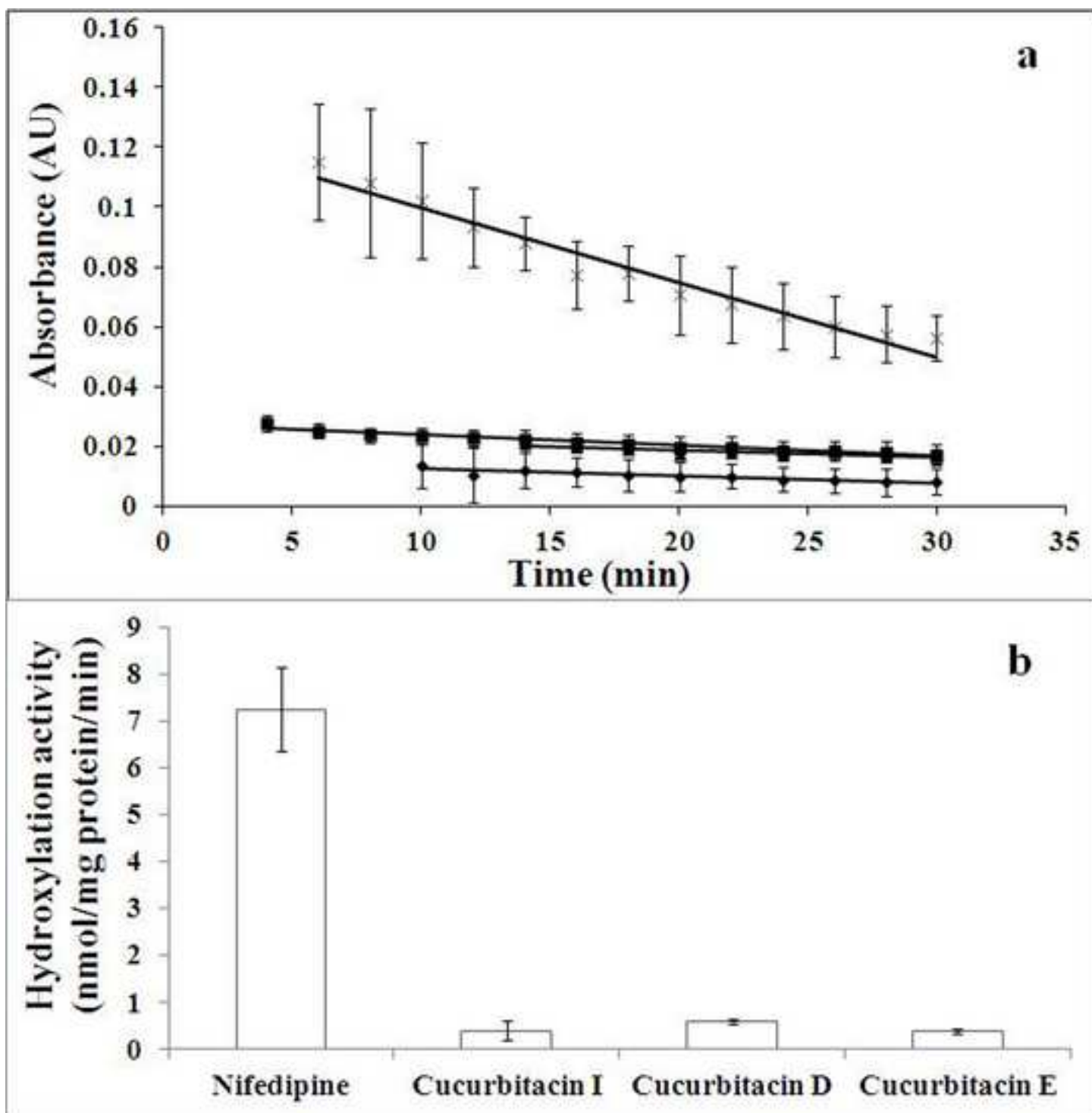
Figure(1)



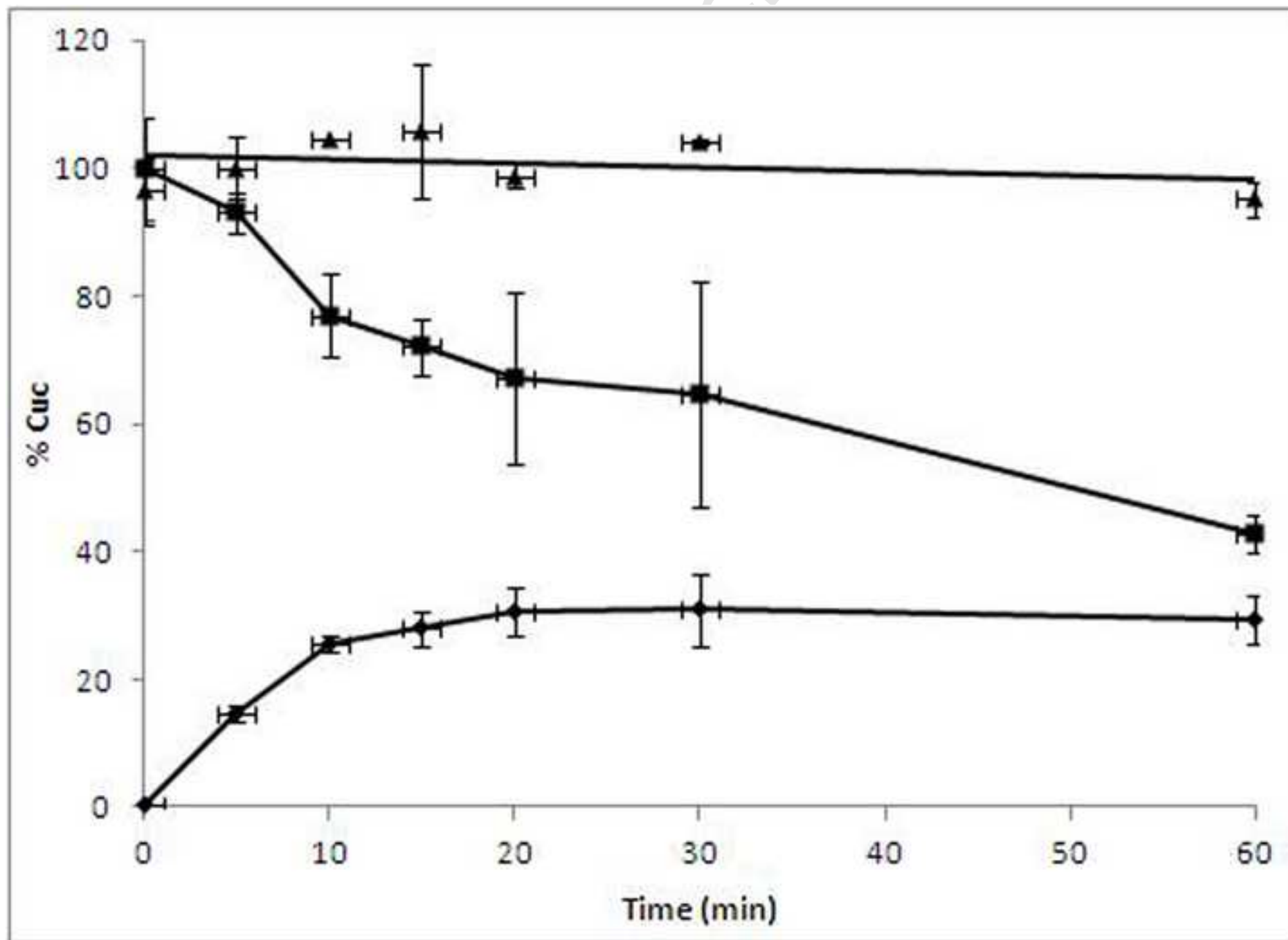
Figure(2)

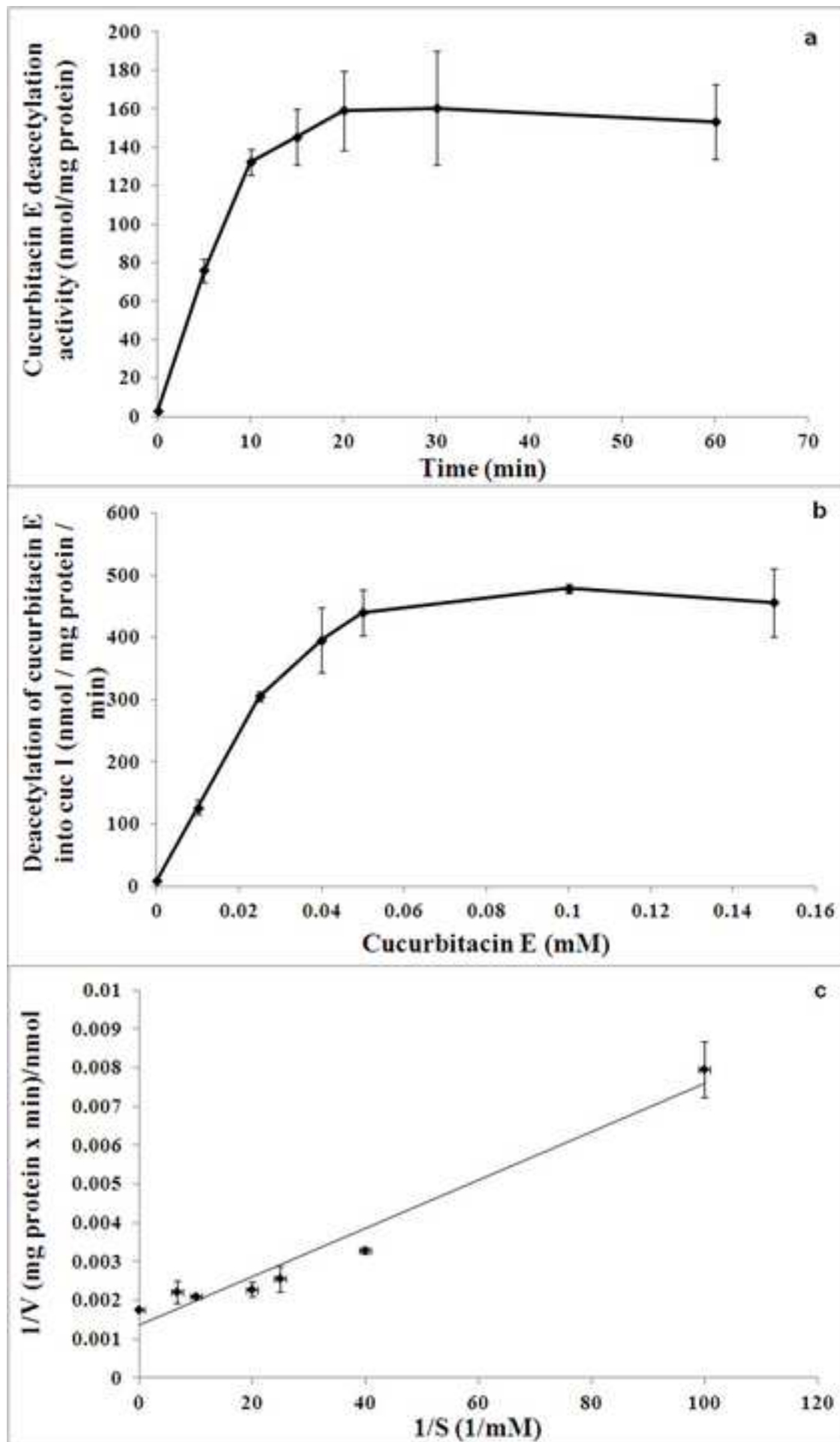




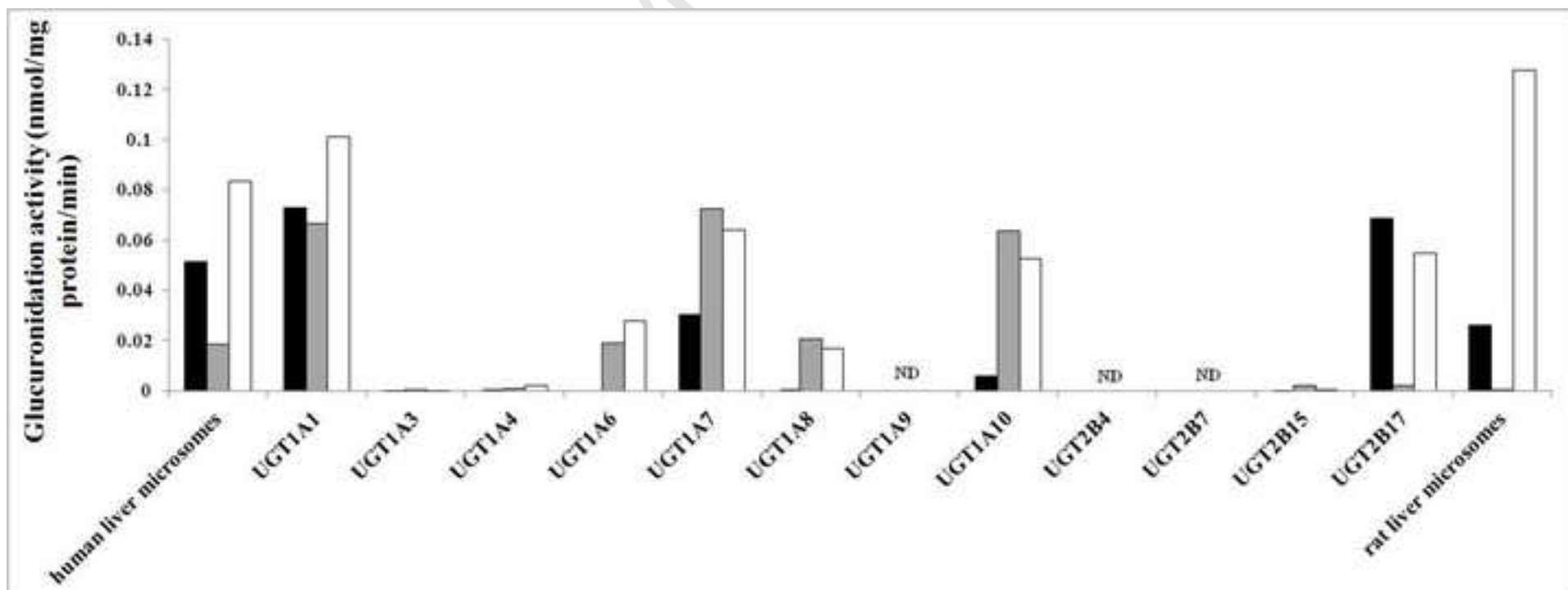


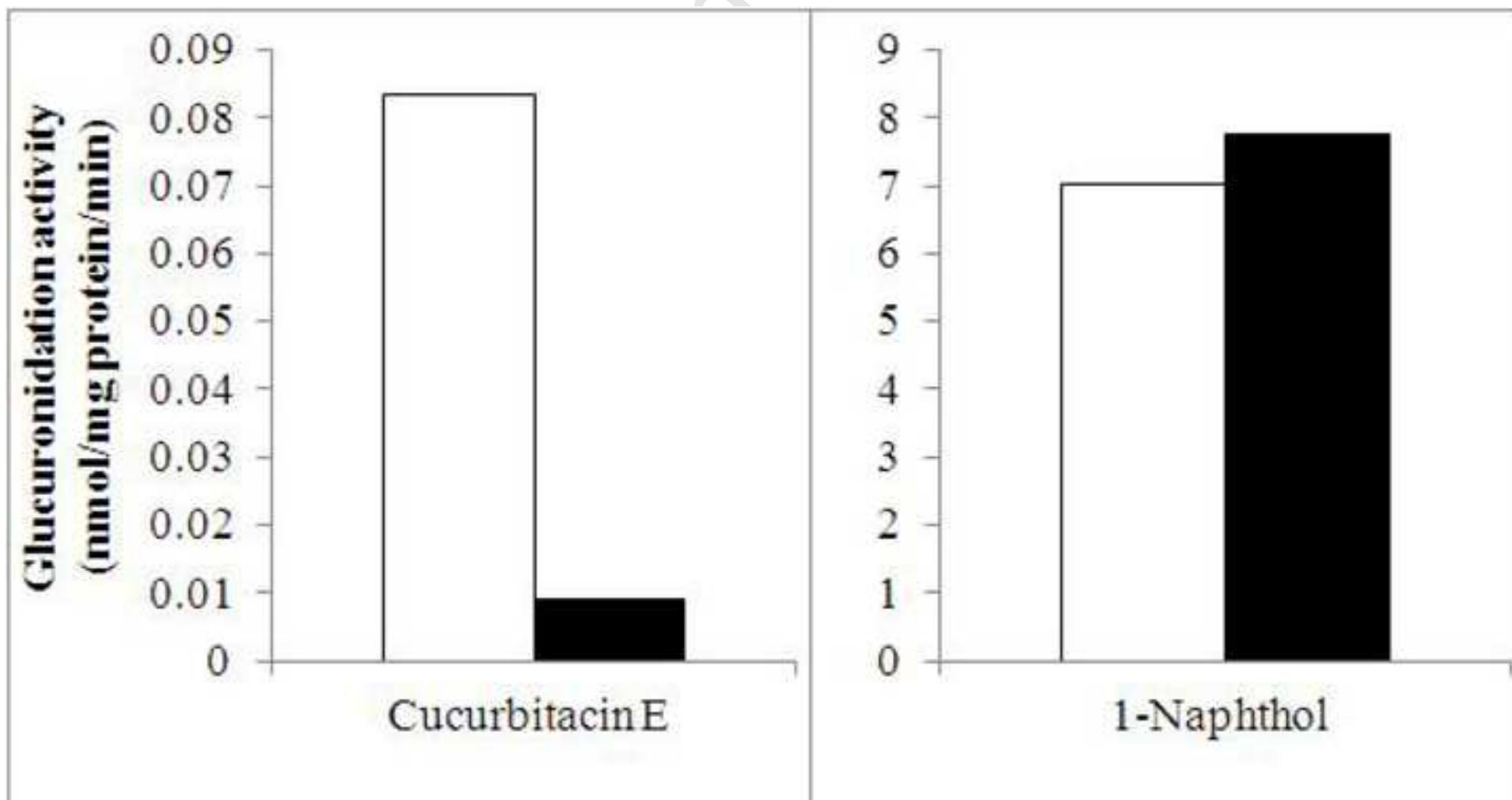
Figure(5)





Figure(7)





Figure(9)

