Métabolites réactifs des anti-inflammatoires non stéroïdiens : bases structurales de leurs interactions avec les cibles protéiques impliquées dans les processus inflammatoires

Nicolas Levoin

▶ **To cite this version:**

Nicolas Levoin. Métabolites réactifs des anti-inflammatoires non stéroïdiens : bases structurales de leurs interactions avec les cibles protéiques impliquées dans les processus inflammatoires. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN12514 . tel-01754346

HAL Id: tel-01754346
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754346

Submitted on 30 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I
2002

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement
Le 25 mars 2002
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

Mention Sciences du médicament

par
Nicolas LEVOIN

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Métabolisme et mécanismes d'action des médicaments. Pharmacologie clinique.

Sujet :

Métabolites réactifs des anti-inflammatoires non stéroïdiens : bases structurales de leurs interactions avec les cibles protéiques impliquées dans les processus inflammatoires

D6 8771

MEMBRES DU JURY

Président :
Professeur P. NETTER

Rapporteurs :
Professeur Y. ARTUR
Docteur M. PAIRET

Juges :
Docteur D. PICOT
Docteur J.Y. JOUZEAU
Docteur F. LAPICQUE

Invités :
Professeur E. BENOIT
Docteur Y. CHAPLEUR

Ce travail a bénéficié du soutien financier

Du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie et de l'Université Henri Poincaré Nancy 1,

Du Centre National de la Recherche Scientifique,

De l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite,

D'un Contrat de Programme en Recherche Clinique du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy.

Plein de gratitude à leur égard, je voudrais associer à cette thèse, par ordre d'apparition chronologique dans le scénario :

Mes parents et beaux-parents, pour leurs encouragements et leur soutien, sans lesquels ces longues études n'auraient pas été réalisables,

Marie, mon épouse, pour sa patience à écouter mes résultat-discussion-soliloques assurément très ennuyeux et ponctuant chaque manip,

Armand, enfin, pour qui cette thèse a été l'occasion de comprendre qu'on commute le moins souvent possible l'interrupteur en position « off » quand papa travaille à l'ordinateur !

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

REMERCIEMENTS

Je suis très reconnaissant aux personnes qui ont obligeamment accepté d'évaluer ce travail, en particulier mes rapporteurs et membres du jury.

A Monsieur le Professeur Yves Artur, qui m'a fait l'honneur de son autorité en matière de métabolisme des xénobiotes. Je le remercie de son enthousiasme à accepter d'être rapporteur de ce travail.

A Monsieur le Dr Michel Pairet, pour m'avoir permis de bénéficier de son éminente compétence dans les voies de biosynthèse cellulaire des eicosanoïdes. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude.

A Monsieur le Professeur Patrick Netter, qui m'a accueilli dans l'UMR 7561. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Daniel Picot, dont le travail éminent dans la connaissance structurale des COX m'a beaucoup aidé à comprendre mes résultats. Je le remercie vivement de l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Jean-Yves Jouzeau, pour ses conseils et idées précieuses. Il m'a souvent incité à pousser plus avant mes analyses, et ainsi aboutir à des résultats beaucoup plus intéressants. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Etienne Benoit, à qui cette thèse doit énormément, tant en ce qui concerne les anticorps utilisés dans différentes techniques, que pour sa gentillesse, ses accueils chaleureux et sa promptitude à résoudre mes problèmes expérimentaux. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma plus respectueuse amitié.

A Monsieur le Docteur Yves Chapleur, pour m'avoir hébergé si aimablement et de façon si efficace dans son Laboratoire. Je lui témoigne mon plus vif respect et mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Françoise Lapicque, qui a été l'instigatrice de cette étude. Elle m'a permis d'apprendre beaucoup durant les 5 années où j'ai eu la chance de travailler sous sa direction. Je lui sais gré en particulier de la rigueur intellectuelle qu'elle m'a inculquée, comme de son enthousiasme et sa clairvoyance pour mes travaux et projets. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma plus vive amitié.

A Monsieur le Docteur Jacques Magdalou, pour ses conseils avisés et sa bienveillante disponibilité. Je lui adresse ici mes chauds remerciements et ma plus respectueuse amitié.

A Madame le Docteur Françoise Chrétien, pour sa grande compétence et sa patience sans borne à combler mes lacunes en matière de chimie organique. Je lui exprime ici mes plus sincères remerciements et ma profonde amitié.

A Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux et Monsieur le Docteur Mohamed Ouzzine, dont la disponibilité et l'expertise méthodologique ont été une aide inestimable pour tous mes travaux de biologie moléculaire. Je leur témoigne mon plus profond respect et ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Bernard Vitoux, qui m'a aimablement ouvert les portes du LCM3B ; portes physiques et portes techniques de la cristallogenèse. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

Ce travail n'a été rendu possible que par la participation savante, stratégique, technique et largement encourageante de beaucoup de personnes que j'ai eu le bonheur de côtoyer pendant la thèse. J'aimerais saluer tout spécialement les équipes de l'UMR 7561, du groupe Sucres de l'UMR 7565, de l'équipe Biostructures du LCM3B (UPRESA 7036), et du Département de Biochimie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

Un grand merci également à Cécile, Sylvie, Marie, Céline, Line, Adeline, Carine et Sophie (quelle équipe de rêve !) pour leur aide technique émérite et très appréciée. J'ai éprouvé le plus grand plaisir à travailler en leur compagnie, et les assure de ma plus sincère amitié.

TABLE DES MATIERES

BIBLIOTHÈQUE NANCY

I_ INTRODUCTION *8*

II_ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE *10*

A. L'inflammation au niveau cellulaire **10**
A. 1. Stimulus 10
A. 1. a) Les médiateurs de l'inflammation et leurs récepteurs 10
A. 1. b) Transduction du signal 13
A. 1. c) Facteurs de transcription: effecteurs de la stimulation 15
A. 2. Réponse : quelques acteurs 24
A. 2. a) NOS 24
A. 2. b) Phospholipases 28
A. 2. c) COX 36
A. 2. d) Les PG synthases 57
A. 2. e) Les lipoxygénases 57
A. 2. f) Couplages fonctionnels : continuité et amplification du signal 58
A. 3. Régulation de la réponse et résolution de l'inflammation 62
A. 3. a) Disparition des médiateurs et des facteurs pro-inflammatoires 62
A. 3. b) Apparition des acteurs anti-inflammatoires 64

B. Les anti-inflammatoires propioniques **67**
B. 1. Place dans la thérapie 67
B. 1. a) Anti-inflammatoires stéroïdiens 68
B. 1. b) Salicylés 69
B. 1. c) Inhibiteurs sélectifs de COX-2 (ISC) 70
B. 2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens 73
B. 2. a) Propriétés physico-chimiques 73
B. 2. b) Pharmacocinétique 73
B. 2. c) Pharmacodynamie 80
B. 3. Effets biochimiques et pharmacologiques des métabolites 86
B. 3. a) Glucuronides de xénobiotes 86
B. 3. b) Acyl-CoA 87

C. Métabolisme lipidique, acyl-CoA et inflammation **87**
C. 1. Biosynthèse et devenir des acyl-CoA 88
C. 1. a) Synthèse : acyl-CoA Synthétases (ACS) 88
C. 1. b) Hydrolyse 94
C. 1. c) Transport 94
C. 2. Implications biochimiques 99
C. 2. a) Sites de fixation 99
C. 2. b) Acyl-CoA comme agent acylant 101
C. 3. Les membranes cellulaires 110
C. 3. a) Généralités et métabolisme membranaire 110
C. 3. b) Existence de microdomaines membranaires (rafts) et conséquences biologiques 114

III_ PRESENTATION DU PROJET *120*

IV_ MATERIEL ET METHODES *122*

A. Réactifs et matériel **122**
A. 1. Réactifs et produits 122
A. 1. a) Biologie moléculaire 122
A. 1. b) Anticorps 122
A. 2. Matériel 122
A. 3. Lignées cellulaires 123
A. 4. Animaux 123

B. Synthèse et caractérisation des métabolites **123**
B. 1. Biosynthèse des glucuronides 123
B. 1. a) Immobilisation des enzymes 123
B. 1. b) Biosynthèse et purification des glucuronides 123
B. 2. Synthèse chimique de l'acyl-CoA 124
B. 3. Synthèse microsomiale de KPF-CoA 124
B. 3. a) Préparation des microsomes 124
B. 3. b) Formation du KPF-CoA 124
B. 4. Cristallogenèse du KPF-CoA 125

C. Méthodes analytiques **125**
C. 1. CLHP 125
C. 1. a) Dosage du KPF 125
C. 1. b) Dosage des métabolites 125
C. 2. ELISA 125
C. 2. a) Dosage des PGE2, 6kPGF1α, PGF2α 125
C. 3. Dosage des protéines 125

D. Biochimie des protéines **126**
D. 1. Activité des COX purifiées 126
D. 2. Western blot des protéines 126
D. 3. Immunoprécipitation 126
D. 4. Préparation des rafts 129
D. 5. Modifications chimiques de la SAH 130
D. 5. a) Acétylation de K199 130
D. 5. b) Nitration de Y411 130

E. Formation et détection des adduits du KPF **130**
E. 1. Formation des adduits 130
E. 1. a) Avec des protéines purifiées 130
E. 1. b) Avec des protéines microsomiales 131
E. 1. c) Avec des protéines cellulaires 131
E. 2. Analyse des adduits par CLHP 131
E. 3. Analyse des adduits par Western blot 131

F. Culture cellulaire et utilisation des lignées **131**
F. 1. Entretien des cellules 131
F. 2. Perméabilisations cellulaires 132
F. 3. Expériences d'inhibition des COX cellulaires 132

G. Biologie moléculaire **134**
G. 1. Etude de l'expression d'enzymes *in vivo* chez le Rat 134
G. 1. a) Extraction d'ARN 134
G. 1. b) Dosage d'ARN 134

G. 1. c) RT-PCR semi-quantitative 134
G. 2. Cinétiques de la transcription d'enzymes *in vitro* 137
G. 3. Clonage et expression recombinante du sous-domaine IIIA de la SAH 138
G. 3. a) Conception des amorces de clonage 138
G. 3. b) Culture des cellules et extraction d'ARN 138
G. 3. c) RT-PCR 139
G. 3. d) Clonage du fragment d'albumine 140
G. 3. e) Amplification des clones positifs et purification du plasmide recombinant 143
G. 3. f) Définition du temps du culture optimum en présence d'IPTG 144
G. 3. g) Détermination de la solubilité de la protéine 144
G. 3. h) Solubilisation des corps d'inclusion et purification de la protéine recombinante 144
G. 3. i) Construction des mutants du domaine d'acylation de l'albumine 144
G. 4. Clonage et expression recombinante des DBD et LBD de PPARγ murin 146
G. 4. a) Amplification sélective des domaines de PPARγ 146
G. 4. b) Clonage des fragments de PPARγ 147
G. 4. c) Sélection des clones positifs 150

H. Modélisations 151
H. 1. Modélisations mathématiques des courbes et statistiques 151
H. 2. Modélisation moléculaire et exploitation de séquences protéiques 151
H. 2. a) Docking 151
H. 2. b) Prédiction de structure par homologie 151
H. 2. c) Mutagenèse 152
H. 2. d) Analyse par HCA 152

V_ RESULTATS ET DISCUSSION 156

A. Synthèse et caractérisation de l'acyl-CoA de KPF et de son analogue non hydrolysable 156
A. 1. Synthèse du KPF-CoA 156
A. 2. Synthèse de l'analogue non acylant (NAK) 158
A. 3. Publication α 160

B. Les métabolites conjugués du KPF comme inhibiteurs des COX 166
B. 1. Les métabolites accèdent aux COX intracellulaires 166
B. 2. Effet de l'albumine sur l'inhibition des COX par le KPF 168
B. 3. Le glucuronide est inhibiteur essentiellement réversible des COX 169
B. 3. a) Activité COX-1 169
B. 3. b) Activité COX-2 171
B. 4. L'acyl-CoA est inhibiteur irréversible sélectif de COX-2 172
B. 4. a) Mise en évidence de la sélectivité pour COX-2 dans un système cellulaire 172
B. 4. b) Caractérisation d'une inhibition qui dépend du temps avec les enzymes purifiées 174
B. 5. Conclusion 175

C. L'acylation du site actif de COX-2 à l'origine de l'inhibition irréversible 176
C. 1. Formation d'adduits avec les COX purifiées 176
C. 2. Détection d'adduits intracellulaires 177
C. 2. a) Mise au point d'un protocole d'immunoprécipitation de COX-2 chez les macrophages 177
C. 2. b) Immunoprécipitation de COX-2 adduite 179

C. 3. Analyse structurale théorique de l'interaction des COX avec les métabolites de KPF 181
C. 4. Conclusion 182
C. 5. Manuscrit β 184

D. Les acyl-CoA comme régulateurs négatifs de l'activité de COX-2 ? 210
D. 1. Expression et régulation de la transcription de COX-2 et des ACS par le LPS *in vivo* chez le Rat 210
D. 2. Cinétique de la transcription d'enzymes de la voie COX et des ACS chez les macrophages en réponse au LPS 212
D. 2. a) Expression d'enzymes de la voie COX 213
D. 2. b) Expression des ACS 213
D. 3. Effet des acyl-CoA endogènes sur l'activité des COX 214

E. Réactivité de l'acyl-CoA de KPF et identification de protéines cibles 218
E. 1. Caractérisation de la réactivité avec l'albumine comme protéine modèle 218
E. 1. a) Cinétique de la formation d'adduits 218
E. 1. b) Définition des sites acylés 219
E. 2. Etude de l'acylation de protéines 219
E. 2. a) Localisation subcellulaire des adduits 219
E. 2. b) Caractérisation de l'acylation des protéines membranaires 223
E. 3. Recherche et définition d'un domaine d'interaction avec les acyl-CoA 223
E. 3. a) Recherche d'un domaine commun chez les protéines interagissant avec les acyl-CoA 223
E. 3. b) Etude de l'archétype de l'ACBD : expression du domaine IIIA de la SAH224
E. 3. c) Implications fonctionnelles de la fixation des acyl-CoA : expression des DBD et LBD de PPARγ 227
E. 4. Identification de cibles particulières du KPF-CoA 229
E. 5. Discussion 232
E. 6. Manuscrit γ 234

VI_ CONCLUSION 256

VII_ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 259

LISTE DES ABREVIATIONS

BIBLIOTHEQUE
PHARMACIE
NANCY

15dPGJ2 : 15-déoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ2
1-AG, 2-AG : 1-, ou 2-Arachidonyl-Glycérol
6kPGF1α : 6-ceto-prostaglandine F1α

AA : arachidonate
AA-CoA: arachidonyl-CoA
ACBP : Acyl-CoA Binding Protein
ACS : Acyl-CoA Synthétase. Elles sont classées selon la chaîne carbonnée des acides gras qu'elles acceptent comme substrat : scACS pour les ACS acceptant les acides gras à courte chaîne, mcACS pour les chaînes de taille moyenne, ...
AEA ; Arachidonyl-Ethanolamide (Anandamide)
AG : acide gras. On distinguera les acides gras à courte chaîne carbonnée (scAG), à chaîne moyenne (mcAG), à longue chaîne (lcAG), voire à très longue chaîne (vlcAG).
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AP-1 : facteur de transcription constitué du complexe Jun et Fos
ARE : AU Rich Element
BSA: albumine sérique bovine
C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein (NF-IL-6)
CCR : Récepteur aux Cytokines CC
CMC : Concentration Micellaire Critique
CoASH : coenzyme A
COX : abréviation usuelle de la Prostaglandine H Synthase (PGHS). Pour éviter toute confusion, nous avons adopté l'italique pour signifier les activités catalytiques, *COX*, pour l'activité cyclooxygénase de COX, *PER* pour son activité peroxydase.
CRE : Elément de réponse à l'AMPc
CREB : cAMP-response element-binding protein
CREBP: cAMP-responsive element- binding protein-binding protein (= CBP/P300)
Ct : extrémité carboxy terminale d'une séquence protéique
CYP : cytochrome P450
DAG : Diacylglycérol
DBD : domaine de fixation à l'ADN
DH : déshydrogénase
DMPC : Dimyristoyl- phosphatidyl-choline
DMPM : Dimyristoyl-phosphatidyl-
DPPC : Dipalmitoyl- phosphatidyl-choline
EET : epoxy-eicosatriénoates C20:3
ELAM : Molécule d'Adhésion des leucocytes endothéliaux
EPA : eicosapentaénoates C20:5
ERK : kinase " extracellular signal-regulated kinase"
FABP : Fatty Acid Binding Protein
FAT : Fatty Acid Translocase
FATP: Fatty Acid Transport Protein
GPCR : Récepteur Couplé aux Protéines G
HCA : Analyse des clusters hydrophobes

HEPE : hydroxy-eicosapentaénoate C20:5
HETE : hydroxy-eicosatetraénoate C20:4
HHT : hydroxy-heptadecatriénoate C20:3
HMGcoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
HNF : Hepatic Nuclear Factor
HO-1: Hème Oxygenase-1
HODE : hydroxy-octadecadiénoate C20:2
HPETE : hydroperoxy-eicosatetraénoates
HSA : albumine sérique humaine
Hsp: Heat shock Protein
ICAM :
IFN : interféron
IKK : IκB Kinase
IL : interleukine
iP : isoprostane
IP-3 : Inositol 3-Phosphate
ISC : Inhibiteurs Sélectifs de COX-2
JNK : Jun N-terminal Kinases
KPF : kétoprofène
KPF-CoA : Acyl-CoA de kétoprofène
KPF-Glc : glucuronide de kétoprofène
LA : linoléate
LOX : lipoxygénase
LPS : lipopolysaccharide
LT : leucotriène
LysoPLA : lysophospholipase. *LysoPLA* est réservé à l'activité lysophopholipase des phospholipases
MAPK : Mitogen Activating Protein Kinase
MBD : domaine de fixation à la membrane
MDCK : Mardin Darvey canine kidney cells
MEK : MAPK Kinase
MIP : Protéine Inflammatoire des Macrophages
NMT : N-Myristoyl Transferase
NO : oxyde nitrique
NOS : NO Synthase
Nt : extrémité amino terminale d'une séquence protéique
PA : Phosphatidate
Palmitoyl-CoA: palmitoyl-CoA
PC : Phosphatidyl-Choline
PE : Phosphatidyl-Ethanolamide
PG : prostaglandine. PGA : prostaglandine de classe A, PGD2 : de classe D2, etc
PGS : Prostaglandine synthase. PGIS : Prostaglandine I synthase, PGES: Prostaglandine E synthase, ...
PI : Phosphatidyl-Inositol
PKa : protéine kinase A
PKc : protéine kinase C
PL : Phospholipide
PLA : Phospholipase de classe A. Comme pour COX, l'italique désigne l'activité catalytique : *PLA1* pour une activité d'hydrolyse en sn-1, *PLA2* pour une activité d'hydrolyse en sn-2.
PLAA : Activateur de PLA2

PLP: Phospholipase P. PLPc: Phospholipase P de classe C, PLPd: de classe D, ...
PMA : phorbol-12-myristate-13-acétate
PMN: Polynucléaires Neutrophiles
PPAR : Peroxysome Proliferator Activated Receptor
PPRE : PPAR Responsive Element
PPT : Palmitoyl-transférase
PS : Phosphatidyl-Sérine
PUFA : AG polyinsaturés
RAR : récepteur nucléaire au rétinoate tout trans
RE : Réticulum endoplasmique
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
Rmsd : écart des moindres carrés (Root Mean Squared deviation)
RNApol II : sous unité ARN polymérase II du complexe de l'ARN polymérase
RXR : Retinoid X receptor
RyR : récepteur calcique de la ryanodine
SCP-2 : sterol carrier protein-2
SM : sphingomyéline
SMC : cellule musculaire lisse
SREBP : Sterol Responsive Element Binding Protein
TG : Triacyl-Glycérols
TIMP : Tissue Inhibitor of metalloproteases
TLR : Récepteur Toll-like
Tx : thromboxane. TxA2 : thromboxane de classe A2, ...
TxS : Thromboxane Synthase
UGT: UDP-Glucuronotransferase
UTR: Unttranslated region. Parties non codantes de l'ARN
VCAM : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires
Wy : Wy-14653

L'INTRODUCTION

Parmi les thérapeutiques articulaires, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent une classe médicamenteuse majeure, prescrite pour ses propriétés antiphlogistiques, antalgiques, antipyrétiques et anti-agrégantes plaquettaires. En dépit d'une diversité structurale, leur principal mécanisme d'action est commun et consiste en l'inhibition des cyclo-oxygénases (COX), enzymes majeures de la voie de synthèse des PG, avec toutefois des actions différentes sur les isozymes constitutive (COX-1) et inductible (COX-2). Plusieurs travaux récents montrent que le dualisme initialement avancé entre les fonctions des 2 COX est par trop simpliste, mais il n'en est pas moins vrai qu'une inhibition de COX-1 contrecarre sa fonction constitutive, tandis que celle de COX-2 au site inflammatoire et en phase de réponse inflammatoire, limite la perpétuation de cette réponse.

Tant en ce qui concerne les propriétés thérapeutiques que les effets secondaires, l'inhibition des COX par ces médicaments n'explique cependant pas toutes leurs propriétés pharmacologiques. Il existe en effet de fortes disparités interindividuelles d'efficacité des AINS, comme il existe d'importantes différences entre AINS chez un même patient, ce qui s'explique difficilement par la seule inhibition des COX.

Certains AINS, comme les dérivés propioniques, sont chimiquement chiraux et sont administrés sous forme de mélange racémique. Les 2 énantiomères n'ont pas les mêmes propriétés, en particulier envers COX, pour laquelle les énantiomères S sont inhibiteurs beaucoup plus puissants que leurs antipodes. Malgré un métabolisme conduisant, dans certains cas, à une inversion chirale du R vers le S, l'efficacité des énantiomères R intègre mal un schéma fonctionnel basé sur l'inactivation simple des COX. D'autres effets des AINS, comme l'analgésie dans des modèles de douleur indépendants de COX soulignent encore l'imperfection de nos connaissances et suggèrent fortement qu'il existe un ou des autres modes d'action de ces médicaments.

L'objectif de ce travail s'inscrit donc dans la recherche d'autres activités des AINS qui pourraient éclaircir ces lacunes. Nous avons émis l'hypothèse que ce soit, au moins en partie, par leur métabolisme qu'ils présenteraient ces comportements difficilement compatibles avec un mécanisme d'action aussi simple. Il a en effet été montré récemment que certains métabolites chimiquement réactifs, comme les dérivés acylglucuronides et thioesters du Coenzyme A, sont capables de se fixer de façon covalente aux protéines et d'en modifier les propriétés enzymatiques. Ce travail vise donc d'une part à tester le pouvoir inhibiteur de COX de certains métabolites, d'autre part à prospecter d'autres cibles protéiques éventuelles des médicaments ou de leurs métabolites, pouvant rendre compte des effets pharmacologiques.

Le présent mémoire se propose, dans une première partie bibliographique, de rapporter quelques données essentielles sur les processus biologiques liés à l'inflammation au niveau cellulaire, en se consacrant tout particulièrement à la voie de biosynthèse des PG et aux protéines impliquées. Il rappellera brièvement quelques notions pharmacologiques des AINS, avant de se focaliser sur le métabolisme des acyl-CoA endogènes, ce qui, par analogie, nous permettra de bien cerner biochimiquement le métabolisme correspondant des aryl-propionates.

Après avoir exposé notre stratégie d'étude, nous présenterons les résultats de ce travail, réalisé avec le kétoprofène comme AINS modèle, et tenterons d'en dégager les aspects les plus intéressants et les perspectives ouvrant sur une meilleure compréhension de l'effet de ces médicaments.

L'inflammation est un terme générique désignant diverses réactions de défense contre des substances endogènes ou exogènes, survenant après une blessure tissulaire, une infection ou des stimulations immunologiques. Elle constitue l'ensemble des modifications vasculaires, tissulaires et humorales de l'organisme. Les processus inflammatoires se déroulent généralement dans le tissu conjonctif, et s'accompagnent des événements caractéristiques : rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur. L'inflammation est transitoire et évolue vers des processus réparateurs (inflammation aiguë). Si la réponse que constitue cette phase aiguë est inefficace pour éliminer les stimuli déclencheurs, une inflammation chronique s'installe, accompagnée d'une réaction de type cellulaire.

L'inflammation aiguë est caractérisée par une phase vasculaire suivie d'une phase cellulaire. La première débute immédiatement après l'agression. La vasodilatation des vaisseaux conduit à une congestion, provoquée par l'histamine et la sérotonine, produites par les mastocytes et les plaquettes, et par des dérivés de l'arachidonate [AA] et du complément. La phase cellulaire correspond à un afflux de leucocytes (polynucléaires neutrophiles attirés par des chimiotactiques [C5a, LTB4, ...], puis monocytes, voire lymphocytes).

L'inflammation chronique implique moins de neutrophiles mais plus de macrophages et de lymphocytes. Les macrophages sont issus de l'activation des monocytes par les chimiotactiques. Ils sont alors source de protéases, cytokines, radicaux, facteurs de coagulation, NO et PG.

A. L'inflammation au niveau cellulaire

L'inflammation est un processus évolutif faisant intervenir des facteurs locaux et circulants. Il est complexe et on aborde souvent son étude à l'aide de modèles simplifiés, afin d'atteindre une compréhension fine des phénomènes biologiques et moléculaires qui le régissent. Ces modèles vont des organes en perfusion aux cellules isolées ou aux lignées en culture, voire aux cellules transfectées ou aux enzymes purifiées quand on s'intéresse à une voie biochimique ou à une protéine particulière. Dans ces études *ex vivo* ou *in vitro*, on utilise généralement un stimulus inflammatoire unique et simple, endogène (IL-1, TNF, IFN) ou exogène (lipopolysaccharide, LPS). Comme tout modèle, les simplifications de ces systèmes d'étude limitent leur validité et leur pertinence à leurs circonstances, et il n'est pas rare de constater des divergences voire des contradictions entre différents travaux. Nous prendrons donc toujours soin de préciser les conditions des modèles utilisés dans les études que nous relaterons.

Malgré leurs imperfections, ces modèles nous permettent d'analyser l'évolution biologique et biochimique de l'inflammation, partant du stimulus et du déclenchement de la réponse inflammatoire cellulaire, et aboutissant à sa résolution. Nous nous focaliserons sur quelques acteurs protéiques principaux ainsi que sur les rôles de leurs produits.

A. 1. Stimulus

A. 1. a) Les médiateurs de l'inflammation et leurs récepteurs

Pendant l'apparition de l'inflammation, les cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, macrophages, plaquettes et lymphocytes) expriment un nombre croissant de glycoprotéines de surface (molécules d'adhésion cellulaire). Les cellules endothéliales, qui sont aussi activées durant cette phase initiale de la réponse inflammatoire expriment des

récepteurs pour ces molécules d'adhésion. L'expression régulée de ces molécules permet le trafic précis des leucocytes au site inflammatoire. L'adhésion de cellules immunitaires aux cellules endothéliales forme une bordure sur les vaisseaux sanguins entourant le site inflammatoire, les prévenant d'un balayage hors du site.

Le processus d'influx cellulaire au site inflammatoire est médié par de nombreuses molécules présentes dans le sang et les fluides cellulaires, sécrétés par des cellules dégranulantes, inflammatoires ou endothéliales actives. Parmi ces médiateurs, on trouve les anaphylatoxines de la cascade du complément, des kinines du système de coagulation, des lipides (leukotriènes, prostaglandines), des peptides (tachykinines, VIP, VPF), des facteurs de croissance (TGFβ, PDGF, FGF, EGF). Ces molécules augmentent la perméabilité capillaire et ont une action vasodilatatrice et bronchoconstrictante. Les réactions inflammatoires impliquent encore des cytokines pro-inflammatoires, directement ou par leur capacité à induire la synthèse de molécules d'adhésion cellulaire ou d'autres cytokines. Incluant des chemokines, des interleukines, lymphokines, monokines, TNFα, CSF, IFNγ et d'autres facteurs neuromodulateurs, les cytokines forment un réseau d'acteurs biologiques complexes dont les membres ont souvent des fonctions redondantes.

- **Les cytokines**

Le terme cytokine désigne divers protéines et peptides solubles agissant comme des régulateurs hormonaux à concentration de l'ordre du nano- ou picomolaire et modulant les activités fonctionnelles de cellules individuelles ou de tissus. Elles ressemblent donc aux hormones classiques avec des actions auto-, para-, juxta- ou retrocrines, et certaines sont actives au niveau systémique. Mais contrairement aux hormones, elles agissent sur un spectre de cellules large et ne sont pas sécrétées par des cellules spécialisées. Certaines cytokines ont en outre une activité enzymatique (ADF, NM23, PD/EC-GF, Neuroleukine).

Les cytokines ne sont pas stockées dans les cellules (à l'exception de TGFβ et PDGF dans les plaquettes), mais exprimées dans les cellules activées, en réponse à un signal inducteur. Leur expression est transitoire, rarement constitutive, et très régulée. Leur action est très complexe à cerner puisqu'elles peuvent montrer une activité stimulante ou répressive, comme synergique ou antagoniste de l'action d'autres facteurs. De plus, une même cytokine peut agir différemment selon les circonstances : bFGF est ainsi mitogène pour le fibroblaste à faible concentration et chemoattractant si son taux est élevé. L'IFNγ stimule la prolifération des cellules B activées par l'antigène IgM, mais inhibe leur activité si elles sont stimulées par IL4. Il semble enfin exister une chronologie dans l'intervention des cytokines avec des membres précoces pré-activant des cellules qui peuvent alors répondre à des cytokines tardives.

L'activité biologique des cytokines est médiée par des récepteurs membranaires spécifiques : IL-1α et β sont ainsi ligands du complexe IL-1RI / IL-1RAcP (appartenant à la superfamille IL-1R/ TLR (IL-1R II, IL-18R, récepteur au LPS TLR-2 et -4) [1].

Les interleukines sont d'autres cytokines sécrétées quant à elles par les leucocytes et impliquées dans l'activation cellulaire, la différenciation, la prolifération et la communication cellulaire. Les termes cytokines et interleukines ne sont que des dénominations historiques et ne recouvrent pas une distinction biologique. Ainsi la cytokine IL-8 est une interleukine chimiotactique (chemokine).

Parmi les cytokines, les chemokines sont des molécules ayant surtout des propriétés chimiotactiques. Leur nomenclature répond à leur localisation chromosomique : on distingue ainsi les α chemokines (AM-CSF, IL-8, MIP-2, PF4, NAP-2,-3,-4, Eotaxine, famille CINC), les β chemokines (Eotaxine-2, ACT-2, MCAF, MCP, MIP), les γ chemokines (ATAC, SCM),

et les δ chemokines (Fractalkines). Elles constituent les protéines les plus induites durant la stimulation de monocytes par différents agents, qui montre l'activation de 120 gènes sur 600 testés. 10 à 15 d'entre eux répondent fortement (induction 10 à 50 fois), 20-25 gènes répondent légèrement moins (5 à 10 fois) et 80 à 90 gènes ne sont que faiblement activés (2 à 5 fois). Les plus induits se révèlent être ceux de chemokines (IL-8, MIP1, MIP2 et MCP-1). Dans ces conditions, l'IL-1 est la cytokine la plus induite. Cinétiquement, la transcription est maximale entre 40 et 120 min, tandis que les protéines correspondantes apparaissent surtout entre 10 et 20 h [2]. En conditions inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, les diverses cytokines apparaissent séquentiellement : TNFα d'abord puis IL1α,β puis IL6, GM-CSF (taux d'induction de l'ordre de 10 sauf IL1α : 80 à 4 h), pendant que MIF est down-régulé. Les chemokines suivent une expression contemporaine : IL8, GROx, MIP1α,β (taux de 10 sauf MIP1β à 50). L'aîné des facteurs de transcription ou des protéines associées entrant en jeu est IκB, suivi de FRA1, Jun (1 h), puis P50 de NFκB et CREB2 (4 h) ; simultanément Fos est réprimé (avant 1 h) [3].

• Les eicosanoïdes

Sous le terme eicosanoïdes sont rassemblés les métabolites de l'AA (eicosatétraenoate) et, par extension, d'autres AG polyinsaturés (LA, EPA) ayant des actions plus ou moins spécifiques. Les PG, que nous étudierons plus précisément au niveau cellulaire, sont de puissants vasodilatateurs (TxA2 constrit, PGI2 dilate), contractants musculaires et agrégants plaquettaires (TxA2 « agrège », PGI2 « désagrège »). Ils augmentent le flux sanguin et la perméabilité vasculaire [4]. Ces différents effets ont conduit à estimer que Tx serait souvent associé à une pathologie, alors que les PG seraient homéostatiques. En conditions inflammatoires, on observe une augmentation de la concentration en eicosanoïdes. Ainsi, dans des biopsies de peau irritée par de l'adjuvant de Freund, on mesure près de 12 ng de 6kPGF1α/mg de protéines produits en 30 min contre 5 en conditions témoin, et 19 ng de PGE2, 12 h post-stimulus [5]. Dans un modèle d'inflammation de l'épithélium buccal, on mesure une forte augmentation de la concentration en PGE2 (3 à 11 ng/ g tissu) et de LTB4 (0,1 à 1,3 ng/ g tissu) [6].

Les PG sont fixées par des GPCR aux prostaglandines et leukotriènes de type DP, EP, FP, IP et TP pour les PGD2, PGE2, PGF2α, PGI2 et le TxA2 respectivement, et BLTR pour LTB4 [7]. Chaque ligand est 10 fois plus affine pour son propre récepteur que pour un autre [8]. Ces récepteurs ont des expressions différentes selon les cellules : TP dans les plaquettes, EP1 dans les fibroblastes, FP dans les reins et les astrocytes. Ils sont couplés à différentes protéines G: IP, DP, EP2 et EP4 à Gs puis AC, TP, FP et EP1 à Gq puis voie du Ca^{2+} et de l'inositol phosphate. Différents sous-types d'EP3 activent Gi, Gs ou Go [9]. Des récepteurs aux PG existent dans toutes les membranes cellulaires : PGD2 et PGE2 se fixent surtout dans les membranes plasmiques d'homogénat de cerveau, beaucoup moins dans le RE et le noyau où EP3 est prépondérant par rapport à EP1, 2 et 4. Cependant EP1 régule les flux calciques vers le noyau ainsi que la transcription de Fos [10]. Il est aussi impliqué dans la perception de la douleur [11]. Le passage trans-membranaire des PG s'effectue en deux étapes, une active (ATP dépendante), l'autre passive. Les matrines F/G (ATP indépendantes) transportent ainsi les PGE1, PGE2, PGF2α mais pas iloprost ni 6kPGF1α. Le transporteur des sels biliaires Oatp est inhibé par les PG (Ki # 14 μM) qui ne permet cependant pas leur transport [8].

La disruption des récepteurs aux PG n'a pas permis de montrer lesquels sont cruciaux dans l'inflammation, parmi les 4 EP, TxR ou PGF2αR. Il n'y a que PGI2R qui soit ainsi clairement impliquée [12].

- **L'ATP**

L'ATP extra-cellulaire est un autre médiateur, libéré après des dommages cellulaires ou par l'activation des plaquettes, systémique après sécrétion par les glandes adrénales, ou autocrine. L'ATP stimule la libération d'IL-1β par les cellules de la microglie via P2z/P2x7 [13]. Ce même récepteur est impliqué dans la libération d'AA par les macrophages en réponse au LPS, à fortes concentrations (EC50 = 0,2 mM). Le blocage de ce récepteur réprime en outre COX-2 et V-sPLA2 [14]. Il est enfin responsable de l'activation de NF-AT et NFκB à partir de 1 mM d'ATP extracellulaire [15].

- **Autres facteurs**

L'activation du complément dans les débuts de l'inflammation libère de puissants pro-inflammatoires comme les peptides du complément C3a et C5a (anaphylatoxines). Ces chemo-attractants agissent via leurs récepteurs : C5aR ubiquitaire, et C3aR [16], très exprimé chez les monocytes, macrophages, plaquettes, leucocytes et cellules endothéliales, où C3a induit IL-8 (EC50 = 1 nM alors qu'on retrouve jusqu'à 2,2 μM dans le sérum en conditions inflammatoires) [17].

Les sPLA2 sont un autre facteur systémique que nous étudierons ultérieurement, en particulier par leurs récepteurs extracellulaires.

Le lysoPA dispose lui aussi de plusieurs récepteurs spécifiques de la partie PA par rapport aux PAF, PI, PE ou PS, mais de sélectivité d'acyle variable selon l'isoforme, et de profil de réponse différent : EDG4 accepte ainsi les chaînes saturées et insaturées et stimule PLPc, AC et des MAPK, tandis que EDG7, sélectif des insaturés, n'a pas d'effet sur les MAPK [18].

- **Facteurs exogènes**

Les médiateurs chimiques exogènes sont également très variés, d'origine physiologique (LPS) ou non (esters de phorbol, MIA, PMA). Le stimulus du LPS est médié par différents récepteurs (TLR-2 [19], TLR-4 [20] et CD14 [1],[21]) et modulé par le récepteur purinergique P2z/P2x7 [22].

A. 1. b) Transduction du signal

La fixation du médiateur à son récepteur entraîne typiquement l'activation de protéines G qui elles-mêmes recrutent les effecteurs adénylate cyclase, phospholipases A et C, et Tyr kinases. Ceux-ci initient alors diverses cascades de kinases qui agissent en réseau pour aboutir à une réponse cellulaire globale complexe par activation d'enzymes, induction de gènes et régulations de tous ces signaux (Figure 1).

En ce qui concerne les PG, PGE1 et PGE2 activent PKa (la concentration en AMPc est augmentée de 60 fois à 10 μM) et PGF2 active PKc (concentration en IP3 augmentée de 5 fois à 30 μM chez les ostéoblastes [23]. PGF2α active d'autres réponses précoces dans les SMC comme la phosphorylation de eIF4e, 4EBP1, des MAPK et P70 qui active ERK-2, lui-même activé par des voies dépendante et indépendante de IP_3K, et active la phosphorylation de eIF4e et 4EBP1 [24]. L'AA (2 à 30 μM) induit MAPKP-1 qui déphosphoryle ERK et JNK, provoquant ainsi une down-régulation, alors que dans d'autres circonstances l'AA active ERK et JNK [25].

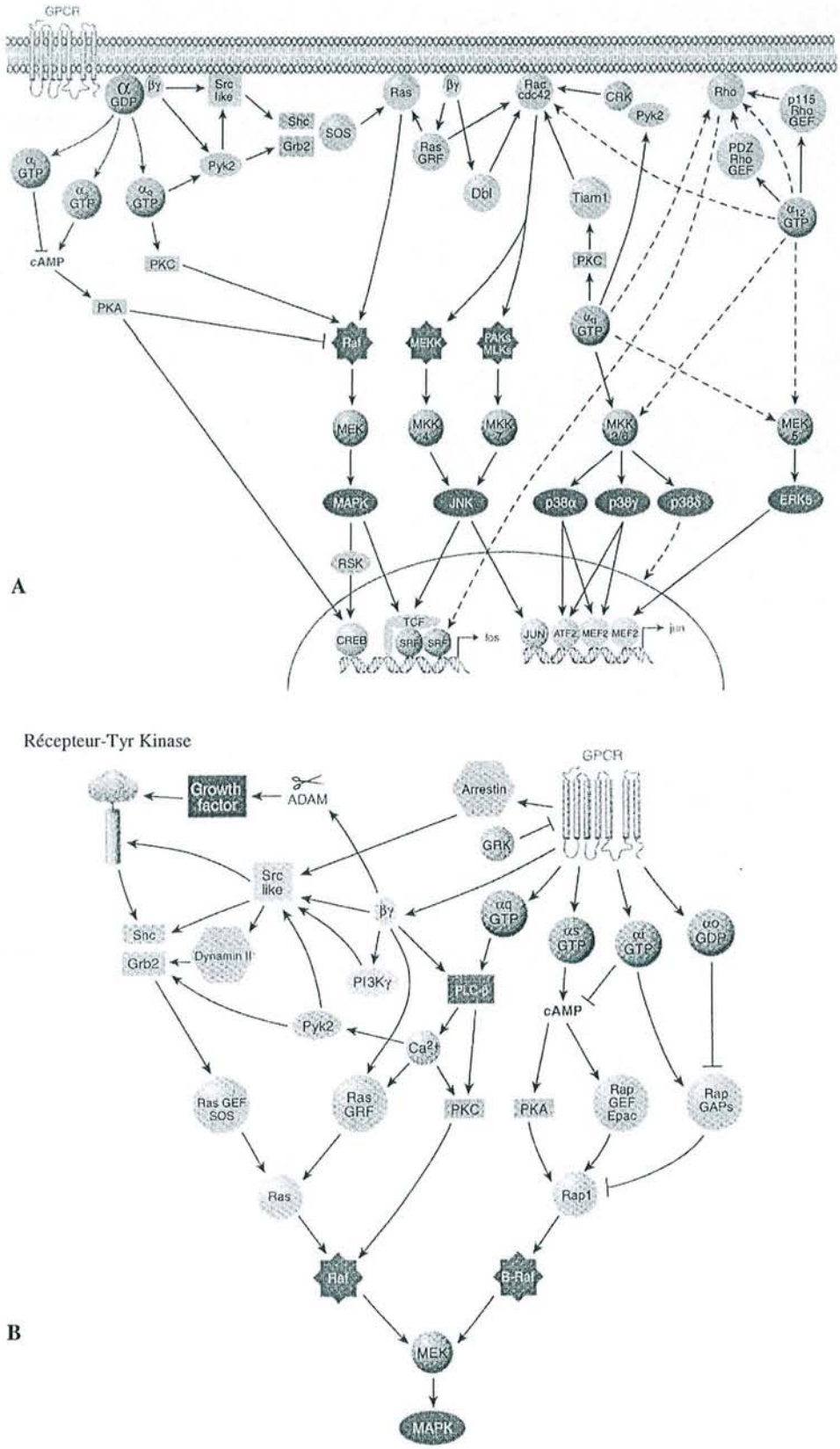


Figure 1 Schéma général de la transduction du signal [21]

A : Schéma de la transduction du signal, des GPCR aux facteurs de transcriptions. Ces facteurs se fixent au promoteur des gènes de fos et jun pris comme exemple de gènes sous contrôle du signal.
B : détail des voies reliant les GPCR aux voies MAPK. Les flèches indiquent une stimulation, les courbes arrêtées des inhibitions et les courbes discontinues des interactions pas totalement établies

Quant à l'IL-1, elle active JNK (phosphorylation de P54 et P45 via MEKK1 et MKK4) et MAPK P38 via MKK3,6 [26] en passant par la voie PKc [27]. De nombreux stimuli empruntent les mêmes voies ou se rejoignent à des nœuds de la transduction, avant les facteurs de transcription, comme pour le LPS, IL-1 ou IL-18 (Figure 2).
Dans un modèle d'inflammation aiguë *in vivo*, la voie ERK est activée mais pas JNK ni MAPK P38 : la phosphorylation apparaît dès 15 min, elle est maximale 4 h après le stimulus, et son activité kinase optimale à 6h. Par ailleurs, l'inhibition de MEK diminue l'œdème [28].

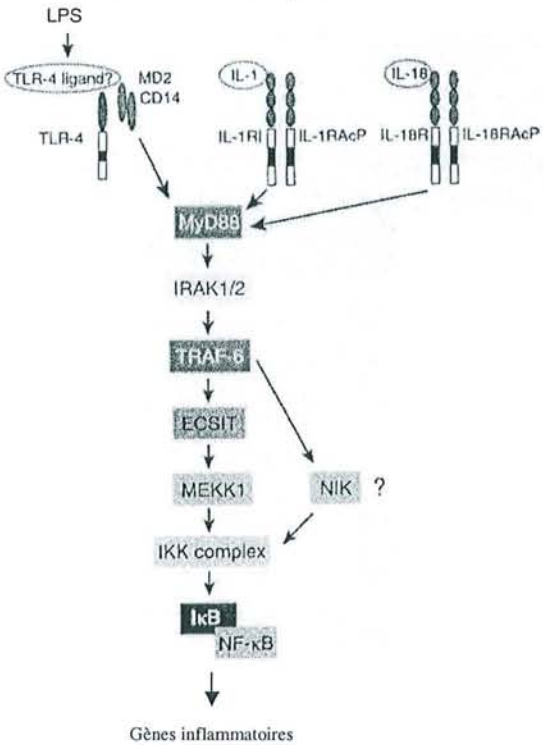


Figure 2 Schéma général de la transduction du signal après activation par le LPS, l'IL-1 ou l'IL-18 [1]

Les 3 médiateurs associés à leurs récepteurs activent les kinases IRAK, MEKK et IKK via les adaptateurs MyD, FRAF et ECSIT pour aboutir à l'activation de NFκB

A. 1. c) Facteurs de transcription: effecteurs de la stimulation

La transduction du signal dont nous venons de voir quelques exemples s'achève par l'activation et/ou l'inactivation de facteurs de transcription. Ces protéines participent au mécanisme de la transcription opérée par des facteurs de transcription généraux (SP-1, AP-2...) associés au complexe de l'ARN polymérase (RNApol II, TFII A,B,...), souvent en tant qu'activateurs distaux.

- **NFκB**

L'expression du gène de NFκB est précoce et ubiquitaire. Le facteur de transcription est constitué d'un homo- ou hétéro-dimère de sous-unités appartenant à la famille Rel (P50, P65, Rel). L'activation de ce facteur résulte de la dissociation de son inhibiteur cytoplasmique IκB, ce qui lui permet de pénétrer dans le noyau et d'y assumer sa fonction. IκB avait été auparavant phosphorylé par des IκB kinases (IKK) puis ubiquitiné avant d'être dégradé par le protéasome (Figure 3). L'activation de NFκB répond à de nombreux stimuli pro-

inflammatoires (ILx, cytokines, ...). Comme nous le verrons plus tard, elle est impliquée dans l'induction de COX-2 via PKc [29] et iNOS. La transcription d'autres protéines associées à l'inflammation est également sous contrôle de NFκB : citons des cytokines (TNF, IL-1β, IL-6, IL-11, GM-CSF), des chemokines (IL-8, RANTES, MIP1α, MCP-3, Eotaxine), des protéases et leurs inhibiteurs (Stromélysine-1, plusieurs TIMP) et des récepteurs (IL-2R) [3].

L'activité transcriptionnelle de NFκB est régulée par d'autres facteurs, comme CREBP (CBP/P300, co-activateur). Il existe par exemple une compétition entre P65 et P53 pour la fixation de CREBP qui active leurs effets (P65 est anti-apoptotique quand P53 est pro-apoptotique). Par ailleurs, P53 réprime l'expression de P65, et *vice-versa* [30]. D'ailleurs, NFκB et CREB-2 ont une induction contemporaine [3]. La fixation à l'ADN de NFκB est souvent en compétition avec PPARα, qui réprime par exemple la transcription d'IL-6 et IL-12 favorisée par NFκB [31]. PGE2 a la propriété d'activer NFκB par une autre voie que sa translocation nucléaire, en synergie avec TNF pour la production d'IL-8 [32].

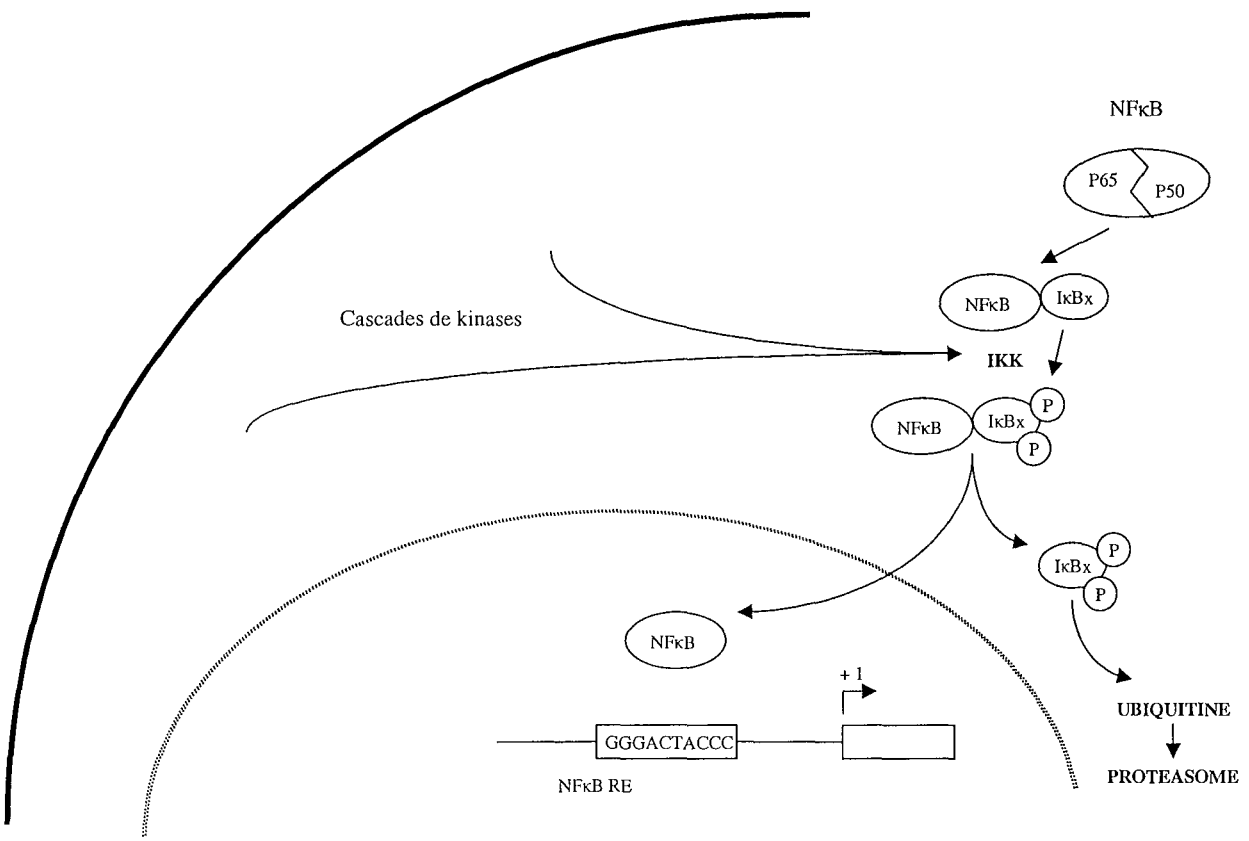


Figure 3 Voies conduisant à l'activation de NFκB

NFκB (ici l'hétérodimère P50 : P65) est maintenu dans le cytoplasme par une association avec son inhibiteur IκB. En réponse à un stimulus, celui-ci est phosphorylé par IKK, ce qui induit la dissociation du complexe. IκB est alors ubiquitiné puis protéolysé, tandis que NFκB peut pénétrer dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription

• PPAR

Présentation générale

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires de type II, c'est-à-dire qu'ils sont essentiellement nucléaires comme les récepteurs à la vitamine D, le récepteur de l'acide

rétinoïque ou des hormones thyroïdiennes. Les membres de cette superfamille forment des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide rétinoïque et se lient typiquement à une séquence d'ADN consensus. Les PPAR sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de gènes associés à des processus biologiques très variés. Ils participent tant au développement embryonnaire [33] qu'au vieillissement [34]. Ils sont cruciaux dans le métabolisme lipidique et sont impliqués dans l'obésité et la résistance à l'insuline qu'on observe dans certains cas de diabète. Nous le détaillerons ultérieurement, les PPAR jouent aussi des rôles fondamentaux dans l'inflammation.

Il existe trois isoformes de ce récepteur, présentant une distribution tissulaire souvent spécifique [35] :

- α : on trouve cette isoforme essentiellement dans le tissu adipeux brun, le foie, les reins, le muscle squelettique, le duodénum et le cœur. Ses gènes cibles interviennent dans le métabolisme des acides gras, comme leur activation en acyl-CoA et leur transport intracellulaire [36],[37]. PPARα stimule également la β-oxydation peroxysomiale et mitochondriale, en augmentant la transcription de la carnitine palmitoyl-transferase [38], l'acyl-CoA oxydase et la thiolase oxydase [39]. Il a globalement une fonction hypolipidémiante en induisant les Apo-AI et –AII et en réprimant l'Apo-CIII [40]. Il est aussi responsable d'une diminution de la production de VLDL [39].
- β ou δ : c'est la forme ubiquitaire. Elle est partout plus exprimée que les deux autres isoformes, sauf dans le tissu adipeux, où γ est prépondérante. Elle est ainsi prédominante dans le cerveau adulte, où elle est fortement exprimée chez les neurones, les oligodendrocytes et les cellules gliales, tandis que PPARα est spécifiquement exprimé chez les astrocytes [41]. Cette isoforme est impliquée dans l'implantation de l'embryon [42].
- γ : cette isoforme est abondante dans le tissu adipeux, le colon, la rétine, et le système immunitaire. Elle régule positivement des gènes cibles intervenant dans la glycéronéogénèse, la différenciation des adipocytes [43],[44], ainsi que les gènes codant pour les protéines de transport des acyl-CoA [36] ou la phosphoénol-pyruvate carboxykinase [45]. PPARγ permet l'induction de la lipoprotéine lipase, hydrolysant les VLDL [46].
  Un promoteur alternatif permet l'existence de 2 formes γ_1 et γ_2, qui se distinguent par la présence de 28 résidus supplémentaires pour γ2. On ignore le rôle de cet ajout. PPARγ_1 a une distribution tissulaire similaire à PPARα tandis que PPARγ_2 est abondante dans le tissu adipeux [47].

Organisation fonctionnelle des PPAR

La protéine est composée de 4 domaines aux fonctions distinctes [48] (Figure 4):

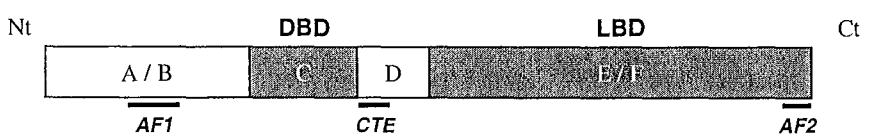


Figure 4 Présentation schématique des domaines de PPAR sur la séquence primaire

- **A/B** : c'est la région dont la séquence varie le plus entre les isoformes. Il assure une fonction transactivatrice indépendante de la liaison d'un ligand, appelée AF1 (Activating Function 1), beaucoup plus importante pour PPARα que pour les autres

isoformes. Le domaine forme une hélice α amphipatique qui est essentielle pour l'activation transcriptionnelle ; une mutation affectant la structure de cette hélice entraîne une diminution de l'activité [42].

- **C** : cette région comporte 66 acides aminés qui forment très probablement 2 motifs en doigts de zinc, d'après leur forte identité de séquence avec le domaine de fixation à l'ADN (DBD) de RXR [49]. Le DBD de PPAR est bien conservée puisqu'on trouve 80% d'identité de séquence entre les trois isoformes. Neuf résidus cystéine sont très conservés entre les différents récepteurs. Chez RXR, huit d'entre eux coordinent les deux ions zinc formant les deux domaines boucle-hélice en doigts de zinc. Les deux hélices sont assemblées perpendiculairement et forment un domaine globulaire maintenu par des chaînes hydrophobes sur le côté [50] (Figure 5).

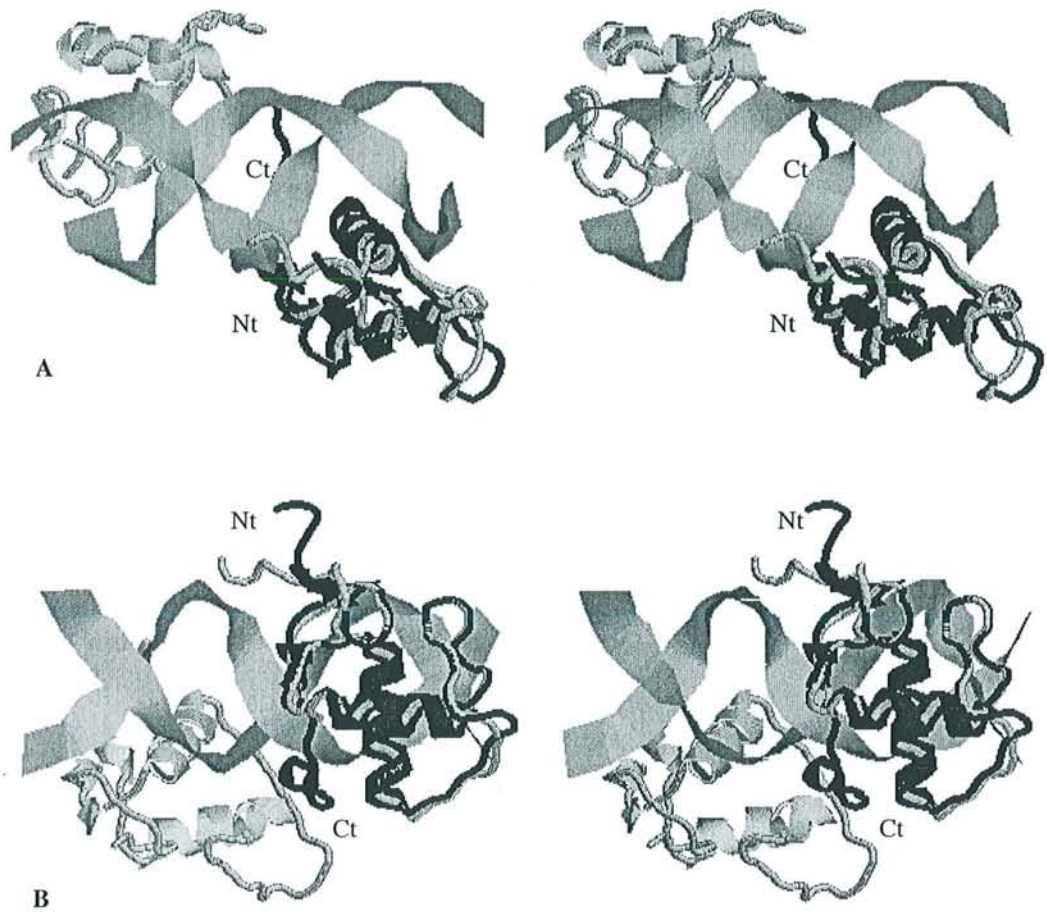


Figure 5 Modèle de la structure tridimensionnelle du DBD de PPARγ

A et **B** sont 2 vues d'orientation perpendiculaire par rapport à l'ADN représenté en ruban. En gris clair apparaît le dimère du DBD de RXR qui a servi de tuteur à la modélisation par homologie, en gris foncé, le DBD de PPARγ. RXR d'après {RXR:DNA} : PDB : 1dsz [51]; le DBD de PPARγ humain a été obtenu grâce au programme Swiss-Model

- **D** : cette région est importante pour l'activation dépendante du ligand et pour l'hétérodimérisation. Le début du domaine D constitue le CTE (Extension Carboxy Terminale).

- **E/F :** Domaine de liaison du ligand (LBD). On note 65% d'identité de séquence entre les trois isoformes pour cette région, dont la structure tridimensionnelle est très conservée. Elle comporte 13 hélices α et quatre brins β. La cavité du LBD pour PPAR est deux fois plus grande que celle d'autres récepteurs. Sa grande taille permet l'entrée de ligands sans affectation de la structure globale (Figure 6) [52]. Seulement 30 à 40 % du volume de cette cavité sont occupés par les ligands connus, ce qui permet de fixer de nombreux ligands chimiquement différents [33]. Outre la fixation de ligand, cette région est nécessaire pour l'homo- et l'hétérodimérisation ainsi que pour l'interaction avec des régulateurs protéiques.

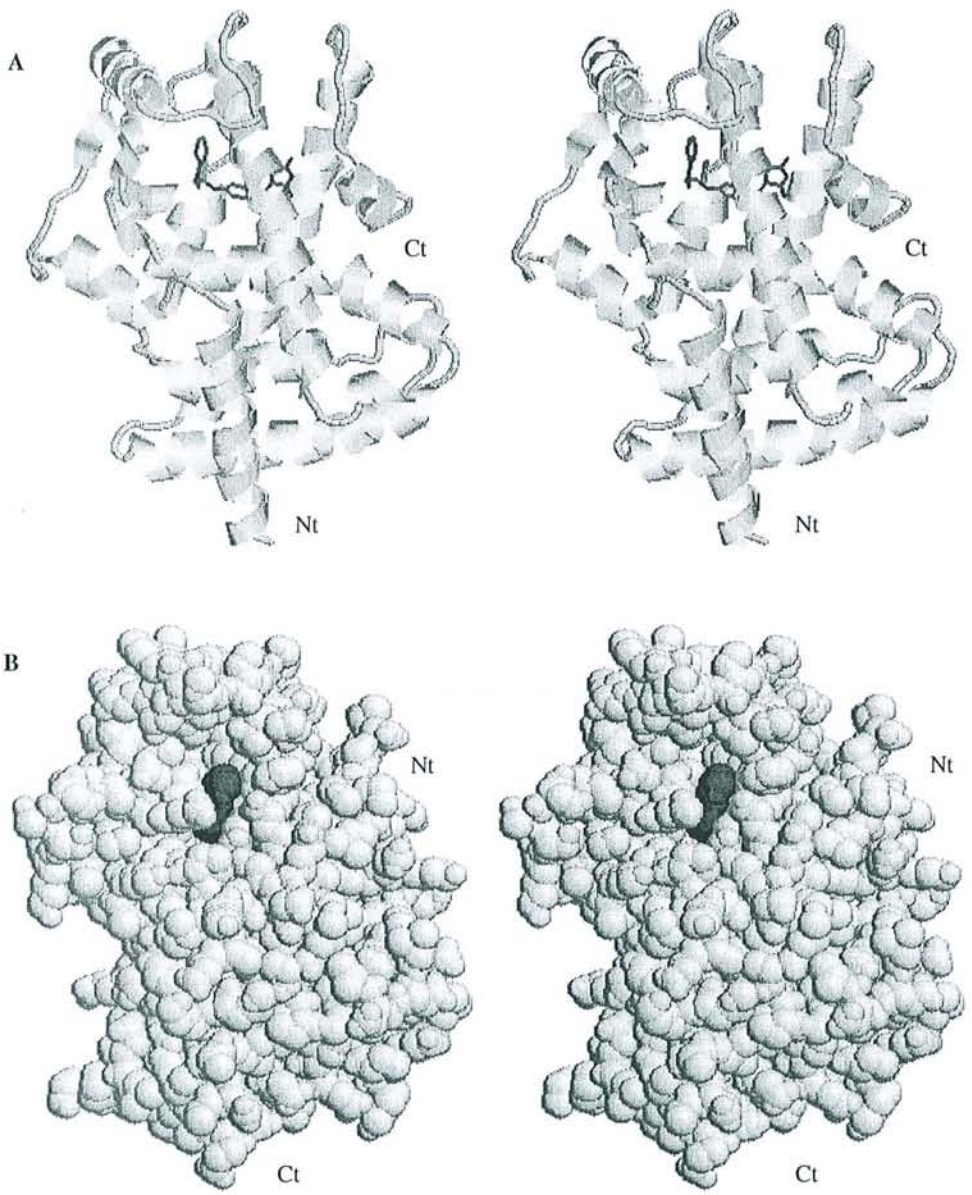


Figure 6 Structure tridimensionnelle du complexe thiazolidinedione:LBD de PPARγ

A : représentation schématique du LBD avec son ligand BRL, **B :** représentation d'après les rayons de Van der Walls. Le ligand est noir et permet d'apprécier l'entrée probable du site de fixation. (d'après PDB : 2prg [53])

◊ Liaison à l'ADN

Comme d'autres récepteurs nucléaires, les PPAR fonctionnent en hétérodimères avec le récepteur RXR et l'activation optimale de ce complexe nécessite la liaison d'un ligand à chacun des deux récepteurs, qui augmente considérablement l'affinité du récepteur pour l'ADN. En absence de RXR, il n'y a pas de liaison détectable de PPARα à un PPRE, mais le DBD tronqué de la partie Nt, peut se fixer [54]. Les deux hélices des doigts de zinc du DBD de RXR assemblées perpendiculairement forment un domaine globulaire dont les contacts avec le squelette phosphate de l'ADN entraînent des changements conformationnels augmentant l'affinité pour l'ADN et la formation du dimère. La liaison de l'ADN stabilise la structure hélicoïdale distordue, présente au niveau des résidus 181 à 187 du deuxième doigt de zinc, qui forme en partie l'interface de dimérisation. La formation de dimère en présence d'ADN est ainsi favorisée [55].

L'hétérodimère PPAR : RXR se fixe au niveau d'un élément de réponse PPRE. Il s'agit d'une séquence tripartite constituée de la répétition non symétrique de la séquence AGGTCA séparée par une seule base (DR1), souvent une adénine, et précédée d'une région riche en AT : A(A/T)CT du côté 5' [56]. Cette séquence contribue à la reconnaissance de la région CTE, prolongement du DBD. Le CTE de PPAR interagit avec l'extension en 5' du DR1, ce qui permet au DBD de se fixer sur la première moitié du DR1 et à RXR de se positionner en 3', sur la seconde moitié (Figure 7).

Les quatre nucléotides en 5' permettent une fixation préférentielle des PPAR au PPRE. En effet, d'autres facteurs de transcription sont affines pour les séquences AGGTCA, comme l'homodimère RXR:RXR [57]. Cette séquence permet même de différencier les PPAR, puisque la fixation du CTE est cruciale pour PPARα et moins importants pour PPARγ [56].

Le nombre de nucléotides séparant les 2 répétitions du site est un autre facteur important dans la sélectivité du PPRE. En effet, le tandem AGGTCA est préférentiellement fixé par des hétérodimères entre RXR le récepteur à la vitamine D, par exemple, s'il existe une séparation de trois bases (DR3). Avec les récepteurs thyroïdiens, quatre nucléotides permettent une affinité optimale (DR4) [58].

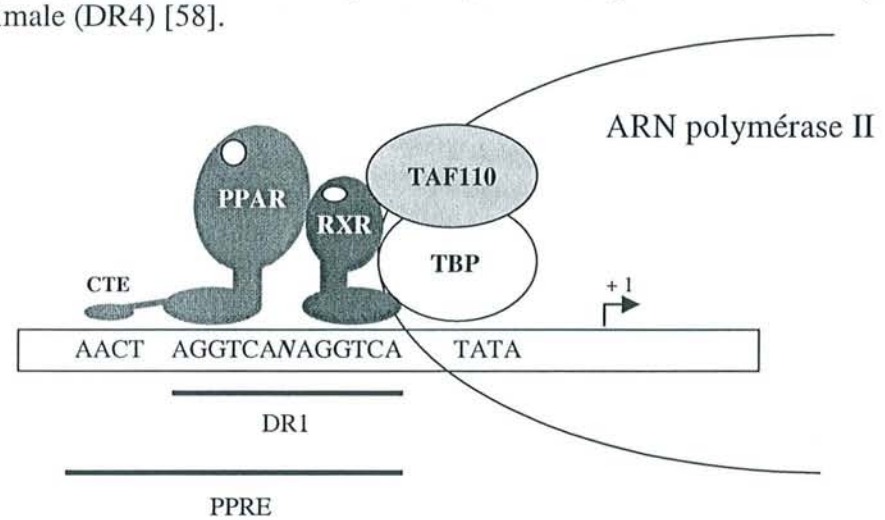


Figure 7 Représentation schématique de la transactivation par PPAR

Schéma de l'interaction de l'holo-hétérodimère PPAR:RXR avec un PPRE et le complexe basal de transcription

◊ Activation de la transcription

Il semblerait qu'en absence de ligand, les PPAR soient associés à des corepresseurs qui les maintiennent fixés au PPRE. Ces corepresseurs font souvent partie de complexes multiprotéiques, où l'on trouve l'histone déacétylase HDAc1/Rpd3 qui contribue au maintien de la chromatine dans un état fermé défavorable à la transcription. La fixation du ligand permettrait alors le basculement vers un rôle protranscriptionnel par libération du corepresseur [59]. Fixé au PPRE, les PPAR interagissent alors avec le complexe basal de transcription pour favoriser son action. RXRα interagit ainsi avec le Ct de la TAT Binding Protein et avec TAF110, composant de TFIID, permettant le recrutement de l'ARN polymerase [60].

◊ Répression de la transcription

PPARα réprime IL-6 par une interaction directe avec la sous-unité P65 de NFκB. C'est le LBD de PPAR qui se fixe aux résidus 12-317 de P65 et provoque ainsi l'inhibition de l'activation transcriptionnelle. La répression implique aussi un interaction entre le domaine A/B de PPAR et les résidus (1-79) de Jun [61].

Régulations de l'activité des PPAR

Les récepteurs nucléaires sont transactivateurs de l'expression de gènes, mais ils sont eux-mêmes régulés de différentes manières :

◊ Régulation de l'expression des PPAR

C'est le mode de régulation de PPARγ pendant la différenciation des adipocytes [62]. L'induction de PPARγ2 est assurée par C/EBPα et δ [63]. PPARγ serait régulé négativement cette fois par ses propres ligands, dans la phase tardive de la différenciation [64]. Il existe enfin un cross-talk entre les PPAR puisque PPARδ régule l'expression de PPARγ chez les adipocytes [65].

◊ Phosphorylation

PPARα est activé par la phosphorylation de S12 et S21 du domaine AF1, assurée par les MAPK en réponse à l'insuline. Cette activation pourrait résulter de la dissociation d'un corepresseur [66].

PPARγ est quant à lui inhibé par phosphorylation du Nt, en particulier sur S82 de PPARγ1 (S112 de PPARγ2) par ERK-2 et JNK. On ignore le mécanisme de cette inhibition, mais la capacité de fixation de l'ADN du dimère PPARγ1/RXRα n'est pas affectée [67],[68].

◊ Compétitions avec d'autres récepteurs nucléaires

Nous avons vu que le PPRE, en tout cas le DR1, peut être fixé par d'autres facteurs de transcription que les PPAR, et que différentes isoformes peuvent entrer en compétition. Ainsi le récepteur orphelin TAK-1 fixe le DR1 et inhibe l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de PPARα chez les hépatocytes. L'affinité de TAK-1 est même supérieure à celle de PPAR [69]. Le gène de la thiolase B porte un PPRE qui fixe l'hétérodimère PPARα/RXRα ou HNF4α. Dans le foie, HNF4α est responsable d'une augmentation du taux d'expression de l'enzyme ; par contre, PPARα le réprime [70].

Outre la fixation au PPRE, la formation de l'hétérodimère avec RXR est sujette à compétition. RAR peut ainsi supplanter RXR, ou encore la dUTPase, qui interagit avec le Nt des 3 PPAR qui sont alors incapables de fixer RXR et perdent leur rôle transactivateur [71].

◊ Activation par des ligands

On connaît de nombreux ligands des PPAR de nature endogène ou exogène. Certains ligands endogènes présentent des affinités suffisamment fortes et leur fixation a des conséquences biologiques telles, qu'on les considère comme les ligands propres aux récepteurs, qu'on ne compte donc plus parmi les récepteurs orphelins. Mais les techniques d'étude utilisées ne permettent en général de définir que des agonistes, et ne permettent guère de distinguer un antagoniste d'une molécule qui n'est pas ligand : gène reporter, fixation à l'ADN dépendant du ligand (Ligand Induced Complex [72]), ou fixation de PPAR à un coactivateur (CoActivator-dependant Receptor Ligand Assay [73]). C'est d'ailleurs plus la recherche de ligands xénobiotes qui a permis de caractériser des antagonistes, par compétition avec des ligands connus.

Les ligands naturels des PPAR sont des AG et des dérivés lipidiques. Les polyinsaturés comme le LA, l'AA et l'EPA sont agonistes de PPARα et δ mais peu de γ. Les LT et PG sont encore de meilleurs ligands que les AG : le LTB4 semblerait être le ligand naturel de PPARα (Kd = 90 nM) [74], mais le 8-S-HETE est aussi un puissant agoniste (Kd #100 nM).

Le 15dPGJ2 est un bon agoniste de PPARγ (Kd = 2 μM) [75], comme les métabolites oxydés du LA 9- et 13-HODE (Kd = 10-20 μM) [76]. La PGA1 est un agoniste sélectif de PPARδ [77]. Si les AG insaturés sont agonistes, leurs dérivés acyl-CoA sont antagonistes comme nous le verrons plus tard (§ II_C. 2. a)

Il existe un grand nombre de ligands xénobiotes des PPAR, développés ces dernières années comme hypolipidémiants. Parmi les ligands sélectifs de PPARα, on peut citer les fibrates et le Wy-14.643 (Kd = 1 μM) [78]. Les antidiabétiques tels que la thiazolidinedione ou les glitazones sont des ligands très sélectifs de PPARγ (Kd = 30-700 nM) [79], comme le BRL49653 (Kd = 40 nM). Les AINS sont ligands des PPAR avec une plus faible affinité. L'indométacine est ainsi agoniste de PPARα et PPARγ (Kd = 100 μM) [80],[81] de même que l'ibuprofène. En revanche, le flufénamate et le sulfide de sulindac sont activateurs de PPARγ [82]. PPARβ est aussi une cible des AINS : le sulindac et l'indométacine inhibent la fixation à l'ADN des hétérodimères PPARβ:RXR, et les AINS inhibent la tumorogénèse colorectale via l'inhibition de PPARβ [83].

La fixation d'un agoniste aux PPAR provoque typiquement une modification conformationnelle de la protéine qui favorise son hétérodimérisation et sa fixation à l'ADN. Mais certains ligands ne permettent pas ce réarrangement et pourraient jouer un rôle d'antagoniste ou d'agoniste partiel, comme le GW0072 (Kd = 70 nM) [84].

◊ Modulation des propriétés de transactivation par interaction avec des corégulateurs

En absence de ligand, les PPAR sont associés aux corépresseurs qui bloquent l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. Parmi ces corépresseurs, on compte SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptor), spécifique de PPARγ [85] et NcoR (Nuclear receptor CoRepressor) fixé à PPARα en partie par son domaine D [86]. Les corépresseurs sont eux-mêmes associés à différentes protéines comme Rpd3, Sin3a et l'histone déacétylase HDAC1 et forment un complexe avec plus de 7 protéines [87].

La fixation d'un ligand entraîne d'importants changements conformationnels, notamment le repositionnement de l'hélice AF2, qui induisent le recrutement de coactivateurs et la libération des corépresseurs [86]. Cependant, parmi les coactivateurs, tous ne nécessitent pas que PPAR soit sous forme holo. Il convient donc de distinguer 3 classes de coactivateurs : **(i)** ceux qui requièrent la fixation de ligand et impliquent le domaine AF2, parmi lesquels on différencie ceux qui interagissent exclusivement avec les PPAR, les PPAR Binding Proteins, et ceux qui fixent également d'autres facteurs de transcription comme AP1 et qu'on qualifie

d'intégrateurs, **(ii)** ceux qui sont indépendant de la fixation de ligand, qui impliquent souvent le domaine AF1, **(iii)** enfin les coactivateurs intermédiaires, aux propriétés particulières.

Parmi les coactivateurs spécifiques des PPAR, on trouve les protéines portant le consensus LXXLL. C'est le cas de la PPAR Binding Protein proprement dite, qui interagit avec le LBD de PPARγ [88]. TRAP220 interagit avec PPARα et PPARγ en présence de ligands [89]. Les intégrateurs présentent aussi les motifs LXXLL, comme SRC-1 (Steroid receptor Coactivator), qui interagit avec les PPAR mais aussi AP1, STAT et NFκB [53]. Cette protéine possède une activité histone acétyltransférase intrinsèque, qui permet de diminuer l'affinité des histones pour l'ADN, et favorise ainsi l'accessibilité du gène au complexe de transcription. La décompaction de la chromatine est d'autant plus favorisée que SRC-1 interagit aussi avec pCAF, autre histone acétyltransférase [87], et un autre intégrateur CBP/P300 [90] qui recrute le facteur TFIID du complexe basal de transcription [91]. CBP/P300 interagit avec le domaine D et le LBD de PPAR de façon dépendante du ligand et avec le domaine A/B indépendamment du ligand [92].

L'activité AF1 du domaine A/B est aussi responsable du recrutement d'autres coactivateurs, indépendant du ligand. C'est le cas de PGC-1 (PPARγ Coactivator), qui interagirait directement avec l'ARN polymérase [93],[94]. L'HMG-CoA synthase est elle-même un coactivateur de PPARα. L'interaction est indépendante du ligand et implique le motif LXXLL porté par l'enzyme, qui joue ainsi un rôle d'autorégulateur transcriptionnel, peut-être par sa fonction d'acétyltransférase [95].

ARA70 est un coactivateur de PPARγ fixant le domaine AF2 même en absence de ligand. C'est par contre sa capacité transactivatrice qui est sensible à la fixation d'un agoniste à PPAR [96]. RIP140 est également capable de s'associer à PPARα en absence de ligand exogène, mais son effet transcriptionnel diffère selon l'état de PPAR. Il est ainsi coactivateur en présence de ligand, mais corépresseur si PPAR est sous forme apo, par interaction physique avec PPAR [97]. PGC-2 est un coactivateur spécifique de PPARγ, fixant le domaine A/B, et donc associé à la fonction AF1. Mais cette fixation indépendante du ligand est, seule, sans effet transcriptionnel, ce qui montre que l'interaction entre PPARγ et PGC-2 est certainement plus complexe [98]. Dernier exemple de coactivateur intermédiaire, CBP/P300 présente une activité via AF1 en plus de son interaction que nous avons déjà décrite avec le LBD. PPARγ2 serait ainsi coactivé par cette protéine de façon coopérative entre AF1 et AF2 [92].

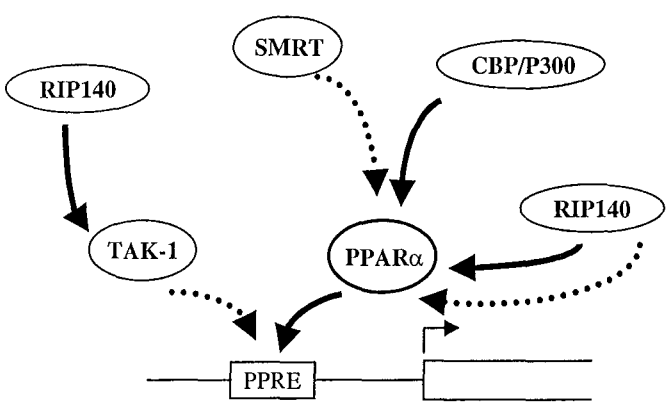


Figure 8 Différents modes de régulation de PPAR par les corégulateurs

Le coactivateur CBP/P300 et le corépresseur SMRT sont donnés comme exemple de corégulateurs interagissant directement avec PPAR. TAK-1 est un régulateur négatif par compétition avec le PPRE. RIP140 est régulateur direct de PPAR sous forme holo, mais agit aussi indirectement en activant le corépresseur TAK-1. Les flèches pleines symbolisent une activation, les pointillées une inhibition.

PPAR et inflammation

Les PPAR sont associés à plusieurs propriétés anti-inflammatoires, que nous développerons plus tard (§ II_A. 3. b) Néanmoins, on les trouve également liés à des processus plutôt pro-inflammatoires, dans certaines conditions ou avec certains types cellulaires. Ainsi des ligands de PPARγ sont responsables d'une induction de sPLA2 dans les SMC en réponse à l'IL-1, en coopération avec NFκB [99]. PPARα peut aussi avoir un rôle pro-inflammatoire, en induisant COX-2 chez les hépatocytes fœtaux [100].

- **Autres facteurs de transcription**

Plus qu'un facteur de transcription donné, c'est souvent un assemblage et une architecture de différents facteurs et récepteurs nucléaires qui sont responsables d'un effet transcriptionnel. L'action concertée de plusieurs protéines multiplie ainsi les modes d'action des facteurs, par un jeu de combinaisons liant des protéines spécifiques d'un facteur (GRIP-120, TRAP-80) et d'autres plus générales (P150, P160, RIP-140, TIF-1) [101]. ASC-2, par exemple, est coactivateur de plusieurs récepteurs nucléaires, interagissant avec CBP/P300, SRC-1, RXR et RAR [102]. En plus de l'existence de 4 isoformes, le DBD d'un même facteur peut adopter différentes conformations selon le contexte du promoteur, comme il a été montré pour NF-AT [103]. A l'instar de NFκB, il est actif après translocation du cytosol vers le noyau, sous régulation de la calcineurine. NF-AT est relié à la voie P2z/P2x7, où il est activé 1h avant NFκB et contrôle l'expression de cytokines (IL-2, IL-4, GM-CSF) [15].

Les gènes impliqués dans l'inflammation sont encore sous contrôle de facteurs généraux comme NF-IL-6 [104] ou Jun [26]. C/EBPβ régule l'expression de nombreux gènes de la phase aiguë, comme ceux de TNFα, G-CSF, IFNγ, IL-2, IL-4, IL-12, et d'autres gènes associés à l'inflammation : IL-1β, IL-6, iNOS. Il agit par fixation aux éléments IL-6RE-I (C/EBP proprement dit) ou IL-6RE-II (STAT) [105].

ESE-1, facteur de transcription de la famille Ets, est inductible au LPS, à l'IL-1 et au TNF entre 4 et 6h dans des cellules endothéliales et les macrophages, via NFκB (P50 et P65). Il agit sur les gènes de iNOS, ICAM-2 et FLT-1. Une interaction protéine / protéine avec NFκB est à l'origine d'une induction synergique de iNOS [106].

A. 2. Réponse : quelques acteurs

Après avoir suivi le cheminement du signal inflammatoire, du stimulus à son effecteur, nous allons nous intéresser maintenant aux gènes répondant à ces facteurs de transcriptions activés. Nous nous concentrerons sur les cibles principales que sont les protéines de la voie de synthèse des PG et du NO.

A. 2. a) NOS

- **NOS : aspects transcriptionnels**

NOS existe sous 3 isozymes : une forme ubiquitaire initialement clonée dans des cellules de neuroblastome (nNOS ou NOS-1), une forme inductible en réponse à des stimuli inflammatoires chez les macrophages (iNOS ou NOS-2), et une forme présente dans l'endothélium (eNOS ou NOS-3). Les 3 NOS sont issus de gènes différents, eNOS sur le chromosome 7 (7q36), iNOS sur le chromosome 17 (17q11.2-q12, 17p13.1-q25) et nNOS sur le chromosome 12 (12q24.2-q24.31). nNOS existe elle-même sous 4 homologues produites par épissage alternatif.

iNOS est inductible en réponse au LPS en synergie avec IFNγ [107]. Elle est aussi induite par des AG saturés mais pas insaturés via TLR-4 dans les macrophages (les AG insaturés seraient antagonistes et répresseurs de iNOS) [108]. Des PG ont très probablement un rôle répresseur puisque des inhibiteurs sélectifs de COX (ISC) induisent iNOS et COX-2 via PKa et une diminution de l'AMPc [109]. Chez les macrophages aussi, l'induction de iNOS par le LPS passe par la PKa, même s'il existe une voie supplémentaire puisque le taux d'AMPc est maximal vers 3-6 h post-stimulus alors que NFκB est activé dès 1 h [110].

Le promoteur de iNOS contient des sites κBu (-971 / -962) et κBd (-85 / -76) qui fixent NFκB [111] ; il fixe aussi Ap1, STAT1, et se trouve régulé par PPARγ [81]. Dans des cellules épithéliales humaines, l'induction de iNOS implique les voies IFNγ, JakK et STAT-1 par un élément bifonctionnel NFκB / STAT-1 à –5.8 kb fixant NFκB et STAT-1, alors que la voie STAT-1 est répresseur dans les fibroblastes (inhibiteur de la transactivation par NFκB) [112]. L'activation de NFκB passe par ERK1 et 2, [22] elle est induite par TNFα, TGFβ, IL1β [113]. Une interaction protéine / protéine entre ESE-1 et NFκB est à l'origine d'une induction synergique de iNOS [106]. Il existe néanmoins d'autres voies puisque l'induction de iNOS dans des macrophages au LPS passe par la voie PKa, avec une concentration en AMPc maximale entre 3 et 6 h alors que NFκB est activé dès 1 h.

Le 15dPGJ2, ligand de PPARγ, diminue la production de NO due à l'IL-1 dans les chondrocytes, tandis que des ligands de PPARα sont sans effet (Wy, LTB4) [47]. 15dPGJ2 a le même effet dans des cellules β pancréatiques [114], alors que dans la microglie et chez les astrocytes, la répression de iNOS qu'il provoque ne passe pas par PPARγ [115].

nNOS existe sous forme d'au moins 6 variants différents selon le tissu et le stade du développement [116].

• NOS : aspects post-traductionnels

Les NOS sont constituées de trois domaines :

▶Nt : domaine oxygénase, fixant l'hème, le cofacteur tetrahydrobioptérine (BH4) et la L-Arg

▶Ct : domaine réductase, fixant FMN, FAD et NADH

▶une région intermédiaire fixant la calmoduline et régulant la communication entre les deux sites catalytiques (Figure 9).

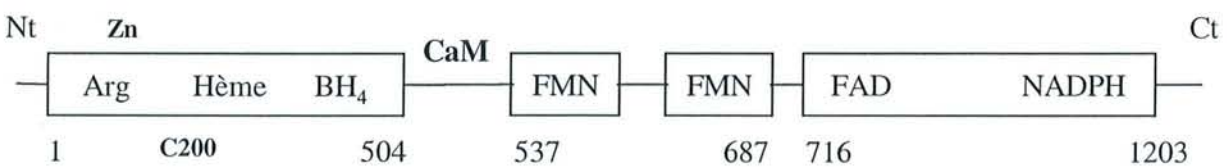


Figure 9 Schéma de l'organisation des domaines des NOS selon la séquence primaire

Le domaine oxygénase est représenté avec ses ligands, le Zn coordonné par une Cys, ainsi que la Cys 200 fixant l'hème. Le domaine réductase présente également ses ligands FMN, FAD et NADPH, et la région interagissant avec la calmoduline est signalée (CaM). La numérotation des résidus est celle de iNOS.

Les NOS sont de taille variable : PM=160 kDa pour nNOS (P29475) et environ 130 kDa pour iNOS (P35228) et eNOS (P29474), mais leurs domaines oxygénase et réductase sont identiques [117]. Elles sont actives sous forme de dimères formés par l'interaction de leur domaine oxygénase (Figure 10).

Les NOS (EC 1.14.13.39) produisent du NO et la L-Citrulline à partir d'oxygène et de L-Arg et le BH4, selon la réaction de la Figure 11. Le mécanisme réactionnel peut être divisé en 2 étapes, avec l'apparition d'un intermédiaire N-hydroxy-Arg [118],[119].

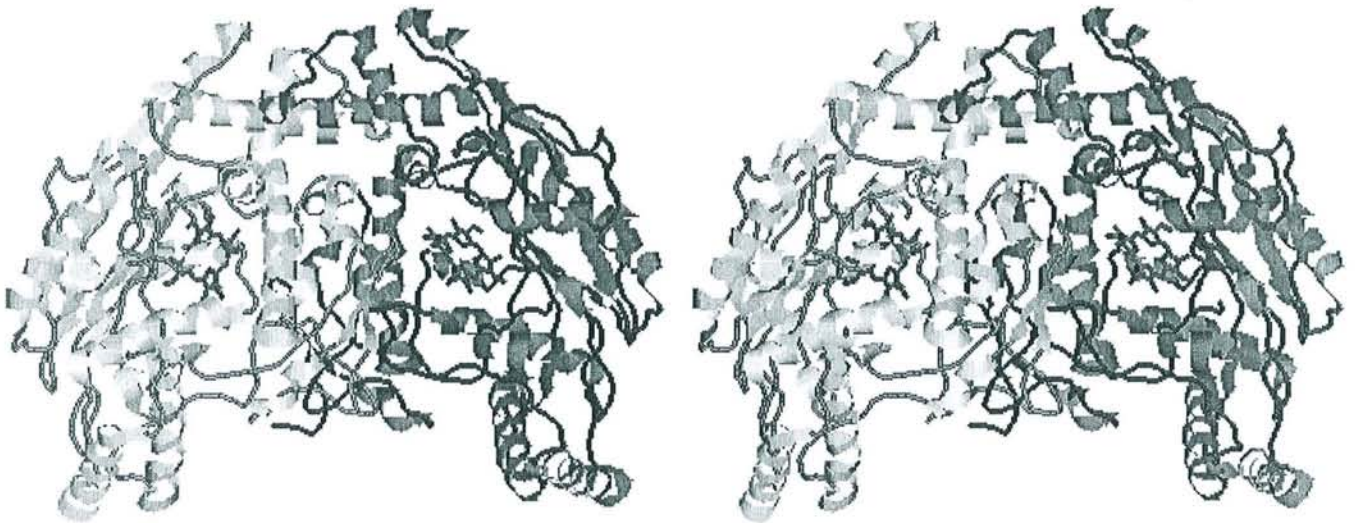


Figure 10 Dimère des domaines oxygénase de NOS

L'un des mères est gris clair, l'autre foncé. L'hème du site actif de chaque domaine est représenté (d'après PDB : 3nod [120])

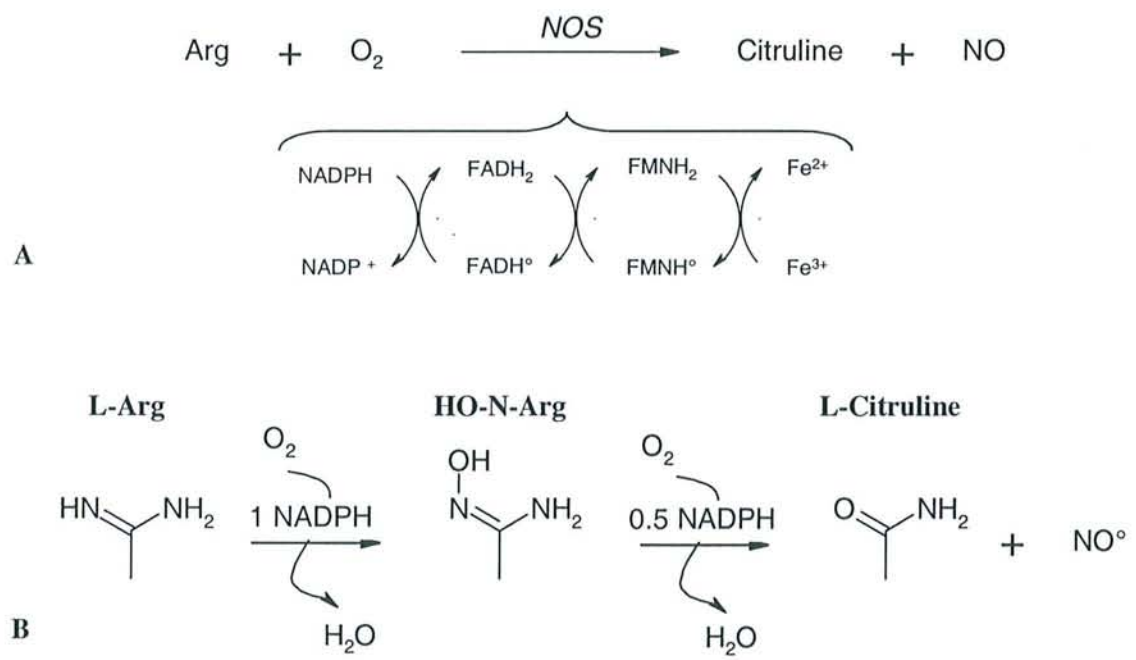


Figure 11 Schéma réactionnel des NOS

A : Mécanisme global. Le détail du flux d'électrons chez les cofacteurs est précisé sous la flèche réactionnelle. **B** : Formation de l'intermédiaire hydroxy-Arg

Ce mécanisme est assuré par l'hème et le cofacteur BH4. Deux résidus sont cruciaux dans le site actif de NOS pour le positionnement du substrat : W358 et E363 (Figure 12).

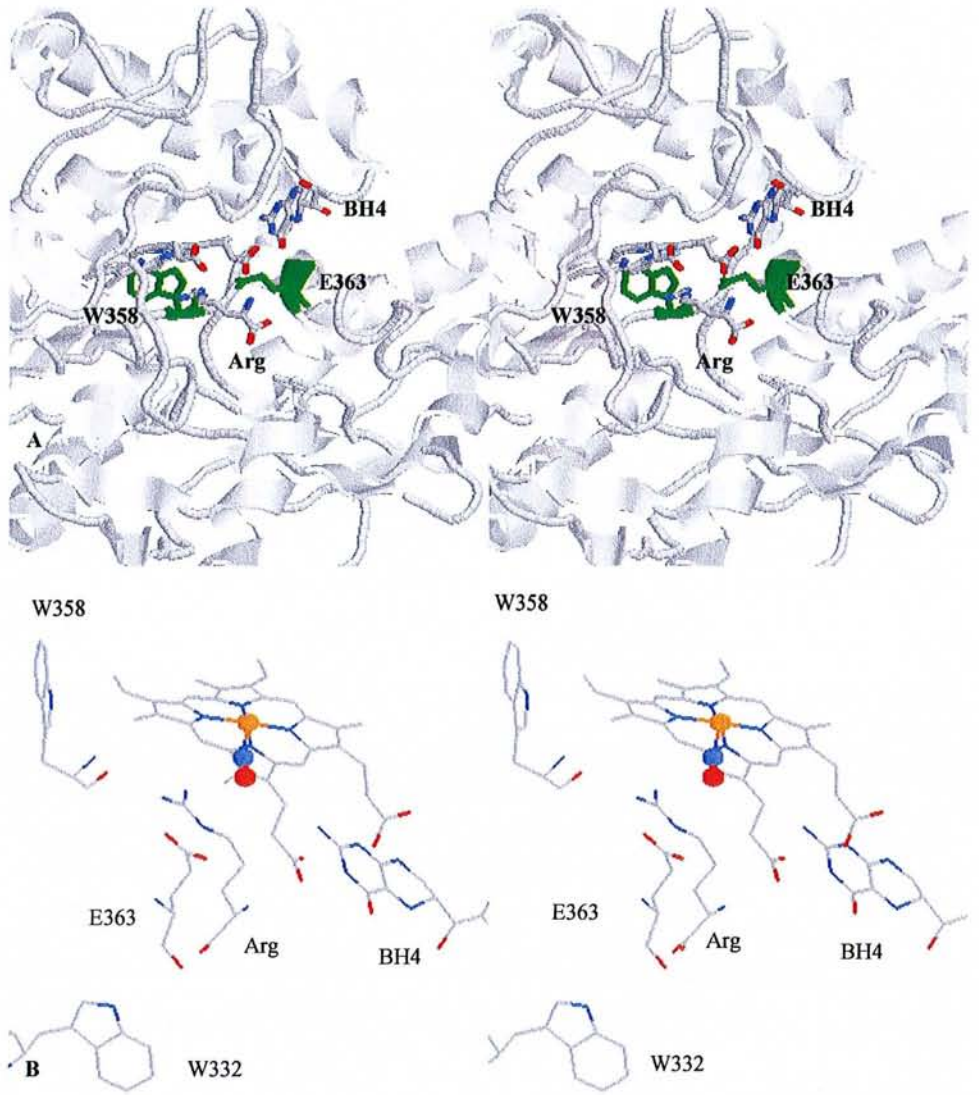


Figure 12 Détail du site actif de NOS

A : Le substrat Arg est représenté sous l'hème dans le site actif. **B** : détail de la figure précédente, figurant le Fe de l'hème ainsi que le NO est billes. (d'après PDB : 1fop [119])

Les NOS produisent aussi l'anion superoxyde ($O_2°^-$), même à saturation de substrat [121]. Il est donc difficile de savoir quel est réellement le produit de l'enzyme qu'on note communément NO, mais qui pourrait très bien être NO^- ou HNO, NO_3^- (peroxynitrite) ou HNO_3 [122],[123].

Il existe différentes voies de régulation de l'activité NOS : on rapporte une inhibition par feedback des NOS par le NO [124]. L'activité des 3 isozymes nécessite la calmoduline, mais nNOS et eNOS ont un besoin en Ca^{2+} beaucoup plus marqué que iNOS. La phosphorylation les régule aussi différemment, stimulant la production de NO par eNOS en S1179, mais inhibant nNOS en S847. Des partenaires protéiques ont également une influence sur leur activité : nNOS est ainsi inhibée par fixation de PIN en Nt, tandis que Hsp 70 serait un régulateur allostérique positif de eNOS [122] ; Hsp 90 régule quant à elle nNOS, peut-être

pour son approvisionnement en hème [125]. Enfin, eNOS est palmitoylée en C15 et C26 [126].

A. 2. b) Phospholipases

• Lyso PLA

Plusieurs phospholipases sont impliquées dans la production d'eicosanoïdes. Les PLPc et d participent à production de PGE2 dans les macrophages [127] mais contrairement aux PLA2, elles ne libèrent pas d'AG mais du DAG et de la PC pour PLPc, et du PA et de la choline pour PLPd [128] (Figure 13).

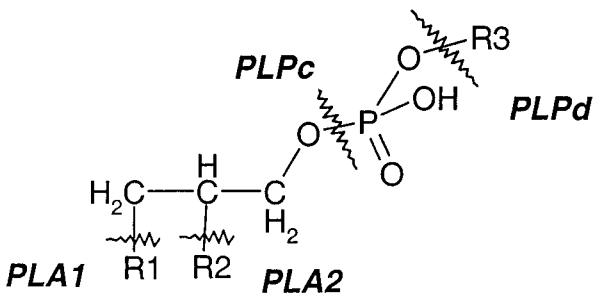


Figure 13 Activités hydrolytiques auxquelles sont sujets les PL

Autres phospholipases, les lysoPLA-I et -II sont des protéines de 25 kDa. Elles n'ont pas d'activité *PLA1* et sont spécifiques des lysoPL. Elles portent le consensus GXSXG des protéases à Ser, des lipases et des thioestérases. La lysoPLA1 a d'ailleurs une activité thioestérasique, puisqu'elle dépalmitoyle les protéines G acylées. Son activité lysoPLA est aussi bien *lysoPLA1* que *lysoPLA2* [129].

• PLA2

La superfamille des PLA2 est difficile à présenter de manière exhaustive car elle s'enrichit régulièrement de nouveaux membres. Elle comprend une douzaine de groupes, définis par le gène et les différents transcrits les produisant, leur localisation cellulaire et leurs besoins en Ca^{2+} (Tableau 1).

Aspects transcriptionnels

L'expression de divers groupes de PLA2 est souvent sensible aux stimuli inflammatoires. La plupart des cytokines induisent cPLA2 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales (IL-1β > TNFα > IFNγ > TGF). La transcription débute vers 4 h, est maximale à 8 h puis décroît [130]. Elle est activée par la voie Ras, ERK ainsi que JNK (MKK-4 et -7), JNK-3 et -2 et MEKK-1 mais pas NFκB [131]. Dans des cellules épithéliales gastriques c'est TGFβ, mais pas IL-1, qui initie la transcription selon la même cinétique [132]. L'induction est plus rapide dans les macrophages puisque la protéine apparaît dès 2 h [127], mais continue en phase tardive [133]. Elle est encore inductible dans les fibroblastes activés par du sérum [134]. Dans les ostéoblastes, elle est légèrement induite par IL-1α et PDGF [27]. Le promoteur de cPLA2 contient différents sites SP-1, NFκB, NF-IL-6, AP-1 et -2, PEA-3, C/EBP et GRE, mais la fonctionnalité de tous ces sites n'a pas été prouvée.

La transcription de iPLA2 a été assez peu étudiée. On sait néanmoins qu'elle est inductible par le sérum dans les fibroblastes [134].

Groupe		Source	Localisation cellulaire	PM (kDa)	Besoins en Ca^{2+}	Locus
I	A	Cobra	S	14	mM	
	B	Pancréas	S	14	mM	
II	A	Plaquettes, Liquide synovial	S	14	mM	1p35
	B	Vipère	S	14	mM	
	C	Testicules	S	15	mM	
	D	Pancréas	S	14	mM	
	E			14		
	F			17		
III		Abeille	S	17	mM	
IV		Rein, Plaquettes	C	85	< μM	1q25ou 1q31-q41
V		Macrophages, Cœur, Poumon	S	14	mM	
VI		Macrophages	C	85	i	22q13.1
VII		Plasma	S	45	i	
VIII		Cerveau	C	29	i	
IX		Serpent de mer	S	14	< mM	
X			S	14		
XI						
XII		Muscle, cœur		19	30 μM	

Tableau 1 Caractéristiques des différents groupes de PLA2

S : soluble, extracellulaire, **C :** cytoplasmique, **i :** indépendante ;
(d'après [135], [136], [137], [128], [138], [139], [140], [141], [142])

Parmi les sPLA2, la IB-PLA2 est up-régulée par l'AA à 1-10 μM en 24 h dans des cellules stromales utérines [143]. V-sPLA2 est induite par le LPS dans les macrophages [144], IIA-, V- et X-sPLA2 par l'IL-1 mais seulement X-sPLA2 par le sérum [145]. Dans les SMC, IIA-sPLA2 est fortement induite par l'IL-1 entre 12 et 24 h, via NFκB, cPLA2, et

PPARβ et γ mais pas par PPARα. Les PPAR coopèrent ici avec NFκB pour la fixation au promoteur. L'AA est un autre inducteur, probablement par son métabolisme des voies LOX mais pas COX [99]. En plus de l'AA, le linoléate et l'oléate sont les PUFA les plus activateurs de la libération d'AA induite par IL-1 via IIA-sPLA2 [146].

Aspects post-traductionnels

◊ Catalyse

* *Activités enzymatiques*

Les PLA2 catalysent l'hydrolyse des esters d'AG en position sn-1 et/ou sn-2 de PL et produisent un AG libre et un lysoPL (lysoPC, lysoPE ...).

$$PL + H_2O \rightarrow lysoPL + AG \quad (EC\ 3.1.1.4)$$

Bien que leur dénomination semble les restreindre à une activité, elles en ont en réalité plusieurs. cPLA2 est ainsi dotée de 5 activités catalytiques : phospholipase A2 proprement dite (*PLA2*, hydrolyse de l'ester en position sn-2, Figure 13), phospholipase A1 (*PLA1*, hydrolyse de l'ester en position sn-1), lysophospholipase (hydrolyse de l'unique ester résiduel d'un lysoPL), transacylase (transfert de l'ester à une autre molécule de PL acceptrice) et PAF (platelet activating factor) acétyle hydrolase. Les activités spécifiques *lysophospholipase* et *PLA2* sont équivalentes et très supérieures à l'activité transacylase (7 % de l'activité) [147]. En fait cPLA2 existe sous 3 paralogues assez divergents (cPLA2α n'a que 30 % d'identité de séquence avec cPLA2β), d'activités différentes : cPLA2α et cPLA2γ présentent des activités *PLA1* et *PLA2* équivalentes et cPLA2β a une activité *PLA1* supérieure à *PLA2* [148]. iPLA2 a les mêmes activités enzymatiques que cPLA2 [129].

* *Sélectivités de substrat*

Les substrats des PLA2 sont amphiphiles, et les deux parties polaire comme hydrophobe sont souvent importantes dans l'affinité de l'enzyme. Chez les sPLA2, la IIA- et la V- sont sélectives de l'AA par rapport à l'oléate mais pas la X-sPLA2 qui est en revanche sélective de l'AA et du palmitate dans les PC. La X-sPLA2 est 100 fois plus efficace que IIA-sPLA2 pour libérer les AA et oléate, ainsi que pour induire la production de PGE2 [134]. IIA-sPLA2 est asélective en sn-2 mais sélective des PL : préférant les PE et PS à la PC [149]. La plupart des sPLA2 (IB, IIAà IIF) sont plus affines pour le phosphatidylglycérol que pour la PC [132].

cPLA2 est sélective de l'AA en sn-2 mais asélective en sn-1 et en PL (PE, PC) [149]. Elle produit cependant principalement de l'AA et du PI dans les monocytes, en utilisant 15 % de l'AA estérifié au PI contre 1-3 % de l'AA d'autres lipides intracellulaires [150].

* *Mécanisme réactionnel*

On connaît la structure tridimensionnelle des sPLA2 des groupes I et II (IA-, IB, IIA, IID). Il existe des différences structurales chez ces enzymes mais le site actif est conservé, en particulier la paire H48, D99, ainsi qu'une molécule d'eau, cruciale dans le mécanisme catalytique (Figure 14) [151]. Celui-ci repose sur la déprotonation de l'H48 par D99, lui-même activé par des liaisons H avec les Tyr 52 et 73. H48 permet alors à une molécule d'eau de jouer le rôle hydrolytique.

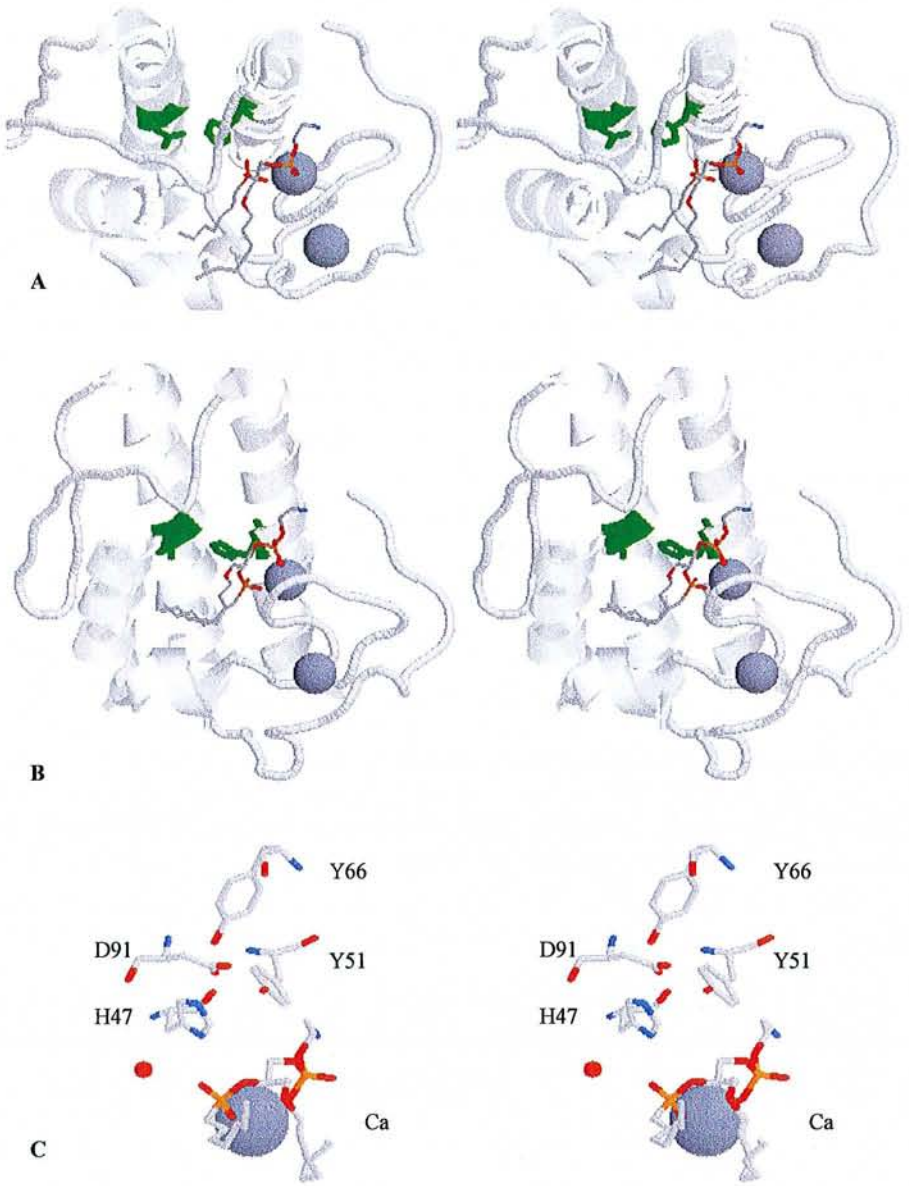


Figure 14 Structure et mécanisme catalytique des sPLA2 [151]

A : Structure du complexe de sPLA avec un inhibiteur. Les 2 Ca sont représentés en billes, les résidus catalytiques H48 et D99 en bâtonnets gris clairs. **B :** même figure que précédemment après rotation de 90 °. **C :** détail des résidus catalytiques et de l'inhibiteur. L'eau catalytique est figurée par une bille, sous H47. (d'après PDB : 1poe [152])

cPLA2 est constituée de 3 domaines, dont un domaine catalytique et le domaine d'interaction membranaire C2. La résolution de la structure cristalline de ces 2 domaines de la IV-cPLA2 a permis de proposer un mécanisme réactionnel régi par R566 et la triade conservée chez les 3 paralogues α, β et γ de cPLA2 : D549, S228 et R200 [153]. Le mécanisme est donc différent de celui des sPLA2 et implique d'autres résidus catalytiques (Figure 15). D549 jouerait le rôle de base en déprotonnant S228 qui serait le résidu nucléophile. R20 formerait un pont salin avec le phosphate du substrat. Les Ca^{2+} de cPLA2 sont indispensables à l'activité enzymatique, et irremplaçables : le Fe^{2+} est inhibiteur [149], mais ne semble pas impliqué dans le mécanisme réactionnel proprement dit.

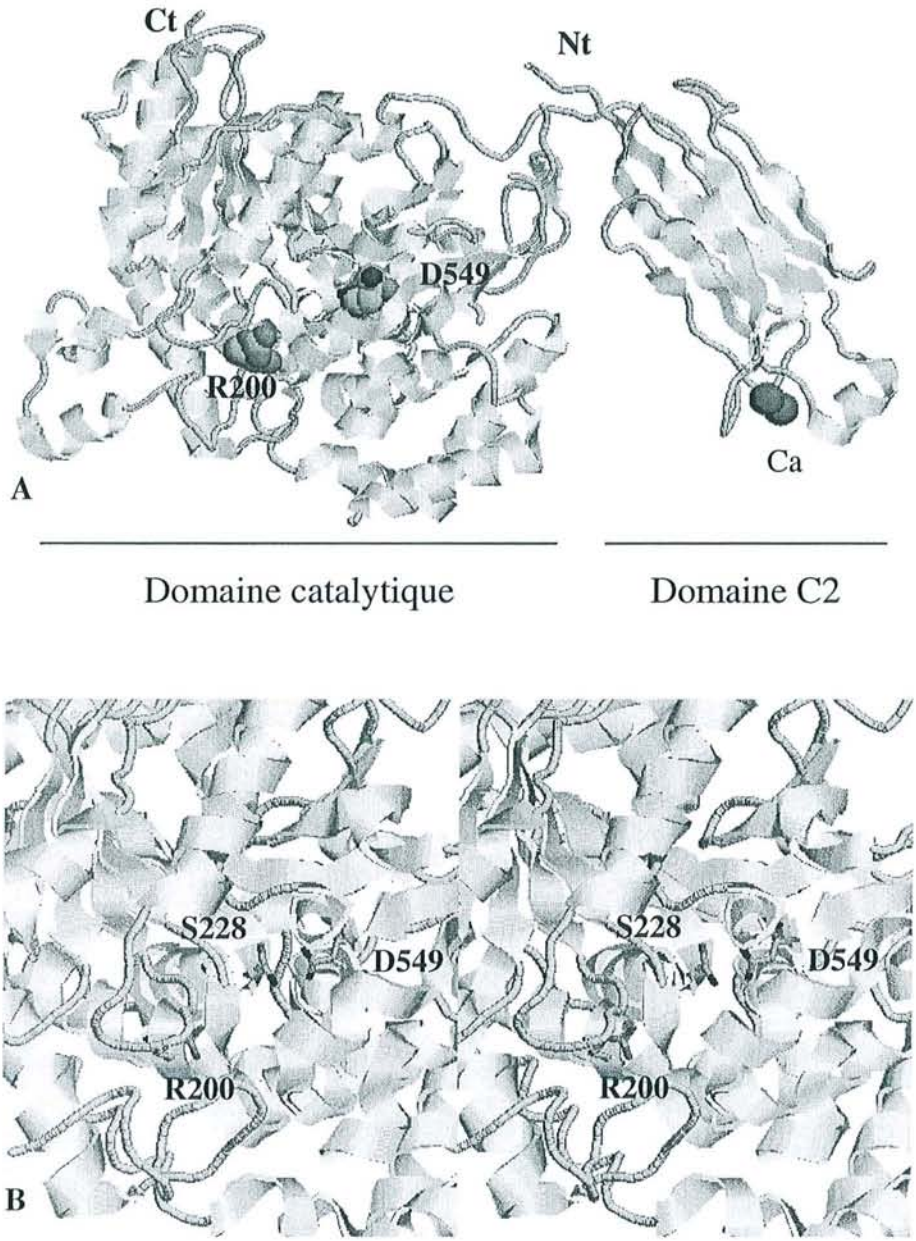


Figure 15 Mécanisme catalytique de cPLA2 [153]

A : Structure globale de cPLA2. Les résidus du site actif R200, S228 et D549 sont représentés par leurs rayons de Van der Walls. **B :** Détail du site catalytique (d'après PDB : 1cjy [153])

* *Interactions membranaires et activation interfaciale*

Certaines PLA2 sont exclusivement intracellulaires (cPLA2, iPLA2), d'autres sont extra- et intracellulaires (IIA-sPLA2). Certaines sont solubles et cytosoliques à l'état latent (sPLA2, cPLA2), d'autres sont toujours membranaires (certaines iPLA2). Qu'elles soient solubles ou membranaires, les PLA2 doivent se situer dans la membrane pour accéder à leur substrat et être enzymatiquement actives. Si elles n'y sont pas résidentes, comme les PLA2 solubles et cytoplasmiques, elles doivent donc se transloquer. Ce mécanisme est dépendant du Ca^2. Il existe de plus un phénomène d'activation interfaciale dépendant du pH : sPLA2 a ainsi une activité plus forte en présence de substrat agrégé plutôt que monomérique. Cette curiosité biochimique lui a valu d'être beaucoup étudiée et un modèle de cette activation a été proposé,

où la déprotonation et l'ionisation transitoire du Nt rendraient compte de la dépendance du pH [154].

L'activité des PLA_2 dépend beaucoup des propriétés physico-chimiques de l'interface membrane / H_2O d'où provient le substrat [155]. Deux modèles d'initiation de la catalyse ont été proposés pour les sPLA2. L'activation de l'enzyme suit une modification du substrat : la tête polaire du lipide devient désolvatée avant d'entrer dans le site actif. Des données de RMN et de fluorescence de PLA2 montrent que Trp3 est dans un environnement plus hydrophobe quand la protéine est à la surface de la membrane, et n'est pas sujet à un effet isotopique avec D_2O ; par ailleurs, Ca^{2+} est moins coordonné à l'eau dans le complexe (protéine:membrane) que dans la protéine en solution. L'association de PLA2 avec une membrane est favorisée par une surface chargée négativement plutôt que zwittérionique (association de PLA2 10^{10} fois plus forte avec DMPM que DMPC). Par dynamique moléculaire sur 120 ps de IIA-sPLA2 sur deux modes de fixation à la membrane (complexe L où la protéine ne pénètre pas dans la zone des têtes polaires et où il existe un film d'eau entre la membrane et la protéine ; complexe T où la protéine est dans PE), on a montré que la protéine n'est pas parallèle à la membrane mais présente une partie Ct positive interagissant avec PE et l'IRS du site actif hydrophobe en contact avec la partie hydrophobe des phospholipides (Figure 16). On compte ainsi 17 liaisons H dont 7 PE / protéine, 9 phosphate / protéine et 1 carbonyle / protéine, et dont 7 sont des ponts salins.

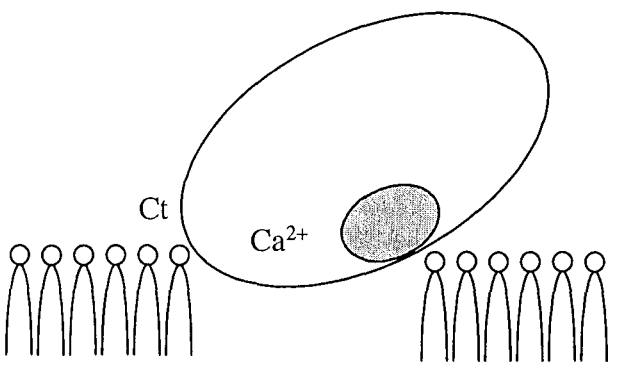


Figure 16 Schéma du mode d'insertion des sPLA2 dans la membrane [156]

La membrane phospholipidique est symbolisée par les groupes polaire et hydrophobe de ses lipides ; l'ellipse représente PLA2. Le site actif en gris et les Ca^{2+} sont indiqués.

cPLA2 est constituée de 3 domaines : **(i)** un domaine C2 Nt nécessaire et suffisant à la fixation de Ca^{2+} et la translocation membranaire, **(ii)** un domaine catalytique Ct, indépendant du Ca^{2+}, incapable de s'associer aux membranes et n'hydrolysant que des substrats monomoléculaires et **(iii)** un domaine intermédiaire homologue à la pleckstrine. Le domaine C2 est similaire au C2 d'autres protéines (synaptotagmine, PLPc, PKc). Néanmoins, à la différence de PKcα où le Ca^{2+} augmente l'association avec la membrane et diminue sa dissociation, le domaine C2 de cPLA2 ne fait que diminuer le taux de dissociation [157]. Les boucles CBR1 et CBR2 sont indispensables à l'interaction membranaire. Elles sont profondément immergées dans la partie hydrophobe de la membrane [158]. On montre expérimentalement que des résidus hydrophobes du domaine C2 sont intégralement (L39, V97) ou partiellement (F35, Y96) insérés dans la membrane (Figure 17). Les deux Ca^{2+} interagissent aussi différemment avec cette membrane et sont associés à deux fonctions distinctes : l'un, $Ca^{2+}{}_1$, est impliqué dans l'activité enzymatique alors que $Ca^{2+}{}_2$ ne l'est que dans la fixation membranaire [159]. Le site actif de cPLA2 est protégé par un « couvercle » constitué des résidus 413 et 457 qui s'ouvre dans la forme membranaire de l'enzyme [153].

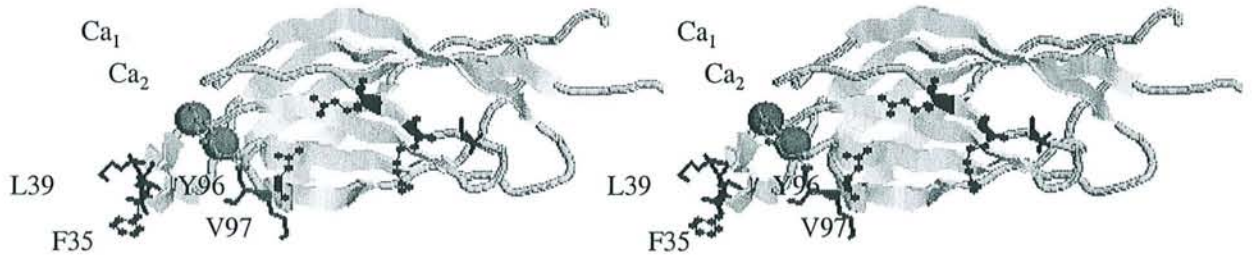


Figure 17 Détail de la région d'insertion membranaire du domaine C2 de cPLA2 [160]

(d'après PDB : 1cjy [153])

Malgré ces connaissances assez fines du processus enzymatique des PLA2, on connaît mal leur importance dynamique : on imagine ainsi 2 modes de fixation à la membrane : **(i)** fixation concertée de la membrane et du substrat, ou **(ii)** fixation en 2 étapes successives. On ignore si la protéine quitte la membrane à chaque cycle enzymatique ou si elle est active tant qu'elle est fixée (« scooting mode »). Le « scooting mode » a néanmoins pu être observé avec des sPLA2 comme avec cPLA2 : le produit de la réaction (AG) active la processivité de cPLA2. Le fait que sPLA2 se fixe 10 fois mieux aux membranes anioniques (PA, PS, PS) qu'aux neutres (PC) relève peut-être de la même propriété [131]. La III-sPLA2 n'hydrolyse quant à elle que les régions membranaires mal structurées. Elle aussi fonctionne en « scooting mode » puisqu'on peut voir des canaux d'hydrolyse dus à une unique enzyme pendant son activité [161].

◊ Régulations

* *Phosphorylations*

cPLA2 est activée par phosphorylation, durant l'activation des ostéoblastes par le PDGF. Cette phosphorylation passe par PKc [27]. Dans les MDCK, c'est la voie MAPK qui joue ce rôle [162]. Chez les macrophages, l'activation de la libération d'AA nécessite la phosphorylation de cPLA2 via MAPKK et les MAPK P42/P44. Il existe néanmoins une autre voie d'activation car la phosphorylation est insuffisante [163]. La phosphorylation comme voie de régulation de cPLA2 n'est du reste pas universelle car les 3 paralogues ne conservent pas les résidus phosphorylés [164].

* *Besoins en Ca2+*

Nous avons vu qu'un ion Ca^{2+} était nécessaire au mécanisme catalytique des PLA2, et les concentrations en sels et Me^{2+} affectent les différentes activités enzymatiques de cPLA2 [147]. Un autre Ca^{2+} est également impliqué dans leur translocation membranaire. Les PLA2 peuvent être séparées en deux groupes : **(i)** un groupe constitué des PLA2 transloquées du cytosol vers les membranes quand la concentration calcique intracellulaire augmente, **(ii)** un autre de PLA2 dites indépendantes du Ca^{2+} (iPLA2) qui sont soit membranaires soit cytosoliques. Parmi ces iPLA2, l'épissage alternatif du même transcrit primaire du gène est ainsi à l'origine d'une forme membranaire et d'une forme cytosolique [133]. cPLA2 ne reste dans la membrane que si l'augmentation de la concentration calcique dure au moins 5 min, sinon elle se retransloque vers le cytosol [165].

* *Régulateurs catalytiques*

Nous avons vu que la membrane elle-même, en fonction de sa composition, pouvait réguler l'activité des PLA2. De même, cPLA2 et IIA-sPLA sont inhibées quand elles sont fixées à la sphingomyéline (SM). Globalement la SM et le cholestérol modulent la

susceptibilité des membranes aux PLA2 [166]. Cette propriété pourrait exclure certaines régions riches en SM et cholestérol du champ d'action des PLA2, comme les rafts, structures membranaires que nous étudierons ultérieurement.

Il est difficile de prédire à quel niveau ils jouent, mais les espèces activées de l'O_2 (H_2O_2, $O_2^{\circ -}$) activent iPLA2 à fortes concentrations (0.25-0.5 mM) sans affecter les sPLA2 ni cPLA2 [167]. Il existe par ailleurs un feedback positif entre les lyso PPC, PPA, et DPC qui provoquent un influx en Ca^{2+} et maintiennent un taux calcique intracellulaire important [168].

* *Régulateurs protéiques*

L'activité des sPLA2 est activée par une protéine de 72 kDa induite très précocement durant la réponse inflammatoire : la PLA2-activating protein (PLAA). L'expression de cette protéine est augmentée avant 30 min chez les macrophages stimulés au LPS. On retrouve également une forte expression de cette protéine *in vivo* chez des patients porteurs de pathologies inflammatoires [127].

D'autres facteurs assurent un rôle inhibiteur; la protéine P11, membre de la famille des protéines fixant le Ca^{2+} S100, interagit avec le Ct de cPLA2 et provoque son inhibition de manière très efficace (IC50 = 10^{-11} M) [169]. Nous verrons plus tard que l'annexine-1 constitue un autre régulateur négatif de cPLA2 [170].

iPLA2 est indépendante du Ca^{2+} mais fixée par la calmoduline qui régule probablement son activité [171].

◊ Les PLA2 et l'inflammation

* *Quelle isozyme ?*

L'étonnante multitude d'isozymes de PLA2 exprimées chez les mammifères amène à s'interroger sur leur fonction et leurs implications. Relativement à l'inflammation, cPLA2 est essentielle à la fois dans la phase précoce et dans la phase tardive de génération des eicosanoïdes chez les macrophages [138] et les mastocytes, comme l'a montré l'absence de production de PGD2 chez des souris cPLA2 KO [172]. La V-sPLA2 également est impliquée dans les 2 phases de réponse chez les macrophages [173], et serait la plus importante en phase immédiate [144].

In vivo, l'administration de PLA2 synoviale (IIA-$sPLA_2$) conduit à une réponse inflammatoire. On trouve d'ailleurs une forte concentration en IIA-$sPLA_2$ dans le liquide synovial et le cartilage de patients atteints d'affections rhumatismales [128]. Dans le sérum également, on retrouve de fortes quantités de IIA-sPLA2 mais pas de V-sPLA2 [174]. Au niveau intracellulaire, IIA- et V-sPLA2 ne sont pas redondantes car leur localisation subcellulaire diffère : IIA-sPLA2 est dans des granules sécrétoires, tandis que V-sPLA2 est plutôt dans le Golgi, l'enveloppe nucléaire et la membrane plasmique [175]. Alors qu'elles ont des activités comparables, on voit ainsi que IIA-sPLA2 semble vouée à la sécrétion tandis que V-sPLA2 aurait plutôt un rôle intracellulaire. Néanmoins, IIA-sPLA2 a aussi été impliquée dans la libération d'AA intracellulaire : dans les cellules épithéliales gastriques, TGFα, mais pas l'IL-1, induit cPLA2 à partir de 6 h (expression maximale à 18 h), alors que TGF et IL-1 sont synergiques pour la production de PGE2 et l'activation de IIA-sPLA2 entre 12 et 18 h. En réponse au TGF, PGE2 est issue à 50 % de cPLA2 et à 50 % de IIA-sPLA2, tandis qu'en réponse à TGF + IL-1, elle est à 85 % due à IIA-sPLA2 [137]. iPLA2 pourrait quant à elle participer à la phase précoce [176].

* *Quel mode d'action ?*

L'activité *PLA2* et l'approvisionnement en substrat des enzymes de la cascade de l'AA ne sont pas le seul mode d'action des sPLA2. Elles disposent ainsi de plusieurs récepteurs extracellulaires, de type N, de type M présent dans le foie et les muscles et un autre dans le

cerveau reconnaissant les sPLA2 des groupes I et II [177],[178]. sPLA2 est internalisée par les cellules après sa fixation au récepteur de type M plutôt qu'au récepteur de type N [179]. La capacité de production d'AA par les IIA- et V-sPLA2 est indépendante de l'expression du récepteur de type M [180]. Et cependant, les $sPLA_2$ produites par les mastocytes sont capables d'activer la production de PGE_2 par des fibroblastes en co-culture, via COX-1 [181]. IIA-et V- mais pas cPLA2 ni iPLA2 ont ainsi un rôle paracrine en augmentant la production de PGE_2 des cellules voisines [176], ce qui suggère que la réponse aux sPLA2 dépend probablement du type cellulaire concerné.

La XII-sPLA2 aurait également une autre fonction que son activité PLA2 car son activité spécifique est faible et très inférieure à toutes les autres PLA2. Elle présente de plus de nombreux variants [142].

iPLA2 pourrait participer à la transduction du signal puisqu'elle active la cascade MAPK (phosphorylation de MEK-1/-2, MAPK P42/P44, ATF-2) [182], mais sa fonction première est plutôt associée au remodelage des PL [183],[184].

L'autre produit de la réaction enzymatique des PLA2 a aussi son importance puisque le lysoPC, par exemple, induit COX-2 dans les cellules endothéliales [185].

Il existe des relations entre l'activité et l'expression de certaines PLA2. Ainsi l'activation de cPLA2 up-régule l'expression de V-sPLA2 [144]. Ces voies sont complexes et nous les développerons dans le paragraphe traitant des couplages fonctionnels (voir paragraphe II_A. 2. f)

A. 2. c) COX

- **COX : aspects transcriptionnels**

COX existe sous 2 isozymes issues de 2 gènes différents : le locus de COX-1 est situé sur le chromosome 9 (9q32-q33.3), celui de COX-2 sur le chromosome 1 (1q25.2-q25.3). Il existe 2 transcrits de COX-2, de 4.6 et de 2.8 kb dérivant d'un polyA alternatif [186]. Dans la plupart des tissus et cellules, COX-1 est exprimée de manière constitutive et constante, tandis que COX-2 n'est pas ou très peu exprimée à l'état basal, mais induite très rapidement en réponse à divers stimuli. On note cependant quelques exceptions, avec COX-1 légèrement induite par des AG insaturés (AA, LA, EPA) et des PG (PGE2, PGD2, PGF2α) dans des kératinocytes [187] et des ostéoblastes [23], et réprimée dans le foie de rats alcooliques [188]. On note ainsi une traduction accrue de COX-1 dans des monocytes au LPS, où la protéine apparaît 30 min après le stimulus, ce qui laisserait penser davantage à une activation post-transcriptionnelle [189].

Rarement exprimée à l'état basal, COX-2 est cependant constitutive dans différentes parties du rein [190], dans le système nerveux central et en particulier le cerveau [191], dans des cellules endothéliales [192],[193],[194]. Dans ces tissus, elle est exprimée en plus de COX-1 et conserve son inductibilité, comme dans la muqueuse gastrique [195]. Au contraire, elle est réprimée par les stimuli habituellement inducteurs, comme IL-1, le PMA ou le sérum dans l'épithélium thyroïdal, sous contrôle d'IL-1α. En fait, COX-2 semblerait constitutive dans les tissus endocrines : cerveau, rein, épithélium des bronches, îlots pancréatiques, cellules stellaires du foie, épithélium thyroïdien [196]. Il est notable que l'expression de COX-2 dans un type cellulaire donné dépend de surcroît des conditions d'étude : ainsi les kératinocytes en culture expriment COX-2, ce qui ne semble pas être le cas dans la peau [197].

Quand l'expression de COX-2 n'est pas basale, le messager est produit très rapidement en réponse au stimulus (en général avant 1 h dans des cellules en culture ou des

modèles inflammatoires *in vivo*). Ce messager est cependant très labile par la présence de nombreux motifs d'instabilité AUUUA (ARE) en 3'UTR. Certaines cytokines augmentent d'ailleurs la quantité de COX-2 par une stabilisation du messager en favorisant la fixation de protéines à ces motifs d'instabilités [186],[198]. L'analyse fine de ce 3'UTR a montré combien il est complexe et important dans l'expression de COX-2 : l'ARE situé en (1-60) est responsable d'une forte instabilité du transcrit (demi-vie = 4 h avec, demi-vie = 10 h sans l'ARE), mais le 3'UTR contient aussi une séquence stabilisante en (373-792) et (1558-2232), et présente encore un message d'inhibition de la traduction. Néanmoins, toutes ces séquences ne suffisent pas à conférer l'up-régulation due à l'IL-1, ce qui suggère la participation supplémentaire du 5'UTR [199].

Le signaling conduisant à l'induction de COX-2 est lui aussi très complexe : les stimuli, les voies de transduction et les facteurs de transcription impliqués sont très divers et souvent spécifiques du type cellulaire et du stimulus: le LPS et les cytokines pro-inflammatoires sont de bons stimuli pour les macrophages et les cellules endothéliales, des facteurs de croissance, le serum, le PMA dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, l'IL-1β et la sérotonine dans les cellules mésengliales, des hormones lutéinisantes et follicule stimulantes dans des cellules granuleuses ovariennes. Le site NFκB en (-402/-392) est nécessaire dans de nombreuses cellules, sauf dans des macrophages, des ostéoblastes et fibroblastes. Les sites CRE et la boîte E (-59/-48) sont indispensables dans l'expression basale et inductible dans la majorité des cellules mais pas les fibroblastes où C/EBPb n'agit que sur le site C/EBP(-138/-130) et pas sur le site NFκB ni sur la boîte CRE / E ni sur le second site C/EBP (-93/-85) [200]. Il existe des redondances apparentes dans le signaling de l'induction de COX-2 chez les macrophages activés au LPS, puisqu'elle implique les MAPK P38, JNK, ERK, et PKcξ des voies MAPK et PKc via les éléments NFκB, NF-IL-6 et CRE fonctionnellement impliqués [201]. Le Tableau 2 résume ainsi les différentes voies impliquées dans l'induction de COX-2 dans différents tissus ou types cellulaires.

type cellulaire	inducteur	voie de transduction	facteurs de transcription	RE	cinétique	taux d'induction	Ref
Monocyte	LPS				24h pour le mRNA mais pas d'activité		[202]
	AA	IP3K, PKc, MEK-1, MAPK P42/P49 et P38, JNK	Jun, Elk-1				[203]
	LPS 100 ng/mL				protéine : 3-12h, surtout à 12 h		[204]
Macrophage	IL-1, TNF					que stabilisation	[205]
	AG sat	TLR-4	NFkB pas PPAR				[108]
	LPS						[144]
	IIA- et V-sPLA2						[206]
	LPS, PGE2	EP2 mais pas EP-1 ni EP-3, AMPc			7 à 24 h		[207]
	LPS		Jun, CREB, USF-1	CRE, boite E			[208]
	LPS + Endothéline-1	ET-B4					[209]
	LPS	JNK, MEKK-1 mais pas Ras, ni Raf-1, MAPKK ni ERK	Jun	CRE, NF-IL-6, pas boite E			[210]
	LPS, PP						[211]
	LPS, IL-1+ NO		NFkB, AP-1			super-induction	[212]
Cellules endothéliale	lysoPC	MAPK P38, ERK-1/-2	CREB, ATF-1				[185]
	NaF					que stabilisation	[213]
SMC	Benzopyrène	MAPK, ERK-1/-2	NFkB				[214]
	UTP	MAPK P42/P44 pas P38	P90	ARE	< 1 h	stabilisation	[215]
Cellules épithéliale	AG, PP, PGD2, PGF2, PGA2, AINS		PPARa, b, g	PPRE			[216]
	LPS, IL-1+ NO		NFkB, AP-1			super-induction	[212]
	transfection	Ras					[136]
	transfection	Wnt-3					[217]
	transfection	Wnt-1	PEA-3	NF-IL-6, C/EBP a et d			[218]
	IL-1		NFkB	-447/-438 -224/ -214	1-3 h		[219]
	IL-1	JNK P54 et P46		-447/-438 -224/ -214			[26]
	IL-1, TNF, LPS	MAPK P38				stabilisation	[220]
Epithélium de cornée	Hypoxie, AINS		PPAR a et b ?				[221]

type cellulaire	inducteur	voie de transduction	facteurs de transcription	RE	cinétique	taux d'induction	Ref
Cellules T			NFkB, Jun	-117 / -58			[222]
		Cot K (homologue MAPKKK	NF-AT	-105 / -97 -76 / -61			[223]
Kératinocyte	IFNg	MAPK P38, ERK			mRNA: 8-16 h, protéine: 16-24 h, PGE2: 48 h		[224]
	EPA, AA, LA PGE2, PGD2, PGF2a	AMPc, EP-1				0,5-6 h	[187]
Fibroblaste	*transfection*		P35 à P90	ARE		stabilisation	[198]
	transfection			CRE (-80:-40), pas boite E (Rac), ni CRE ni boite E (Rho)			[225]
ostéoblaste	TNF		NF-IL-6 (C/EBPb), AP-2	-186 / -131 -512/-385			[211]
	transfection	MEKK, JNK	Jun, C/EBP pas CREB	boite E, NFkB, NF-IL-6 (2sites), CRE			[226]
	stress mécanique		C/EBPb, CREB, AP-1		1-6 h		[227]
	agents activant les microtubules	Rho, Raf-1, ERK-1/-2, MAPK P38, JNK	AP-1, ATF-2	CRE (-59/-53) mais pas (NFkB (-223/-241) ni NF-IL-6 (-132/-124)			[228]
	PGE2	Pka, MAPK P38		ARE distaux et proximaux	2-48 h		[229]
Cellules granuleuses			USF-1, -2 mais pas ATF, ni C/EBP ni AP-2				[230]
Astrocytes	LPS		NFkB				[231]
Cellules mésengliales	ISC	PKa (diminution d'AMPc)					[232] [109]
Mastocyte		Ras, MEKK-1, JNK mais pas Raf-1, ERK	C/EBP, Jun	CRE			[233]
PMN	LPS, TNF				protéine en 3h		[204]

type cellulaire	inducteur	voie de transduction	facteurs de transcription	RE	cinétique	taux d'induction	Ref
C. de Kupfer	alcool						[188]
Hépatocyte	LPS, PP						[100]
fœtal	LPS, IL-1						[234]
C. de carcinome mammaire	IL-1, TGFβ	ERK, SAPK			stabilisation		[186]
C. du stroma utérin	AA						[143]
C. amniotique	Phosphatidate Phospho hydrolase active						[235]
ilôts pancréatiques	IL-1						[236]
MDCK (rein)	TCDD		AhR	XRE (-157 et -1071)			[237]
promoteur	TGFβ			NF-IL-6 ? (-454 / -288)			[238]
transfections		MEK-1 (voie ERK), MKK-3/-6 (voie MAPK P38) et MKK-7 (voie JNK)					[239]
oedeme de patte					< 1h	3-4 fois	[240]
inflammation aiguë					3 h		[241]

Tableau 2 Les voies du signaling régulant l'expression de COX-2

Les différents éléments de réponses potentiels ou actifs décrits, ainsi que leur position, sont schématisés Figure 18.

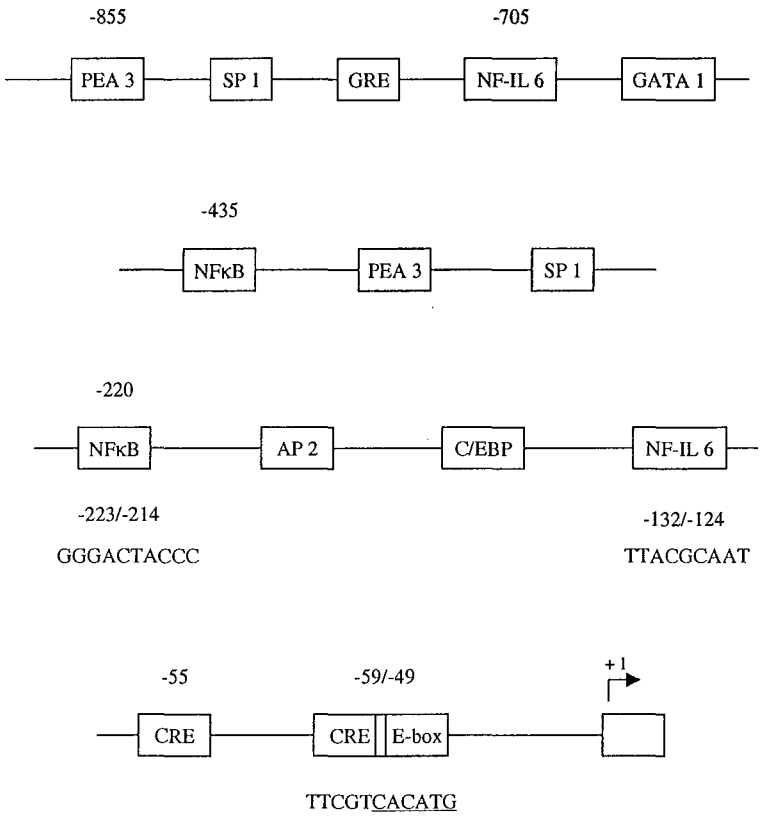


Figure 18 Schéma des sites potentiels et fonctionnels du promoteur de COX-2

Les rectangles représentent les éléments de réponses putatifs. Sont également précisées leur position par rapport au codon initiateur, ainsi que la séquence des éléments principaux.

• COX : aspects post-traductionnels

Généralités

La prostaglandine H2 synthase, PGHS2 (EC 1.14.99.1), communément nommée "Cyclo-oxygénase" ou COX, est une enzyme bifonctionnelle catalysant la formation de PGG2 à partir d'AA (activité cyclooxygénase), puis de PGH2 par son activité péroxydasique. Nous avons vu précédemment qu'il existe deux isozymes, COX-1 et COX-2.

Les 2 enzymes partagent 60% d'identité de séquence chez l'Homme, et sont très conservées chez les mammifères. Le corail exprime une COX ayant 50 % d'identité de séquence aussi bien avec COX-1 que COX-2, ce qui suggère que ces deux enzymes aient un ancêtre commun moins ancien que celui des COX de mammifères et du corail [242].

Les acides aminés essentiels sont conservés, les sites actifs comparables et les paramètres enzymatiques très proches. Les 2 COX sont constituées de 3 domaines : EGF-like, domaine d'interaction avec la membrane (MBD) et domaine catalytique (Figure 19).

	COX-1 (PGH2S)	COX-2 (PGH2S)
	P23219	P35354
Nombre de résidus	599	604
PM (kDa)	68	68
Domaine EGF-like	31-78	18-65
MBD	78-116	65-104
Domaine catalytique	116-596	104-599

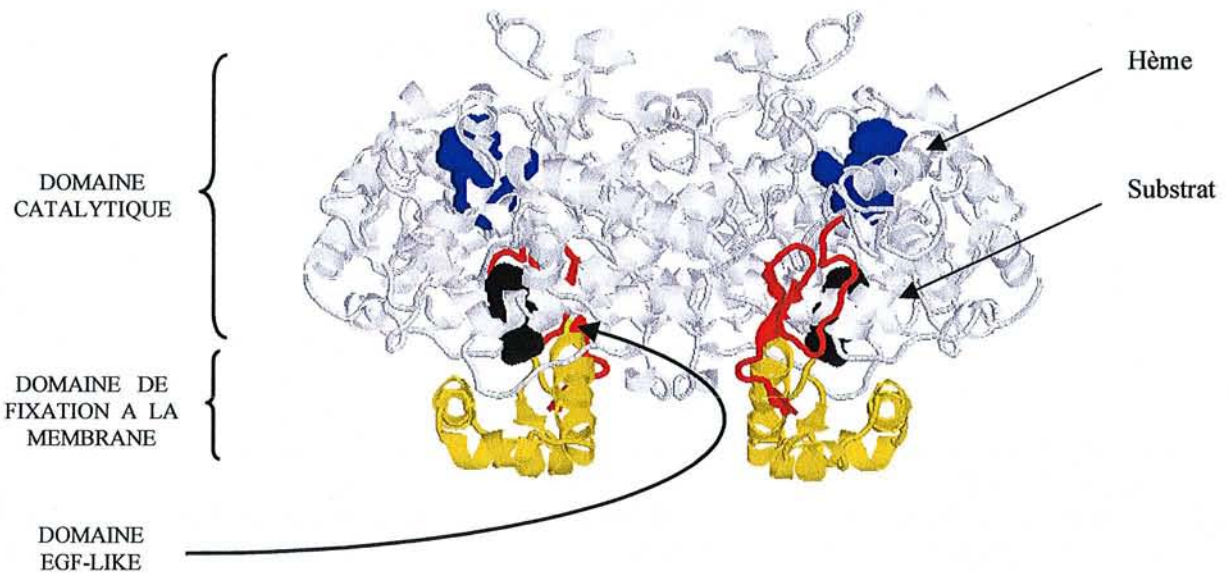


Figure 19 Structure et caractéristiques des domaines de COX
(d'après PDB : 1pge [243])

Ce sont des protéines membranaires dont le mode d'insertion dans les membranes est particulier [244]. Le MBD est en effet constitué de 4 hélices α amphiphiles formant un pied s'enchâssant probablement à plat sur la membrane, permettant ainsi un accès direct du substrat membranaire dans le site actif (Figure 20). Le photolabelling des régions (74-140) de COX-1 et (59-108) de COX-2 par une sonde hydrophobe (TID) a permis de prouver qu'il s'agissait du MBD. Ce domaine est cependant indispensable à l'activité enzymatique puisque des mutants de COX-1 de l'hélice A (AINTWLRTT) et C (RWLNDFVNA) perdent l'activité, et la mutation de l'hélice B (PSFIHFL) ne conserve que 20 % des activités cyclooxygénase et peroxydase [245]. Ceci s'explique à la fois par la proximité du site actif (littéralement chapeauté par le MBD), et par la possibilité d'un site de fixation transitoire des ligands de COX dans le MBD. En effet, les AINS (sulindac et ibuprofène) sont à l'origine d'une compétition avec le TID pour le marquage du MBD. Le mode d'interaction avec les membranes est le même pour les 2 isozymes, et elles montrent la même localisation subcellulaire : RE et enveloppe nucléaire (membranes interne et externe) [246]. Les Ct des 2 COX portent la signature KDEL de rétention dans le RE qui est le seul épitope accessible du cytoplasme. Néanmoins, COX-1 est plus sensible que COX-2 à des mutations de ce Ct [247].

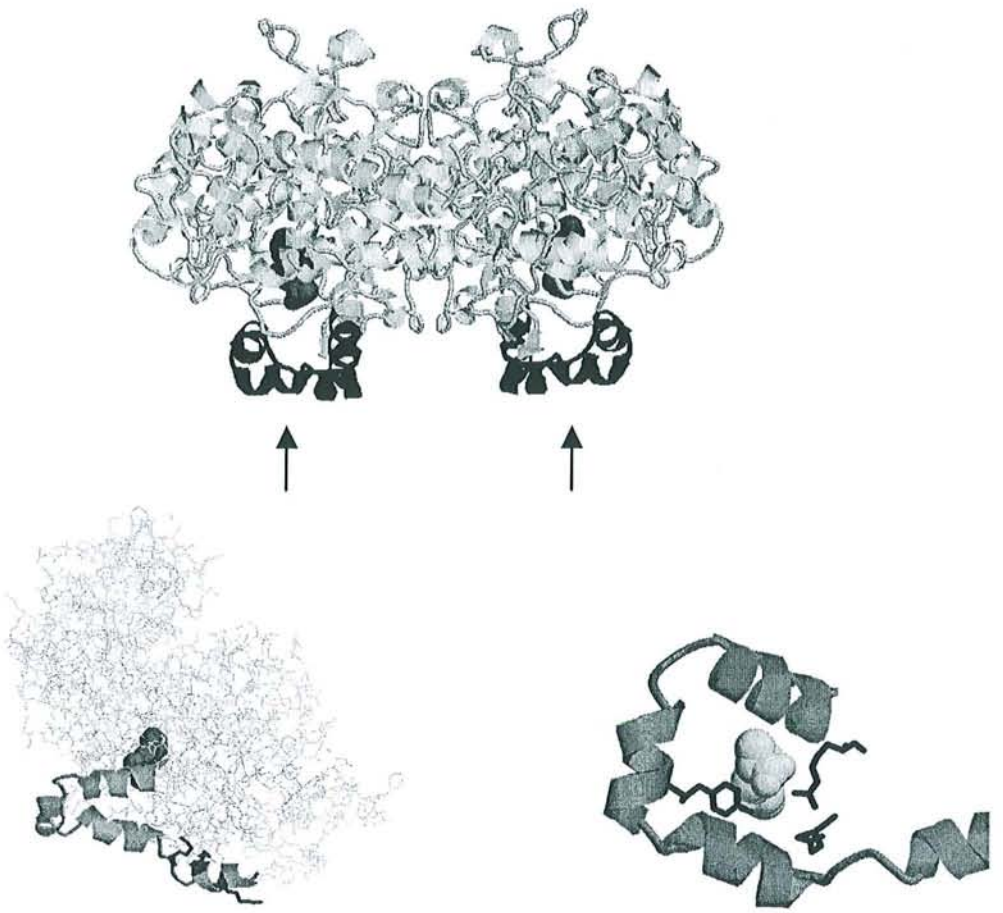


Figure 20 Détail de la structure membranaire du MBD de COX
(les flèches indiquent l'entrée probable du site actif. Les hélices membranaires la constituant sont détaillées en bas, ainsi que les 3 résidus cruciaux R120, Y355 et E524. d'après PDB : 1pge [243])

Les 2 isozymes sont polyglycosylées : la COX-1 de vésicules séminales contient 4 sites de glycosylation potentiels et porte des $Man_9GlcNAc_2$. N68, N144 et N410 sont glycosylés mais pas N104. COX-2 porte quant à elle 5 sites consensus, et 4 glycoformes ont été caractérisées, avec des $Man_{5-10}GlcNAc_2$ et GlcNAc sur N53, N130, N396, N580 mais rien sur N592 [248]. La glycosylation de COX-2 a de légères conséquences sur son activité, puisque la mutation N580Q active l'enzyme 1,4 fois, tandis que le mutant S582A est 2 fois plus actif et moins sensible au diclofénac que la forme sauvage [249].

Les deux enzymes ont été cristallisées sous forme apo, en complexe avec des inhibiteurs et avec le substrat AA. Les structures tridimensionnelles révèlent que le fold des deux protéines est identique, et que la fixation de l'hème, comme du substrat ou des inhibiteurs, implique les mêmes résidus (Figure 21, Figure 22).

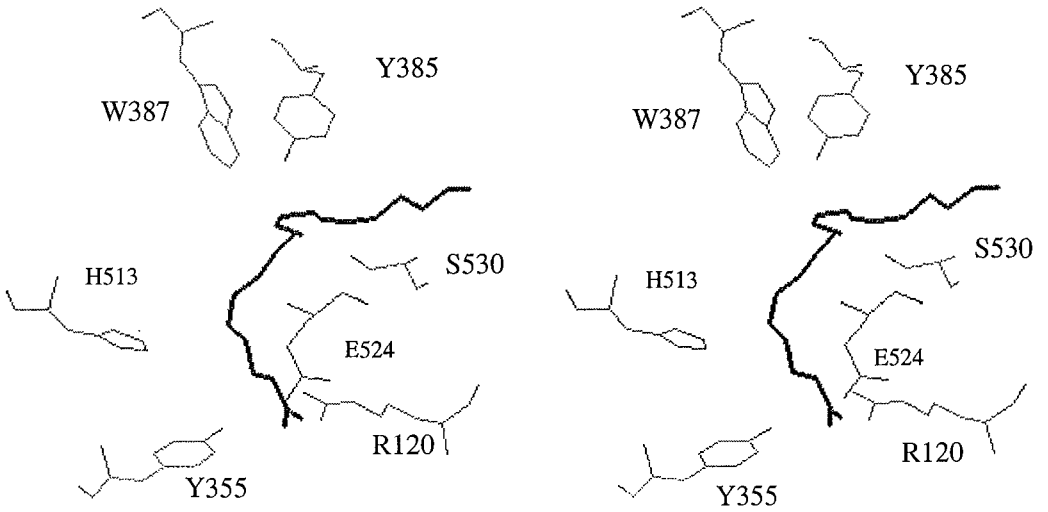


Figure 21 Mode de fixation de l'AA par COX-1

(d'après PDB: 1diy [250, 251])

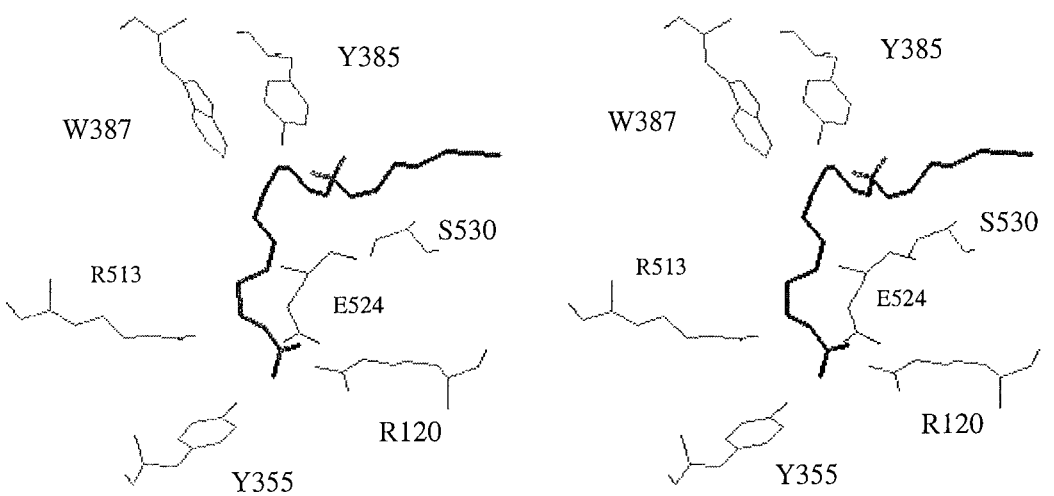


Figure 22 Modèle de la fixation de l'AA par COX-2

La numérotation des résidus est décalée pour correspondre à celle de COX-1.
(d'après PDB: 1dcx, [252],[253])

La fixation de ligands aux COX, que ce soit l'hème [254], l'AA ou des AINS [255], provoque une modification conformationnelle allostérique de COX. La fixation diminue la flexibilité des hélices du MBD et restreint les distances interatomiques des résidus le composant. La forme holo est ainsi en conformation compacte par rapport à la conformation étendue de la forme apo en solution (la conformation holo cristalline étant plus proche de la forme apo en solution) [256]. Les 2 COX fixent l'AA de la même manière, le carboxyle se situant à l'entrée du site actif tandis que l'extrémité ω est enfouie dans le cœur de la protéine, en direction de l'hème. Il forme très certainement un pont salin avec R120 puisque le mutant R120E de COX-1 est inactif [257]. La même mutation chez COX-2 ne supprime pas l'activité mais augmente le Km d'un facteur 30 [258].

Il existe quelques différences en acides aminés dans le site actif des 2 enzymes qui permettent à COX-2 de disposer d'un volume de 393 $Å^3$ au lieu de 316 $Å^3$ pour COX-1, essentiellement par la mutation V523 (COX-2) → I (COX-1) [259].

Les enzymes ont à peu près les mêmes paramètres enzymatiques, même si l'activité *COX* de COX-2 est un peu plus efficace [260] :

	COX-1 (bélier)	**COX-2 (mouton)**
Km AA (μM)	8,3	2,1
Vm (μmol O2 / mg COX)	13	12,2
Vm / Km	1,56	5,8

Bien que la structure cristalline et les expériences de photolabelling suggèrent que le substrat provienne de la membrane plasmique, d'autres formes d'approvisionnement ne doivent pas être écartées. En effet, il existe des transporteurs intracellulaires très affines pour l'AA. C'est le cas, par exemple des protéines S100 A8/A9, qui fixent sélectivement les 2 substrats de COX, l'AA et le LA. Leur fixation dépend de la concentration en Ca^{2+} (Kd = 0,2 μM avec une EC_{50} = 0,2 μM pour le Ca^{2+}). Ces protéines ne représentent pas moins de 40 à 50 % des protéines cytosoliques des neutrophiles où les FABP ne sont pas exprimées. Elles sont transloquées vers la membrane plasmique quand le taux de Ca^{2+} augmente, apparaissent à la surface cellulaire et sont sécrétées. Elles stimulent l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et sont retrouvées en quantité importante dans le sérum de patients atteints de pathologies inflammatoires chroniques [261]. Il existe 4 isoformes de S100A8 et 2 de S100A9. La forme fonctionnelle de cette protéine serait un trimère de 34 kDa $\{S100A8\}_2A9$ [262]. Chez les cellules endothéliales, l'« uptake » d'AA est actif, médié à 85 % par CD36 qui interagit avec les protéines S100A8/A9 [263].

COX comme enzyme polymorphique

◊ Enzyme à plusieurs activités catalytiques

L'activité enzymatique des COX procède de 2 mécanismes catalytiques successifs : une activité cyclooxygénase (*COX*) oxydant l'AA en PGG2, suivie d'une activité peroxydase (*PER*) réduisant PGG2 en l'alcool correspondant PGH2 (Figure 23).

La première étape de ce mécanisme est l'abstraction du proton pro-S du C13, par un radical Tyr. Le cycle catalytique serait ainsi initié par un hydropéroxyde qui oxyde l'hème (Fe III → Fe IV) coordonné par H388 neutre proximale [264] et H207 distale [265] et qui oxyde ensuite Y385 en radical. Celui-ci oxyde alors le proton 13 pro S de l'AA et initie ainsi le cycle *COX*. Un mécanisme catalytique entièrement radicalaire a été proposé pour l'activité *COX* (Figure 24).

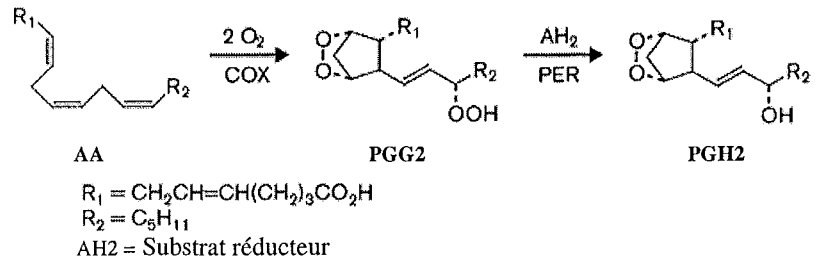


Figure 23 Schéma catalytique des activités *COX* et *PER* de la cyclooxygénase

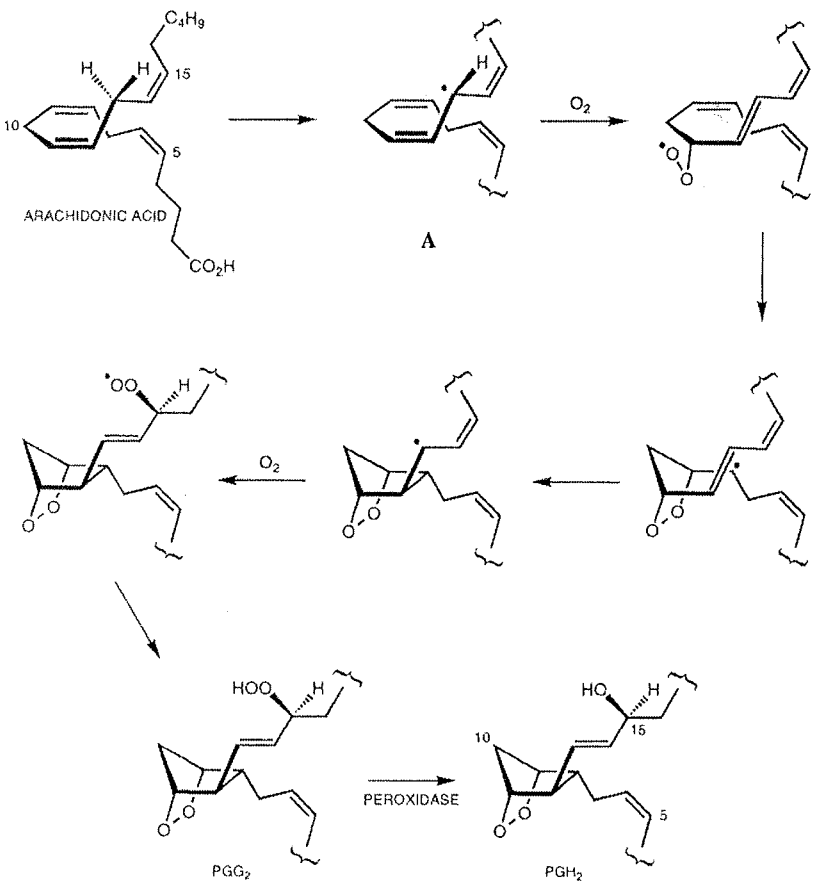


Figure 24 Hypothèse du mécanisme entièrement radicalaire de l'activité *COX [266]*

Mais ce mécanisme n'est pas le seul envisagé : un intermédiaire carbocation pourrait y participer, pour s'intercaller entre l'AA et le composé radicalaire A (Figure 25).

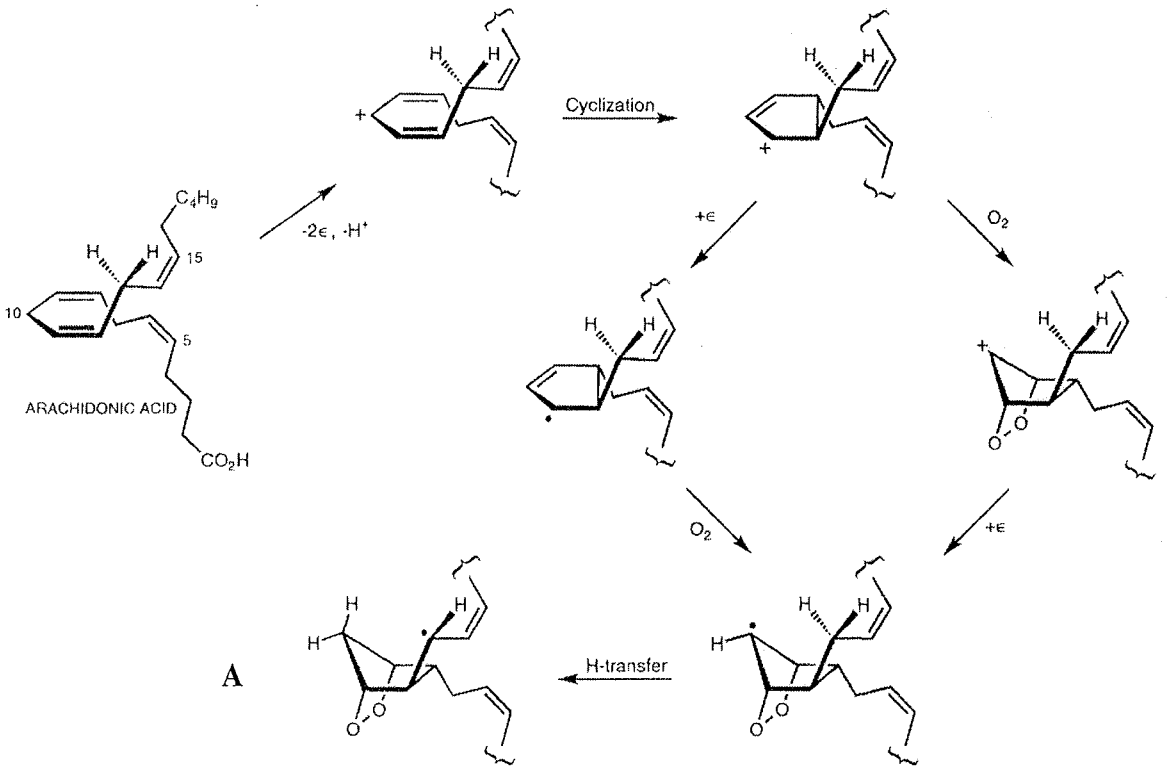


Figure 25 Mécanisme à intermédiaire carbocation de l'activité COX [266]

Les sites *PER* et *COX* sont distincts car **(i)** des ligands du site *COX* ne sont pas inhibiteurs compétitifs de *PER* et *vice versa* ; **(ii)** PGG2 peut se dissocier du site *COX* [267]. Mais l'environnement membranaire est aussi un acteur important du processus catalytique puisque COX-1 purifiée peut accepter un PGG2 exogène comme substrat contrairement à COX microsomiale, tandis que les COX microsomiales solubilisées ont un comportement intermédiaire. La perte de membrane semble ainsi permettre l'accès à un site inaccessible dans l'enzyme native [268]. On peut donc envisager plusieurs chemins d'accès au site *PER* pour le substrat PGG2 (Figure 26). L'hypothèse A est supportée par la présence de molécules d'eau piégées dans une cavité de l'interface entre les 2 mers de la structure cristalline du complexe COX-2:AA, qui pourrait constituer un canal de transfert entre le site *COX* d'un mer et le site *PER* de l'autre [252]. L'hypothèse B est étayée par l'importance de la présence de la membrane dans l'accès d'un PGG2 exogène [268]. Elle suppose le passage du site *COX* vers le site *PER* via le relargage de l'intermédiaire dans la membrane. L'hypothèse C ne diffère de la précédente que par l'accès au site *PER* : il se ferait ainsi par l'extérieur de la protéine et conformément à l'accès au site actif d'autres peroxydases. L'hypothèse D n'est pas incompatible avec l'importance de la membrane citée ci-avant, mais ne correspond pas au modèle mécanistique de la chaîne branchée que nous développerons ci-dessous. Ces hypothèses soulignent la difficulté qui existe à comparer les résultats de la littérature alors que de nombreuses observations sont rapportées dans des modèles cellulaires ou microsomiaux, quand d'autres sont issus de l'utilisation d'enzymes purifiées.

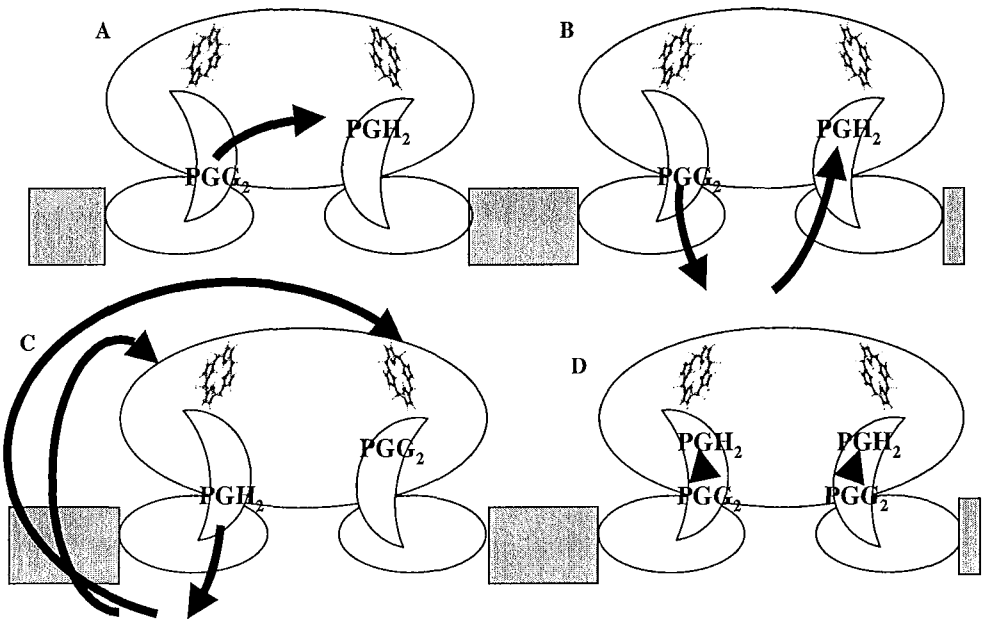


Figure 26 Différentes hypothèses supportant l'approvisionnement de l'activité *PER* de COX

La membrane est symbolisée par les rectangles gris, les MBD par les ellipses, les sites actifs par les demi-lunes. La position de l'hème indique l'extrémité du site actif

Si on sait que les sites *COX* et *PER* sont distincts, on cerne mal en revanche les résidus et les cavités qui les définissent fonctionnellement. Les cocristaux COX-1:AA et COX-2:PGG2 montrent en effet le même positionnement du substrat de *COX* ou de *PER*, et ne permettent donc pas de caractériser les sites (Figure 27, Figure 28).

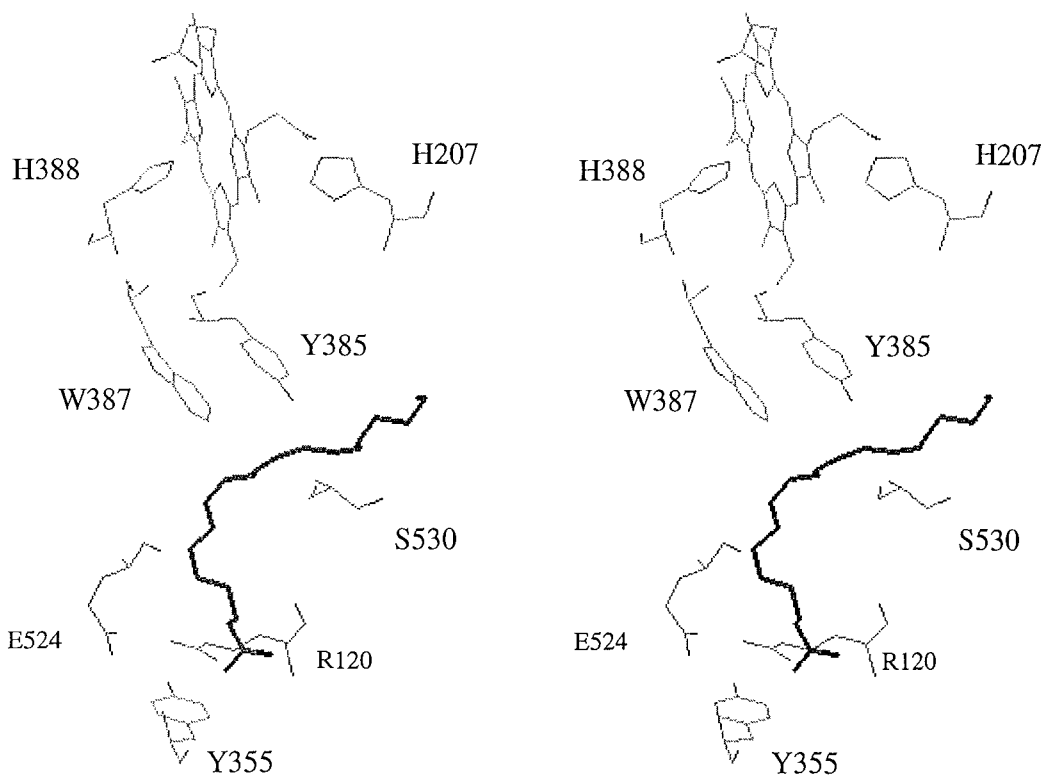


Figure 27 Complexe AA : COX-1 en présence d'hème coordonné au Co^{3+}

(d'après PDB: 1diy [251])

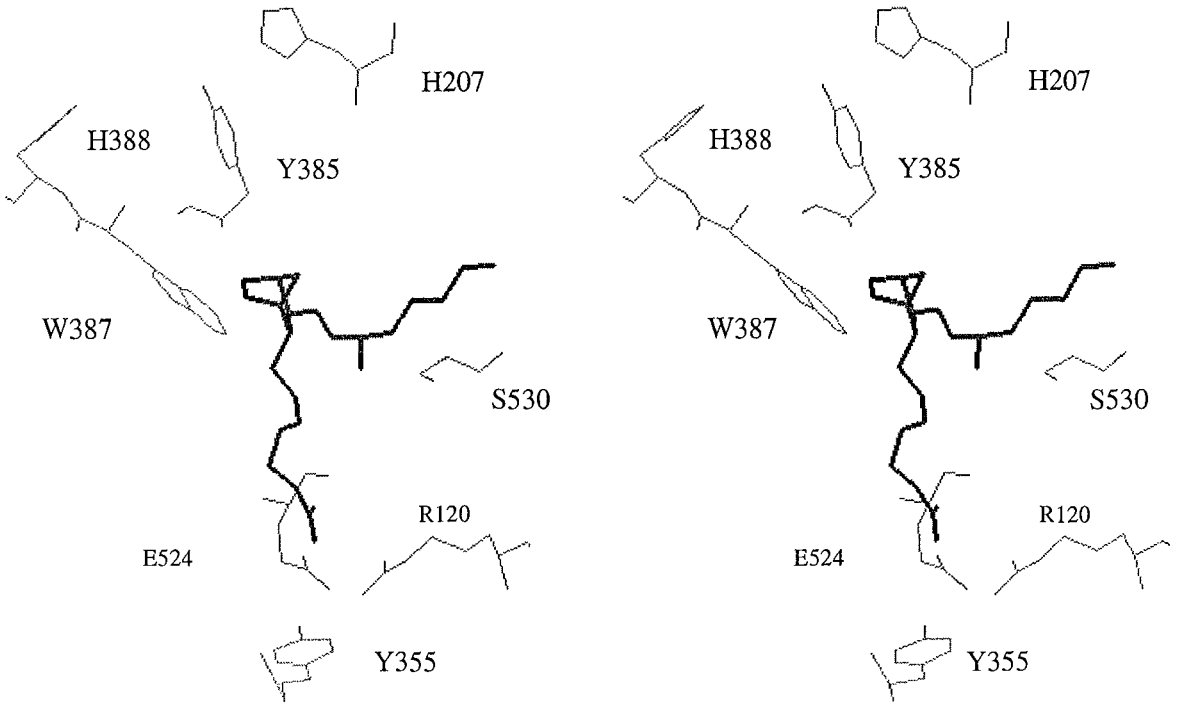


Figure 28 Complexe PGG2 : COX-2 sans hème

(d'après PDB : 1ddx [252])

La PGG2 résultant de l'activité *COX* peut alors être réduite selon 2 mécanismes : **(i)** modèle de la chaîne branchée, où les réactions *COX* et *PER* sont indépendantes, **(ii)** modèle couplé où l'activité *COX* est directement suivie de l'activité *PER*, partie prenante du cycle. L'accumulation transitoire de PGG2 et d'intermédiaires enzymatiques ainsi que la stœchiométrie entre la consommation d'O_2 et la production d'AA oxydé arguent clairement en faveur du premier modèle [269], maintenant bien établi [270],[271],[272]. La PGG2 résultant de l'activité *COX* est ainsi réduite en produisant l'intermédiaire I qui régénère le cycle *COX* en formant l'intermédiaire II (Figure 29).

◊ Enzyme à plusieurs substrats

L'AA sélectivement hydrolysé par les PLA2 est le substrat préférentiel des COX, mais elles acceptent d'autres AG ou dérivés lipidiques comme substrats. 7 fois moins bons que l'AA, l'EPA et le LA sont ainsi substrats de l'activité *COX* de COX-1, avec un mode de fixation dans le site actif tout à fait similaire [273]. Le dihomo-γ-linolénate est lui aussi fixé dans la même conformation L que l'AA dans le site actif de COX-1, et n'est que 2 fois moins efficace pour l'activité *COX* de COX-1, et 5 fois moins pour COX-2 [274].

Les acyl-glycérol de l'AA, 1- et 2-AG, sont également substrats de *COX* de COX-2, formant des PG-Glycérol, avec une efficacité respective de 20 et 50 % par rapport à celle de l'AA. Ils sont en revanche mauvais substrats de COX-1 (5 % de l'AA) [275]. R513, R120 et E524 sont les principaux résidus discriminants par rapport à l'AA [276] ; ce qui paraît logique d'après la structure chimique de ces composés.

L'acyl-ethanolamide de l'AA (AEA) est un autre substrat de COX-2 mais pas de COX-1. L'efficacité de *COX* à son égard est de 80 % celle de l'AA [277],[253],[278].

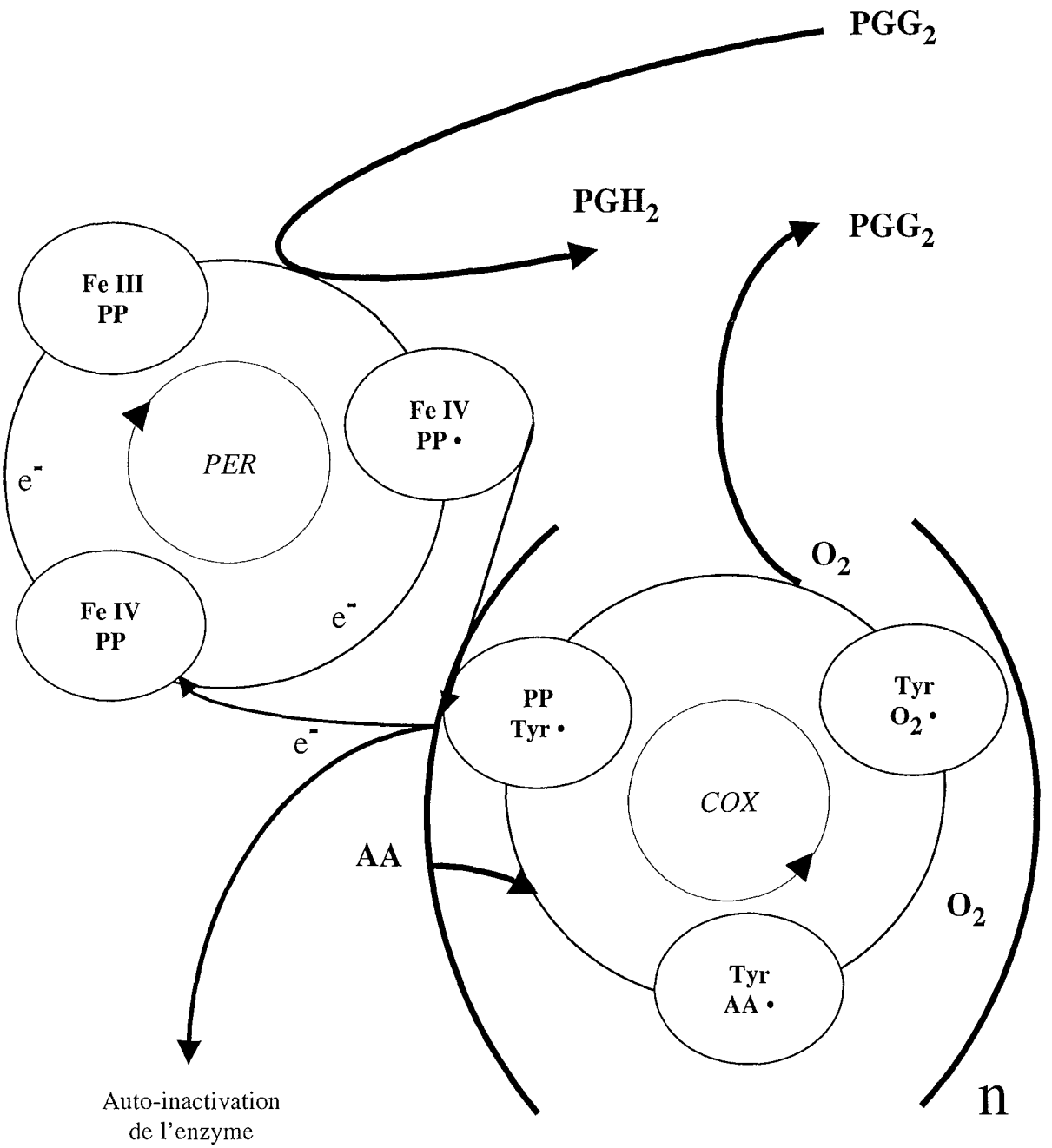


Figure 29 Schémas des cycles catalytiques *COX* et *PER* selon le modèle de la chaîne branchée

Les disques symbolisent les cycles catalytiques *COX* et *PER*. Les ellipses représentent les intermédiaires réactionnels, pour lesquels sont précisés l'état électronique du Fe, l'état radicalaire de l'hème (protoporphyrine, PP) et des réactifs. (d'après [269],[272],[270],[271]).

◊ Enzyme à plusieurs produits

Le fait d'accepter différents substrats permet aux COX d'être à l'origine de plusieurs produits. Nous avons vu précédemment que les COX produisaient des PG-glycérol, PG-éthanolamide, et prostaglandines dérivés du LA et de l'EPA (Figure 30).

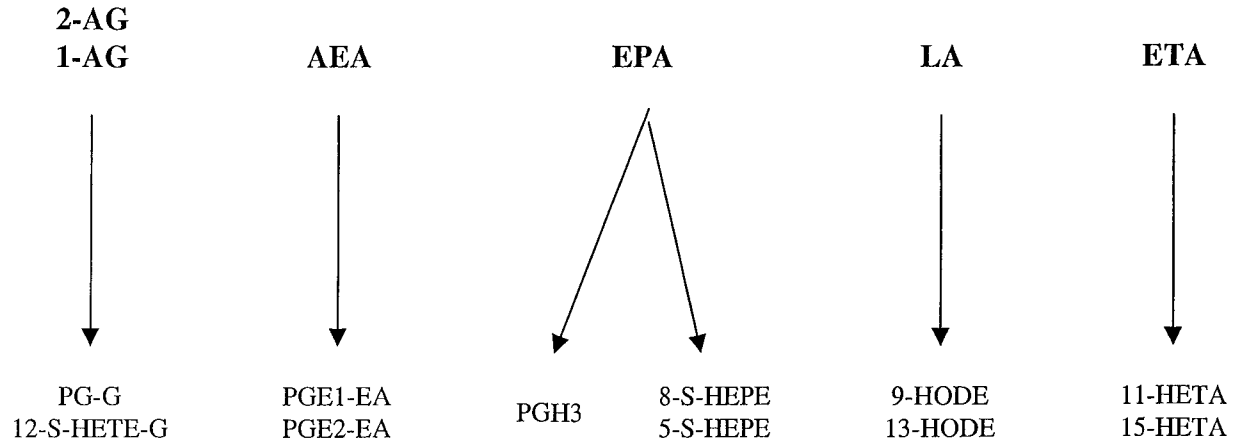


Figure 30 Profil métabolique des COX en fonction de la nature du substrat

PG-G : Prostaglandine-Glycérol, **PG-EA :** Prostaglandine-Ethanolamide, **HEPE :** hydroxy-eicosapentaénoate, **HODE:** hydroxy-octadecadiénoate, **ETA :** eicosatriénoate, **HETA :** hydroxy-eicosatriénoate

Mais la flexibilité et le volume du site actif permettent de surcroît différentes conformations catalytiquement viables pour un même substrat, à l'origine là-aussi de plusieurs produits : ainsi, à partir de l'AA, COX-2 produit certes essentiellement PGG2 puis PGH2, mais aussi 11-R-HETE et 15-R-HETE. COX-1 produit 15-S-HETE et dans une moindre mesure (30 % du 15-HETE) 15-R-HETE et 11-R-HETE (Figure 31). Le ratio R/S-15-HETE est indépendant de la concentration en AA contrairement au ratio HETE / PG :

	Dérivés de PGG2	11 HETE	15 HETE
Km AA (μM)	5,5	12	19

En concentration physiologique d'AA (< 2μM), la PGG2 produit par COX-1 représente donc plus de 95 % des produits oxygénés [279].

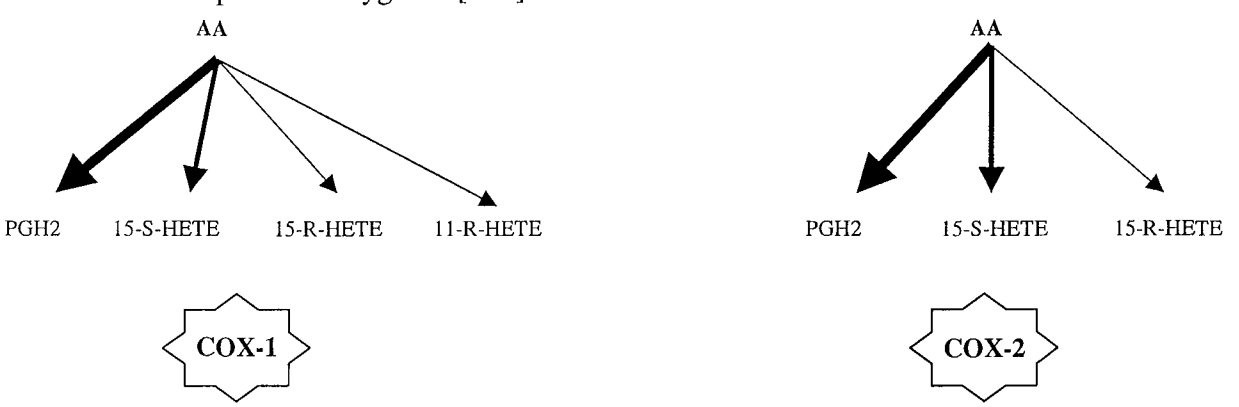


Figure 31 Profil métabolique des COX utilisant l'AA comme substrat

L'épaisseur des flèches symbolise l'importance relative des productions décrites

Des réactions chimiques non enzymatiques sont de plus à l'origine de PG et de HHT autocatalysés à partir de PGG2 ou PGH2. Ainsi, à partir de COX-1 purifiée, on détecte PGF2α > 12-HHT > PGE2 > 11-HETE > PGD2 > 15-HETE [280],[279].

Malgré la précision des mécanismes catalytiques, le nombre de résidus catalytiquement cruciaux est en fait assez limité dans le site actif de COX-1, avec Y385 (abstraction du H du C13 de l'AA), G533 et Y348 (positionnement correct du C13 pour la réaction), R120 (critique pour la fixation à haute affinité de l'AA) et V349, W387 et L534 (conformation de l'AA favorisant la production de PGG2 plutôt que HPETE) [280]. Ainsi le mutant V349L ne produit plus de 11-HETE. Cette possibilité des COX de métaboliser de plusieurs façon l'AA vient de sa capacité à le fixer dans différentes conformations autorisées par des fluctuations du positionnement de l'AA à l'extrémité ω [281],[282],[283],[284].

Si PGH2 est le produit prépondérant des COX, les autres catalyses n'en existent pas moins, même au niveau cellulaire, puisque l'indométacine et l'aspirine (inhibiteurs des COX) diminuent la production de 15-HETE, HHT et 11-HETE dans des cellules endothéliales activées par l'IL-1, cellules où 15 LOX n'est pas exprimée [285]. Les chondrocytes ont aussi une production de 11- et 15-HETE (très inférieure à PGE2 néanmoins) sensible à l'indométacine [286]. Dans des macrophages, COX-1 métabolise l'AA en HHT à 30 %, et COX-2 entre 10 et 15 % [287]. Au niveau cellulaire, d'autres facteurs interviennent dans la nature des produits des COX, comme les conditions redox : le GSH, par exemple, modifie considérablement le profil métabolique de l'AA par les COX (Tableau 3) [288].

			1 mM GSH	
	COX-1	**COX-2**	**COX-1**	**COX-2**
15-HETE	< 1 (variable)	7 (15 S)		
11-HETE	< 10 (variable)	5 (11 R)		
12-S-HHT			88	78

Tableau 3 Profil métabolique des COX cellulaires selon les conditions redox

Outre les produits du catabolisme des PG, on retrouve des isoprostanes (iP) dans les urines. On dose ainsi autour de 0,3 ng/mL d'iPF2 dans le plasma humain et environ 0,8 et 1 ng/mL de 8-iso-PGF2α et d'iPF2 dans les urines [289]. Mais les COX ne sont pas impliquées dans la production de ces iP puisque des inhibiteurs sélectifs de COX-2 ou non sélectifs (aspirine, ibuprofène et célécoxib) sont sans effet sur le taux urinaire des iPF2α-III et 8-,12-iso-iPF2α [189], pas plus que l'aspirine ou l'ibuprofène sur le taux de 15-iPF (0,36 contre 0,39 ng/mg créatinine) [290]. Les iP seraient en fait des produits d'oxydation non enzymatique de l'AA (Figure 32).

La COX du corail *Gersemia fruticosa* est également à l'origine de HETE en plus de PG, avec PGD2 > PGE2 > PGF2α >> 11-R-HETE > HHT > 15-S-HETE [242], tandis que la COX d'une autre espèce de corail, *Plexaura homomalla,* a un profil de produits encore plus varié et une stéréospécificité inversée, avec 15-R-PGE2 > 15-R-PGD2 > 15-R-PGF2α > 12-HHT, 12-R-HETE >> 11-R-HETE [291].

A partir d'autres substrats que l'AA, les COX produisent également plusieurs produits, comme les 9- et 13-HODE avec le LA [273]. A partir d'AEA, COX-2 purifiée est à l'origine de PGE2-EA, PGD2-EA, 12-HHT-EA et 15-HETE-EA. Dans des fibroblastes, PGE2-EA est largement prépondérant [277]. Les métabolites du 2-AG par COX-2 purifiée sont essentiellement PGE2-G et 11 HETE-G, mais aussi PGD2-G et un peu 15-HETE-G et très peu de HHT-G (PGE2-G / HETE-G = 4 ; 11-HETE / 15-HETE = 3,4). Dans des macrophages, on retrouve essentiellement PGD2-G [275].

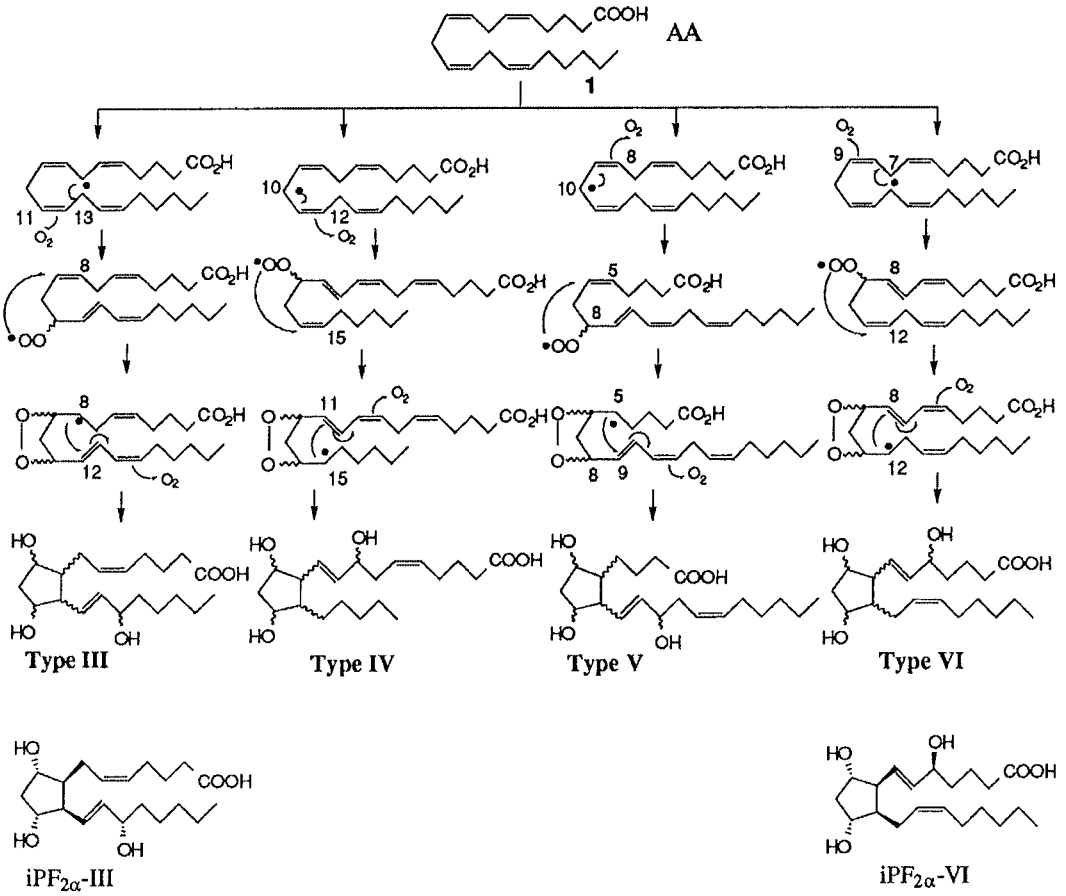


Figure 32 Mécanismes oxydatifs conduisant à la synthèse des isoprostanes

Différents mécanismes réactionnels aboutissant à la production d'iP de classe III à VI à partir de l'AA. Les iP iPF2α de classe III et VI sont indiqués à titre d'exemple

Régulations des activités catalytiques

◊ Auto-inactivation

Les COX ont un turn-over limité, avec 10 à 300 réactions selon la concentration en réducteurs, quel que soit le substrat de COX [277]. L'auto-inactivation est associée à une perte d'activité *COX* et *PER*, mais surtout *PER*. En effet, toute la production de PGH2 est atteinte en 1 min, alors que la consommation d'O_2 continue encore un peu. COX-1 purifiée produit ainsi 1300 mol PGF / mol COX [292]. L'inhibition de l'activité péroxydasique suit une cinétique de premier ordre lente (0,4 /s), indépendante de la concentration en peroxyde et a lieu après formation du radical Tyr°. Elle n'est cependant pas due à une liaison covalente entre Tyr et l'hème [293]. Le mécanisme de cette auto-inactivation est encore mal compris : on sait qu'il est associé à une modification chimique de la protéine n'impliquant pas l'hème sous forme radicalaire (Intermédiaire I) mais une Tyr radicalaire (Intermédiaire II), contrairement à l'auto-inactivation qu'on peut encore observer en présence d'AINS qui elle provoque, d'une part, une modification chimique de l'hème sans lien avec la protéine, d'autre part, une fixation covalente de l'hème avec l'enzyme [294]. L'auto-inactivation implique un changement de structure majeur du radical Y385 dont on ignore la nature physique, mais il existe une autre Tyr impliquée qui n'est ni Y348 ni Y355 [295].

Cette auto-inactivation ne semble pas impliquer les métabolites d'AA qu'on peut retrouver fixés de façon covalente dans le site actif de COX-1 [296], puisqu'elle semble plus rapide que la formation d'adduits. Les cosubstrats de *PER* (Phénol, paracétamol, TMPD) affectent

l'activité *COX* en atténuant l'auto-inactivation et en augmentant la rapidité de la réaction catalytique. Ils augmentent ainsi de 10 à 60 % la capacité enzymatique [270].

◊ Existence d'inhibiteurs endogènes

S'ils ne sont pas à l'origine de l'auto-inactivation qu'on observe avec des protéines purifiées, les adduits dus à des métabolites de l'AA, produits par COX elle-même ou par d'autres voies représentent néanmoins un moyen de régulation supplémentaire pour l'activité COX. L'incubation de COX-1 et COX-2 avec des lysats de fibroblastes activés par du sérum se traduit par leur inhibition non reversée par l'addition d'AA [297]. L'activité COX est très sensible aux conditions redox, et la déplétion de cellules en GSH augmente leur production de PGE2 [221]. Inversement, le GSH en présence de GS Peroxydase inhibe COX-1 et COX-2 *in vitro* [298] et *in vivo* [299].

La privation de substrat est un dernier moyen de réguler l'activité COX. L'AA libre n'a en effet qu'une très brève durée de vie dans la cellule : si on incube des hépatocytes avec de l'AA, 80 % sont incorporés dans les triglycérides et les PL après 10 min, alors qu'il n'en reste que 20 % de libre. Il faut noter cependant que le LPS modifie considérablement ce métabolisme puisqu'en présence de l'endotoxine, on retrouve encore 50 % d'AA libre après 10 min [300]. Une compétition entre les COX et les ACS pour l'utilisation du substrat commun AA a d'ailleurs été montrée [301],[302]. A faibles concentrations en AA (1-50 μM), ACS est plus efficace dans les microsomes de medula de rein, et il existerait une coopérativité vers 30 μM. L'indométacine (50 μM) diminue de 50 % la production de PG et augmente de 40 % celle d'AA-CoA, tandis que la triacsine C (200 μM) augmente de 30 % la production de PG et diminue de 60 % celle d'AA-CoA [303]. ACS-4 est fortement sélective de l'AA et de l'EPA, ce qui en fait un bon candidat pour l'activité AA-CoA synthétase nécessaire à la lysophospholipid:arachidonoyl-CoA acyltransférase et ainsi limite la concentration d'AA libre [304].

Nous verrons plus tard que des métabolites issus des COX sont également capables de l'inhiber par acylation.

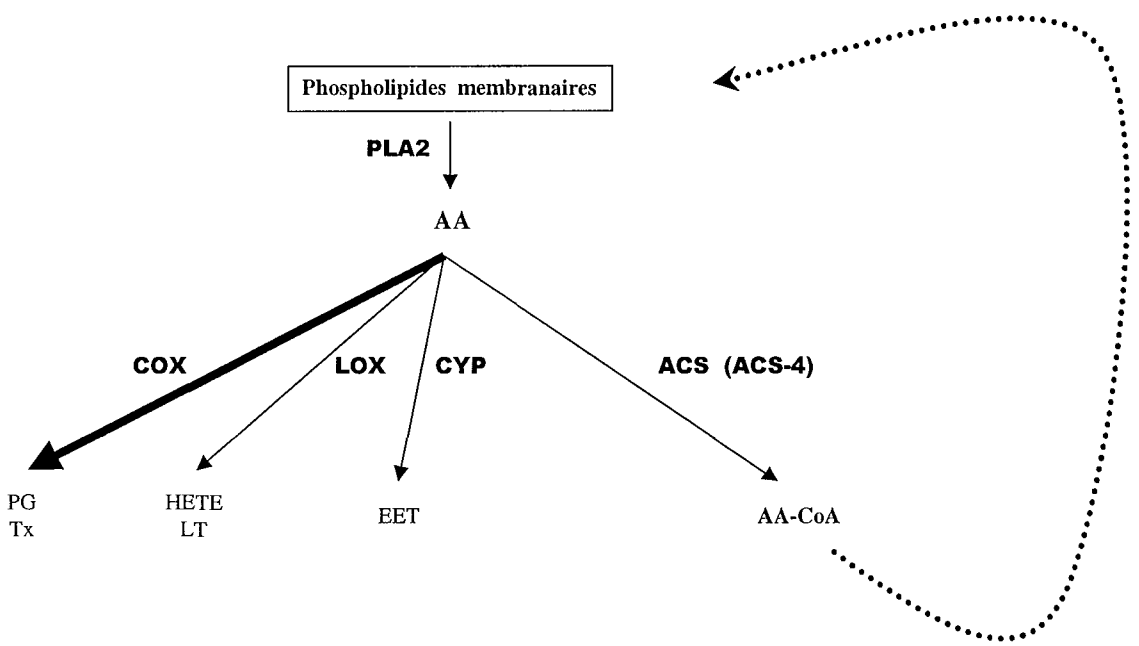


Figure 33 Devenir de l'AA après hydrolyse des membranes

L'AA est utilisé principalement par les COX, mais il est aussi substrat des LOX et de CYP ainsi que d'ACS. L'importance relative de ces différentes voies alternatives constitue un mode de régulation de la production de PG

◊ Partenaires protéiques

Nous verrons ultérieurement qu'il existe des couplages fonctionnels complexes entre les COX et d'autres enzymes de la cascade de l'AA, soit en amont (PLA2), soit en aval de COX (PGS). Ces couplages sont encore un moyen de réguler la production de PG par les COX (cf paragraphe II_A. 2. f)

Pourquoi deux COX ?

◊ Fonctions biologiques distinctes

La compréhension et la distinction des rôles biologiques de COX-1 et COX-2 a longtemps été dirigée par leur profil d'expression : COX-1 est exprimée dans la plupart des tissus et cellules, tandis que COX-2 n'apparaît qu'en réponse à divers stimuli. Une forte induction de COX-2 a ainsi été mise en évidence dans des tissus inflammatoires [241],[240]. L'injection intrapéritonéale d'un antisens de COX-2 réduit l'apparition de l'arthrite à l'adjuvant [305]. Prépondérante et inductible dans le système nerveux central [306],[307], COX-2 est également médiateur de la fièvre, comme l'a montré l'utilisation de souris COX-1 ou COX-2 KO [308]. Plusieurs études l'impliquent aussi dans la perception de la douleur [241],[309].

COX-1 est cruciale dans la production de TxB2 par les plaquettes et de PGE2 dans la muqueuse gastrique, tandis que COX-2 est la source des PG systémiques [310]. Il était donc tentant d'envisager une dualité dans les fonctions physiologiques des COX, en attribuant un rôle de « housekeeping » à COX-1 et une fonction pro-inflammatoire et médiateur de la douleur à COX-2. Nous avons vu cependant que COX-2 est constitutive dans certains tissus où elle a un rôle crucial. Elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques, comme la cicatrisation des ulcères ou la biologie de la reproduction [311]. L'absence de réponse immunitaire intestinale à des antigènes alimentaires est due aux PGE2 produites par COX-2 [312]. De plus, son expression ou son absence d'expression ne gouverne pas l'inflammation : COX-1 y participe également. Ainsi, des souris COX-2 KO ne présentent pas d'altération de la réponse inflammatoire, tout en développant de sévères malformations rénales [313]. La phase précoce de la réponse à l'activation des mastocytes, qui s'accompagne d'une forte surproduction de PGD2, est clairement due à COX-1 plutôt qu'à COX-2 [314],[315],[172]. Nous avons vu que COX-1 semblait subir une activation traductionnelle puisque la protéine apparaît en 30 min chez les monocytes traités au LPS [189]. On observe le même type d'activation éclair de COX-1 après stimulation de cellules endothéliales au NaF [213]. Dans un modèle de pleurésie à la carragénine, les inhibiteurs non sélectifs sont plus anti-inflammatoires que les sélectifs [316]. Dans le modèle de la poche à air, l'aspirine inhibe la production de PGE2 quand des ISC sont sans effets [317]. Elle intervient peu dans certains modèles de douleurs, mais autant que COX-2 dans d'autres [309]. Quant à la fonction gastroprotectrice de COX-1, si elle est constitutive dans la muqueuse gastrique et y est responsable de la production de PGE2, l'administration d'ISC augmente les lésions stomacales [318]. COX-2 est impliquée dans nombre d'autres processus biologiques, supportant aussi un rôle considérable dans la prolifération cellulaire et la carcinogenèse. La surexpression de COX-2 est suffisante pour induire une tumorogenèse mammaire [319]. Elle favorise aussi l'adhésion à la matrice extra-cellulaire et inhibe l'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales [320].

Comble du paradoxe, COX-2 est fortement impliquée dans la phase de résolution de l'inflammation, ce que nous détaillerons ultérieurement (paragraphe II_A. 3.).

COX n'est cependant pas la seule enzyme dupliquée. Il est ainsi fréquent, dans la synthèse des lipides chez les eucaryotes, de disposer de paralogues : c'est le cas dans la

synthèse des glycérolipides (AcétylcoA carboxylase-1 et -2, glycéraldéhyde 3 phosphate acyltransférase mitochondriale et microsomiale, phosphatidate phosphatase Mg^{2+} dépendante et indépendante), celle des phospholipides (Phosphatidylserine synthase-1 et -2, Phosphatidylserine décarboxylase-1 et -2), celle des stérols (HMG-CoA réductase du RE ou des péroxysomes) [321].

◊ Capacité enzymatique de renfort et/ou primordiale ?

Au lieu d'une dichotomie fonctionnelle dans l'inflammation, peut-être faut-il voir chez COX-2, en tout cas dans son inductibilité, une capacité de production accrue transitoire de PG. D'ailleurs, la capacité catalytique de COX-2 est supérieure à celle de COX-1 : son besoin en initiateur radicalaire est ainsi 10 fois plus faible, ce qui fait que, dans une même cellule, COX-1 peut être latente quand COX-2 est déjà active [298]. COX-2 a une activité *COX* plus rapide que COX-1 et un temps de relaxation plus long, ce qui prolonge la durée de vie du radical Tyr, d'où une activité plus longue [322]. Si la vitesse de production de l'intermédiaire I à partir de 15-HPETE est identique pour les 2 isozymes ($2{,}5.10^7$ $M^{-1}.s^{-1}$), la génération de l'intermédiaire II est limitante chez COX-1 (5.10^2 $M^{-1}.s^{-1}$) mais pas chez COX-2 [323].

COX-1 et COX-2 sont coopératives pour l'AA. Modeste pour COX-1 (n_H=1,29), cette coopérativité s'accompagne d'une modification conformationnelle vers 0,1 μM d'AA. Elle est plus difficile à évaluer chez COX-2 dont le phénomène allostérique a lieu vers 50 nM [324]. L'activation allostérique semble impliquer le passage du réseau de liaisons H à l'entrée du canal du site actif (R120, E524, Y355) [278]. La cinétique coopérative est due à une activation par feedback de l'hydroperoxide qui est plus efficace pour COX-1 que pour COX-2 [325]. Si l'on en juge par les besoins en initiateur radicalaire, COX-2 est donc la première active, en revanche, l'activité de COX-1 est plus efficace à faibles concentrations en AA, avant que l'induction de COX-2 ne la rende à nouveau prépondérante.

Plusieurs travaux ont rapporté une sélectivité des COX quant à la provenance de l'AA. COX-1 utiliserait ainsi préférentiellement l'AA exogène, alors que COX-2 serait sélective de l'AA endogène [326],[327],[193],[145]. L'AA « endogène » est néanmoins généralement produit en réponse à un stimulus (ionophore A23187), ce qui complique l'interprétation des résultats : il est toujours possible que la concentration en AA soit plus importante que sa provenance.

◊ Produits différents

Nous avons vu que les COX pouvaient être à l'origine de produits différents, selon les substrats disponibles et les cofacteurs présents. COX-1 est globalement plus sélective de l'AA que COX-2. On pourrait donc imaginer que la forme inductible puisse être utilisée pour produire d'autres eicosanoïdes (acyl-glycérols, acyl-éthanolamides), tandis que COX-1 serait cantonnée à l'utilisation classique de l'AA (ce que confirme sa coopérativité). A l'inverse, COX-1 est seule à pouvoir produire 15-S-HETE [279]. Les PG sont auto- et paracrines mais pas endocrines, car il existe un catabolisme très rapide pour ces composés. Les prostanoïdes issus du métabolisme de l'anandamide et de l'acyl-glycérol d'AA par COX-2 sont en revanche plus stables et bénéficient d'une durée de vie suffisante dans le plasma pour avoir un effet systémique (demi-vie de 8 à 16 min dans le plasma humain) [328]. Le 13-HODE, produit du LA par COX, et le 15-HETE peuvent aussi être circulants car ils sont désorbés de la membrane et fixés par l'albumine [329].

A. 2. d) Les PG synthases

• Aspects transcriptionnels

La PGES est issue d'un gène situé à proximité de celui de COX-1 (9q34.3) [330]. PGES est inductible dans les modèles d'arthrite à l'adjuvant, au LPS et à l'IL-1 dans de nombreux tissus (poumons, cœur, cerveau, rein) [331]. La PGES membranaire, mPGES, est inductible dans les macrophages stimulés au LPS [332], avec un taux d'induction de l'ordre de 30 % [287], en particulier dans la phase tardive [138]. Comme PGIS, elle est également induite chez les cellules endothéliales activées par l'IL-1β [333],[274].

• Aspects post-traductionnels

PGES est une protéine de 17 kDa appartenant à la famille MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism), constituée de la 5-LOX Activating Protein, LTC4 synthase, mGST-2 et –3 [334]. Elle catalyse la conversion de PGH2 en PGE2. Elle est inhibée par des inhibiteurs de FLAP (MK-886) et LTC4, tandis que le paracétamol et l'indométacine sont sans effet [331]. Outre la forme membranaire (mPGES, [O14684]), il existe une autre isozyme cytosolique (cPGES) de 23 kDa, d'expression constitutive et uniquement inductible dans le cerveau [335].

PGIS (Q16647) appartient à la superfamille des CYP. C'est une protéine de 57 kDa d'expression ubiquitaire. Elle catalyse l'isomérisation de PGH2 en PGI2 (EC 5.3.99.4).

A. 2. e) Les lipoxygénases

Les LOX constituent elles-aussi une grande famille très importante dans le métabolisme des acides gras et la production d'eicosanoïdes [336]. On les différencie selon leur activité catalytique, la 5-LOX oxydant l'AA en position 5, la 12-LOX en position 12, etc. On pense que cette spécificité catalytique à partir d'un substrat commun est due à la position du Fe, couplée au volume du site de fixation. Ces 2 facteurs seraient ainsi conjointement liés à l'accessibilité d'un résidu basique en position 403 [337]. La 5-LOX est une protéine de 78 kDa exclusivement cytosolique dans les macrophages, neutrophiles et éosinophiles latents, mais à la fois cytosolique et nucléaire dans les macrophages alvéolaires et les mastocytes. Cette translocation nucléaire est sans conséquence sur sa capacité catalytique [338]. La 5-LOX est la seule LOX à se transloquer dans le noyau (pas la 1-, 3-, 8-, 12-, 15-, ni la 12 R-LOX). Le tonneau β Nt est indispensable à la translocation, et les seuls 5 résidus supplémentaires de 5-LOX expliquent cette spécificité (les tonneaux β de 12- ou 15-LOX ne transloquent pas) [339]. Cette propriété pourrait être le fait de partenaires protéiques, puisque des expériences de double hybride et de co-immunoprécipitation ont révélé que 5-LOX interagit avec différentes protéines, dont une cactosin-like protein, TRAP-1 (TGFβ R-I associated protein-1) et l'homologue d'une protéine nucléaire de *Caenorhabditis elegans* [340].

Les LOX catalysent l'hydroperoxydation de l'AA. Une réduction transforme ensuite le HPETE produit en HETE, comme schématisé ci-dessous pour la 12-LOX [341].

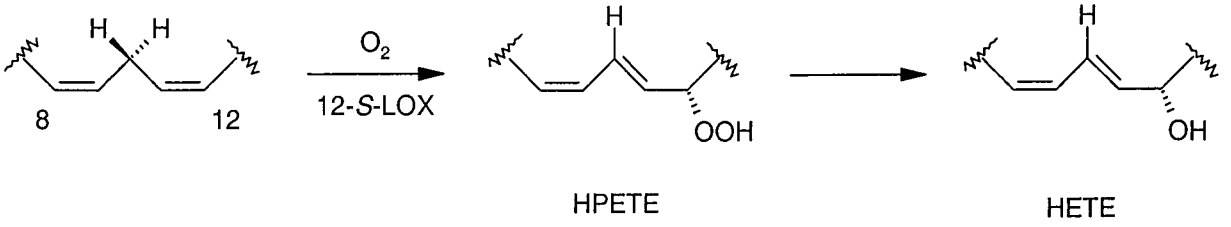


Figure 34 Schéma réactionnel de la réaction catalysée par les LOX

La 12-LOX est prise comme exemple, produisant de l'hydroperoxy-eicosatetraénoate (HPETE) puis de l'hydroxy-eicosatetraénoate (HETE) à partir d'AA

Les LOX sont stéréospécifiques et ne produisent que des S-HETE. Il existe cependant une 12-R-LOX, différente de la 12-S-LOX classique, transformant l'AA en 12-R-HPETE à 98 % [342].

Les LOX ont de nombreux points communs avec les COX : elles peuvent accepter différents substrats, être à l'origine de plusieurs produits et subissent une auto-inactivation. Ainsi la 12-LOX oxyde les 1- et 2-AG et produit les 12-HPETE et 12-S-HETE correspondants. La cinétique réactionnelle est plus lente qu'avec le substrat type AA, mais comme l'auto-inactivation est également ralentie, l'efficacité globale est identique [343]. La 15-LOX-L1 de graine de Soja ne produit que du 15-HPETE à faibles concentrations en AA, mais génère aussi du 5-,15-diHPETE et du 8-,15-diHPETE à plus fortes concentrations. La 15-LOX de mammifères est aussi à l'origine de 12-HPETE en plus du 15-HPETE [341]. Comme COX, elle est rapidement auto-inactivée (en 1-2 min) [344].

Contrairement aux COX cependant, leur propre produit n'est pas qu'un intermédiaire dans une voie métabolique (en l'occurrence pour la production de LT et des lipoxines à partir de HPETE) mais peut aussi constituer le produit final puisque les HETE et HPETE ont de nombreuses fonctions biologiques [345],[346]. Ainsi, 15-HETE est responsable de l'induction de CD36 dans les macrophages [347], 5-HETE stimule la prolifération de cellules cancéreuses [348]. A l'instar des COX, les HETE et HPETE produits par les LOX sont aussi substrats d'autres enzymes de la cascade de l'AA, comme la 5-HPETE déhydratase à l'origine de LTA4, et sont également à l'origine des lipoxines et hepoxilines [349], qui ont elles-même de multiples rôles biologiques [350],[351]. Le profil métabolique des LOX dans les macrophages est ainsi 12-HETE > 15-HETE > 5-HETE > LTB > 6-trans-LTB > 6-trans-12-epi-LTB et des lipoxines A et B [352]. Beaucoup moins étudiée que la série 2 des Tx, la série 3 est cependant importante quantitativement : la production de TxB3 dépasse ainsi de 7 fois celle de TxB2 après incubation d'EPA avec des artères pulmonaires et de 3 fois avec des plaquettes [353] ; mais on ne connaît guère leur importance biologique.

A. 2. f) Couplages fonctionnels : continuité et amplification du signal

• Couplages : aspects transcriptionnels

Coexpressions coordonnées

Nous avons vu que l'initiation de la réponse inflammatoire s'accompagnait de la transcription simultanée, mais à différents taux, de nombreux gènes de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines. De même, certaines enzymes de la cascade de l'AA présentent une induction concomitante, voire coordonnée. C'est le cas pour COX-2 et mPGES dans les macrophages [332]. Le coactivateur de PLA2, la PLAA est inductible au LPS et à l'IL-1, et son messager apparaît en 2-10 min (la protéine en 15-30 min) dans les macrophages,

avant cPL2 (dont la protéine apparaît en 2-4 h) et COX-2 (8 h). *In vivo* également, il existe une induction de PLAA, cPLA2 et sPLA2 dans les pathologies inflammatoires [127]. La phase tardive de réponse des macrophages (entre 3 et 24 h) est associée à l'induction concomitante de COX-2, PGES, cPLA2 et sPLA2,[138] en particulier V-sPLA2 [173].
Dans le processus de cicatrisation également, il existe une expression coordonnée de IIA-, V-sPLA2 et COX-2 dans les keratinocytes [354].

Feedbacks croisés

De nombreux acteurs de la réponse inflammatoire stimulent la production d'autres, en dessinant des boucles d'auto-amplification. C'est bien entendu le cas pour les cytokines et chemokines et pour d'autres protéines à activité cytokine-like, comme le domaine Nt de la tRNA synthétase P43 qui active la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-8, MIPx, IL-1β, ICAM-1) et le récepteur à l'IL-7 [355]. Mais des produits enzymatiques participent aussi à la perpétuation du signal, soit par un feedback positif, soit en activant une voie pro-inflammatoire voisine.

C'est ainsi que le NO induit IIA-sPLA2 dans les cellules mésengliales [356]. Il induit aussi COX-2 en 4-8 h dans les macrophages, en synergie probablement avec PGE2 [357]. Mais son effet sur l'expression de COX-2 dépend de la dose : il est inducteur jusqu'à 100 μM mais répresseur au-delà [358]. Dans la synoviale inflammatoire, où les cellules endothéliales et les macrophages infiltrés sont source de cytokines et de NO, celui-ci est responsable de l'induction de COX-2 dans les synoviocytes, via NFκB [359]. Les effets du NO dépendent souvent du générateur utilisé, cependant dans les astrocytes, NO°, NO^{3-}, NO^{+} et NO^{-} induisent COX-2 en synergie avec le LPS. Cette étude montre en outre que les effets du NO dépendent fortement des conditions redox du milieu [107]. Le NO augmente la quantité d'AA libre dans les îlots pancréatiques, en inhibant son estérification, et favorise ainsi son utilisation par les enzymes de la synthèse des eicosanoïdes : c'est ainsi que dans ces conditions, la quantité de PGE2 et de 12-S-HETE augmente [360].

Les AG, en particulier l'AA, le linoléate et l'oléate, activent la libération d'AA induite par l'IL-1 via IIA-sPLA2, constituant un autre exemple de feedback positif [146]. PGE2 en est un autre, qui potentialise l'induction de COX-2 par le LPS chez les monocytes [202]. De plus, PGE2 stabilise le messager de COX-2 via les ARE distaux et proximaux du 3'UTR dans des fibroblastes synoviaux activés à l'IL-1, ce qui, à 0,1 μM, se traduit par une demi-vie de 13 h au lieu de 0,85 h, et permet un taux de présence maximal du transcrit de 2 à 48 h [229]. Chez les PLA2, les couplages sont aussi très importants : ainsi, l'expression de V-sPLA2 est réprimée par l'inhibition de cPLA2. L'inhibition de V-sPLA2 ou de cPLA2 réprime également COX-2 chez les macrophages [173]. L'administration de PLA2 synoviale *in vivo* conduit à une réponse inflammatoire associée à une induction de sPLA2 mais pas de cPLA2 dans différents types cellulaires [128].

• Couplages : aspects post-traductionnels

Des produits de la cascade de l'AA et du NO

Des couplages fonctionnels ont été mis en évidence au niveau enzymatique, en particulier entre les voies NOS et COX. Le NO est cosubstrat réducteur de l'activité *PER* de COX-1 et COX-2, en fixant l'hème Fe II. COX est ainsi nitrosylée (via Y385) après incubation avec le NO [361]. Cependant, les conséquences catalytiques rapportées sont contradictoires, certains auteurs montrant une stimulation, d'autres une inhibition, d'autres enfin ne notent pas d'effet [362]. Via le peroxynitrite, le NO active COX-1 et COX-2 purifiées (légèrement plus COX-1 que COX-2) ainsi que les COX de macrophages. Il réagit

aussi avec d'autres peroxydases à hème mais pas à Se [363]. NO est aussi catalytiquement « consommé » par COX-1 durant l'agrégation plaquettaire [364].

Cependant, d'autres études ont rapporté que le NO inhibe la production de PG dans des microsomes de macrophages. Le peroxynitrite inhibe également COX-1 et COX-2 cellulaires avec une IC_{50} de 60 μM, ce qui correspond à la concentration de NO mesurée chez des macrophages activés par LPS + IFN [358].

Le NO est cosubstrat réducteur et favorise ainsi l'activité *PER*, mais il est simultanément inhibiteur de l'activité *COX*, ce qui globalement lui confère peu d'effet chez les macrophages [365]. Comme nous l'avons vu précédemment, les conditions redox et le donneur de NO utilisés expliquent probablement ces discordances : ainsi il a été rapporté que NO^{3-} active les COX-1 cellulaires tandis que NO° les inhibe [366]. Dans des systèmes cellulaires complets, le taux d'expression relatif de COX-1 et COX-2 aurait également son importance puisqu'on rapporte qu'en réponse au NO, il existe une augmentation de la production de PGE2 dans des fibroblastes COX-2 KO et une inhibition chez les COX-1 KO [361].

La 15-LOX «consomme » aussi le NO sans modification du profil de ses produits, ni nitration de l'enzyme, mais avec une inhibition réversible de la formation de 13-HPODE à partir de LA [367].

En retour, PGG2 et 15-HPETE stimulent l'activité NOS en présence d'ATP (EC50 = 0,2 μM). Il s'agit d'un effet dépendant des hydroperoxydes puisque PGH2 et 15-HETE sont sans effet [368].

Chez les PLA2 aussi, il existe un certain nombre de couplages, bien que, comme nous l'avons vu précédemment, il soit souvent difficile de savoir si les phénomènes sont liés à leur activité enzymatique ou à la fixation aux récepteurs des sPLA2. IB-PLA2 et V-sPLA2 provoquent la phosphorylation et l'activation des MAPK P42, P44, P38 et de cPLA2 entre 5 et 10 min ainsi que la libération d'AA et de PGI2. Leur effet est médié par cPLA2α. Cependant, le cross-talk sPLA2 / cPLA2 est spécifique du type cellulaire : chez les astrocytes et les cellules mésengliales, sPLA2 exogène stimule l'activité de cPLA2. Chez les fibroblastes, l'activation de cPLA2 est nécessaire à l'initiation de l'activité sPLA2 et à son induction. Chez les plaquettes, cPLA2 est la seule active alors que les 2 sont exprimées. Chez les macrophages, cPLA2 est nécessaire à la fonction de sPLA2 et à son expression [144] ; chez les neutrophiles, sPLA2 inhibe la formation de LTB4 qui active alors cPLA2 [369]. Des couplages impliquent d'autres phospholipases, comme celui reliant PLPD2 mais pas PLPD1 à cPLA2 et IIA-sPLA2 pour la production de PGE2 [370]. Chez les neutrophiles, LTB4, 5-HETE et 5-oxo-HETE stimulent cPLA2, probablement en favorisant sa phosphorylation [369].

Partenariats privilégiés

Le profil métabolique cellulaire de l'AA montre clairement qu'il existe des couplages fonctionnels entre l'activité de certaines enzymes. A partir d'AA exogène comme endogène, COX-1 est ainsi à l'origine de 60 % des métabolites d'AA, contre 30 % pour les voies LOX. PGI2, TxA2, PGD2 et HHT sont les principaux produits issus de la voie COX-1, LTB4 et 5-HETE ceux des voies LOX. L'ajout d'indométacine augmente la proportion d'AA non métabolisé et celle de 12-HETE. COX-2 métabolise quant à elle 85 % de l'AA (PGI2 et PGE2 à 85 %), le reste formant 5-HETE [287]. Quand les 2 enzymes sont présentes, PGE2 est surtout issu de la voie COX-2, PGD2 de la voie COX-1 et TxB des deux [371].

En combinant les transfections et cotransfections des acteurs de la cascade de l'AA, on a tenté de construire un modèle des interactions unissant les COX aux PLA2, en se focalisant sur les cinétiques de réponse au stimulus. En réponse immédiate (après quelques minutes de

stimulation par un ionophore ou la bradykinine), les deux COX produisent autant de PGE2, alors qu'en phase tardive (stimulation par l'IL-1 + sérum), COX-2 produit beaucoup plus de PGE2. iPLA2 liée à COX-1 dans la réponse précoce n'est pas impliquée dans la réponse tardive. En coculture, $sPLA_2$ a un rôle paracrine en augmentant la production de PGE2 des cellules voisines, mais pas les autres PLA2 [176]. Le modèle a été complété en montrant que cPLA2 et sPLA2 sont associées pour la production de PGE2 par COX-2 [232]. Jusqu'à 10 μM d'AA exogène, COX-2 produit deux fois plus de PGE2 que COX-1, mais au-delà, la production de COX-1 rend négligeable celle de COX-2. Par ailleurs, le produit de COX-2 peut activer la production d'AA (boucle d'auto-amplification). Malheureusement, ce genre de modèle achoppe à la simplification que constitue l'étude de voies aussi complexes par transfection, en ne respectant ni l'équilibre d'expression des différentes enzymes ni le phénotype d'un type cellulaire donné. Nous avons en effet vu que, chez le macrophage, par exemple, PGE2 est essentiellement issue du métabolisme de COX-2 et très peu produit par la voie COX-1.

En aval de COX, il existe également des couplages préférentiels avec les PGS. Dans des cellules endothéliales, l'IL-1 double la production de TxA2, multiplie par 50 le taux de PGI2 et par 80 celui de PGE2. Un ISC n'inhibe que la production de PGE2 et de PGI2, ce qui montre qu'il existe un lien entre COX-2, PGIS et PGES, de même qu'entre TxS et COX-1 [333]. Par immunocytologie, on a montré que mPGES, PGIS et TxS sont périnucléaires et associées sélectivement à COX-2, en phase précoce et tardive, tandis que cPGES est, quant à elle, associée à COX-1. PGDS travaille soit avec COX-1 en phase immédiate, soit avec COX-2 en phase tardive. Le couplage dépend aussi de la concentration en AA [372]. De même, la cotransfection de mPGES avec COX-1 produit beaucoup moins de PGE2 qu'avec COX-2 [332]. Chez les macrophages, l'utilisation d'antisens a montré que la production de PGE2 en phase tardive dépend de V-sPLA2 et de COX-2, mais pas de iPLA2 [144]. Dans des cellules endothéliales, PGIS est colocalisée avec COX-1 dans le RE mais surtout dans la région périnucléaire et l'enveloppe nucléaire. Après induction, COX-2 est située dans des structures vésiculaires, non associée à PGIS [373].

Synthèses transcellulaires

Des cellules n'expriment pas certaines enzymes de la cascade de l'AA mais coopèrent avec d'autres pour produire certains eicosanoïdes. C'est le cas des cellules endothéliales qui libèrent PGH2 dans le milieu où il est métabolisé en TxB2 par les plaquettes [193]. Les neutrophiles, exprimant la 5-LOX, la 5-LOX activating protein et la LTA4 hydrolase, mais pas la LTC4 synthase, peuvent également prendre en charge l'AA libéré par les cellules endothéliales pour produire LTB4. L'activité conjointe des plaquettes, des cellules endothéliales et des neutrophiles est ainsi une source de cysteinyl-leukotriènes (Cys-LT), LTB4, LTC4 [374]. Une voie de synthèse transcellulaire relie encore les chondrocytes exprimant les LTA4 hydrolase et LTC4 synthase aux PMN exprimant la 5-LOX [286].

Les sPLA2 produites par un type cellulaire (IIA- et V-sPLA2) peuvent se fixer aux récepteurs aux sPLA2 de cellules voisines pour jouer un rôle paracrine [176]. Les sPLA2 produites par les mastocytes sont également capable d'activer la production de PGE2 par les fibroblastes [181].

Il est probable que ces coopérations cellulaires permettent un ciblage de la production d'eicosanoïdes donnés à un endroit et un moment précis, ce qui ne serait pas si toutes ces cellules exprimaient l'ensemble des enzymes de la cascade de l'AA.

Tous les couplages fonctionnels, que nous avons vus, sous différentes formes, concourent à la propagation et l'amplification du signal inflammatoire, en plus de différents facteurs dont la fonction propre est d'activer certains acteurs pro-inflammatoires. La PLAA en

est un exemple, comme la protéine TWEAK, membre de la famille TNF, qui est très rapidement traduite à partir d'un stock de messager pré-existant en phase inflammatoire naissante [375].

A. 3. Régulation de la réponse et résolution de l'inflammation

Suite aux stimuli pro-inflammatoires, la réponse inflammatoire s'est propagée et a gagné différents types cellulaires. Dans des conditions normales et non pathologiques, elle est ensuite résorbée et disparaît quand le facteur déclenchant est éliminé. L'étude et la compréhension de cette phase de résolution n'en sont qu'à leurs débuts et on n'en sait que peu de choses. Elle semble cependant impliquer les mêmes acteurs que ceux de la phase inflammatoire, en particulier la voie de synthèse des PG.

A. 3. a) Disparition des médiateurs et des facteurs pro-inflammatoires

Cette régulation est complexe et encore mal connue mais on sait, par exemple, que l'activité de IL1α et IL1β est régulée par un antagoniste du récepteur IL-1RI (IL-1RA) et un récepteur « gratuit », IL-1RII, limitant l'action de la cytokine. IL-1RII inhibe ainsi fortement la production de facteurs induits par IL-1, comme NO et PGE2 dans le chondrocyte. Il existe une sous-expression de IL-1RII et IL-1RA dans le cartilage de patients arthritiques par rapport au cartilage sain. Il est notable que IL-1RII n'est pas produit dans le cartilage où sa présence n'est donc permise que par le plasma [376]. L'IFNγ, TNFα, IL2, IL4 sont inhibés par des récepteurs solubles et des cytokines (IL10, TGF_β) peuvent encore en inhiber d'autres.

• Catabolisme des PG

Les petits médiateurs moléculaires de l'inflammation ont une durée de vie très courte, ce qui limite leur effet systémique. Les estimations de la demi-vie du NO sont assez divergentes, mais ne dépassent pas quelques secondes [377]. Les PG subissent une inactivation très rapide par oxydation en position 15, catalysée par une 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (EC 1.1.1.141) [328],[378], ou en position ω par des P450. Des CYP hydroxylent les eicosanoïdes, comme le CYP4a11 qui métabolise les AG dans le foie et les reins, le CYP4f2 le LTB4 dans le foie [379]. Il existe aussi nombre d'oxydations non enzymatiques de ces composés, comme la voie des LG que nous développerons plus tard.

• Inhibition des COX

Au niveau transcriptionnel, le NO provoque une glutathionylation de Jun. Cette modification du facteur de transcription inhibe sa fixation à l'ADN et peut ainsi constituer un rétrocontrôle négatif sur de nombreux gènes surexprimés pendant l'inflammation [380]. Le NO nitrosyle également d'autres facteurs de transcription comme NFκB [381], et plusieurs autres protéines, par un mécanisme auto-catalytique [382]. Chez les macrophages, le TNFα a une action biphasique sur l'expression de COX-2 : il augmente la transcription jusqu'à 3 h de 1 à 10 ng/mL. Après lavage, le TNFα (50 ng/mL) réprime cette fois COX-2. Il est difficile de dire si c'est la dose ou la cinétique le facteur responsable, mais on voit que TNFα acquiert des propriétés anti-inflammatoires [205], soit après un temps d'action pro-inflammatoire, soit quand il a atteint une concentration critique. Une fois encore, on constate des disparités de

réponse anti-inflammatoire entre types cellulaires : IL-4 et IL-10 répriment COX-2 chez les monocytes, mais pas chez les PMN [204].

Bien sûr, la régulation négative de la voie COX passe aussi par une répression de son expression. P53 joue ce rôle par une compétition avec TBP pour fixer le promoteur de COX-2 [383]. PGE2, PGI2 et l'AA participent aussi à un feedback négatif réprimant COX-2 et iNOS chez les macrophages [384], de même que TGFβ [113].

Au stade post-traductionnel, PGE2 dessine une boucle de feedback négatif en activant PKa inhibitrice de la voie MAPK, elle-même responsable de l'activation de cPLA2 : indirectement donc, le produit de COX la prive de substrat [162]. De façon convergente, un autre produit issu de la voie COX, PGF2 active quant à lui PKc qui down-régule cPLA2.

Nous avons vu que la plupart des enzymes produisant les eicosanoïdes ont des auto-inactivations très rapides, qui concernent la COX, la Tx synthase, le PGI synthase, la LTA4 hydrolase, les 5-, 12- et 15-LOX [385].

Le NO et le peroxynitrite pourraient être d'autres inhibiteurs [358], mais les travaux concernant leurs implications dans la synthèse des eicosanoïdes sont souvent contradictoires.

Différents inhibiteurs de COX ont été décrits ou mis en évidence, comme le GSH. Les autres substrats de COX que l'AA pourraient également constituer des inhibiteurs, sous forme de substrats gratuits : l'EPA est ainsi mauvais substrat à l'origine de PGH3, mais il est excellent inhibiteur compétitif de l'AA pour la production de PGH2 [273]. De plus, les COX peuvent être acylées : l'incubation de plaquettes avec l'AA résulte en effet en une formation d'adduits concernant 10 à 15 protéines dont COX-1 simultanément inhibée [386]. Ce processus implique probablement un métabolite de COX elle-même, puisqu'on peut aussi l'observer avec COX-1 purifiée. Il diffère de l'auto-inactivation proprement dite, car celle-ci est atteinte à 96 % en 1 min tandis qu'on ne mesure que 0,5 mol d'adduit par mol de COX en 10 min [387]. Ces adduits pourraient être le fait de lévuglandines (LG) comme LGE2 et LGD2 formant 20 % des dérivés de PGH2 incubée dans l'eau (le reste étant essentiellement PGE2 et PGD2). Ces composés permettent un taux d'adduits de 9,3 mol par mol de COX-2 après 2 min d'incubation pour 59 mol d'AA oxydé. Les adduits se forment avec des Lys (base de Schiff et lactame). Cette formation d'adduit est également observée avec des protéines normalement acétylées comme l'ubiquitine et des histones, en créant des polymérisations de protéines [388].

COX peut encore être régulée négativement par une déplétion en substrats issus des PLA2. La plupart des cellules sont naturellement sensibles aux sPLA2, dont IIA- et V-sPLA2, mais se désensibilisent après contact avec l'enzyme. La lysolecithine, comme les 1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-(phospho-1-glycérol) reversent ou préviennent cette résistance, en partie via cPLA2. La réversion de la résistance des cellules s'accompagne d'un mouvement translamellaire des PL puisque PE se retrouve en surface cellulaire. Simultanément, les cellules libèrent des vésicules contenant PE et PC. On peut donc supposer que l'insensibilisation est au moins en partie due à l'épuisement des PE du feuillet externe, substrat préférentiel de la IIA-PLA2 [168]. Cette insensibilisation des cellules aux sPLA2 pourrait aussi participer à la résolution de l'inflammation.

• Apoptose des cellules activées

La disparition des cellules activées, qui se sont plus ou moins spécialisées dans la production de molécules pro-inflammatoires, est encore une stratégie de régulation. Une accumulation des AG, et de l'AA tout particulièrement, accompagne souvent l'apoptose [389]. On peut donc supposer que l'inhibition des enzymes de la cascade de l'AA, que ce soit par auto-inactivation ou par d'autres facteurs, provoque une accumulation de produits de

PLA2 et puisse être un déclencheur de l'apoptose. Chez des cellules cancéreuses, l'inhibition de 5-LOX induit une apoptose rapide, associée à la carence en 5-HETE [348].

Les PPAR sont cruciaux dans ces phénomènes d'apoptose. PPARα et γ induisent ainsi l'apoptose chez les macrophages saturés en lipides [390]. L'action pro-apoptotique des PPAR est certainement liée à leur inhibition de NFκB, lui-même crucial dans la survie cellulaire.

Le nettoyage des cellules apoptotiques par les phagocytes appartient à la phase ultime de la résolution. La reconnaissance de ces cellules est permise par des modifications de surface : exposition de glucides spécifiques (lectines) et formation de ponts intercellulaires (thrombospondine, C3b). La phagocytose est également associée à une perte d'asymétrie des PL de surface cellulaire, en particulier par la présence de PS sur le feuillet externe : des cellules incapables d'exposer la PS en surface ne sont pas phagocytées, même quand elles sont apoptotiques [391]. L'insensibilisation des cellules aux sPLA2, que nous avons décrite précédemment, s'accompagne de l'exposition de lipides du feuillet interne en surface. Il est donc probable que la PS suive le même mouvement, induisant ainsi peut être la phagocytose de cellules activées.

A. 3. b) Apparition des acteurs anti-inflammatoires

• Protéines à action anti-inflammatoire

Plusieurs protéines et enzymes ont des fonctions anti-inflammatoires. C'est le cas d'Hsp72 et de son facteur de transcription HSF-1, par exemple. Ces 2 protéines sont actives et surexprimées dans les cellules infiltrées 48 h après le stimulus, quand l'inflammation qui était optimale à 24 h est en régression. L'injection du RE de HSF de Hsp72 dans la cavité pleurale augmente la réponse inflammatoire, en corrélation avec une diminution de l'expression de Hsp72 et de la fixation de HSF-1 à son promoteur, ce qui démontre un rôle anti-inflammatoire de Hsp72 [392].

Un autre membre de la famille de Hsp70, l'hème oxygenase-1 (HO-1) a également des propriétés anti-inflammatoires, comme l'hémine, un inducteur de HO-1, à partir de 24 h après le stimulus [393]. Le contexte cellulaire est cependant essentiel car dans d'autres circonstances, HO-1 est plutôt pro-inflammatoire [394].

La lipocortine, protéine de 40 kDa fixée aux membranes de monocytes et neutrophiles de façon dépendante du Ca^{2+}, inhibe l'activité des sPLA2 [206]. Parmi les lipocortines (Annexines 1 à 5), c'est en fait l'annexine-1 qui inhibe cPLA2 par interaction directe et pas par déplétion de substrat PL [170].

• PPAR et les cyclopentenones

Nous l'avons vu, de nombreux effecteurs aux actions pro-inflammatoires, le NO et les PG par exemple, peuvent aussi avoir des rôles anti-inflammatoires, tout au moins agir dans le sens d'une résolution de l'inflammation dans d'autres circonstances. C'est aussi le cas pour les facteurs de transcription que sont les PPAR.

PPARγ

Des ligands de PPARγ inhibent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et aux neutrophiles en diminuant l'expression de VCAM-1 et de la E-Sélectine [395]. Cette répression de la glycoprotéine de surface E-Sélectine des cellules endothéliales vasculaires passe par la fixation de LRF-1/ATF-3 sur le site NF-ELAM-1 du promoteur [396]. PPARγ inhibe aussi l'activation des macrophages et y réprime iNOS, Gel B et Scavenger A. Cette répression passe probablement par une inhibition des facteurs de transcription AP-1, NFκB et STAT-1 [397].

PPARγ régule aussi l'expression de nombreuses enzymes majeures de l'inflammation. Son expression est elle-même induite par certains facteurs humoraux produits durant l'inflammation : IL-4, GM-CSF mais ni l'IL-1 ni le TNF, induisent PPARγ1 dans les macrophages. PPARγ induit CD36 mais réprime iNOS, probablement via des produits de la voie 12/15-LOX (13-HODE ou 15-HETE) [347]. Le 15dPGJ2 (ligand de PPARγ) réprime la protéase GelB, iNOS et COX-2 et la production d'IL-1 par les macrophages. Il réprime encore des cytokines comme Il-1, TNF et IL-6 chez les monocytes, probablement par l'inhibition de AP1 [398].

Enfin, PPARγ induit des facteurs anti-inflammatoires, comme Hsp70, HSF-1 et HO-1 [399].

Le 15dPGJ2, mais pas PGE2, PGF2α, PGA1 ni PGD2, réprime COX-2 et cPLA2 et 5-LOX dans les fibroblastes synoviaux rhumatoïdes activés par l'IL-1 ; cependant, PPARγ ne semble pas impliqué (la troglitazone et un anticorps anti-PPARγ sont sans effet) [400]. Il faut dire que dans ces processus également, le type cellulaire est discriminant. Si PPARγ est à l'origine du rétrocontrôle de l'expression de COX-2 par 15dPGJ2 dans les macrophages, ce n'est pas le cas dans les cellules endothéliales. Le taux d'expression ou d'activation de ce récepteur nucléaire explique probablement cette contradiction car la transfection des cellules endothéliales avec PPARγ leur confère le même comportement que les macrophages [401]. La voie utilisée pour l'induction joue peut-être aussi puisque PPARγ a été rapporté répresseur de COX-2 dans ces mêmes cellules endothéliales activées par le PMA, par un mécanisme impliquant AP-1 au site CRE mais pas NF-IL-6 ni NFκB [402].

PPARα

Une autre isoforme, PPARα, a aussi des propriétés anti-inflammatoires. *In vivo*, des souris PPARα KO présentent une réponse inflammatoire plus longue que les sauvages, ce qui suggère un rôle anti-inflammatoire pour son ligand naturel supposé, le LTB4 [74]. Des aortes de souris PPARα KO ont également une réponse inflammatoire exacerbée. La répression d'IL-6 exercée par PPARα [403] passe par une interaction avec le RE de NFκB et de AP-1. Le Nt du LBD fixe Jun tandis que le Ct se lie à NFκB. L'interférence est réciproque, puisque P65 et Jun inhibent la transactivation de PPARα et *vice versa* [61]. Ce sont des agonistes de PPARα et pas γ qui répriment IL-6 et COX-2 dans les SMC [403]. Dans les SMC et les hépatocytes, l'activation de PPARα réprime les gènes pro-inflammatoires (VCAM-1, COX-2, IL-6) et interfère négativement avec NFκB. Ils induisent également IκBα [404].

L'activité anti-inflammatoire de PPARα est elle-même régulée par des cytokines. En effet, le facteur STAT-5b, activé par phosphorylation en réponse à IL-2, IL-3 et IL-5, inhibe la transcription de gènes sous contrôle de PPAR [405]. Cette inhibition a pour cible la fonction AF1 des 3 PPAR, mais n'est pas due à une compétition pour le PPRE ni à une interaction protéine / protéine entre STAT et PPAR [406].

Outre leur activation de PPARγ, les cyclopentenones ont une fonction anti-inflammatoire, en inhibant directement IKKβ, kinase responsable de la phosphorylation de IκB [407].

• COX-2 et les PG

L'induction et l'activité des COX suivent plusieurs phases, durant la réponse inflammatoire. Dans les mastocytes, COX-1 et TxS sont essentielles dans la réponse immédiate (1h), qui se caractérise par une faible production de PGE2 comparativement à TxB2, tandis que COX-2 devient prépondérante dans la phase tardive (vers 4 h), où on observe une forte production de PGE2, par un couplage fonctionnel entre COX-2 et PGES [138]. cPLA2 est indispensable dans les 2 phases [172]. Nous avons vu précédemment qu'elle

est à la fois source de substrat pour COX et indispensable à l'induction de V-sPLA2 et de COX-2 durant cette phase tardive [173].

Dans une phase encore plus tardive (12-24 h) COX-2 est à nouveau up-régulée chez les cellules inflammatoires, qui ne produisent alors plus de PGE2 mais PGD2 et 15dPGJ2 dont nous avons vu les effets anti-inflammatoires [408]. La surexpression de COX-2, comme la production de 15dPGJ2, PGA1 et PGA2 inhibent la translocation nucléaire de NFκB [32]. PGF2α pourrait aussi avoir des propriétés anti-inflammatoires car il a une action opposée à PGE2 dans la formation de l'œdème ; il est lui aussi produit tardivement (48 h) [393]. Plus que les produits enzymatiques eux-mêmes, c'est peut-être l'équilibre PGE2 / PGD2 / 15dPGJ2 qui distingue l'effet pro- ou anti-inflammatoire de COX-2. L'équilibre NO / PGE2 pourrait constituer un autre facteur clef. En effet, si la quantité de NO est maximale avant 6 h dans un modèle d'inflammation chronique *in vivo* quand celle de PGE2 n'a pas encore augmenté, on observe une inversion de ce rapport de concentration en phase de résolution après 15 j, où le taux de PGE2 est maximal quand NO est minimal [409]. L'activité de iNOS est ainsi importante en phase aiguë (6 h) et chronique (7 j) puis diminue en début de phase de résolution pour remonter à partir de 21 j [5].

Il a été émis l'hypothèse qu'une COX-3 putative pourrait être à l'origine de la modification de profil métabolique observée en phase de résolution [410, 411].

• Autres eicosanoïdes

EET et HETE

Les EET (époxy-eicosatriénoates) issus du métabolisme de l'AA par des CYP ont de nombreuses fonctions biologiques, dont des propriétés anti-inflammatoires [346],[412]. Ils répriment ainsi des molécules d'adhésion comme VCAM et la E-Sélectine [413]. Leurs effets sont modulés par les diverses FABP intracellulaires pour lesquelles ils entrent en compétition avec l'AA : la hFABP fixe ainsi les EET et HETE, avec une affinité 10 et 50 fois moindre que l'AA respectivement [414].

Les divers HETE sont produits à la fois par les COX (produits secondaires, en général) et les LOX. Ces composés ont de nombreuses propriétés associées à un rôle anti-inflammatoire : le 15-HETE inhibe ainsi la production d'anion superoxyde par les PMN, via l'inhibition de la PLPc [415]. Les 15-R et 15-S-HETE inhibent la production de LTB4 par les PMN [416]. Chez les neutrophiles, le 5-HETE est rapidement incorporé dans les lipides, via la formation de 5-HETE-CoA, ce qui limite son action. Son dérivé 5-oxo-HETE est lui moins sensible à ce métabolisme et peut se fixer à un GPCR [417]. La production des HETE est loin d'être marginale, même si elle est beaucoup moins étudiée que celle des PG ; ainsi les plaquettes stimulées au collagène produisent 2,5 fois plus de 12-HETE que de TxB2, et 4 fois plus que de 8-epi-PGF2α. *In vivo*, la concentration plasmatique de TxB2 atteint 250 ng/mL tandis qu'on retrouve 230 pg/mL de 8-epi-PGF2α [418].

Lipoxines

Les principales lipoxines sont LxA4 et LxB4 (Figure 35). Elles sont issues du métabolisme transcellulaire de l'AA par les voies LOX. En effet, la biosynthèse des lipoxines requiert l'action séquentielle de 2 LOX ; or les cellules expriment rarement 2 LOX (mis à part les leucocytes disposant de 5- et 12-LOX). Leur synthèse débute par la formation de LTA4 par la 5-LOX ensuite transformé en LxA4 par la 12-LOX. Le 15-R-HETE peut quant lui être métabolisé en 15-epi-LxA4 et 15-epi-LxB4 par la 5-LOX. Les Lx et epi-Lx ont de nombreuses propriétés associées à un rôle anti-inflammatoire, comme l'inhibition du trafic des PMN et éosinophiles, la stimulation du nettoyage des cellules apoptotiques au site

inflammatoire et la modulation de l'activité de métalloprotéases stimulées par les cytokines [419]. Le 15-epi-LxA4 inhibe aussi l'adhésion des PMN [420]. Le LxA4 et le 15-epi-LxA4 inhibent l'infiltration des neutrophiles dans un modèle inflammatoire, probablement par la fixation à leur récepteur LxA4R, très exprimé chez les neutrophiles [421]. Ce récepteur est inductible par l'IL-1 chez les fibroblastes synoviaux, où LxA4 réprime IL-6, IL-8 et MMP-3. Il induit en revanche TIMP-1 et -2, à des concentrations de 10^{-11} à 10^{-9} M [422]. Outre ce récepteur, le 15-epi-LxA4 est aussi ligand de LTD4-R mais pas de LTB4-R [423]. Le LxA4 inhibe à faibles concentrations (1-10 nM) la production d'anion superoxyde et la libération d'IL-1 par les PMN [424].

Parmi les produits des voies LOX, les hépoxilines (hydropéroxydes formés par la voie 12-LOX) pourraient aussi présenter des effets anti-inflammatoires. Elles ont de nombreuses fonctions biologiques *in vitro* mais sont instables. HxA3 et HxB3 inhibent ainsi faiblement l'agrégation plaquettaire [425]. Leur principal mode d'action repose sur l'inhibition de la libération du Ca^{2+} par les médiateurs inflammatoires chez les neutrophiles [426].

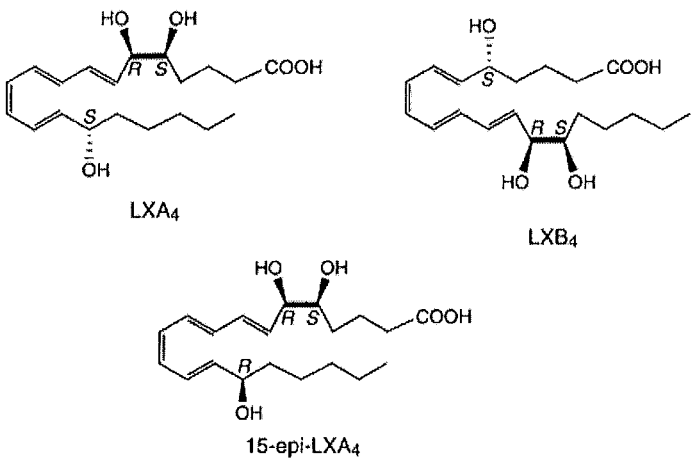


Figure 35 Structure chimique des lipoxines principales

B. Les anti-inflammatoires propioniques

B. 1. Place dans la thérapie

Parmi les anti-inflammatoires, on peut distinguer 2 classes majeures, les molécules à structure chimique stéroïde (cortisone, dexaméthasone) et les autres, non stéroïdiens. Parmi ceux-ci, on différencie les anti-inflammatoires non stéroïdiens proprement dits (AINS) des salicylés (aspirine, diflunisal). La découverte de l'isozyme de COX inductible au site inflammatoire a donné naissance à de nouveaux inhibiteurs sélectifs de COX-2 (ISC).

Il existe plusieurs classifications des anti-inflammatoires non stéroïdiens s'appuyant essentiellement sur le mode d'action par rapport à leur cible principale COX. On distingue souvent 4 classes :

1. Les inhibiteurs sélectifs de COX-1 (faible dose d'aspirine)
2. Les non sélectifs (forte dose d'aspirine, indométacine)
3. Les préférentiels de COX-2 (méloxicam)
4. Les sélectifs de COX-2 (ISC) (célécoxib, rofécoxib)

Une autre classification, plus mécanistique, partage :

1. Les inhibiteurs irréversibles de COX-1 et / ou COX-2 (aspirine, acetoxy-phenyl-hept-2-ynyl sulfide [APHS])
2. Les compétitifs réversibles de COX-1 ou COX-2 (ibuprofène, piroxicam, méfénamate)
3. Les réversible de dissociation lente « dépendants du temps » (indométacine, flurbiprofène)
4. Les irréversibles de fixation lente « dépendants du temps » (célécoxib, rofécoxib) [427].

B. 1. a) Anti-inflammatoires stéroïdiens

Ils agissent au niveau transcriptionnel de gènes impliqués dans l'inflammation, en réprimant l'induction des principaux acteurs enzymatiques pro-inflammatoires, et parfois en up-régulant l'expression de gènes anti-inflammatoires. Ainsi le cortisol réprime l'induction de COX-2 [428], les glucocorticoïdes répriment iNOS et COX-2 chez les macrophages murins [429] et dans le cortex rénal [430], et probablement PLA2 [149]. Ils induisent par contre les lipocortines, inhibiteurs de sPLA2 [431], et diminuent la libération d'AA par l'induction de l'inhibiteur de cPLA2 P11 [432].

La dexaméthasone réprime COX-2 et PGES chez les macrophages [332], elle inhibe l'induction de COX-2 induite au LPS via NFκB [429], et chez les synoviocytes incubés avec du NO [359]. Elle réprime également COX-2 et cPLA2 des cellules épithéliales [26]. La répression de COX-2 est associée à la diminution de la fixation de P50 et P65 sur le site NFκB (-223/-214) de son promoteur [429]. De surcroît, la dexaméthasone augmente l'instabilité du messager de COX-2, diminuant sa demi-vie de 90 à 40 min [198]. Elle réprime aussi PGES chez les macrophages [332] et cPLA2 chez les fibroblastes et les cellules endothéliales [135]. Elle n'a par contre globalement pas d'effet sur l'expression de iNOS ; en fait, elle réprime iNOS à 30 % mais rallonge la demi-vie de son mRNA chez les SMC activées par l'IL-1 [113].

Le cortisol comme la dexaméthasone répriment les molécules d'adhésion que sont la E-Sélectine et ICAM-1 [433].

Des dérivés stéroïdiens triterpénoïdes répriment iNOS et COX-2 par inhibition de la libération de IκB dans les macrophages murins [429]. Les lactones de sesquiterpènes (hélénaline, chamissonolide, extraits de fleurs d'*Arnica montana et chamissonis*) sont elles-aussi responsables d'inactivation de NFκB par une acylation directe de P65 qui l'empêche alors de fixer l'ADN, malgré sa translocation dans le noyau [434].

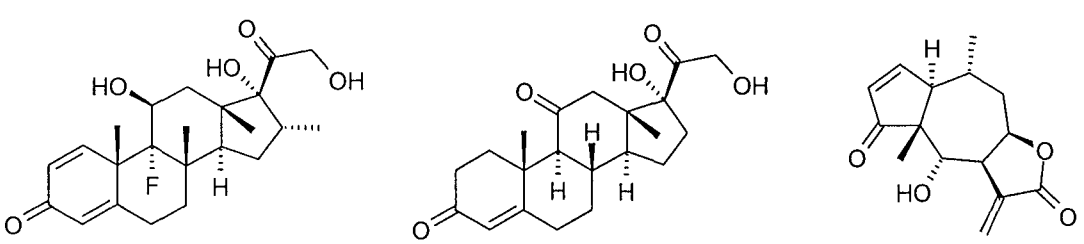


Figure 36 Structures chimiques de quelques stéroïdes et composés naturels aux propriétés anti-inflammatoires

B. 1. b) Salicylés

In vivo chez l'Homme, on distingue 3 doses d'action différentes pour l'aspirine : à faible dose (80 mg/j), elle inhibe COX-1 (inhibition de la production de TxA2 par les plaquettes). A dose moyenne (2 à 4 g/j), elle inhibe COX-1 et COX-2 et bloque la production de PG. A haute dose (6 à 8 g/j), elle est utilisée comme la cortisone dans les pathologies inflammatoires, où son action passe par un mécanisme non totalement résolu. L'aspirine est inhibiteur irréversible des COX à activité perdurante. En effet, le recovery de l'activité est très long : il existe encore une inhibition de COX de 75 % dans la muqueuse gastrique 24 h après la prise, et de 85 % après 72 h dans les plaquettes. En extrapolant, la muqueuse comme les plaquettes sont remplacées avant la régénération de leur activité COX (durée de vie des plaquettes de 10 j et de 3 j pour la muqueuse) [435].

L'aspirine inhibe les COX par acétylation de S530. La chaîne acyle de l'aspirine a son importance dans la sélectivité d'inhibition des COX. En effet, si la chaîne heptanoyle est optimale pour l'inhibition des 2 COX, les chaînes acétyle (aspirine) et propionyle sont également assez efficaces. Le valéryle permet une sélectivité pour COX-1 [436]. D'autres dérivés de l'aspirine, comme le o-(acetoxy-phenyl)hept-2-ynyl sulfide (APHS), confèrent en revanche une sélectivité pour COX-2, alors que l'aspirine est plutôt sélective de COX-1 [437].

L'environnement immédiat de S530 est crucial dans le mécanisme d'acétylation, en particulier Y348, Y385 et R120 qui forment probablement un réseau de liaisons H [438]. L'acétylation de COX-1 se traduit par une extinction totale de l'activité enzymatique. En revanche, l'acétylation de COX-2 provoque surtout une modification du profil des produits de l'enzyme : plus de PGH2 mais davantage de 11-S-HETE et 15-S-HETE et apparition de 15-R-HETE, qui n'est produit que dans ces conditions. Une mutation S530M a les mêmes conséquences catalytiques que l'acétylation de l'enzyme sauvage. Si on remplace les résidus discriminants dans le site actif de COX-2 par ceux de son isozyme, on génère le même comportement : le triple mutant V434 R513 V523 en IHI (résidus de COX-1) lui procure la même perte d'activité, comme V228F acétylée [282]. Le groupement acétyle doit forcer un réarrangement de l'extrémité ω de l'AA, puisque le 15-R-HETE présente une configuration du OH en 15 opposée à celle des PG [284]. L'acétylation diminue néanmoins l'affinité de COX-2 pour l'AA (Km décuplée) et pour les AINS : elle ne fixe plus les diclofénac et méclofénamate, mais reste inhibée par d'autres AINS (kétoprofène, flurbiprofène, ISC) [439].

Avec d'autres substrats que l'AA, COX-2 se comporte de la même manière et avec la même stéréochimie : production de 15-HETE-G à partir de 2-AG (15-R à 40 % du 15-HETE, 11-R -HETE à 99 % du 11-HETE) [276].

Si l'aspirine est responsable d'une inhibition irréversible des COX par acétylation, son métabolite principal, le salicylate n'est pas inhibiteur de COX. Il a néanmoins des propriétés anti-inflammatoires identiques à l'aspirine, et souligne d'autres modes d'action à fortes concentrations. Ainsi, l'aspirine et le salicylate inhibent la dégradation de IκB et l'entrée de NFκB dans le noyau (IC_{50} # 1 à 2 mM pour les deux) [440]. Cet effet pourrait être dû à une inhibition non sélective de kinases (80 % de l'activité kinase cellulaire inhibée, sans effet sur la viabilité), puisque le salicylate inhibe un bon nombre de facteurs de transcription [441]. Aspirine et salicylate interfèrent aussi avec la transduction du signal, en diminuant l'activation de ERK, MEK et la voie AMPc avec une IC_{50} # 1 à 8 mM. Ils inhibent l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales vers 10 mM [442]. Ils répriment également la transcription de TNFα par la même voie avec une IC_{50} # 1 mM [443], et sont répresseurs encore plus efficaces de COX-2 (EC50 = 1 μM) [444]. L'aspirine, comme le salicylate,

provoque la libération d'adénosine extracellulaire, qui présente un effet anti-inflammatoire par fixation à plusieurs récepteurs, mais indépendamment de l'inhibition des COX et de NFκB [445].

En revanche, seule l'aspirine inhibe iNOS et la réprime à fortes concentrations (30 % d'inhibition à 3 mM) [446].

Le salicylate peut inhiber la production de PG sans effet direct sur COX ni sur son expression (l'inhibition de l'activation de NFκB n'apparaît pas avant 140 mM). Il semblerait plutôt agir au niveau de l'approvisionnement de COX en AA (inhibition de PLA_2 ?) [447].

L'aspirine pourrait quant à elle priver COX de substrat car elle diminue d'un facteur 3 l'uptake d'AA et de LA pendant 3 j chez les monocytes [448]. Elle augmente l'activité PKa dans les neutrophiles et la concentration en adénosine extracellulaire. Des effets transcriptionnels sont probables puisqu'elle augmente en outre la fixation de HSF au DNA (EC_{50} # 15 mM) sans activer la transcription des gènes sous son contrôle : elle semble ainsi être un compétiteur de HSF activé par la chaleur [449].

Indirectement, l'aspirine agit enfin par l'action anti-inflammatoire des produits issus de la voie COX-2 acétylée : nous avons vu précédemment que le 15-HETE produit est substrat des LOX qui produisent les lipoxines. La COX-2 acétylée est ainsi à l'origine de 15-epi-LxA4 et de 15-epi-11-trans-LxA4, par synthèse transcellulaire entre des cellules endothéliales et neutrophiles [420]. Contrairement aux PG et LT (médiateurs essentiellement pro-inflammatoires), les Lx sont inhibitrices d'évènements clefs de l'inflammation, comme l'infiltration des PMN. Les différentes Lx produites ont des efficacités comparables (entre 15-epi-LxA4 / B4 et LxA4 / B4) [422]. Enfin l'aspirine inhibe iNOS et la réprime à fortes concentrations (30 % d'inhibition à 3 mM) [446].

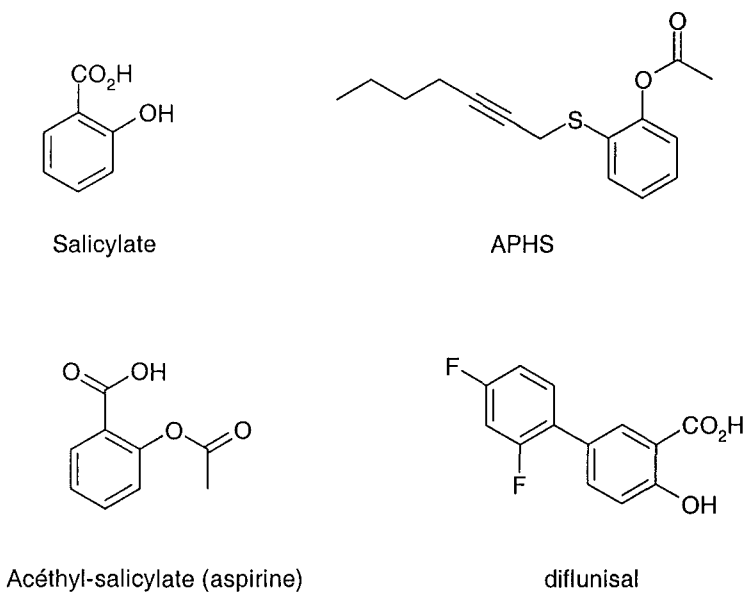


Figure 37 Structure chimique de quelques salicylés

B. 1. c) Inhibiteurs sélectifs de COX-2 (ISC)

La découverte d'une forme inductible de COX, et de son implication majeure dans les processus pro-inflammatoires a amené à penser que des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (ISC) pourraient apporter les effets thérapeutiques des AINS tout en prévenant les effets secondaires qu'on pensait alors dus uniquement à l'inhibition de COX-1. De nombreuses séries chimiques ont ainsi été développées. La résolution de la structure cristalline des COX a ensuite permis

d'affiner ces séries, en particulier en cherchant à tirer profit du volume du site actif de COX-2 supérieur à celui de COX-1, ainsi que de la présence d'une poche secondaire (Figure 38). Globalement, le volume du site actif de COX-2 est plus important que celui de COX-1 d'environ 25 % (394 $Å^3$ contre 316 $Å^3$). Le canal hydrophobe d'entrée est aussi plus vaste de 17%, et il existe une poche secondaire constituée par L352 et S353 plus vaste chez COX-2 [259]. Dans le site actif, une mutation H513R (de COX-1 à COX-2) est le discriminant majeur. I523V est important également [450], et le remplacement F503 (COX-1) → L (COX-2) à proximité immédiate lui permet une plus grande mobilité [451]. A527, ramassé sur le bord de la poche principale de COX-2, est plus gênant stériquement dans COX-1. La mutation de COX-1 I523V augmente ainsi sa sensibilité aux ISC, et le double mutant I523V H513R augmente encore cette sensibilité et entraîne une inhibition dépendante du temps de COX-2 [452]. *A contrario*, la mutation de COX-2 V509I (V523 selon la séquence primaire de COX-1) l'insensibilise à des ISC [453] et prévient son inhibition dépendante du temps qui n'existe pas chez COX-1 [450]. En ce qui concerne les inhibiteurs, la substitution des carboxyles d'AINS (indométacine et méclofénamate) par différents esters ou amides crée une sélectivité pour COX-2, et les dérivés obtenus deviennent inhibiteurs dépendants du temps [454].

On s'est en effet aperçu que les ISC présentent toujours une inhibition dépendante du temps, réversible mais à dissociation excessivement lente, au point qu'on les considère souvent comme des inhibiteurs irréversibles. Cette dépendance du temps est propre à l'interaction des ISC avec COX-2. Ils sont effectivement fixés rapidement par COX-1 comme par COX-2, mais forment ensuite un complexe stable avec COX-2 uniquement [455]. C'est plus la dissociation que l'association qui est responsable de l'efficacité de l'interaction des ISC avec COX-2. Le SC-299 présente ainsi une affinité pour COX-2 près de 1000 fois supérieure à COX-1. La différence de cinétique d'association k_{assoc} entre les 2 isozymes est trop faible pour expliquer la sélectivité. Par contre, la dissociation de COX-2 est 200 fois plus lente que celle de COX-1 [456].

On a longtemps pensé que l'inhibition dépendante du temps passait par un réarrangement conformationnel et allostérique de COX-2. Néanmoins, des inhibiteurs réversibles indépendants du temps (ester méthylique du flurbiprofène, ibuprofène) et des inhibiteurs dépendants du temps (flurbiprofène, aclofénac) ont des positions du carboxyle superposables dans les complexes avec COX, toujours situées dans le réseau de liaisons H formé par les résidus R120 Y355 et E524. La seule différence résiderait plutôt au niveau du phényle distal. De plus, la conformation globale de la protéine est toujours la même. La seule hypothèse permettant d'expliquer cette dépendance du temps serait donc plutôt une interaction transitoire des inhibiteurs dépendants du temps avec un autre site de fixation que le site actif [457]. D'autres travaux confirment cette hypothèse : des ISC sont inefficaces sur COX-1, mais leur pré-incubation diminue l'inhibition de l'aspirine ou de l'indométacine. Cet effet des ISC est réversible et levé par une pré-incubation avec l'AA. Comme l'AA, les ISC doivent donc pouvoir se fixer à un site secondaire [458].

Outre les séries chimiques développées pour constituer des ISC, certains produits naturels présentent cette sélectivité : c'est le cas du γ-tocophérol (IC50 = 7,5 μM dans les macrophages) [459], ou du resveratrol [460] (Figure 39).

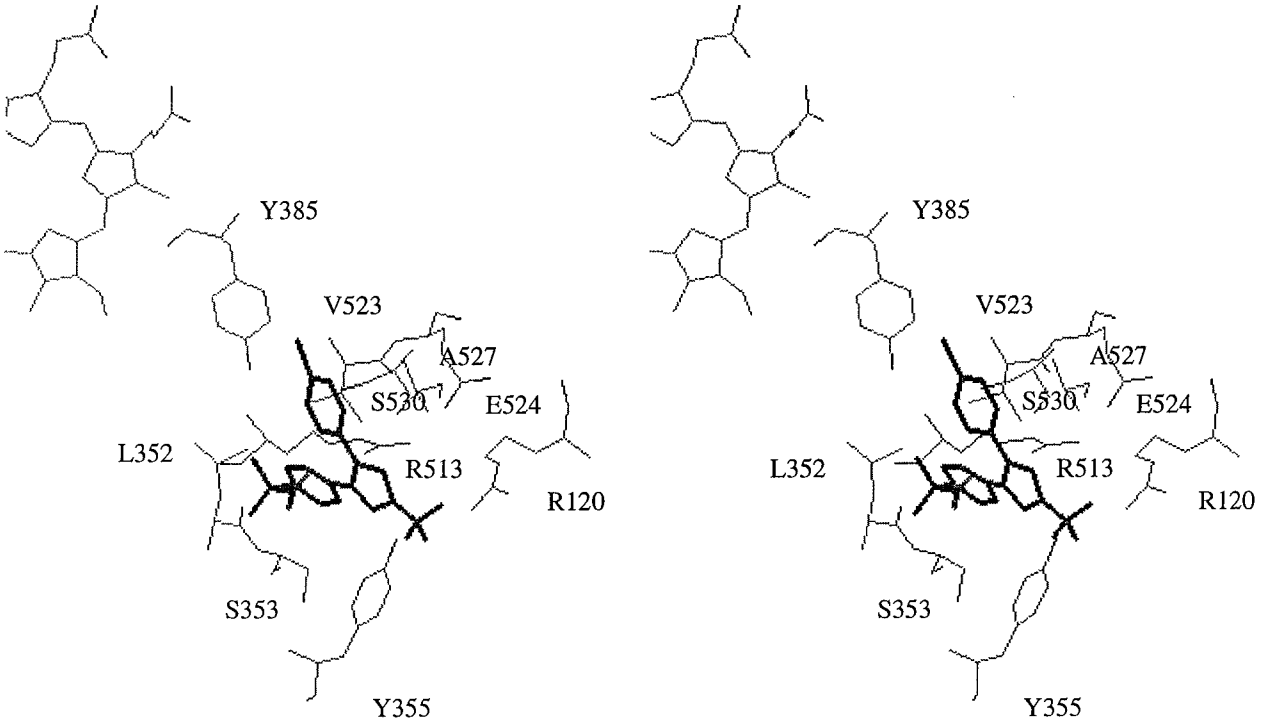


Figure 38 Structure tridimensionnelle du complexe COX-2 : SC 558 [461]

(d'après PDB : 1cx2 [461])

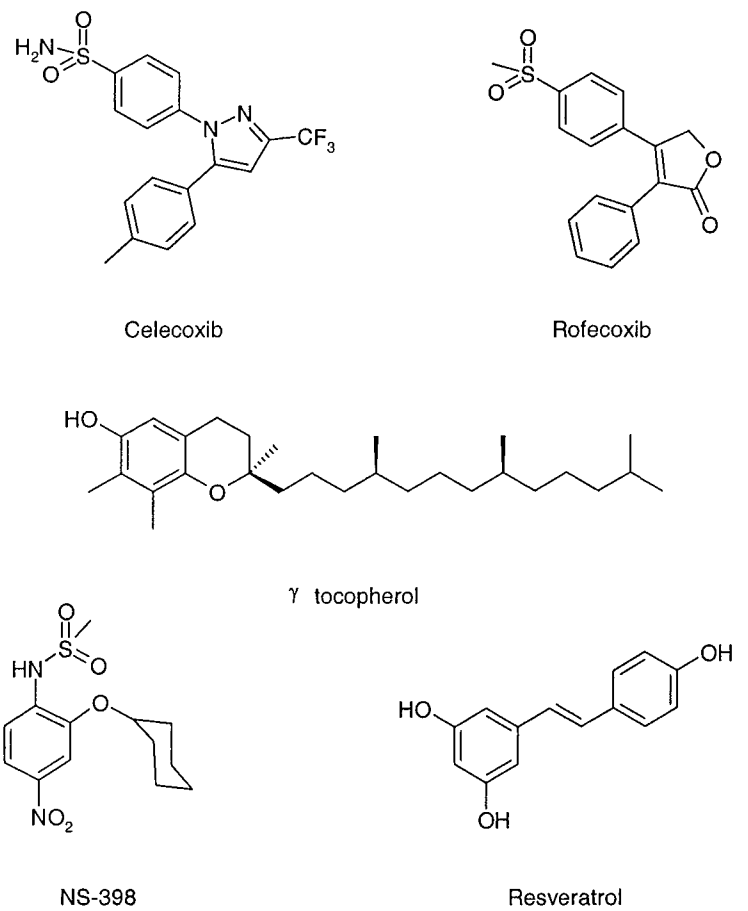


Figure 39 Structures chimiques de quelques ISC et inhibiteurs de COX d'origine naturelle

B. 2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent une classe thérapeutique très prescrite, principalement comme anti-inflammatoires (traitement de rhumatismes inflammatoires et dégénératifs) ; leur sont en outre associées des propriétés antalgiques, anti-pyrétiques et antiaggrégantes plaquettaires.

B. 2. a) Propriétés physico-chimiques

Répartis en 7 classes selon leur squelette de base, ils sont de structures chimiques assez différentes, souvent acides (arylpropionates), (pKa= 3~6) et de nature hydrophobe (coefficient de partition octanol/eau compris entre 3 et 4). Les arylpropionates et quelques autres présentent la particularité de comporter un carbone asymétrique, conférant une chiralité à la molécule.

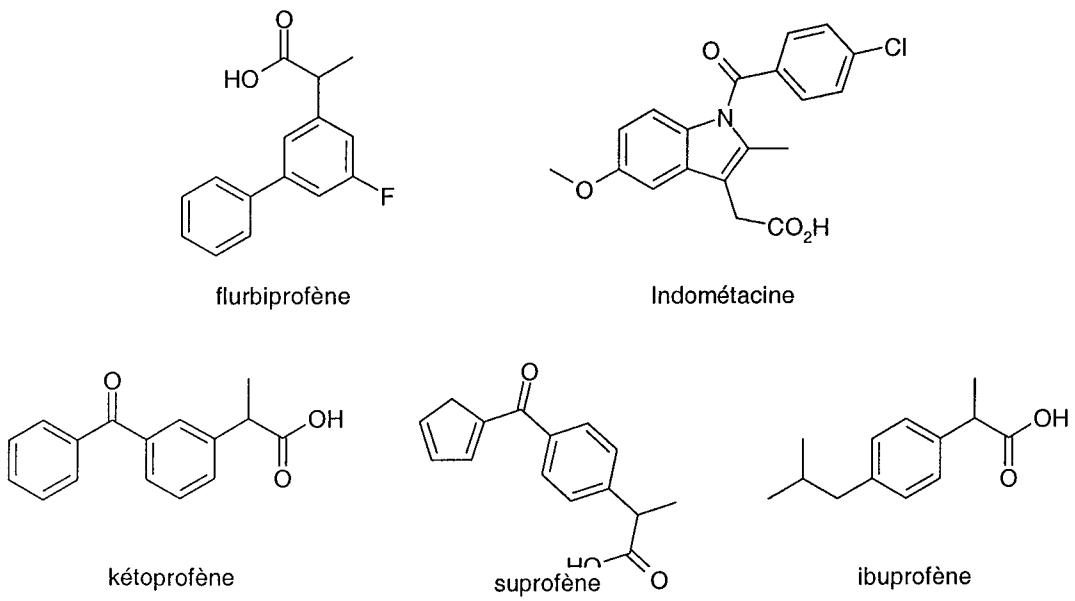


Figure 40 Structures chimiques de quelques AINS

B. 2. b) Pharmacocinétique

• Absorption

Diffusion passive

L'absorption cellulaire des AINS s'effectue à différents niveaux. Après ingestion, ils sont essentiellement absorbés par l'intestin grêle. Cette absorption est corrélée à la solubilité et à la perméabilité de la molécule [462],[463], ce qui suggère un transport passif. De nombreux travaux décrivent ainsi une absorption passive de ces médicaments, mais les modèles membranaires utilisés sont souvent plus ou moins artificiels (fantômes cellulaires, membranes cellulaires, membranes synthétiques). S'ils miment bien l'absorption de certaines cellules intestinales, ils peuvent être un très mauvais reflet de l'absorption par d'autres types de cellules. De plus, ces études sont souvent indirectes et menées dans des conditions peu physiologiques (ratio AG / albumine souvent très élevé). L'« uptake » non saturable d'oléate ne contribue ainsi à 50 % de l'incorporation globale qu'à partir d'un ratio oléate : BSA de 5, alors qu'il est inférieur à 3 dans les conditions physiologiques [464].

Diffusion facilitée

En fait, l'absorption par des cellules de divers acides carboxyliques comme les AINS, s'opère par deux types de transports. Une voie non saturable correspond à une diffusion passive à travers la membrane plasmique, comme on peut l'observer avec des cellules de type Caco 2. L'autre voie est plus efficace, saturable, stéréosélective et sensible à une inhibition et une compétition. Tous ces paramètres signent une voie due à des transporteurs [465]. On retrouve les mêmes propriétés de saturabilité, dépendance de la température dans l'uptake d'oléate par les myocytes [466]. Chez les adipocytes et les hépatocytes, l'uptake d'oléate suit à 90 % une voie saturable [464]. Les AG empruntent donc eux aussi des transporteurs, pour lesquels on connaît des inhibiteurs : la phlorétine (65 % d'inhibition à 200 μM), les DIDS et SSO, l'azistéarate (inhibiteur irréversible à 90 % à 400 μM), le pentachlorophénol, le diisosalicylate, la quercitine et des protéases (pronase, trypsine inhibiteurs à 90 % à 2g/L). Le taux d'inhibition de ces agents varie beaucoup d'un type cellulaire à l'autre [467], ce qui signifie peut-être que la proportion de transport facilité par rapport à la diffusion passive est elle-aussi fonction du type cellulaire.

Par analogie physico-chimique avec les AG, on peut penser que des xénobiotes tels que les AINS empruntent les mêmes voies de passages, c'est-à-dire différents récepteurs et transporteurs membranaires. On en compte au moins 5 dont 4 sont bien caractérisés :

- FAT (Fatty Acid Translocase)(=CD36) qui agit de concert avec la FABP intracellulaire ;
- ADRP (Adipose Differenciation Related Protein), très exprimée dans le tissu adipeux et les cellules à fort métabolisme lipidique. Elle est sélective des AG à chaîne saturée ou insaturée plus longue que 16 C ;
- pmFABP (plasmic membrane Fatty Acid Binding Protein) correspond à l'aspartate aminotransferase mitochondriale ;
- FATP (Fatty Acid Transport Protein), supposée impliquée dans le transport d'AG exogènes, a une forte homologie de séquence avec les vlcACS. On en connaît 6 isoformes, dont FATP-4 qui est très exprimée sur la face apicale des entérocytes de l'iléum et du jéjunum. Un antisens de ce transporteur inhibe l'uptake des lcAG à 50 % [468]. FATP est également impliqué dans l'« uptake » d'AG chez la levure. La disruption de son hétérologue de FATP inhibe l'incorporation de 20 à 50 % selon l'AG [469].

Les transporteurs peuvent être spécifiques de certains ligands : ainsi l'AA traverse les membranes d'hématies par des transporteurs différents de ceux du palmitate [470]. Ces transporteurs ne sont pas de simples pores fixes et inertes car certains semblent doués d'activité acyl-CoA synthétase (ACS), comme l'analogue de levure FAT1 dont la disruption diminue l'activité ACS cellulaire [467]. Le métabolisme intracellulaire constitue ainsi la force motrice de l'« uptake » des AG : celui du palmitate chez les myocytes requiert une protéine du sarcolemme, et l'inhibition du métabolisme cellulaire diminue l'incorporation du palmitate. En conditions normales, celui-ci est estérifié à 55 % et oxydé à 20 % en 3 min [471]. Chez les adipocytes, le métabolisme est encore plus rapide puisque 70 % de l'oléate est estérifié 15 s après l'« uptake » [464]. Ceci explique certainement que les concentrations extra- et intracellulaires d'AG ne s'équilibrent pas. FATP et ACS sont ainsi synergiques pour l'« uptake » d'AG chez les adipocytes [472].

L'expression des transporteurs est régulée par des médiateurs de l'inflammation : des endotoxines (LPS) induisent FAT dans le foie tandis qu'elles répriment les mêmes FAT et FATP dans les autres tissus ; des cytokines (TNFα, IL-1) répriment FATP et induisent FAT dans le foie, *in vivo* [473].

L'albumine pourrait également participer à ce transport facilité : l'« uptake » d'oléate est ainsi favorisé par la BSA, de façon saturable chez les adipocytes. L'albumine est alors fixée aux cellules par des processus saturables et non saturables [474]. Il existerait en effet des récepteurs à l'albumine qui pourrait ainsi libérer ses AG directement à leur transporteur [475], voire même subir une endocytose, comme on a pu le montrer chez les cellules endothéliales [476]. Les transporteurs intracellulaires sont aussi fortement impliqués. En effet, un anticorps anti-hFABP inhibe l'uptake à 50 % chez les myocytes [466].

• Métabolisme

La plupart des AINS subissent différentes hydroxylations et conjugaisons. Le métabolite majoritaire est bien souvent, et de loin, le glucuronide. Le kétoprofène (KPF), modèle de notre étude, forme au moins 2 hydroxyles et 2 glucuronides chez l'Homme [477]. 70 % de la dose sont retrouvés dans les urines totales de 24 h dont 93 % sous forme de glucuronides [478], et seulement 0,5 % non métabolisé [479]. Son incorporation dans le tissu adipeux et le phénomène d'inversion chirale, observés *in vivo* chez le Rat, passant obligatoirement par un intermédiaire acyl-coenzyme A, permettent de supposer qu'il s'agit là d'un autre type de métabolite qu'on ne détecte pas directement (Figure 41).

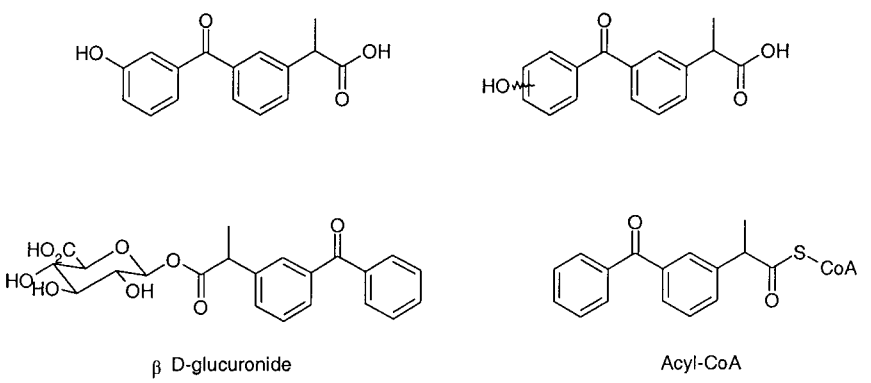


Figure 41 Métabolites de KPF chez l'Homme

En haut : hydroxylés produits durant la phase I, en bas : métabolites conjugués (d'après [477])

Biosynthèse et devenir des glucuronides

Déjà fonctionnalisés par leur carboxyle, les arylpropionates sont substrats d'une ou plusieurs isoformes d'UDP-Glucuronosyltransférase (UGT) hépatiques et/ou rénales (Figure 42). Il existe souvent une énantiosélectivité de la conjugaison : le S-ibuprofène est ainsi glucuronoconjugué presque 10 fois plus que son antipode chez l'Homme [480]. La conjugaison du KPF par des microsomes hépatiques de Rat n'est en revanche quasiment pas énantiosélective [481].

Il existe de fortes variations tissulaires d'expression des UGT, en particulier pour la 2a2 et les 1a dans le tractus gastro-intestinal. De plus, ces enzymes font l'objet de régulations interindividuelles polymorphiques, comme pour les isozymes 1a1, 1a6, 2b4, 2b7 et 2b15. La conjugaison extra-hépatique est peu décrite et certainement sous-estimée ; elle est cependant importante dans l'intestin [482].

Le glucuronide ainsi formé permet une augmentation considérable de l'hydrosolubilité de l'acyle, apportant un ΔlogP de l'ordre de -2; Ainsi le glucuronide de diflunisal a un logP de 2,4 quand celui du diflunisal est de 4,2 [483]. Excrété de la cellule par des transporteurs

multi-anions spécifiques (Pompe à efflux ATPasique type $MOAT_{3,4}$ des eythrocytes, par exemple [484]), il est finalement éliminé par les reins.

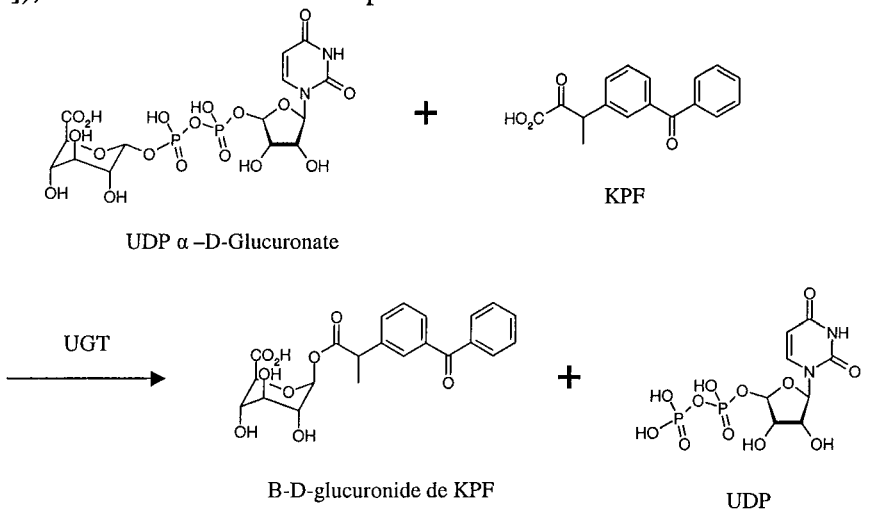


Figure 42 Schéma réactionnel de la glucuronidation du KPF

Formation d'un β-glucuronide par inversion de configuration de l' α-glucuronate initial due à un mécanisme SN2

La présence d'une liaison ester entre le médicament parent et le glucuronate le rend très réactif, contrairement aux éthers glucuronides. Trois types de réactions peuvent en effet être observées :

• hydrolyse

L'hydrolyse du glucuronide de kétoprofène (KPF-Glc), composé intrinsèquement instable, est favorisée par les protéines, en particulier l'albumine [485]. La libération de l'aglycone qui s'ensuit provoque une redistribution du médicament dans l'organisme (cycle futile).

• acylmigration

La migration de l'acyle depuis le C1 (Figure 43) vers les autres carbones hydroxylés du sucre, observée pour quasiment tous les glucuronides, peut avoir diverses conséquences, telles une perte de reconnaissance par les β-glucuronidases (spécifiques des β1), comme il a été montré pour les isomères de glucuronide de diflunisal [486], ou différentes aptitudes à la fixation protéique, même si les isomères précédents semblent former autant d'adduits.

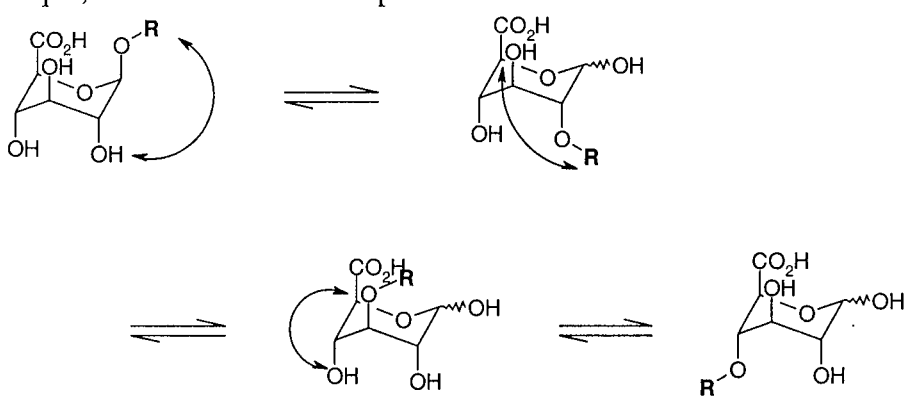


Figure 43 Mécanisme de l'acylmigration

Mouvement du groupement R de sa position initiale β-1 vers les positions 2, 3, 4 suivantes du sucre. Chaque étape est réversible, mais le retour en position 1 peut s'effectuer en β ou en α. (d'après [487])

Des études avec le zomépirac et le tolfénamate montrent qu'ils subissent des isomérisations dans l'urine à pH physiologique [488],[489]. La réversibilité de cette isomérisation a été démontrée avec le diflunisal, en partant d'isomères βx (x=2,3,4) qui reviennent spontanément vers le β1 [490]. Des cinétiques d'isomérisation ont par ailleurs été étudiées pour le méthylbenzoate, qui subit une migration spatiale séquentielle sur le glucuronate [487] (Figure 43), et pour le KPF où les constantes de vitesse d'isomérisation ont été calculées [491].

• fixation irréversible

Du fait de leur réactivité, les acylglucuronides sont capables de se fixer irréversiblement aux protéines pour former des adduits. Des adduits plasmatiques et microsomiaux ont ainsi été mis en évidence avec le naproxène, acylant l'albumine et des protéines membranaires de 39 et 62 kDa. Quantitativement, il existe environ 10 fois moins d'adduits plasmatiques que de glucuronide, et 500 fois moins de glucuronide que de médicament non métabolisé chez l'Homme [492]. La formation de ces adduits passe par 2 mécanismes possibles : attaque nucléophile ou intermédiaire imine (formation d'une base de Schiff). Ces 2 mécanismes semblent coexister, selon l'AINS conjugué et les acides aminés impliqués dans sa réaction. Nous étudierons plus tard les conséquences que peut avoir la formation de ces adduits (paragraphe II_B. 3. a) .

Biosynthèse et devenir des acyl-CoA

L'existence de l'acyl-CoA d'un AINS n'a jamais été directement montrée dans les études métaboliques. Il s'agit en effet d'un intermédiaire assez labile et à durée de vie très limitée. De plus, il n'est jamais libre mais toujours associé soit aux membranes, soit à des transporteurs intracellulaires. Le seul acyl-CoA de xénobiote directement caractérisé est celui de l'acitrétine, lui-même métabolite du rétinoïde étrétinate [493].

◊ Synthèse

La biosynthèse de l'acyl-CoA d'AINS est très stéréosélective et concerne essentiellement l'énantiomère R. Chez le Rat par exemple, le R-KPF est plus thioestérifié que son antipode, et les enzymes impliquées sont différentes : prépondérante dans les mitochondries pour le R-KPF (un peu dans les microsomes et très peu dans le cytosol), alors qu'elle est essentiellement cytosolique pour le S-KPF [494]. On a également mis en évidence au moins 2 activités enzymatiques responsables de la thioestérification de l'ibuprofène. L'une d'elles, de forte affinité (Km = 60 nM) est énantiosélective de l'énantiomère R, l'autre, de plus faible affinité n'est pas énantiosélective [495]. La thioestérification des R-fénoprofène et R-ibuprofène est prépondérante dans le foie et le diaphragme, mais on la détecte aussi dans les muscles, le rein et le tissu adipeux [496]. Le cerveau est aussi le siège d'une thioestérification des AINS. Si son activité spécifique ne représente que 12 % de l'activité hépatique pour le R-fénoprofène, son efficacité par rapport au palmitate est en revanche du double [497].

Comme la glucuronoconjugaison, cette voie de métabolisme des AINS présente des variations interindividuelles, avec des activités variant de 1 à 3 pour l'ibuprofène, par exemple, chez le Rat [495]. Il existe aussi une forte variation de ce métabolisme entre différents mammifères, de 1 à 30 avec le fénoprofène, par exemple [498].

La formation des acyl-CoA d'AINS entre en compétition avec celle des lcAG, ce qui montre qu'elle est principalement due à une activité lc ACS. Ces enzymes acceptent d'ailleurs d'autres xénobiotes comme substrats, ainsi l'étomoxir, avec la même stéréosélectivité pour l'énantiomère R [499].

La "R-ibuprofenyl-CoA synthétase", protéine de 72 kDa très exprimée dans le foie est vraisemblablement une ACS. Cette enzyme a en effet une activité élevée avec des lcAG (palmitate, AA) et faible avec des mcAG. Elle est très sélective du R-ibuprofène mais son antipode, s'il n'est pas substrat, est inhibiteur (Ki = 400 µM) [500]. Parmi les AINS, elle présente une certaine sélectivité envers le R-ibuprofène, devant le R-KPF et le R-flurbiprofène (les énantiomères S ne sont pas substrats) [501].
L'ACS-1 est l'ACS prépondérante dans la thioestérification des AINS propioniques, mais l'ACS-2 y participe aussi [502], ainsi que l'ACS-5 [503]. Relativement au palmitate, la thioestérification des AINS par ACS-1 et ACS-2 est loin d'être marginale, puisqu'elles ne sont respectivement que 2 et 4 fois moins efficaces envers le R-ibuprofène qu'envers l'AG. ACS-1 est 2 fois plus efficace envers le R-ibuprofène comparativement au palmitate que la "R-ibuprofenyl-CoA synthétase".

Les AINS pourraient constituer un feedback positif par leur rôle d'agoniste de PPAR. En effet, l'ibuprofène, par exemple est activateur de PPAR *in vivo* [37]. Dans les tissus où l'expression des ACS est régulée par les PPAR, comme dans le foie où PPARα up-régule ACS-1, les AINS pourraient favoriser leur propre métabolisme par la voie du CoA.

Si la thioestérification est fortement stéréosélective en faveur du R, le thioester de l'antipode S peut cependant apparaître après plusieurs étapes enzymatiques. Le mécanisme d'inversion chirale, propre à de nombreux AINS, entraîne en effet l'existence de l'acyl-CoA de chacun des énantiomères (Figure 44).

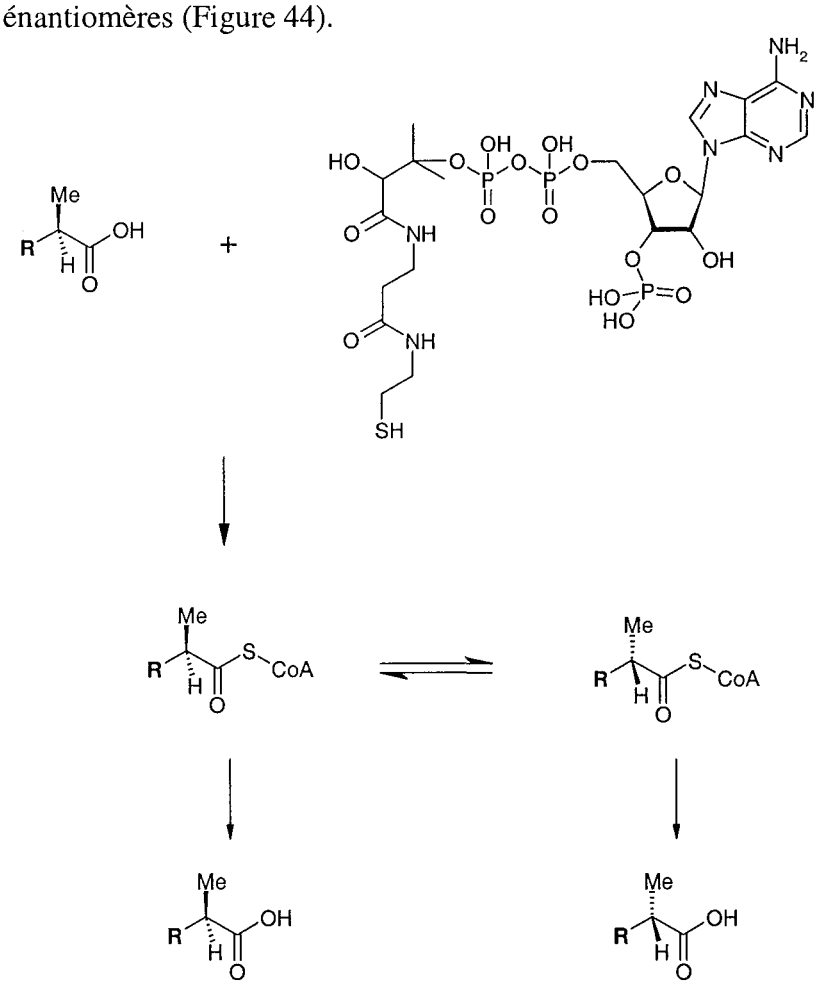


Figure 44 Synthèse et cycle de l'acyl-CoA des arylpropionates (AP)

Le R-AP-CoA est produit à partir du R-AP et épimérisé en S-AP-CoA. Une hydrolyse est alors possible pour libérer le R-AP initial ainsi que son antipode S

◊ Epimérisation

L'inversion de configuration des AINS est une conséquence de l'épimérisation de leur acyl-CoA. En effet, le proton α du KPF, par exemple, est trop peu acide et s'échange trop peu pour que l'inversion s'effectue spontanément, avec une demi-vie de 92 h [504].

L'inversion des AINS est systémique et pré-systémique chez le Rat, impliquant le tractus gastro-intestinal et le foie [505]. Elle se déroule essentiellement dans les mitochondries, peu dans les microsomes et pas dans le cytosol [506],[496]. Le taux de cette inversion ainsi que son sens énantiomérique est très variable selon l'espèce animale et l'AINS considéré [507],[508],[509] : elle est ainsi unidirectionnelle de R vers S à 80 % pour le KPF chez le Rat, 30 % chez le Cochon d'Inde, 50 % chez le Singe, 60 % chez la Souris. Chez l'Homme, elle est de 10 % de R vers S. Chez la Souris, l'inversion du S-KPF en R existe également [510]. La stéréosélectivité de l'inversion des AINS est due à celle des acyl-CoA synthétases car le taux d'inversion de configuration de l'ibuprofényl-CoA est identique pour les 2 énantiomères dans les mitochondries et les microsomes de foie de Rat, avec une activité mitochondriale supérieure [511],[512].

Une protéine hépatique a été purifiée d'après sa propriété d'inversion de l'ibuprofényl-CoA. Cette protéine ne nécessite aucun cofacteur et n'a pas de pH optimum. Elle est cytosolique (50%) et mitochondriale (30%) [513]. Le clonage de cette α-méthyl-acyl-CoA racémase (P70473) a révélé qu'il s'agit d'une protéine de 42 kDa exprimée principalement dans le foie et les reins, mais aussi dans le cœur et le cerveau [514].

Le mécanisme de l'inversion chirale n'implique pas la formation d'un alcène intermédiaire (pas d'échange isotopique sur le méthyle) [515], même s'il passe par une acidification du proton lié au carbone chiral, comme l'a montré son échange isotopique chez les microorganismes (*Cordyceps militaris*) capables d'inverser à 84 % la configuration de 2-aryl-propionates [516], ou *in vivo* avec le R-ibuprofène (Figure 45) [517]. Il procède certainement du mécanisme de la mc acyl-CoA DH [518].

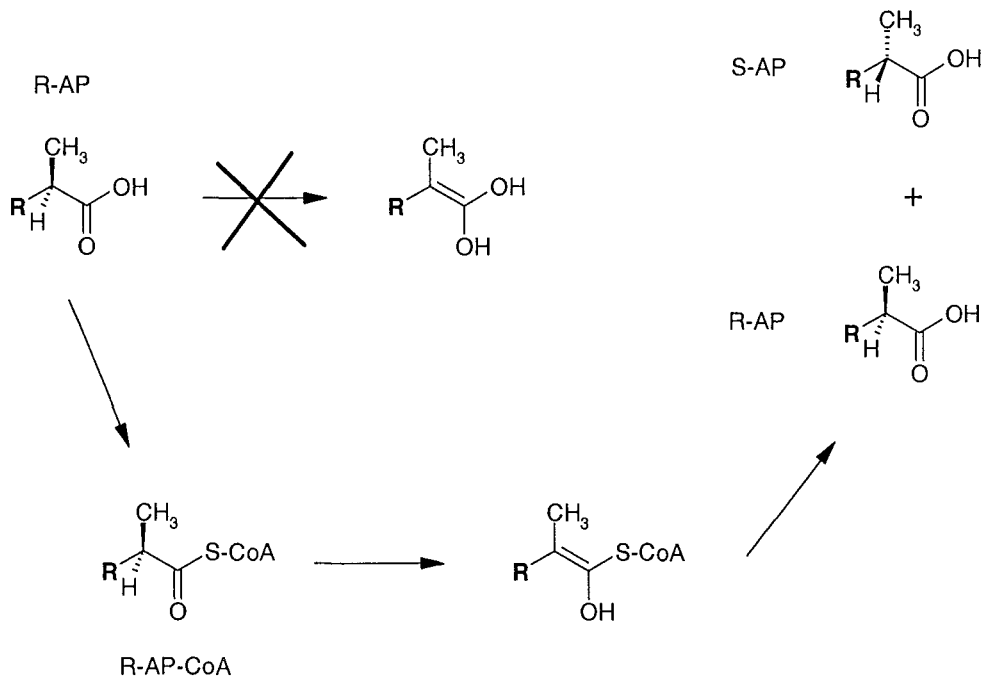


Figure 45 Schéma réactionnel de l'inversion chirale des AINS arylpropioniques (AP)

L'énantiomère R des AP forme l'acyl-CoA par un mécanisme n'impliquant pas un alcène intermédiaire. Ce composé est lui-même sujet à une épimérisation via un énol

◊ Hydrolyse

Comme l'épimérisation, cette étape n'est pas énantiosélective. L'hydrolyse des acyl-CoA d'AINS est en effet aussi efficace envers les R- et S-ibuprofényl-CoA dans le foie de Rat [519]. Si elle présente une légère stéréosélectivité pour l'énantiomère S dans les microsomes, elle est asélective dans les mitochondries [511], qui est le site majoritaire du processus, le cytosol n'étant quasiment pas impliqué [506]. Une hydrolase n'a pas été caractérisée précisément, mais il en existe plusieurs dans les microsomes et mitochondries, impliquées dans l'hydrolyse des acyl-CoA d'AG [520]. Différentes enzymes pourraient prendre en charge chacun des énantiomères [511], et nous détaillerons ultérieurement les thioestérases hydrolysant les acyl-CoA endogènes, auxquelles elles appartiennent certainement (paragraphe II_C. 1. b) .

B. 2. c) Pharmacodynamie

• Effets thérapeutiques

Les AINS agissent par des mécanismes périphériques et centraux, impliquant majoritairement les COX dans les 2 compartiments. L'effet central est plutôt lié à leur action antipyrétique et analgésique qu'anti-inflammatoire.

Effets liés à la voie COX

L'action périphérique des AINS est principalement liée à l'inhibition de la production de PG : alors qu'il existe une surproduction de PG lors d'un phénomène inflammatoire, on observe une diminution de ce taux après administration d'un AINS *in vivo*. L'inhibition de production de PG a aussi été mise en évidence au niveau central [521], où les PGE2 produites par les COX périphériques induiraient les COX-2 spinales et ainsi la production centrale de PG [522].

Il est maintenant bien établi que les AINS sont inhibiteurs compétitifs ou mixtes des COX, propriété démontrée par des analyses enzymatiques [455],[523] et par la résolution de complexes AINS:COX, montrant qu'ils occupent le site actif. L'inhibition ne concerne que l'activité *COX* et pas l'activité *PER*. L'inhibition de ces enzymes répond aussi à la stéréosélectivité connue des effets anti-inflammatoires des arylpropioniques. En effet, les 2 énantiomères de la plupart des AINS chiraux n'ont pas la même activité pharmacologique : l'antipode S est actif *in vitro* au contraire de son antipode R.

De nombreux travaux ont cherché à comparer l'efficacité des AINS en tant qu'inhibiteurs des COX ainsi que leur sélectivité pour l'une ou l'autre isoforme [524],[525]. Malheureusement, les résultats obtenus avec un modèle d'étude donné sont rarement comparables à ceux d'un autre modèle, ce qui tend à discréditer ce genre de comparaison et impose de toujours se référer au modèle en question, sans extrapolation à un autre [526],[527].

◊ Interactions des COX avec les AINS

Certains AINS ont été cocristallisés avec les COX et permettent de comprendre *in situ* leur mode d'interaction : c'est le cas du suprofène dans le site actif de COX-1, empêchant l'accès de l'arachidonate au site cyclo-oxygénase (Figure 46) :

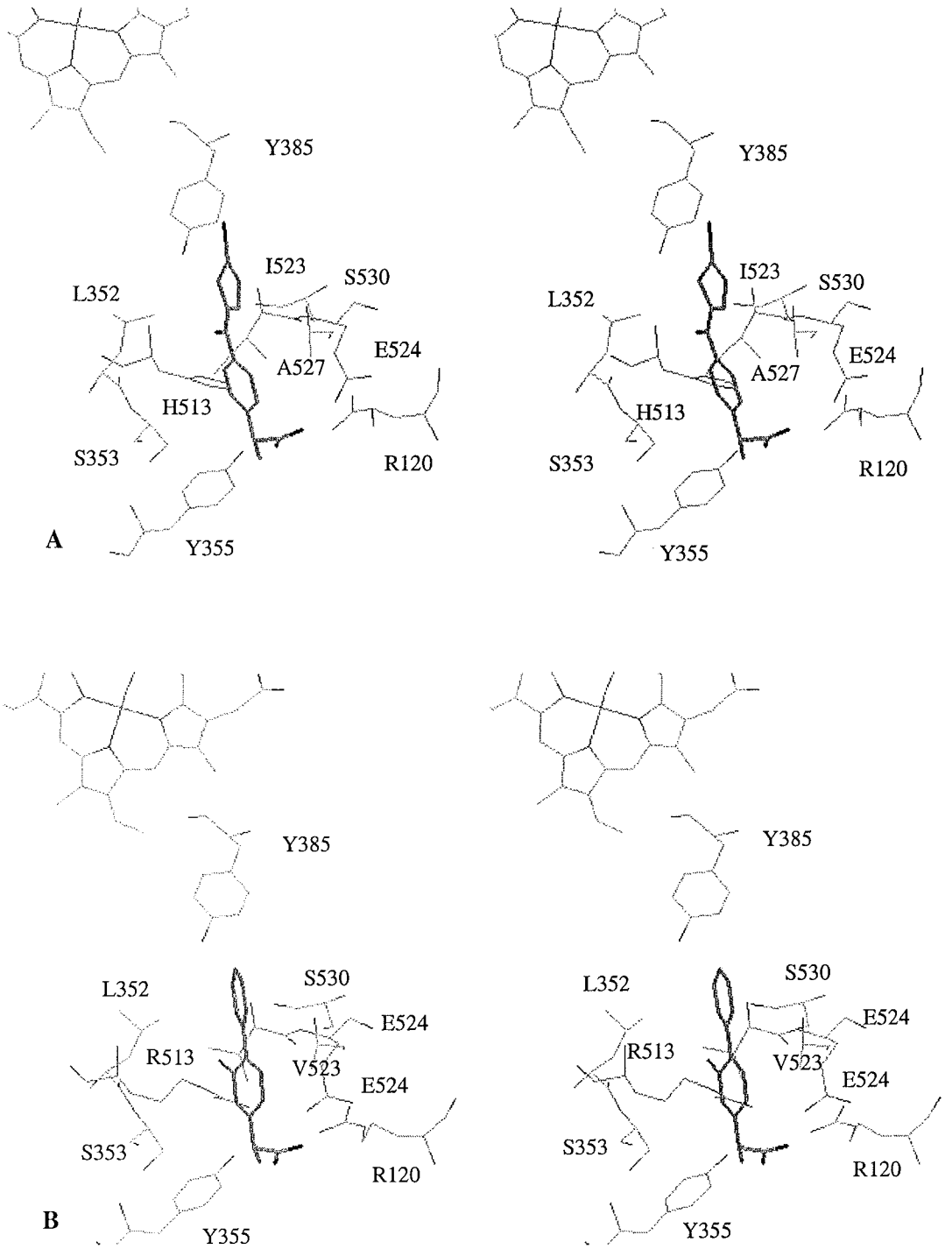


Figure 46 Structure tridimensionnelle de complexes AINS:COX
A : complexe suprofène : COX-1 (d'après PDB : 1pge [243])
B : complexe flurbiprofène : COX-2 (d'après PDB : 3pgh [461])

La fixation du suprofène par le site est permise par les caractéristiques stériques et électrostatiques, du fait des interactions favorables : pont salin avec R120, liaisons H avec E524, Y355, S530 et Y385. Les liaisons H impliquées dans la reconnaissance des AINS sont différentes selon les isoformes : Y355 forme deux liaisons hydrogène avec l'indométacine chez COX-2, contre une chez COX-1, R120 trois contre deux (PDB).

Y355 apparaît comme le discriminant principal quant à la stéréochimie des AINS, constituant un encombrement stérique pour le méthyle des énantiomères R [278]. Le mutant Y355F diminue ainsi 4,5 fois la stéréosélectivité pour l'ibuprofène [257].

◊ Origines cinétiques de l'effet des AINS sur les COX

Nous avons vu que les AINS classiques sont classés communément en 2 catégories, selon leur cinétique d'inhibition sur les COX (page 67) :

•**Classe I** : Inhibition compétitive ou mixte des 2 isozymes. Exemples : ibuprofène, naproxène et la plupart des AINS

•**Classe II** : Inhibition dépendant du temps ("d'interaction lente"), réversible : l'indométacine, le flurbiprofène et le méclofénamate présentent cette cinétique pour les 2 COX, tandis que le célécoxib, le piroxicam, le méloxicam ou l'étodolac sont inhibiteurs compétitifs ou mixtes de COX-1 mais dépendants du temps pour COX-2.

L'inhibition compétitive apparaît dès la mise en contact de l'inhibiteur avec l'enzyme, alors que les inhibiteurs dépendants du temps ne présentent leur capacité optimale d'inhibition à une concentration donnée qu'avec un certain délai, néanmoins très bref (avant 2 min). L'indométacine atteint cette capacité dès 1 min, par exemple [528]. Cette cinétique est la même que celle observée avec les ISC et relève certainement du même mécanisme.

Le fait que tous les AINS, comme l'AA, provoquent une modification conformationnelle de COX après fixation [256], alors qu'on ne distingue pas de différence conformationnelle dans les cristaux de complexes COX / inhibiteurs dépendants du temps ou non [457] suggère que tous les inhibiteurs permettent le même réarrangement final de COX (EI*). Selon ce modèle, c'est la vitesse de dissociation qui distinguerait les inhibiteurs simples de ceux qui dépendent du temps ($k_{2'} << k_2$) (Figure 47).

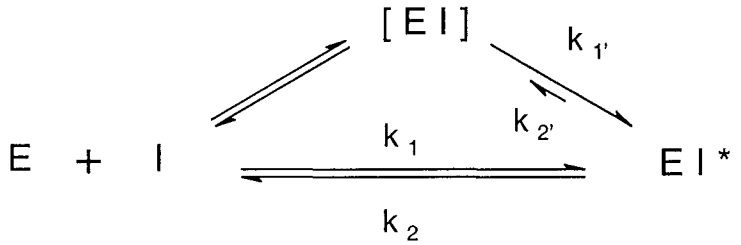


Figure 47 Schéma de la cinétique d'inhibition des COX

L'enzyme E et son inhibiteur I peuvent former un complexe stable EI* impliquant une modification conformationnelle en passant ou non par un intermédiaire EI suivant le type d'inhibiteur

◊ Effet sur l'expression de COX-2

Le S-flurbiprofène et le rac-KPF (10 μM) répriment COX-2 à 40 et 30 % respectivement, chez les monocytes activés par le LPS [202]. *In vivo*, les AINS présentent aussi des effets transcriptionnels : l'indométacine réprime ainsi COX-2 dans le modèle d'œdème de la patte (à 10 mg/kg po) [240]. Les 2 énantiomères de flurbiprofène répriment COX-2 dans la moelle épinière et le modèle d'inflammation de la patte. Chez les macrophages, la diminution de la transcription est corrélée à une inhibition de l'activation de NFκB et de AP-1, avec une efficacité beaucoup plus marquée pour l'énantiomère R. Cette inhibition est indépendante de la phosphorylation et de la dégradation de IκB [305].

Il a été montré que certains AINS agissent aussi en amont de COX : un 2-aryl-propionate récent (M5011) inhibe ainsi légèrement le relargage d'AA, avec une inhibition de 15 % à 1 μM [529]. L'alminoprofène est inhibiteur de sPLA2 en plus de COX à partir de 10 μM [530]. L'ibuprofène inhibe le relargage d'AA dans les macrophages (IC50 = 0,1 mM). Cependant, cet effet observé à forte concentration est l'inverse de ce qu'on observe à plus faibles taux (10^{-13} à 10^{-10} M), où il est plutôt activateur de la libération d'AA [531].

Effets indépendants de la voie COX

Les effets des AINS non liés aux COX sont souvent relatifs à leur effet analgésique qui pourrait être médié par des opioïdes endogènes, le blocage de sécrétion de sérotonine ou l'activation de récepteurs du N-méthyl aspartate [532]. Différents AINS, en particulier le suprofène et l'ibuprofène, sont inhibiteurs de la déamidation de l'anandamide, antagoniste endogène du récepteur CB1 aux cannabinoïdes (IC_{50} = 170 et 270 μM respectivement) [533] ; ses récepteurs à l'anandamide étant eux-mêmes associés à des propriétés anti-inflammatoires [534]. L'effet indépendant des COX est mis en évidence par leur stéréochimie, puisque l'énantiomère R est faible inhibiteur des COX : ainsi les R-flurbiprofène et R-KPF ont des propriétés analgésiques, alors qu'ils ne sont pas inhibiteurs de COX (100 à 1000 fois moins que le S *in vitro*) dans des conditions où ils ne sont pas sujets à l'inversion chirale [478], [535]. Les 2 énantiomères de flurbiprofène également sont antalgiques *in vivo*, alors que seul l'énantiomère S inhibe la production de PGE2 [536]. Le KPF quant à lui est actif dans des modèles de douleurs indépendants de COX, mais il est curieusement le seul AINS à présenter cette propriété [537],[538]. L'inhibition de l'hydrolyse de l'anandamide est stéréosélective pour les R-ibuprofène et le R-kétorolac dans le cerveau de Rat (IC50 = 50-250 μM) [539]. L'action analgésique des AINS passe aussi par la déplétion de substance P. Le diclofénac réduit la quantité de substance P dans le museau de Souris de 27 % à 0.5 mg/kg/j [540]. Ce même diclofénac réduit aussi la quantité de substance P dans le liquide synovial lors de polyarthrite rhumatoïde, comme les 2 énantiomères de flurbiprofène au niveau de la moëlle épinière dans un modèle inflammatoire [541].

Les AINS influent aussi le trafic cellulaire : les 2 énantiomères du KPF, comme d'autres AINS, inhibent la migration des PMN (inhibition de 90 % à 1 μM) et leur activité élastase [542]. Ils peuvent interférer avec les interactions intercellulaires et cellules/matrice en inhibant l'activation de l'intégrine αIIbβ3 [543]. Certains AINS inhibent des protéases comme la collagénase et MMP-1 dans les chondrocytes activés par l'IL-1 [544]. Ils inhibent le chimiotactisme des neutrophiles induit par l'IL-8 [542]. Le KPF réduit d'ailleurs la concentration en IL-8, et augmente l'activité superoxyde dismutase sanguine *in vivo* (IC50 = 100 mg/kg) [545]. Les AINS (indométacine, KPF, suprofène) contribuent encore à l'élimination d'espèces radicalaires par leur nature chimique : ils sont en eux-mêmes des pièges à radicaux, aussi efficace que le GSSG à forte concentration (0,2 mM) [546]. L'ibuprofène diminuerait d'ailleurs légèrement la concentration en NO *in vivo* [547].

Il est fort probable que les AINS favorisent aussi la résolution de l'inflammation, en stimulant l'apoptose des cellules inflammatoires activées. Ils induisent ainsi une protéine sécrétée de la famille TGFβ, NAG-1 (NSAIDs Activated Gene) aux propriétés pro-apoptotiques [548]. L'action pro-apoptotique des AINS a d'ailleurs été beaucoup étudiée dans des modèles de tumeurs et de cellules cancéreuses : ils agissent ainsi par les voies FADD et caspase-8 puis-3, mais pas par Bax dans les cellules leucémiques. En revanche, leur action passe par Bax et les mitochondries avant la caspase-3 dans les cellules épithéliales du colon [549]. L'effet pro-apoptotique pourrait également passer par l'inhibition de Mrp-1 qui est impliquée dans le maintien de l'asymétrie lipidique membranaire [550].

Néanmoins, les effets observés peuvent souvent être plus ou moins directement rattachés aux voies COX : ainsi les AINS peuvent moduler l'activité de certains facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation, ce qui peut aboutir à une down-régulation d'enzymes de la voie COX. Les R- et S-ibuprofène inhibent ainsi l'activation de NFκB (IC_{50} = 120 et 60 μM). L'effet semble spécifique puisque 10 mM d'ibuprofène n'influent pas sur la fixation de HSF et que le benzoate est sans effet [551]. Cette inhibition est indépendante de la phosphorylation et de la dégradation de IκB [305]. Le TNF est une des cibles de ce mécanisme, puisque l'ibuprofène inhibe la fixation de NFκB au promoteur de TNFα chez les macrophages, à 200 μM [443].

Nous avons vu précédemment l'importance des PPAR dans l'expression des enzymes clef de l'inflammation ; or les AINS interagissent encore avec ces récepteurs. Le fénoprofène, l'indométacine ou l'ibuprofène, par exemple sont ainsi agonistes de PPARα et PPARγ [80]. En tant que tels, ils inhibent par exemple la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes [398]. Ils sont également agonistes de PPARδ [83].

Les AINS interfèrent aussi avec la transduction du signal, où l'indométacine diminue l'activité de ERK-2 et inhibe sa translocation nucléaire [552].

• Effets secondaires

L'effet secondaire majeur des AINS est l'irritation de la muqueuse gastrique qui peut conduire à l'apparition d'ulcères [553]. On a longtemps considéré que cet effet résultait de l'inhibition de la COX-1 épithéliale, à l'origine des PG gastroprotectrices, et des auteurs ont tenté d'établir une corrélation entre une sélectivité pour COX-1 et une toxicité gastro-intestinale, en comparant les IC50, ou plus récemment les IC80 pour les COX et des données épidémiologiques [554]. Mais nous avons vu que COX-2 aussi est fondamentale dans l'homéostasie du tractus, et l'inhibition de COX-1 ne provoque pas forcément de dommages gastriques, comme l'a montré un inhibiteur sélectif de COX-1, qui protège même des lésions induites par l'indométacine [555]. Le salicylate, non inhibiteur de COX, provoque les mêmes lésions que l'aspirine. De plus des ulcérations dues à l'aspirine n'apparaissent qu'après injection intragastrique alors qu'il inhibe l'activité COX gastrique à 90 % aussi bien après injection sous-cutanée que gastrique [318]. Enfin, la stéréosélectivité de ces effets secondaires n'est pas toujours en accord avec celle de l'inhibition des COX. Si le R-KPF (100mg) est mieux toléré que le rac-KPF (100 mg) [478], le R-flurbiprofène est en revanche plus ulcerogène que son antipode [536]. Une autre étude montrait que si le rac-flurbiprofène est plus ulcérogène que le S-, le R- flurbiprofène est sans effet [556]. L'ensemble de ces observations est donc en faveur d'un ou de mécanismes d'irritation de la muqueuse gastrique indépendants de COX.

Les blessures intestinales pourraient être liées aux dommages mitochondriaux observés *in vivo* avec l'indométacine [557]. Certains AINS (diflunisal, tolfénamate, flufénamate) sont en effet inhibiteurs de la respiration mitochondriale [558]. D'autres par contre l'augmentent (EC50 = 7 μM avec des mitochondries, 20 μM avec des cellules intactes) mais diminuent la synthèse d'ATP ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial [559]. La β-oxydation mitochondriale est également inhibée par le R-ibuprofène (IC50 = 0,4 mM), mais pas par le R-flurbiprofène ni par son antipode [560]. Les contradictions rapportées entre l'effet des antipodes pourraient résulter des conditions expérimentales. En effet, le R-ibuprofène inhibe seul la β-oxydation du palmitate à 2,5 μM, mais si on augmente la concentration en CoASH, les 2 énantiomères sont actifs sur les mitochondries isolées comme *in vivo* (IC50 = 1 mmol/kg en ip pour les 2 énantiomères) [561]. La participation de métabolites pourrait aussi interférer car les composés formant des acyl-CoA peuvent dépléter

les cellules en CoASH et ainsi perturber les processus métaboliques, comme il a été montré avec le benzoate chez les hépatocytes [562]. L'irritation de la muqueuse pourrait également résulter de l'interaction directe des AINS avec les membranes la constituant : l'indométacine et le naproxène diminuent ainsi la fixation de molécules hydrophobes et ont un effet rigidifiant sur les lipides de la surface de la muqueuse gastrique [563].

L'idiosyncrasie respiratoire à l'aspirine, ou « asthme à l'aspirine », associée à la triade de Widal (polypose nasale, asthme et intolérance à l'aspirine), est un autre effet secondaire des AINS, beaucoup plus rare que les lésions gastriques. On connaît encore mal l'origine de cette réponse, mais plusieurs explications ont été proposées [564]. Parmi celles-ci, une théorie immuno-allergique s'appuyant sur les symptômes anaphylactoïdes : on n'a cependant pas identifié d'anticorps précis, et il existe des réactions croisées avec les AINS et certains additifs alimentaires, malgré la diversité chimique de ces composés. Une autre théorie se fonde sur la modification de profil métabolique de l'AA : inhibition de la synthèse de PGE bronchodilatatrices et de PGE1 qui limite la dégranulation des mastocytes ; augmentation de la production de LTC et D bronchoconstricteurs [565].

On rapporte également des hépatites médicamenteuses, de source cytotoxique directe ou immuno-allergique [566]. La cytotoxicité directe a pour origine l'apparition de métabolites électrophiles et de radicaux libres (essentiellement produits des CYP), réagissant avec des lipides ou des protéines sur leur lieu de production (le RE). Les hépatites immuno-allergiques suivent une réaction immunologique dont l'hépatocyte est la cible. Le mécanisme passerait là aussi par une fixation covalente de métabolites des médicaments aux protéines du RE qui migreraient ensuite vers la surface de l'hépatocyte [567]. On a ainsi pu identifier différents anto-anticorps, dont les LKM-1 (Liver-Kidney Microsomes), reconnaissant des antigènes présents sur la membrane plasmique d'hépatocytes de Lapins exposés à l'halothane. Parmi les antigènes, on trouve une protéine cellulaire portant des adduits de métabolites de CYP [568]. Les anti-LKM-2 et anti-LM (Liver Microsomes) reconnaissent des CYP2c8/9/10 et 1a2 respectivement [569], [570]. Des autoanticorps anti-UGT ont été caractérisés parmi les anti-LKM-3 [571].

Des protéines du complément pourraient aussi constituer des cibles des AINS ou de leurs métabolites. Ainsi C3 (PM = 180 kDa) subit une maturation protéolytique par l'adipsine et d'autres protéases chez les adipocytes. Il génère alors 2 sous-unités α (110 kDa) et β (70 kDa) reliées par un pont dissulfure, clivées ensuite en C3a et C3b par la C3 convertase [572],[573]. C3b contient un thioester interne (-C-Q-) qui est activé au cours des protéolyses de C3 [574]. Q1013 est alors capable de fixer de manière covalente certains résidus de protéines, comme des Thr [575] ou des Tyr [576]. La fixation de ces protéines antigènes permet alors la stimulation de la réponse immunitaire [577]. C3b peut aussi réagir avec de petites molécules comme des acides aminés, des glucides ou des xénobiotes à structure phénolique [578]. L'anti-inflammatoire rosmarinate est également une cible [579]. Les AINS, par eux-mêmes ou par leurs métabolites (hydroxylés, conjugués), pourraient ainsi acyler C3b et former un haptène responsable de réactions allergiques. Un autre type d'adduits pourrait encore participer à ces effets secondaires : l'inhibition des COX par les AINS provoque en effet l'accumulation d'AG et de lysoPL dans les membranes. Ces PL sont sujets à des oxydations spontanées, produisant des molécules très réactives formant des adduits avec des protéines comme la β2-glycoprotéine [580]. De tels adduits constituent des épitopes, puisqu'on trouve des anticorps dirigés contre ces PL oxydés *in vivo* [581].

Nous avons vu le rôle ambivalent de plusieurs médiateurs de l'inflammation, assurant une fonction pro-inflammatoire dans l'apparition de la réponse inflammatoire puis anti-inflammatoire dans la phase de résolution. L'intervention des AINS durant cette phase

pourrait paradoxalement la défavoriser et empêcher l'issue de la réponse : ainsi le S-KPF (et pas le R) active la production de TNFα et IL1β *in vivo*, ce qui peut être relié à son inhibition de COX (PGE2 down-régule la production de TNFα) [535]. L'énantiomère S du KPF et du flurbiprofène induisent aussi TNFα (EC50 = $1\text{-}5.10^{-7}$ M) et répriment la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (40 % à 10 μM) chez les macrophages. Au contraire, des inhibiteurs de COX sont inducteurs de COX-2, en synergie avec le LPS (indométacine, NS-398 à 50 μM induisent 4 à 5 fois plus que le LPS seul) [100]. Autre rôle pro-inflammatoire, l'indométacine peut induire ICAM-1 et la 2 intégrine, favorisant l'adhésion cellulaire [433].

Les AINS perturbent globalement le métabolisme lipidique, peut-être par les voies associant les PPAR. Ils ont ainsi des effets hypolipidémiants divers [582], en diminuant par exemple le taux de cholestérol plasmatique [583],[584]. Ils stimulent la fixation et la dégradation des LDL par les hépatocytes, en augmentant l'expression des récepteurs aux LDL (induction de 30 % à 10 μg/mL) [585]. Les diflunisal et nalidixate sont inhibiteurs compétitifs de la mcACS mitochondriale hépatique [586]. Le R-ibuprofène est inhibiteur compétitif de la lcACS de microsomes hépatiques, tandis que le S-ibuprofène comme les R- et S-KPF et naproxène, sont inhibiteurs mixtes [587]. Les AINS pourraient aussi inhiber certains CYP ; en effet, l'allène oxyde-synthase, une CYP végétale, est acétylé par l'aspirine et inhibé de manière compétitive par le salicylate, l'indométacine, l'ibuprofène et le piroxicam [588].

Certains AINS enfin, et particulièrement le KPF par son groupement benzophénone, sont responsables d'une phototoxicité associée à la peroxydation de lipides membranaires et conduisant à une cytolyse [589].

B. 3. Effets biochimiques et pharmacologiques des métabolites

Le métabolisme des xénobiotes tend à les faire disparaître en favorisant leur élimination urinaire ou biliaire. Il procède d'une hydrosolubilisation par l'ajout de différentes fonctions chimiques polaires, qui n'annule cependant pas toujours l'activité de la molécule mère et peut lui procurer d'autres propriétés pharmacologiques.

B. 3. a) Glucuronides de xénobiotes

La fonction ester des glucuronides est labile et fait du conjugué une molécule réactive, capable de se fixer irréversiblement aux protéines pour former des adduits. Ainsi, les glucuronides de fibrates forment des adduits plasmatiques et tissulaires, en particulier dans le foie et les reins où le xénobiote est stocké pendant plus de 15 j (0,13 μg/g tissu) [590].

En ce qui concerne les AINS, les adduits concernent aussi des protéines plasmatiques et intracellulaires. Dans le plasma, l'albumine est la cible principale, acylée par environ 3 % du KPF, tandis que d'autres protéines comme le fibrinogène ou les α-, β-, γ-globulines ne sont pas impliquées [591]. Les adduits concernent aussi des protéines hépatiques ou rénales, comme l'UGT2b1 [592]. L'aglycone n'est pas la seule partie fixée de manière covalente, et on a même montré que le glucuronate constituait l'adduit majoritaire [593]. Cette formation d'adduits pourrait limiter l'action thérapeutique du médicament car on a montré que l'albumine glyquée (adduits d'Amadori) stimule 16 fois la production de NO (4 fois à 17 g/L) et active celle de TxB2 (2 à 3 fois à 17 g/L) ; cette activation passe par une induction certainement corrélée à celle observée pour TNFα dans les mêmes conditions [594]. L'albumine glyquée dispose ainsi d'un récepteur (calnexine), responsable d'une induction de TGFβ, de iNOS chez les cellules endothéliales et mésengliales [595]. La glycosylation de la HSA (en particulier sur K525) provoque en outre une modification de conformation qui diminue son affinité pour ses ligands, bilirubine ou AG [596].

Les glucuronides pourraient aussi participer aux réactions allergiques observées parfois avec les AINS. Les adduits protéiques constitueraient des haptènes, comme ceux formés à partir du diflunisal chez le Rat [597].

B. 3. b) Acyl-CoA

Par analogie structurale et biochimique, il paraît probable que les acyl-CoA d'AINS empruntent les voies des acyl-CoA d'AG endogènes et inhibent ou séquestrent les ACBP, FABP, ACS, épimérase et thioestérases impliquées dans leur métabolisme. Les xénobiotes thioestérifiés diminuent le taux cellulaire de CoASH et d'acétyl-CoA [598]. Une séquestration est notée aussi pour la Gly, par conjugaison avec le 2- phénylpropionate chez le Chien [599]. Mais la conjugaison aux acides aminés est rare chez l'Homme.

Les acyl-CoA de xénobiotes peuvent être régulateurs d'enzymes : le clofibryl-CoA et d'autres acyl-CoA d'hypolipidémiants activent la PKc de cerveau et le foie de Rat [600]. Chez les AINS, le S-ibuprofényl-CoA est inhibiteur compétitif de l'acyl-CoA carboxylase [601]. Les R- et S-ibuprofényl-CoA sont inhibiteurs de COX-1 et COX-2 dans les plaquettes, les monocytes et le sang total, ce qui suggère une participation de ce métabolisme à l'activité des AINS [602].

Les acyl-CoA sont des acides carboxyliques activés et peuvent être à l'origine de formation d'adduits. On a ainsi montré que des fibrates (nafénopine, bezafibrate) pouvaient acyler des protéines d'hépatocyte (à partir de 5 μM) avec une certaine sélectivité de cible puisque les protéines acylées sont de PM différent selon les acyles (fibrates, palmitate, myristate). Ces adduits sont microsomiaux et cytosoliques (dont PM = 13 kDa) [603]. La nafénopine, via son acyl-CoA acyle des protéines de 50-100 kDa en compétition avec le palmitate. Les adduits sont des thioesters à 75 % et amides à 25 % [604]. Différents acyl-CoA de xénobiotes sont inhibiteurs irréversibles de CPT, ce qui là aussi pourrait impliquer une acylation [605].

Les AINS sont incorporés dans les membranes sous forme de PL hybrides, comme ils le sont dans d'autres lipides (TG) [606]. Cette incorporation nécessitant la formation de l'intermédiaire acyl-CoA, elle est elle-même stéréosélective de l'énantiomère R. On a mesuré un Km de 1 μM pour l'incorporation de R-fénoprofène dans les TG d'adipocytes, et de 3 μM chez les hépatocytes [607]. L'incubation d'hépatocytes avec 0,5 mM de rac-KPF montre qu'en 30 min, 3.4 % du KPF est sous forme d'acyl-CoA, 33 % de TG hybride et 63 % est non métabolisé [494]. C'est probablement la glycerol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) mitochondriale (EC 2.3.1.15) qui est responsable de cette incorporation dans les TG, puisqu'elle catalyse la même réaction avec les AG exogènes [608]. L'incorporation dans les lipides permet un stockage du médicament, mais il est difficile de savoir si cette réserve est pharmacologiquement active. L'administration de clofibrate (inducteur d'ACS-1) accélère ainsi la disparition plasmatique de R-ibuprofène sans modifier la concentration de l'antipode, et augmente la concentration tissulaire en ibuprofène (dans le tissu adipeux, les poumons, le cerveau, les reins et le foie) [609].

C. Métabolisme lipidique, acyl-CoA et inflammation

Nous avons vu que la synthèse et la dégradation des PG est la plaque tournante de la réponse inflammatoire, tant en ce qui concerne son installation et sa propagation que sa résolution. Elle est imbriquée dans le réseau des voies du métabolisme lipidique où elle agit sur d'autres membres, de même qu'elle est régulée par des enzymes ou des produits d'autres voies lipidiques. Les acyl-CoA sont des intermédiaires communs à nombre de ces processus biochimiques, mais ils en sont également régulateurs à différents niveaux.

Après avoir rappelé comment ils sont synthétisés, nous analyserons leur devenir cellulaire et nous intéresserons à ce en quoi leurs multiples rôles peuvent les relier à l'inflammation. Le but de ce chapitre est donc double : affiner notre compréhension des mécanismes biologiques fondamentaux associés à l'inflammation et tenter de prévoir, par analogie chimique, les conséquences possibles de la présence d'acyl-CoA de d'AINS.

C. 1. Biosynthèse et devenir des acyl-CoA

C. 1. a) Synthèse : acyl-CoA Synthétases (ACS)

L'activité acyl-CoA synthétase (ACS) est due à des enzymes de la superfamille des protéines fixant l'AMP, constituée d'enzymes portant un domaine de fixation de l'AMP (PROSITE : PS00455) et parfois une signature FACS, portée par les mcACS et lcACS mais pas l'acétyl-CoA synthétase ni les vlcACS. Il existe différentes formes d'enzymes présentant cette activité, qui se distinguent par leur sélectivité quant à la chaîne acyle du substrat. On différencie donc des ACS à courte chaîne (scACS), à moyenne chaîne (mcACS), à longue chaîne (lcACS) et à très longue chaîne (vlcACS). Quantitativement, la thioestérification concerne surtout les AG à chaîne comprise entre C10:0 et C20:4, dans les peroxysomes et mitochondries de foie de Rat. Au niveau tissulaire, le foie est l'organe principal, avec une activité entre 3 et 4 fois supérieure à celle détectée dans le cœur, et près de 10 fois celle des reins, testicules, cerveau et muscle [610].

Sources des acyl-CoA, ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses voies du métabolisme lipidique, telle que la β-oxydation, la synthèse et le remodelage des lipides (cf paragraphe II_C. 3.).

Les ACS catalysent une réaction passant par un intermédiaire acyl-AMP :

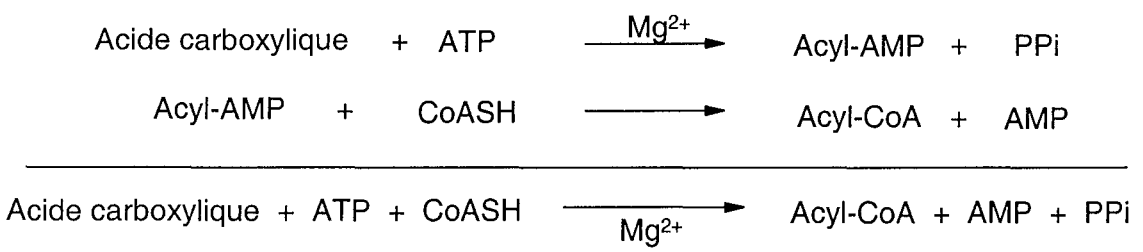


Figure 48 Schéma réactionnel de la formation des acyl-CoA catalysée par les ACS

Un acide carboxylique est transformé en acyl-CoA par consommation d'un ATP et libération d'AMP et de pyrophosphate. Le mécanisme réactionnel passe par un intermédiaire acyl-AMP

• Les scACS

Les scACS sont sélectives des AG à courte chaîne. Certaines sont plus spécifiques de l'acétate et du propionate, d'autres sont plus sélectives du propionate et du butyrate et n'acceptent pas l'acétate [611]. On a ainsi purifié plusieurs scACS, protéines de 50 kDa, spécifiques des AG à courte chaîne [612]. L'acétyl-CoA synthétase (AF263614) est une protéine de 78 kDa, très exprimée dans le foie, les reins. Il en existe 2 paralogues, une forme mitochondriale et une forme cytosolique. On ignore quelle pourrait être leur affinité pour les AINS, mais il n'est guère probable qu'elles participent à leur thioestérification dans la mesure où elles sont fortement sélectives de l'acétate, acceptant faiblement le propionate mais pas le butyrate ni le palmitate [613].

• Les mcACS

Les mcACS acceptent essentiellement les AG à chaîne C6-C8 comme substrats. Elles thioestérifient aussi certains xénobiotes, comme le benzoate. Une mcACS a été purifiée dans les mitochondries hépatiques. Il s'agit d'une protéine de 65 kDa inhibée de façon compétitive par le salicylate (Ki = 37 μM) et activée par l'albumine [614]. La mcACS de foie de Bœuf est elle-aussi inhibée par différents xénobiotes : salicylate, nalidixate et diflunisal (Ki = 37; 12 et 0,8 µM) [615].

MACS-1 et la « protéine SA » sont des mcACS de 62 kDa, surtout exprimées dans le foie et le rein. Elles sont localisées dans la matrice mitochondriale. Leurs produits sont principalement utilisés pour la β-oxydation. MACS-1 accepte le benzoate comme substrat, pour lequel elle présente 20 % de l'activité du C8 [616]. D'autres activités mcACS ont été caractérisées par une activité xénobiotyl-CoA synthétase : de ce fait nommés XL (Xenobiotic-CoA ligase), mais leurs substrats endogènes sont néanmoins les mcAG [612],[617]. Il existe 3 isozymes d'environ 55 kDa, XL-I à -III. Présentes dans les mitochondries, XL-I et XL-II ont une activité enzymatique très sensible à la concentration en cations mono- et divalents ; XL-III est moins sensible à ces paramètres et n'a pas de pH optimum comme les deux autres (pH_{opt} = 8,8) [618]. Le nicotinate, le salicylate et le benzoate sont de bons substrats de XL-I et XL-II, le décatetranoate de XL-III [612]. XL-I a de fortes homologies de séquence avec la "protéine SA" [619]. On ignore s'il s'agit d'une des enzymes précédemment citées, mais il existe une activité ACS rénale, acceptant le benzoate et le salicylate comme substrats, tandis qu'une autre semble spécifique des acides biliaires ($Kd_{chenodéoxycholate} = Kd_{coASH}$ = 2,5 μM) [620]. Le mécanisme réactionnel des XL a été finement étudié au niveau enzymatique, et on a pu déterminer la chronologie des associations / dissociations entre l'enzyme, ses substrats et produits : dans un cycle catalytique concernant le benzoate, l'ATP-Mg^{2+} se fixe en premier, puis le benzoate avant la formation de l'acyl-AMP intermédiaire et relargage du PPi. Enfin le CoASH est fixé et provoque une modification conformationnelle, le benzoyl-CoA formé est libéré. Finalement, l'AMP est relargué [617].

Les mcACS ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la thioestérification des AINS, n'acceptant pas le R-ibuprofène comme substrat [621]. Cette réaction a lieu plus dans les microsomes que dans les mitochondries et ne présente pas de compétition avec le propionate mais avec le palmitate [622].

• Les lcACS

L'alignement de séquences des 12 ACS connues a révélé la conservation de deux régions : domaine de fixation de l'AMP, (200-273), domaine propre aux enzymes de la famille des luciférases, et le domaine de la signature FACS (353-455). Une étude par mutagenèse dirigée sur l'ACS de *E.coli* fad D a précisé les zones essentielles pour l'activité enzymatique (432-453) et pour la sélectivité de substrat (4739 et 448-455) avec 3 positions cruciales pour cette sélectivité : K_{454}, D_{438} et R_{453} [623]. La formation des acyl-CoA d'AINS entre en compétition avec celle des lcAG, ce qui montre qu'elle est principalement due à une activité lcACS.

Il existe en fait 5 lcACS (ou FACL, pour Fatty Acid CoA Ligases) aujourd'hui clonées et caractérisées chez l'Homme et le Rat : ACS-1 à -5. ACS-1, -2 et -5 forment un premier groupe phylogénétique (plus de 55% d'homologie de séquence en acides aminés chez le Rat), ACS-3 et -4 un autre (68% d'acides aminés identiques toujours chez le Rat). Moins de 30 % des acides aminés sont conservés entre les deux sous-familles (Figure 49).

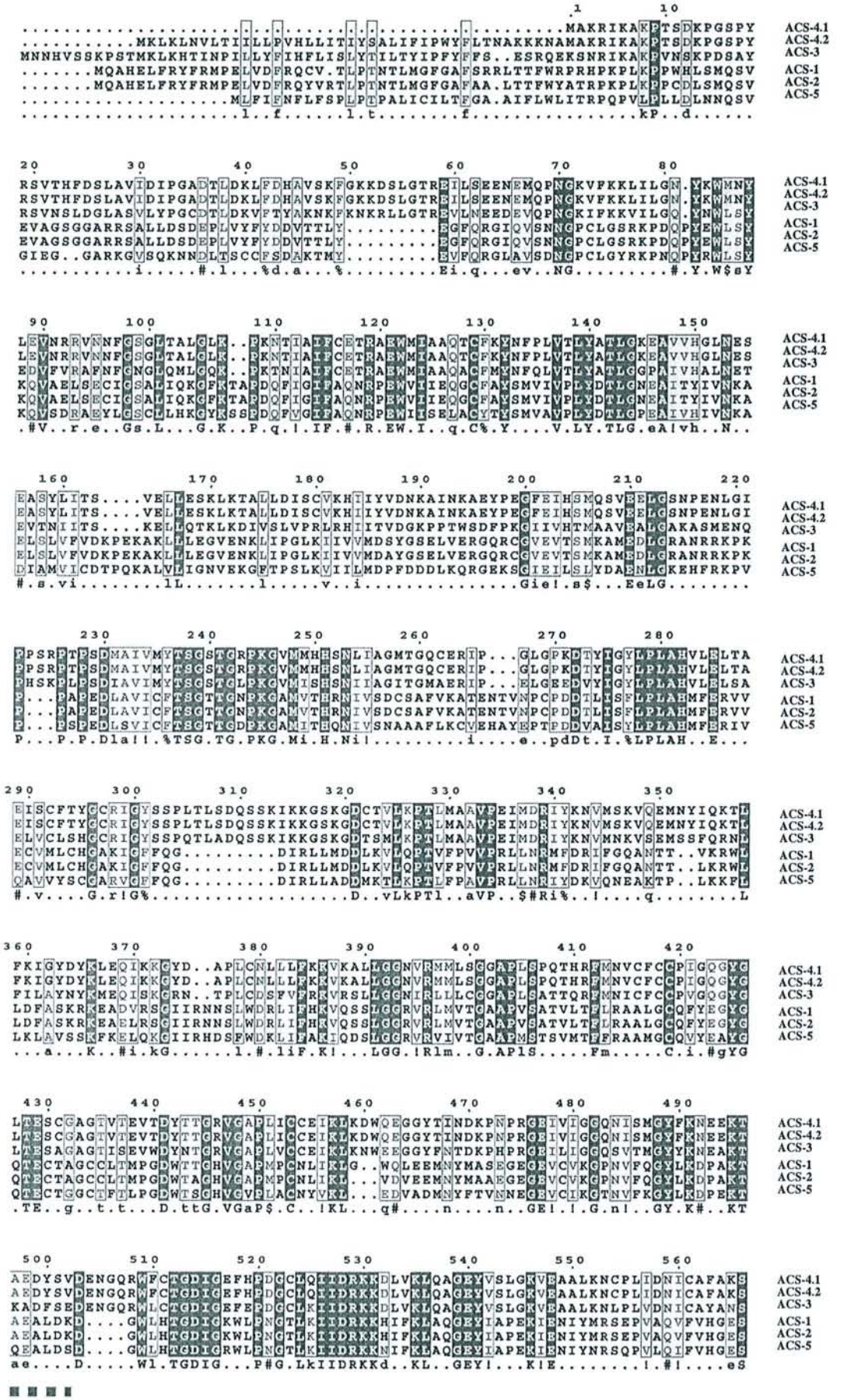


Figure 49 Alignement des séquences primaires d'ACS humaines

Les ACS sont des protéines membranaires de 70 à 80 kDa. Elles sont composées de cinq domaines dont deux domaines "Luciférase-like" très conservés. Il est cependant difficile d'en conclure qu'il s'agit du siège de la réaction catalytique puisque toutes les délétions menées sur ACS-1 se sont révélées délétères pour l'activité enzymatique [624]. La signature FACS contient la région de fixation du substrat acide carboxylique (région soulignée en pointillés Figure 49) [625].

Expression, localisation tissulaire et subcellulaire

Les différentes isozymes se distinguent par leur localisation tissulaire et cellulaire ainsi que par leur sélectivité de substrats.

ACS-1 (P41215) est la forme majoritaire dans le foie [626],[627]. Il existe 3 promoteurs alternatifs sur le gène de ACS-1, à l'origine de 3 transcrits de région 5' UTR différentes dans le cerveau, le cœur et le foie de Rat. Le taux de ces transcrits varie avec le régime alimentaire (augmenté par un régime riche en acides gras ou en glucides), comme après administration d'agents hypolipémiants (clofibrate) [628]. Le gène de l'ACS contient 3 exons dont la transcription est régulée par 3 autres régions. L'un d'eux semble avoir une expression constitutive alors que l'autre est augmentée 30 fois par le fénofibrate, 10 fois par le LA et 20 fois par des analogues non métabolisables d'AG. Cette induction est médiée par PPAR:RXR [629]. La transcription d'ACS-1 est régulée *in vivo* par des cytokines et endotoxines. Ainsi le LPS (10 g/100g), comme le TNFα et l'IL-1 la répriment dans le foie, le tissu adipeux, le cœur et les muscles [630]. Comme beaucoup de gènes du métabolisme lipidique, ACS-1 est induite 3 à 8 fois par PPARα dans les hépatocytes [54]. Elle est en revanche réprimée par le LPS dans le foie [631].

ACS-2 (P33121) et ACS-3 (O95573) sont les formes prédominantes dans le cerveau [632]. Cependant le profil d'expression de cette dernière est assez différent : le taux d'expression d'ACS-3 atteint son maximum 15 jours après la naissance puis diminue progressivement jusqu'à se stabiliser à 10% de ce maximum à l'âge adulte. Parallèlement, le taux d'ACS-2 augmente continuellement au cours du développement du cerveau et atteint un maximum à l'âge adulte [633].

ACS-4 (O60488) est exprimée dans les tissus stéroïdogènes, les ovaires et les testicules [304]. Son substrat préférentiel, l'AA l'induit mais pas d'autres AG, comme le palmitate ou l'EPA [634].

ACS-5 est présente dans les érythrocytes, les cellules épithéliales, les pré-adipocytes et le cerveau [635],[636]. Les endotoxines et les cytokines diminuent l'activité ACS globale dans les mitochondries mais l'activent dans les microsomes de foie [630]. Le TNFα diminue ainsi de 40 % le taux de palmitoyl-CoA dans des cellules de fibrosarcome et augmente d'un facteur 3 l'incorporation de LA dans les PC et PE de mitochondries [637].

Au niveau subcellulaire, ACS-1 est essentiellement cytosolique, mais on la trouve aussi en quantité importante dans le RE et les membranes associées aux mitochondries. Malgré sa forte présence cytosolique, son activité est exclusivement microsomiale. Chez les adipocytes, l'activité oléyl-CoA synthétase due à ACS-1 est essentiellement localisée dans la membrane plasmique et les microsomes de haute densité, environ le double de l'activité présente dans les noyaux et les mitochondries [472]. On la trouve également associée à des compartiments subcellulaires particuliers, comme les vésicules contenant le transporteur de glucose GLUT-4 chez les adipocytes [638]. ACS-4 est exprimée sous forme de 2 isozymes de 80 et 75 kDa résultant d'un épissage alternatif. Elle est essentiellement dans les membranes associées aux mitochondries tandis qu'ACS-5 est très fortement concentrée dans les mitochondries [639]. On observe d'ailleurs une bonne activité lcACS dans la membrane externe des mitochondries [640]. Il existe également une forte activité lcACS dans le noyau

de cellules hépatiques, où on trouve une activité spécifique presque aussi importante que dans l'homogénat cellulaire. Cette activité est sélective du palmitate et du LA, mais concerne aussi l'eicosatriénoate. Elle est saturée à une concentration en acyl-CoA de 13 µM [641].

Sélectivité de substrats

Les substrats différencient également les ACS. Si elles acceptent tous les AG saturés et insaturés de C10 à C22 avec un profil de sélectivité de type gaussien, elles présentent des préférences propres. ACS-1 et ACS-2 ont globalement la même sélectivité de substrat (de C10 à C18 pour les saturés, de C16 :1 à C20 :4 pour les insaturés) [624], mais ACS-1 est plus affine pour les saturés courts (C10, C12) quand ACS-2 l'est plus pour les longs (C20, C22) [502] (Tableau 4).

Isoforme	AG saturés	AG insaturés	Références
ACS-1	Laurate (12:0) Palmitate (16:0)	Palmitoléate (16:1) Oléate (18:1) Linoléate (18:2)	[624]
ACS-2	Laurate (12:0) Palmitate (16:0)	Arachidonate (20:4) Eicosapentaenoate (20:5)	[624] [502]
ACS-3	Laurate (12:0) Myristate (14:0)	Arachidonate (20:4) Eicosapentaenoate (20:5)	[632]
ACS-4	Palmitate (16:0) Stéarique (18:0)	Arachidonate (20:4) Eicosapentaenoique (20:5)	[304]
ACS-5	Palmitate (16:0)	Oléate (18:1)	[635]

Tableau 4 Sélectivités de substrats des ACS

Outre ces 5 isoformes d'ACS bien caractérisées, il existe une autre lcACS ne présentant que 25 % d'identité de séquence avec les lcACS, mais conservant la signature AMP binding (AF208125). Il s'agit d'une protéine cytoplasmique de 80 kDa essentiellement exprimée dans les cellules de Leydig des testicules, dont l'expression est down-régulée par hCG. Elle présente une activité lcACS, avec une certaine sélectivité pour les AG insaturés de 18 à 20 [642].

Rôles biologiques des lcACS

Les lcACS sont indispensables pour la synthèse *de novo* de glycérolipides et d'esters de cholestérol, mais pas pour le recyclage des AG en PL chez les fibroblastes [643]. Les ACS sont encore essentielles à l'« uptake » des AG, en créant le gradient favorable à leur passage intracellulaire. Ainsi, FATP-1, transporteur membranaire des AG est codistribué avec une ACS chez les adipocytes. Ce système semble comparable au système de transport des AG par les bactéries, impliquant un couplage fonctionnel entre le transporteur FadL et l'ACS FadD qui estérifie dans la membrane les AG libérés par FadL [644],[645]. En accord avec ce modèle de couplage, les expressions de FATP et d'ACS sont souvent coordonnées : elles sont co-induites *in vivo* dans le cœur, le foie et le tissu adipeux. D'après les ligands inducteurs, PPARα serait impliqué dans le foie, PPARγ dans le tissu adipeux et le muscle [36]. Cet effet est spécifique des hétérodimères PPAR:RXR et n'implique pas des dimères PPAR:RAR [646].

Les ACS pourraient enfin être responsables du « chanelling » fonctionnel des acyl-CoA. En effet, des inhibiteurs d'ACS comme la troglitazone et la triacsine [647] inhibent la

synthèse *de novo* de glycérolipides, alors que la formation de corps cétoniques et la réacylation sont moins sensibles. L'inhibition de l'estérification du cholestérol dépend quant à elle du type cellulaire, bloquée chez les fibroblastes mais peu inhibée chez les hépatocytes. Dans le foie, la triacsine C inhibe plus fortement la synthèse de TG que la réacylation ou la β-oxydation. Elle diminue l'incorporation d'oléate dans certains lipides (TG, PL, DAG) mais pas dans d'autres (esters de cholestérol). Elle inhibe la synthèse de certains glycérolipides (TG) mais pas d'autres (DAG, PL). Chez les fibroblastes, la triacsine bloque la synthèse *de novo* de TG et PL alors qu'elle est sans effet sur la réacylation et la β-oxydation. Chez les hépatocytes, la triacsine D inhibe la synthèse de TG à 60 % sans avoir d'influence sur celle d'esters de cholestérol [648].

D'autres inhibiteurs, comme la troglitazone, inhibent l'activité ACS dans les membranes associées aux mitochondries mais pas dans les mitochondries elle-mêmes ni dans les microsomes. Par contre, la triacsine C l'inhibe dans toutes les fractions subcellulaires de foie [639].

• Les vlcACS

L'activité vlcACS est prépondérante dans le foie, mais importante aussi dans le cœur et le tissu adipeux [649]. Les vlcACS caractérisées sont très exprimées dans le foie, le rein, et moins dans le cerveau, les testicules, le cœur et les poumons. Elles sont principalement présentes dans les microsomes, un peu moins dans les péroxysomes, et absentes des mitochondries, alors que les lcACS sont également partagées dans ces trois compartiments du foie [650]. Si elles ne portent pas la signature FACS, les vlcACS ont 2 motifs conservés de la levure aux mammifères : une séquence YTSGTTGLPK et une autre YFRDRSGDTFRWRGENVSTTEV. La vlcACS clonée chez le Rat est une protéine de 70 kDa, principalement exprimée dans le foie de séquence plus proche des FATP que des lcACS [650]. La FATP-1, protéine de transport membranaire des AG, est en fait une ACS. Si elle présente une activité lcACS (substrat palmitate) très supérieure à son activité vlcACS (substrat lignocérate), sa séquence primaire la rapproche davantage des vlcACS [651]. D'ailleurs toutes les vlcACS sont beaucoup plus affines pour les lcAG, mais elles sont les seules à accepter des substrats à chaîne carbonée > 22 (C24, C26) [652], comme la vlcACS hépatique qui catalyse la thioestérification du lignocérate et du cholate, ce qui en fait un bon candidat à l'activité cholyl-CoA synthétase nécessaire au catabolisme du cholestérol (Tableau 5) [653]. Une autre forme de vlcACS, (vlcACS-Relative) a été caractérisée dans le foie, un peu dans le cerveau, les poumons et les testicules, mais est absente du rein. Comme les vlcACS, elle partage de fortes homologies de séquence avec FATP (52%, pour 53 % avec la vlcACS) [654]. Le cerveau dispose d'une vlcACS propre, orthologue des ACS « bubblegum » de la drosophile [655]. Contrairement aux autres ACS, cette protéine de 80 kDa est soluble [656].

La délétion de la vlcACS est responsable de l'adrénoleucodystrophie.

% d'activité par rapport au Palmitate (C16:0)	**vlc ACS-1**	**vlc ACS-2**	**ACS-1**
Lignocérate (C24:0)	2.1	3.2	0.7
Cholate	0	4	0

Tableau 5 Activité vlcACS de différentes ACS relativement au palmitate
(d'après [653])

L'activité des ACS est modulée par les transporteurs cellulaires d'acyl-CoA : l'ACBP stimule cette activité [657], alors que la FABP l'inhibe à 30 % et augmente la production de PA (18 fois) [658]. L'action contraire des deux transporteurs est conforme au ciblage des acyl-

CoA vers leurs voies biochimiques par les transporteurs : ici l'ACBP très affine pour les acyl-CoA leur permettrait d'activer leur propre voie de biosynthèse, mais, quand leur concentration est élevée, ils se fixent aussi sur FABP et ainsi down-régulent cette synthèse.

C. 1. b) Hydrolyse

On connaît 4 gènes de thioestérases, une forme cytosolique (CTE-1), une mitochondriale (MTE-1), à l'origine de protéines de 45 kDa, et d'autres peroxysomiales (PTE-1a et 1b). Elles ont un taux d'expression tissulaire variable, mais sont surtout présentes dans le foie et les reins [659]. La localisation subcellulaire des thioestérases hydrolysant les acyl-CoA endogènes est différente de celle des xénobiotes, ce qui suggère l'implication d'enzymes distinctes. Ainsi, l'activité palmitoyl-CoA-hydrolase hépatique est microsomiale à 56 % et cytosolique à 12 %, quand l'activité clofibryl-CoA-hydrolase est moins ségrégée, à 25 % peroxysomiale, 35 % cytosolique et 30 % mitochondriale [660]. L'activité AA-CoA-hydrolase de la medulla de reins est surtout cytosolique et microsomiale [301]. L'activité thioestérasique peut encore être localisée dans des fractions subcellulaires très précises, comme dans les puits recouverts de clathrine, où on associe cette activité à la protéine Eps-15 [661]. Au niveau tissulaire, c'est dans le cerveau qu'on trouve la plus forte activité palmitoyl-CoA hydrolase, double de celle dans les testicules et entre 10 et 20 fois celle dans les autres tissus chez le Rat [610]. L'acyl-CoA thioestérase de cerveau humain (EC 3.1.2.2), très vraisemblablement une CTE-II, accepte les AG à chaîne de C8 à C18 comme substrats. Il s'agit d'une protéine de 43 kDa probablement active sous forme de dimère, à 90 % cytosolique [662].

Les hydrolases de la famille nudix, responsables de la déphosphorylation des nucléotides, participent aussi au catabolisme des acyl-CoA [663].

C. 1. c) Transport

On a déterminé une teneur tissulaire d'environ 230 nmol de lc acyl-CoA / g de tissu, soit une concentration cytosolique approchant les 100 μM. Or on ne dose que 0,5 μM d'acyl-CoA, ce qui suggère donc que seulement 0,5 % des acyl-CoA soient libres [664]. Les acyl-CoA cellulaires sont en effet pris en charge par au moins 3 transporteurs : Acyl-CoA Binding Proteins (ACBP), uniquement cytosolique ; Fatty Acid Binding Proteins (FABP), cytosoliques et associées aux microsomes ; et SCP-2, surtout dans les peroxysomes et le RE. Par ordre d'affinité, les acyl-CoA sont ainsi fixés par la BSA > ACBP > h et cFABP. En présence de membranes de PC, l'affinité pour l'ACBP est largement supérieure à la BSA puis les FABP [665].

• ACBP

L'ACBP est une petite protéine de 10 kDa fixant les acyl-CoA de C14 à C22, aussi bien à chaîne saturée qu'insaturée [666]. La détermination de la structure tridimensionnelle de l'ACBP en solution montre qu'elle est constituée de 4 hélices α [667]. La conformation de la protéine est conservée sous forme holo (rmsd = 0,42 Å pour les hélices), même si l'étude de la dynamique de fluorescence montre qu'il existe un réarrangement conformationnel global pendant la fixation du ligand [668]. Dans ce complexe, l'acyl-CoA adopte une conformation repliée, formant plusieurs liaisons H intramoléculaires ; l'interaction prépondérante entre le ligand et la protéine concerne le 3'-phosphate [666],[669] (Figure 50).

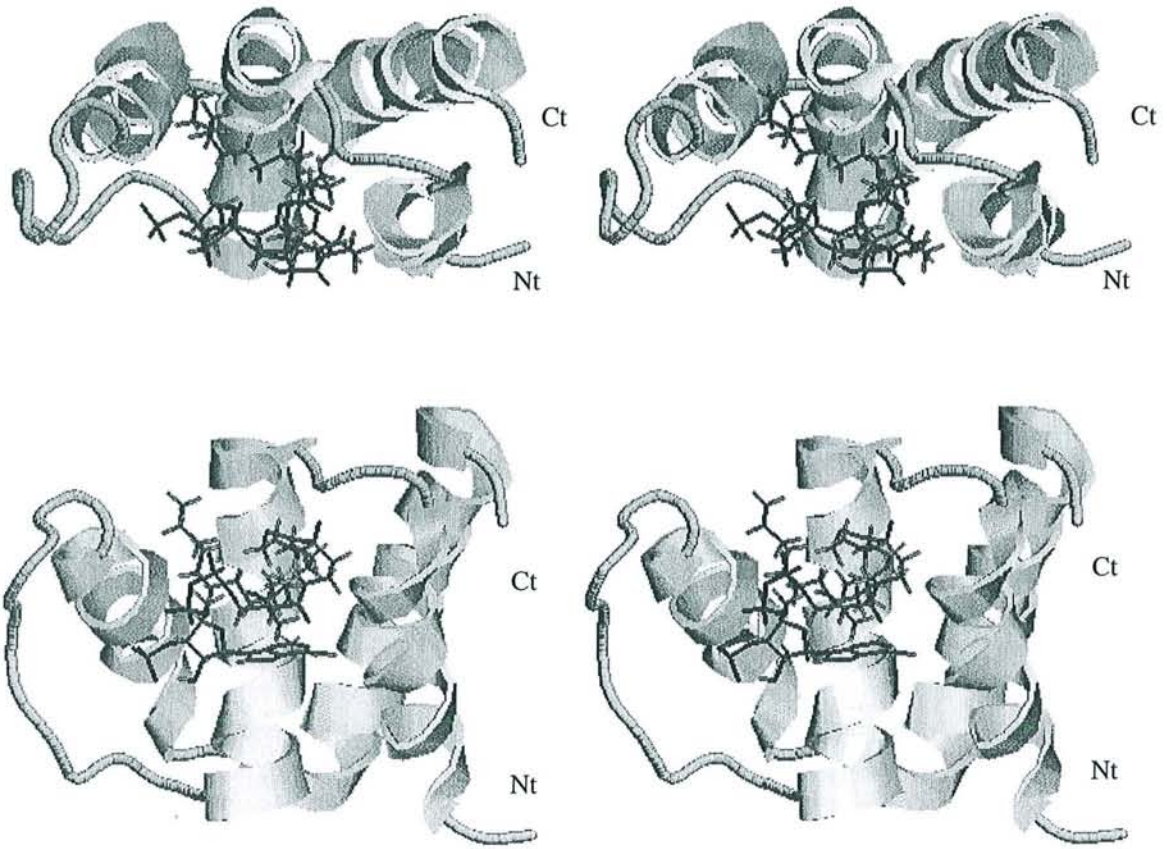


Figure 50 Structure tridimensionnelle du complexe ACBP:Palmitoyl-CoA

La figure supérieure présente une vue dans l'axe des hélices, la figure inférieure est perpendiculaire à la précédente. (d'après PDB : 1aca [669])

L'affinité du transporteur pour ses ligands est de l'ordre du nM (Kd = 0,2 μM pour l'octanoyl-CoA, 0,6 nM pour le lauryl-CoA et inférieure à 0,1 nM pour le palmitoyl-CoA) [670].

Les concentrations subcellulaires d'acyl-CoA et d'ACBP sont en relation inverse : forte concentration d'acyl-CoA pour faible taux d'ACBP et *vice-versa*, dans le cytosol, les mitochondries et le reticulum. Dans des cellules transfectées avec l'ACBP, la concentration intracellulaire en acyl-CoA augmente pour atteindre un ratio de 1 avec l'ACBP [671]. L'expression de l'ACBP est sous contrôle transcriptionnel de SREBP et régulée négativement par les stérols [672]. La protéine est surtout présente dans les érythrocytes et le foie, on a mesuré une concentration en ACBP de 0.5 μM dans les hématies [673]. Les ACBP sont à 85% cytosoliques et 5% nucléaires. Leur présence dans le noyau est certainement associée à la régulation de facteurs de transcription médié par les acyl-CoA, comme nous le verrons plus tard (§ II_C. 2. a) [674].

- **FABP**

Il existe plusieurs isoformes de FABP : lFABP, iFABP, hFABP, aFABP, eFABP et bFABP, respectivent trouvées dans le foie, l'intestin grêle proximal, le muscle, le tissu adipeux, l'épiderme et le cerveau [675, 676].

La résolution de la structure cristalline de la FABP a montré qu'elle est essentiellement constituée de feuillets formant un tonneau β.

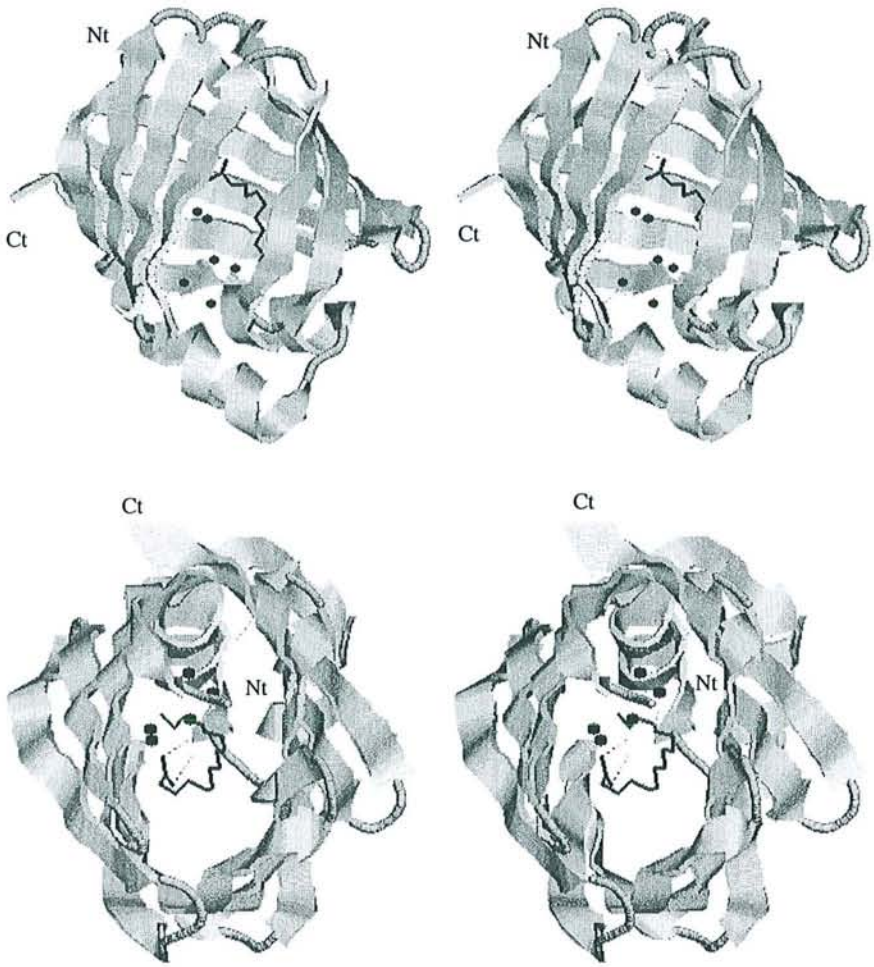


Figure 51 Structure cristalline du complexe palmitate: iFABP

La figure supérieure présente la structure de la protéine, la figure inférieure permet d'appréhender la cavité interne ; les deux vues présentées sont perpendiculaires. Les molécules d'eau présentes dans le site de fixation sont représentées en billes (d'après PDB : 2ifb [677])

La FABP, dont la fonction première est le transport des AG, prend aussi en charge les xénobiotes hydrophobes et les acyl-CoA, alors que les ACBP sont spécifiques des acyl-CoA. La lFABP présente ainsi la même affinité pour l'oléate et pour l'oleyl-CoA [678]. Cependant, les affinités respectives amènent à penser que physiologiquement, seules les ACBP fixent les acyl-CoA [Kd $_{FABP}$(oleyl-CoA) = 4,2 M, Kd $_{ACBP}$(palmitoyl-CoA) = 0,5 nM] [658]. Il n'est pas étonnant que la FABP soit capable de fixer des acyl-CoA, puisque le volume de son site de fixation est plus important que celui de ses ligands ($V_{cavité} = 2.V_{palmitate} = 850$ Å^3), que la chaîne n'est pas maintenue en place, et que le volume non occupé par l'acyle l'est par H_2O [679], comme le montrent les molécules d'eau piégées dans le cristal (Figure 51). Il semble en fait que FABP se referme sur son ligand, comme la CREBP [680].

- **SCP-2**

Le gène SCPx / SCP-2 dispose de 2 sites d'initiation, produit 2 messagers et 2 protéines : une 3-cetoacyl-thiolase, protéine de 58 kDa active avec les mc acyl-CoA (SCPx), et un transporteur intracellulaire non spécifique des lipides, protéine de 13 kDa fixant la PE, le cholesterol et des AG (SCP-2 = nsLPT) [681]. SCP-2 stimule l'activité enzymatique

d'enzymes de la β-oxydation et du métabolisme du cholestérol [682]. Elle pourrait avoir un rôle de tunnel entre l'acyl-CoA-oxydase et d'autres enzymes de ces voies [683].
SCP-2 est une protéine de structure α/β mixte, dont une moitié du site de fixation est constituée de brins β, tandis que l'autre l'est d'hélices α (Figure 52).

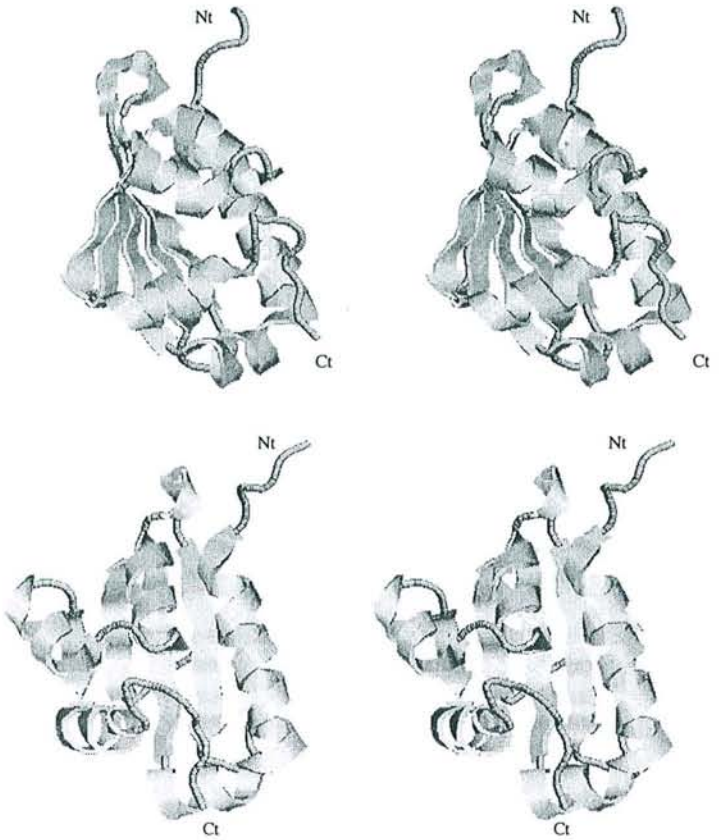


Figure 52 Structure cristalline de l'apo SCP-2
(d'après PDB : 1c44)

Comme FABP, SCP-2 fixe les AG et les acyl-CoA mais elle est sélective de ces derniers (Tableau 6).

Kd (μM)	Parinarate	Oléate	Cholestérol
Acide	40	0,3	0,004
Acyl-CoA	0,4	0,003	

Tableau 6 Affinité de SCP-2 pour différents ligands
(d'après [684], [685])

Elle présente des sélectivités (longueur et insaturation) marquées pour les longues chaînes. Des expériences de déplacement montrent qu'elle dispose de 2 sites de fixation : un site cholestérol / lcAG / lc acyl-CoA et un site lcAG / lc acyl-CoA apparaissant à forte concentration en SCP-2 [685]. Cette protéine pourrait être une *ACBP* des organelles (péroxysomes, mitochondries), alors que l'ACBP proprement dite n'est que cytosolique. Elle est en effet membranaire, essentiellement localisée dans les péroxysomes (à 50 %), mais aussi dans le RE et les mitochondries [686].

Outre ces 3 transporteurs bien caractérisés, citons encore l'α-Synucléine, constituant majeur des corps de Lewy, observés chez les patients parkinsoniens, et qui est encore une

FABP [687], et l'ELP (endozépine-like peptide), *ACBP*, très exprimée dans les tissus gonadiques (testicules, épididyme, ovaires), mais peu dans les autres organes [688].

• Rôles des transporteurs d'acyl-CoA

ACBP et FABP ont plusieurs rôles biochimiques :

• **facilitation du transport des acyl-CoA vers leur cible** [657]. Les ACBP stimulent d'un facteur 3 la production de PA à partir d'oleyl-CoA [689]. Les trafics intracellulaires entre péroxysomes (β-oxydation) et RE (biosynthèse) des AG à 24 C pourraient impliquer les AC/FABP [690],[691]. CPT-1 et carnitine acyltransferase-1 utilisent ainsi essentiellement les acyl-CoA venant de l'ACBP [692], qui apparaît comme un système d'approvisionnement de CPT-1, avec une spécificité fonctionnelle car la BSA a un effet inverse [693]. Sans ACBP, l'AA-CoA est dans les membranes (à concentration de protéines inférieure à 330 nmol/mg dans les membranes d'hématies), puis passe dans le cytosol après saturation des membranes. En présence d'ACBP, tout l'AA-CoA est cytosolique et le complexe (ACBP:AA-CoA) stimule l'acyl-CoA:lysoPL acyl-transferase membranaire (incorporation dans les PC) [673]. lFABP stimule l'activité ACS des microsomes hépatiques, mais pas Hfabp [694]. FABP est encore impliquée dans l' « uptake » d'AG par les myocytes [466]. Enfin SCP-2 augmente l'incorporation d'oléate dans les PL et les TG, stimule la transacylation microsomiale et modifie la sélectivité d'acyle de ces réactions en faveur des AG insaturés [686].

• **création et régulation de stocks cytoplasmiques d'acyl-CoA** [671]

• **protection cellulaire face aux acyl-CoA**. Nous le verrons ultérieurement, les acyl-CoA sont des agents acylants, inhibiteurs ou substrats d'enzymes, et détergents ; les *ACBP* peuvent donc prévenir ces effets. L'ACBP affecte aussi le remodelage des lipides membranaires en diminuant de 50 % l'incorporation d'oléate à partir d'oleyl-CoA dans les PC et de 60 % dans la SM [689]. Elle atténue encore l'inhibition de l'adénosine-translocase mitochondriale et de l'acyl-CoA-oxydase [695]. Le palmitoyl-CoA est inhibiteur de CPT-0. A faible concentration en palmitoyl-CoA, l'ACBP favorise l'inhibition par feedback de la CPT-0 par l'acyl-CoA, alors que la FABP comme la BSA la diminuent. A fortes concentrations en palmitoyl-CoA par contre, l'ACBP comme la FABP diminuent l'inhibition due au palmitoyl-CoA [696].

• **protection cellulaire des acyl-CoA** (par rapport aux thioestérases). L'ACBP diminue l'hydrolyse d'oleyl-CoA de 70 % [562], comme toutes les FABP [694].

Ces transporteurs sont encore associés à d'autres processus biologiques : en corrélation avec l'induction de PPARγ et EBPα, ACBP est présente dans le noyau d'adipocytes et impliquée dans leur différenciation [697]. Des homodimères d'ACBP sont activateurs de la m-Calpaïne (protéase dépendante du Ca^{2+}), en diminuant d'un facteur 40 ses besoins calciques. Mais la fixation d'acyl-CoA semble sans influence [698].

Leur fonction de transporteur pourrait s'exercer aussi au niveau extracellulaire. En effet, lFABP est sécrétée dans la bile (mais pas ACBP), et il existe une corrélation entre les taux de FABP biliaire et cytosolique, ainsi que des acides biliaires, ce qui suggère un rôle de protéine d'excrétion [699]. L'ACBP pourrait avoir une fonction similaire puisqu'elle est sécrétée dans le lumen du duodénum et y stimule la sécrétion exocrine de cholecystokinine [700]. Les acyl-CoA endogènes peuvent aussi être excrétés sous forme de conjugués à la carnitine qui sont alors éliminés par les reins. On retrouve ainsi 2 μM d'acyl-carnitines plasmatiques chez l'Homme (acyle de C2 à C18) [701].

C. 2. Implications biochimiques

C. 2. a) Sites de fixation

• Ligands de récepteurs

La concentration cytosolique en Ca^{2+} est un régulateur important de nombreuses fonctions cellulaires. Elle augmente par libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires (RE) à travers deux types de canaux : un canal sensible à l'IP_3 (IP_3R) et un autre sensible à la ryanodine (RyR). Si IP_3R répond à la fixation du messager secondaire IP_3, RyR semble activé par le Ca^{2+} lui-même (libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+}). L'activation de ce relargage est peut-être initiée par IP_3 sur son récepteur, mais il a aussi été montré que les acyl-CoA sont agonistes de RyR (EC_{50} = 14 µM) [702],[703]. Il est notable que dans les cellules de l'acinus pancréatique, la cholecystokinine, dont la libération est induite par l'ACBP intestinale, augmente aussi les flux calciques. Les lc acyl-CoA stimulent le même RyR des citernes terminales du muscle squelettique (oleyl-CoA et palmitoyl-CoA à 4 µM). Cet effet n'est probablement pas dû à une acylation, car un analogue non hydrolysable a les mêmes conséquences [704].

Les acyl-CoA sont aussi activateurs du transporteur à protons mitochondrial [705]. Ils régulent encore les flux de K^+ en activant le canal régulé par l'ATP K_{ATP} des cellules pancréatiques, par fixation de la sous-unité formant le pore Kir6.2, en compétition avec l'ATP [706]. Ils déplacent l'ADP et l'ATP du transporteur ADP/ATP mitochondrial [707], mais inhibent par contre le canal K_{ATP} mitochondrial ($K_{0.5}$ = 80 à 260 nM) [708].

Chez les végétaux, les lc acyl-CoA inhibent l'uptake de glucose-6-phosphate par son transporteur plastidique de façon réversible (IC50 = 0,25 µM) [709],[710].

• Ligands d'enzymes

C'est principalement dans les voies du métabolisme énergétique qu'on trouve des enzymes sensibles à des acyl-CoA endogènes. Ainsi plusieurs déshydrogénases sont inhibées de façon réversible ou irréversible par le palmitoyl-CoA, comme la glutamate-DH, la malate-DH, l'isocitrate-DH [711]. La G6PDH est inhibée de façon irréversible par dissociation du tétramère actif en dimère inactif. Cet effet semblerait n'être pas seulement dû aux propriétés détergentes du composé car la palmitoyl-carnitine est sans effet et il existe une compétition avec le cofacteur NADP [712], et le glucose-6-phosphate [711]. Le palmitoyl-CoA est encore inhibiteur de la G6-phosphatase (EC 3.1.3.9) [713]. Les lc acyl-CoA sont inhibiteurs compétitifs du glucose et de l'ATP et réversibles de la glucokinase (EC 2.7.1.2) [714], pour laquelle ils sont régulateurs allostériques (n_H = 1,7) [715]. Des acyl-CoA sont aussi régulateurs de la pantothénate-kinase appartenant à la voie de biosynthèse du CoASH (mais cet effet pourrait être spécifique des sc acyl-CoA) [716]. On relate encore l'inhibition d'acyl-CoA:cholesterol-acyltransferase par le complexe ACBP:acyl-CoA [717], de l'adénine nucléotide-translocase (Ki = 1 µM), des transporteur à anions (Ki = 2,4 µM) et à protons mitochondriaux, de la glucokinase, pyruvate-DH, lc acyl-CoA-DH (Ki = 0,2 µM), ACOX (Ki = 5,5 nM), HMG CoA-reductase [705]. L'oléyl-CoA [718] comme le palmitoyl-CoA (IC50 = 35 µM) sont inhibiteurs réversibles d'UGT [719].

Les lc acyl-CoA sont aussi régulateurs de la PKc, avec des effets variables selon l'isoforme. Ils sont ainsi activateurs de la forme a de PKc, mais pas des formes c et n. En revanche, ils inhibent la forme c [720]. Les acyl-CoA constituent des super-activateurs qui augmentent l'affinité de l'enzyme pour ses activateurs DAG et PS (EC50 = 10 µM) [721]. Ils diminuent ainsi ses besoins en PS (diminution de la coopérativité de n_H = 4,6 à 2,8) [722].

L'AA et les AG insaturés inhibent l'adénylate-cyclase, probablement via des métabolites comme les acyl-CoA car l'inhibition dépend du temps et de la température et nécessite un carboxyle libre [723].

- **Ligands de facteurs de transcription**

Les lc acyl-CoA sont capables de réguler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides : chez *E. coli*, ils sont ligands d'un facteur de transcription constituant la plaque tournante des voies du métabolisme des lipides : Fad R. En absence d'acyl-CoA, celui-ci réprime la transcription de gènes de la β-oxydation (fad BA, D, E, L, H) et active celle de fab A, B impliquée dans la synthèse d'AG insaturés [644]. La fixation de ces lc acyl-CoA (et pas des AG ni des mc acyl-CoA) inhibe la fixation de FadR qui se dissocie de son RE [724],[725].

Chez les mammifères, les récepteurs nucléaires PPAR assurent un rôle fonctionnel dans le métabolisme lipidique comparable à celui de FadR. L'expression de acox est réprimée par les lcAG (60 % de répression à 50 μM). Cet effet n'étant pas observable avec un analogue non métabolisable, il est possible qu'il soit plutôt dû à des métabolites comme les acyl-CoA qu'aux AG eux-mêmes [726]. C'est d'ailleurs le cas pour l'ACOX de maïs, réprimée par le palmitoyl-CoA et l'oléyl-CoA (IC50 = 10-50 μM) [727]. Une cotransfection d'un reporter sous contrôle du PPRE d'acox et de PPAR et une ACS a révélé une inhibition de l'expression du reporter [728]. Récemment, on a montré qu'un analogue non hydrolysable du palmitoyl-CoA inhibe la fixation de PPAR au PPRE du gène de l'ACOX. La fixation de l'acyl-CoA ne semble pas s'accompagner d'une hydrolyse du ligand donc d'une fixation covalente. Elle entre en compétition avec des ligands de PPAR et s'accompagne d'une modification de conformation. La fixation de l'acyl-CoA abolit l'interaction du récepteur avec son coactivateur Src-1 et augmente son interaction avec son corépresseur NcoR [52]. Une autre étude a précisé que les acyl-CoA sont ligands du LBD de PPARα et PPARγ, avec une affinité supérieure aux AG correspondants. Les lc acyl-CoA sont ainsi de meilleurs ligands de PPARα que Wy et presque aussi affines que le ligand endogène supposé, 8-S-HETE. Le stéaryl-CoA est aussi bon ligand de PPARγ que le 15dPGJ2 [729].

Ligands des PPAR, les acyl-CoA n'en sont pas agonistes : remarquant que les spécificités structurales des ligands de PPAR sont celles des lc acyl-CoA, Forman et al. [72] avaient émis l'hypothèse que ces AG puissent être ligands de PPAR par leur thioester de CoA, mais ils n'ont pas observé d'activation de PPAR par les lc acyl-CoA. D'autres études ont également montré que le palmitoyl-CoAn'est pas activateur de PPARα ni RXRα [730]. Ils sont cependant fixés par PPARα et γ, pour lesquels ils jouent un rôle d'antagonistes en inhibant leur activation [729],[52].

Les acyl-CoA modulent l'activité d'autres facteurs de transcription. Ainsi $HNF_{4\alpha}$ est régulé par les acyl-CoA mais pas par les AG, activé ou inhibé selon la taille et le degré de saturation de la chaîne. La fixation des acyl-CoA à chaîne < 12 carbones ne dépend pas de la taille ni de l'insaturation de la chaîne, alors que ce facteur est activé par C16:0 et inhibé par C18:0, 18:2, 18:3 et 20:5 [730]. L'interaction du myristoyl-CoA avec ce récepteur pourrait impliquer des modifications post-traductionnelles car ses effets sont différents selon le système d'expression : il est parfois activateur parfois non. L'effet dépend aussi de la dose, agoniste de 1 à 10 μM, mais antagoniste de 20 à 100 μM [731]. L'effet peut aussi dépendre du facteur impliqué : le PPRE de la 3-cétoacyl-CoA thiolase B, par exemple peut fixer PPARα et HNF4α. La fixation de HNF résulte en une transactivation, mais pas celle de PPAR, ce qui suggère un rôle répresseur par compétition pour PPAR [70]. Les acyl-CoA de xénobiotes, comme les proliférateurs de peroxysomes sont aussi ligands de HNF4α, en compétition avec le palmitol-CoA, et sont antagonistes. L'effet hypolipidémiant de ces molécules (Medica-16,

nafénopine, bezafibrate) passerait par PPARα chez les rongeurs mais par HNF4α chez l'Homme [732].

Les lc acyl-CoA sont encore inhibiteurs de la fixation de la thyronine à son récepteur nucléaire (Ki = 0,5 μM), mais pas du récepteur aux glucocorticoïdes [705]. Ils sont enfin inhibiteurs compétitifs de l'ADN de l'ARN polymérase de *E. coli* (Ki = 1-20 μM) [733].

- **"Ligands" des membranes**

Il existe un pool membranaire important d'acyl-CoA s'ajoutant au pool cytosolique formé par les ACBP (2 sites de fixation pour le palmitoyl-CoA : Kd = 15 et 60 μM, [734]). Sans ACBP, les membranes contiennent 95 % du palmitoyl-CoA [735] ; or les membranes de PC ne supportent pas plus de 15 % d'oléyl-CoA sans que leur intégrité ne soit affectée [705], et les vésicules microsomiales sont perméabilisées par 10 à 20 μM de palmitoyl-CoA[736]. Néanmoins, les acyl-CoA interagissent moins fortement avec des membranes de PC que les acyl-carnitines (Kd = 2,2 μM pour le palmitoyl-CoA contre 1,6 μM pour la palmitoyl-carnitine) [737]. Ainsi la palmitoyl-carnitine provoque une solubilisation des membranes et une transition de phase lamellaire en phase micellaire mais pas le palmitoyl-CoA [735], malgré une CMC plus forte (Tableau 7). Les acyl-CoA inhibent les processus de fusion membranaire tout en favorisant les bourgeonnements de vésicules [738],[739].

	Myr-CoA	**Palmitoyl-CoA**	**Palmitoyl-CoA [664]**	**Oléyl-CoA**	**AA-CoA**	**Palmitoyl-carnitine**
CMC (μM)	6 - 17	1,5 – 4,5	> 50	1,2 – 6,8	0,3 – 1,8	19

Tableau 7 Concentrations micellaires critiques (CMC) de différents acyl-CoA ([715] [714])

Outre cette fixation de nature réversible, nous avons vu que les acyl-CoA sont des intermédiaires de la synthèse des phospholipides membranaires, que nous étudierons ultérieurement.

C. 2. b) Acyl-CoA comme agent acylant

Leur participation essentielle au métabolisme des lipides n'est pas la seule fonction des acyl-CoA, qui sont aussi utilisés par la cellule pour leur capacité acylante envers des protéines. On distingue 3 formes majeures d'acylation des protéines : prénylation, myristoylation et palmitoylation. Elles concernent plus de 200 protéines, permettant ou facilitant leur ancrage dans les membranes, une localisation subcellulaire précise, la stabilisation d'interactions protéines / protéines et des régulations enzymatiques.

La prénylation définit la fixation covalente d'un isoprénoïde (farnésol [C15] ou de géranylgéranol [C20]) à des Cys pour former un lien thioether. Elle n'implique donc pas d'acyl-CoA. Elle est catalysée par 2 classes d'enzymes : les CAAX prényltransférases et les CC ou CXC prényltransférases, selon leur sélectivité de séquence du substrat protéique [740]. On connaît 3 isozymes dans le cerveau de mammifères : FPT-1 (Farnésyl protein transferase, de classe CAAX), GGT-1 (geranylgeranyl-transferase, de classe CAAX) et GGT–2 (de classe CC ou CXC). Dans le foie, FPT-1 est principalement dans la matrice mitochondriale et microsomiale [741]. La géranylgéranyl-transférase catalyse la thioethérification par un substrat géranylgéranyl-diphosphate [742]. La fonction de cette modification chimique des protéines n'est guère connue. Elle est probablement impliquée dans l'association membranaire et les interactions protéines/protéines : la farnésylation de PGI2-R ne modifie pas ses propriétés de fixation de ligand mais son couplage à l'adénylate cyclase et PLPc [743].

• Myristoylation

La myristoylation procède d'une amidation irréversible. Elle est généralement cotraductionnelle, apparaissant après l'élimination de la Met Nt par la méthionylaminopeptidase, mais peut aussi être post-traductionnelle. Elle est catalysée par une N-myristoyltransférase (NMT, EC 2.3.1.97), qui acyle la Gly Nt [744] après fixation séquentielle du myristoyl-CoA puis de la protéine substrat [745]. Il existe plusieurs NMT : on en connaît 6 dans le cerveau de bœuf (protéines d'environ 50 kDa), et 2 gènes ont été clonés chez l'Homme : nmt-1 et –2, mais nmt-1 est à l'origine de 4 protéines de tailles différentes (50-68 kDa) [746]. Les petites NMT-1 sont cytosoliques, tandis celles de plus haut PM sont membranaires et cytosoliques. NMT-2 (65 kDa) est surtout membranaire [747]. La NMT d'*Arabidopsis thaliana* est cytosolique et ribosomiale, en accord avec sa fonction cotraductionnelle, et présente une forte sélectivité pour le myristoyl-CoA comme substrat [748].

La myristoylation est souvent indispensable à la fonction de la protéine, mais on ignore en général par quel mécanisme elle intervient. Chez la protéine neuronale CAP23/NAP-22, elle est impliquée dans des interactions interprotéines, puisqu'elle est nécessaire à la fixation de la calmoduline et à la phosphorylation par PKc [749].

• Rétinoylation

Le rétinoate peut être fixé de façon covalente à de nombreuses protéines, par un lien thioester. La rétinoylation passe par un intermédiaire acyl-CoA qui acyle des protéines de taille variée, principalement autour de 25 et 45 kDa, mais aussi de plus grosse taille (100, 200 kDa). Le taux de rétinoylation tissulaire est variable, important dans les testicules, moins marqué dans les poumons, cerveau et reins et moins encore dans le foie. Au niveau subcellulaire, les mitochondries sont les principales cibles, mais le noyau est aussi fortement impliqué, plus que les microsomes et le cytosol [750]. Dans des cellules leucémiques, la rétinoylation concerne essentiellement des protéines microsomiales (70 %) de PM d'environ 55 kDa. La fixation covalente est saturable (ED50 = 300 nM) [751]. Chez les macrophages aussi, cette acylation est saturable (maximale à 18 μM d'esters de rétinoate), et les adduits sont stables (perte de 20 % en 8 h). Peu des cibles protéiques du rétinoyl-CoA sont caractérisées, mais on compte la sous-unité régulatrice de PKa, la thioredoxine réductase, la vimentine et la cytokératine [752].

L'activité rétinoyl-CoA synthétase est microsomiale et nucléaire, principalement localisée dans le foie et les testicules, moins dans les reins, le cerveau et le pancréas. Elle semble assurée par les lc ACS car il existe une compétition avec les AG [753].

• Cholestéroylation

Le cholestérol est à la fois donneur et accepteur d'acyle. Il est ainsi acylé sur son hydroxyle par des acyl-CoA, selon un mécanisme catalysé par des acyl-CoA : cholestérol-acyltransférases pour former des esters de cholestérol [754]. Mais il est lui-même capable d'acyler des protéines, comme les protéines Hedgehog [16] et d'autres non caractérisées [755].

• Palmitoylation

La palmitoylation est la thioestérification d'une Cys en général, post-traductionnelle, covalente mais réversible par hydrolyse de la fonction thioester. Il semble exister deux mécanismes de palmitoylation de protéines : enzymatique, catalysée par des acyl-transferases (palmitoyl-transférase), et non enzymatique (auto-palmitoylation). La palmitoylation est la

fixation majeure d'AG, mais d'autres AG contribuent aussi aux modifications chimiques des protéines, comme l'AA. Chez les plaquettes, par exemple, le palmitate forme 3 fois plus d'adduits que l'AA. L'acylation concerne des protéines de 17, 37, 47, et 129 kDa principalement, pour les 2 AG. Cependant le lien chimique n'est pas toujours identique : thioester à 100 % pour le palmitate mais seulement 60 % pour l'AA. La fixation covalente, observée après incubation de l'AA, n'implique d'ailleurs peut-être pas uniquement l'AA-CoA mais aussi des métabolites issus de la voie COX car l'indométacine est inhibiteur de la formation d'adduits [756].

La palmitoylation est-elle enzymatique ?

Une acylation non enzymatique a été rapportée pour les Tyr K de la famille Yes qui sont S acylées après myristoylation. L'acylation spontanée dépend du temps et de la taille de la chaîne acyle, efficace avec le palmitoyl- et myristoyl-CoA mais pas l'acétyl-CoA [757]. De même, la PKc s'auto-palmitoyle (le myristoyl-CoA, l'AA-CoA, le CoASH, l'AG et le DAG ne forment pas d'adduit) [758]. L'AA-CoA est lui aussi capable d'acyler plusieurs protéines non dénaturées ; ce mécanisme est plus ou moins inhibé par des acyl-CoA compétiteurs, l'ATP et le CoASH. Parmi ces protéines, on compte une UGT dont l'activité est inhibée par l'acylation [759]. L'inhibition due à l'ATP et CoASH suggère que la reconnaissance de l'acyl-CoA soit due en partie au groupement adénosine, comme on le note aussi pour le carboxyatractyloside (CAT), le récepteur au bogkrekate (BKA), l'ATP / ADP carrier de membrane interne de mitochondries, l'UCP (uncoupling Protein) et d'autres protéines mitochondriales, même s'il n'a pas été montré d'acylation pour ces protéines [760]. D'autres protéines auto-acylées sont présentées dans le Tableau 8.

Cependant, une palmitoylation enzymatique est aussi observée avec des Tyr K de la famille Src déjà myristoylées [761]. Les protéines Gi et s sont palmitoylées sur une ou plusieurs Cys Nt par une palmitoyl-transférase (PPT) membranaire dont le substrat est l'hétérodimère G^{myr}. Cette enzyme est présente dans la membrane plasmique, peu ou pas dans le Golgi, le RE et les mitochondries de foie [762]. Deux PPT (PM = 30 et 33 kDa) peuvent acyler la protéine P21/Ras, spécifiques du palmitoyl-CoA par rapport au myristoyl-CoA tant comme substrat que comme inhibiteur (Km_{palm} = 4,3 µM, Km_{Ras} = 0,8 µM) [763]. SNAP-25 est auto-acylée, mais la palmitoylation est grandement favorisée par une interaction avec la Syntaxine-1 qui n'a pas d'activité palmitoyl-transférase. On retrouve des interactions protéines/protéines augmentant la palmitoylation avec la protéine Gα et ses partenaires βγ [764].

Il est donc difficile de savoir si la palmitoylation des protéines est spontanée ou nécessite une palmitoyl-transférase, d'autant que les études sont parfois contradictoires pour une même protéine : on rapporte ainsi une auto-palmitoylation pour la protéine de myéline P0 [765], alors que d'autres travaux mettaient en évidence un processus enzymatique [766]. L'explication de ces paradoxes pourrait résider dans l'efficacité de la palmitoylation, qui serait peut-être possible spontanément, mais est catalysée, au sens propre, par des enzymes.

La palmitoylation nécessite-t'elle une structure native ?

La préservation structurale semble elle-aussi ne pas être systématiquement indispensable. On note en effet que la tubuline [767], la protéine de myéline PLP [766] ou la protéine Giα [768] requièrent une conformation intacte pour être palmitoylées. La PLPd-1 est acylée si elle dispose de la région Nt (1-168), mais plus si ce domaine est tronqué [769]. La PKc [758] comme la rhodopsine [770] présentent une sélectivité d'acyle, ce qui suggère un site de fixation précis. Enfin, un certain nombre de protéines acylées sur des Cys présentent encore une capacité d'acylation non négligeable quand les Cys sont mutées en Ser, comme avec le récepteur à l'endothéline B [771], le récepteur à la transférine [772], la cavéoline

[773] ou CCR-5 encore palmitoylé à 40 % [774]. La Ser est un résidu intrinsèquement peu nucléophile, et le fait qu'il puisse au moins en partie suppléer une Cys argue en faveur d'un environnement tridimensionnel capable d'activer sa nucléophilie.

Par contre, des peptides synthétiques de quelques résidus correspondant à la région palmitoylée de protéines peuvent être acylés, comme si la séquence primaire suffisait. C'est le cas de peptides de P21/Ras [775], de kinases Src [757] ou de la protéine de myéline P0 [765]. Là encore, l'efficacité relative des acylations de protéines natives et des peptides n'ayant pas été comparée, il est difficile de conclure réellement qu'une courte séquence primaire peut suffire à l'acylation de protéines.

Effet de l'ACBP sur la palmitoylation

Le rôle d'ACBP est variable : elle inhibe la palmitoylation du peptide acylé de la kinase Lck [757]. A 20 μM, elle inhibe à 90 % l'acylation autocatalytique de peptides portant les séquences palmitoylées de la kinase Lck et de la myéloprotéine P0 [776]. Elle inhibe aussi la palmitoylation enzymatique de Gα avec une IC50 de 8 µM [695]. Elle est par contre sans effet sur l'acylation de la kinase Yes [757] ou de CPT-1 [777].

Nombre d'acyles et nature du lien chimique

Le nombre de palmitates portés par une protéine varie de 1 à 7 (Tableau 8). La fonction chimique liant le palmitate à la protéine est de 3 types : amide (avec des Lys essentiellement), oxyester (avec des Ser et Tyr) et thioester (Cys). Il est difficile d'estimer la fréquence relative de chacun de ces liens car on utilise souvent l'hydroxylamine comme révélateur de fonction thioester, alors qu'elle hydrolyse aussi efficacement les autres esters. On a estimé que pour la tubuline, par exemple, 70 % des palmitates sont associés par des fonctions thioesters, 15 % par des oxyesters, et 10 % par des amides [778].

Durée de vie de l'adduit

La stabilité intrinsèque de la palmitoylation est assez limitée, avec une demi-vie variant de 20 min pour P21/Ras [779], à 50 min pour l'ankirine [780] voire 90 min pour Gsα [781]. Mais ces durées de vies ne concernent que celles des l'adduits purifiés : les palmitates sont régulièrement renouvelés dans les cellules pour que l'acylation se prolonge 1 à 2 j.

Conséquences de la palmitoylation

La palmitoylation est presque toujours associée à l'insertion membranaire de la protéine, la permettant, la favorisant ou assurant une translocation fonctionnelle. Elle peut aussi permettre un ciblage subcellulaire précis, comme l'association avec les rafts. La palmitoylation assure l'insertion membranaire du récepteur à l'histamine H2 [782], de SNAP-25 [783] et du pro-TNF [784]. Elle régule ainsi positivement le récepteur à l'histamine ou la PKc [600], mais maintient le TNF sous une forme non mature inactive. Elle permet la translocation de P21/Ras [779],[775] ou de PKc en les activant, alors que la palmitoylation de eNOS [785] la régule négativement et que la dépalmitoylation de Gsα l'active [781]. L'acylation de protéines solubles pourrait aussi permettre une régulation de leur activité par insertion membranaire : plusieurs protéines glycolytiques solubles sont ainsi parfois associées aux membranes, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate-DH, la fructose-1,6-diphosphate-aldolase ou la phosphoglycerate-kinase, dont l'activité membranaire représente 5 % de l'activité cellulaire totale [786].

La tubuline est partagée entre les fractions cytoplasmique et membranaire. La palmitoylation contribue son association membranaire (23 % de la tubuline cytoplasmique est acylée contre 77 % dans les membranes, et 80 % dans la membrane plasmique) mais n'est pas le seul facteur [787],[788]. Dans la membrane plasmique, une faible proportion de la tubuline

est associée aux rafts [789]. La neurofascine est aussi localisée dans les rafts quand elle est acylée [790], comme Goiα [791] ou la kinase Src Fyn [792],[793].

Autre exemple de localisation membranaire précise : l'acylation du Nt de flagellar calcium-binding protein (FcaBP) de *Trypanosoma cruzi* est nécessaire à sa localisation flagellaire correcte [794].

La palmitoylation intervient également dans les interactions protéines/protéines. L'acylation de PLPd-1 est nécessaire à sa régulation par phosphorylation, certainement en permettant l'interaction avec une kinase, et affecte son association avec les membranes [769]. D'autres protéines palmitoylées sont connues pour disposer de nombreux partenaires avec lesquels ils interagissent physiquement, comme l'ankyrine, Cav-1 [773],[795], PKc [796] ou eNOS [797]. De telles interactions peuvent permettre un couplage fonctionnel pour la transduction du signal, comme on l'observe pour l'isoprénylation du récepteur à la PGI2 [743], ou la palmitoylation de GPCR : un défaut de palmitoylation du récepteur aux endothélines inhibe la transduction du signal (perte de l'inhibition de l'adénylate-cyclase, perte de la stimulation de PLPc) [771]. L'acylation de plusieurs protéines peut d'ailleurs être coordonnée, comme celle de G11α avec des GPCR [798].

En ce qui concerne les récepteurs, la palmitoylation peut être indispensable à l'expression de surface, comme pour CCR-5 [774] ou pour le récepteur à la thyrotropine [799], ou à l'endocytose pour le récepteur à la transferrine [772]. La palmitoylation du récepteur aux chemokines CCR-5 n'influe pas sur l'endocytose ni sur le signaling mais triple sa mobilité membranaire. Non palmitoylé, il est piégé dans le RE [774], moins exprimé en surface cellulaire et non-associé aux rafts comme quand il est acylé. La palmitoylation augmente aussi considérablement sa durée de vie (demi-vie = 4,5 h contre 1,5 h non palmitoylé) en défavorisant sa protéolyse [800].

La palmitoylation peut encore influencer la stabilité structurale des protéines : elle inhibe ainsi le dépliement de la protéine surfactant C [801] et provoque une modification conformationnelle de $G_0\alpha$ [802].

La palmitoylation permet enfin la régulation d'enzymes par inhibition irréversible. La carbamoyl-phosphate-synthétase-1 mitochondriale est ainsi inhibée de façon irréversible par acylation [777]. On a ainsi montré que des acyl-CoA à longue chaîne (palmitoyl-, oleyl-CoA) forment des adduits et inhibent les UGT, selon un mécanisme particulier, puisque l'inhibition de l'enzyme est due à la formation du complexe {enzyme ; acyl-CoA} et non à l'acylation (IC50 # 30 μM) [803].

La réversibilité de la palmitoylation amène à penser que ce processus pourrait permettre des régulations au niveau des interactions protéine/protéine ou protéine/membrane. Ainsi la demi-vie du palmitoyl- de la protéine G (90 min) est divisée par 10 après l'activation du complexe par un antagoniste de récepteur adrénergique, ce qui induit alors la translocation de la membrane plasmique vers le cytosol de Gs [781]. L'hydrolyse du palmitoyl- est assurée par une enzyme à activité G palmitoyl thioestérase dont l'activité est prépondérante dans le cytosol alors que la protéine est plus concentrée dans les microsomes [804]. Plusieurs enzymes catalysent cette hydrolyse, comme la palmitoyl-protein thioesterase-1 (PPT-1) ou l'acyl-protein thioesterase-1 (APT-1) qui dépalmitoyle Gα et Ras. APT-1 est aussi une phospholipase [805]. Au même titre, eNOS est régulée dynamiquement par une double acylation (myristoyl-, palmitoyl-), facilitant ses interactions avec la cavéoline et la membrane cavéolaire [797]. Ceci a probablement des implications enzymatiques car eNOS a une production de NO limitée quand elle n'est pas localisée correctement. La régulation peut encore être affinée par le type d'acyle qui influe considérablement sur la durée de présence de

la protéine dans les membranes : ainsi les doubles acyles myristoyl-, farnesyl- et géranyl-géranyl- sont moins fortement fixés que le palmitoyl-, thermodynamiquement et cinétiquement (demi-vie = 0,2 à 120 h selon les acyles) [806]. Le modèle de piégeage membranaire cinétique décrit la palmitoylation comme un moyen de ciblage précis quant à l'ancrage membranaire : la palmitoyl-transférase fixerait ainsi la présence de protéines à un endroit donné [807]. L'analyse du trafic membranaire de eNOS permet ainsi de proposer un modèle où la palmitoylation réduit la mobilité de la protéine en la piégeant dans des domaines précis, et lui évitant une diffusion latérale aléatoire [808].

- **Acylation par d'autres AG**

Nous avons vu que l'acylation des protéines concerne plusieurs AG et pas uniquement le palmitate. Le dosage des AG libérés après hydrolyse des protéines de foie, cœur et rétine de Bœuf a révélé que l'acylation due aux lc acyl-CoA est majoritaire, et très forte pour le palmitate et stéarate, tandis que les myristoylations sont très faibles. Il n'est pas possible de corréler les concentrations en acyl-CoA tissulaires et la proportion des acylations [809]. Néanmoins d'autres études ont montré que l'approvisionnement cellulaire en AG modifie le type d'acyle fixé aux protéines [810]. $G_0\alpha$, GAP-43 et P21/Ras sont ainsi acylées de façon hétérogène, même si le palmitate reste toujours l'acyle majoritaire, devant l'oléate et l'AA pour Fyn, par exemple [811].

Protéine	isoforme	Acylation enzymatique	Région acylée	Myristylation	Résidu palmitoylé	Ref
Protéines G	G01a		Nt	G2		[791]
	G0a	N			C3 (Trypsine)	[802]
	Gsa				C3 (C3A)	[812] - [781]
	Gsa	N		?	pas C3 (C3A), C160 (Trypsine)	[813]
	Gia1	N		myr	C3 (Trypsine)	[768]
	Gia1			G2 (G2A)	C3 (C3S)	[814] -[815]
	G11a				C9 C10 (C9,10S)	[798]
	Gia1				C3 (C3A)	[762]
	Gsa, G0a				C3 (C3A)	[816]
	P21 / Ras		Ct		C181 (C81S) peptide	[775]
			Ct	farnésylation	C181, C184	[763] -[779] [806, 817]
GPCR						[818]
	CCR-5		Ct		C321,323,324 (CxS)	[800],[774]
	PGI2 R	isoprénylation			C414 (C414S)	[743]
	Histamine H2 R				C305 (C305A)	[782]
	Synaptotagmine 1,2,3		Nt		C74-82 (Trypsine)	[819, 820]
	Neurofascine				C1213 (C1213L)	[790]
	Rhodopsine	N				[770] - [821] - [822] - [823]
	Thyrotropine R		Ct		C699 (C699A)	[799]
	Endothéline B R (ETb)		Ct		C403,405 (CxS)	[771]
	AR a2A		Ct		C442 (délétion)	[824]
	Transferrine R		Nt		C62,67 (CxS, CxA)	[772]

Protéine	isoforme	Acylation enzymatique	Région acylée	Myristylation	Résidu palmitoylé	Ref
Src Kinases	Lck		Nt	G2	pas C3 (C3S), mais C5 (C5K)	[792]
	Fyn		Nt	G2	C3,6 (C3,6A)	[792] - [793]
	Yes	N	Nt	G2	C3 (C3A peptide)	[757]
Tubuline	a>b	N				[778] - [787] [788] - [789]
SNAP 25					C85-92 (CxS)	[783]
		N	milieu			[764] - [819] - [825]
Myéline	PLP	N			T198	[766]
	P0	oui				[766]
	P0	N			C153 (peptide IRYCWLRR)	[765]
P63			Nt		C100 (délétions)	[826]
PLPd-1			Nt		C240,241	[769]
pro-TNF			Nt		C30 mais pas C47 (CxA)	[784]
PKc	cerveau, foie	N	Nt (32kDa)			[758] - [827]

Proteine	isoforme	Acylation enzymatique	Région acylée	Myristylation	Résidu palmitoylé	Ref
GAP-43		N mais faiblement				[768] [811]
NOS	eNOS			G2 (G2A)	C15,26	[126]
	eNOS		Nt		C15,26 (CxS)	[785]
	eNOS					[797]
Cavéolines	Cav-1a et b		Ct		C156 (C156S) C133,143 un peu ?	[773] - [828] - [795]
Surfactant C					C5, C6	[801]

Tableau 8 Caractéristiques de la palmitoylation de protéines membranaires

C. 3. Les membranes cellulaires

Au cours de ce rappel bibliographique, nous nous sommes situé à plusieurs reprises au niveau des membranes cellulaires, que ce soit à l'origine de la production des PG, comme lieu de passage et de stockage des AINS, ou encore dans le devenir des acyl-CoA endogènes et xénobiotiques. Les membranes constituent donc un point de concours pour des voies centrifuges et centripètes que nous avons jusqu'alors suivies. Il nous apparaît donc important de caractériser ce compartiment cellulaire, crucial dans notre étude.

Les membranes cellulaires sont constituées de 3 types de lipides (Figure 53) : glycérophospholipides, sphingolipides et cholestérol. La composition en lipides varie considérablement selon le type cellulaire. Chez l'érythrocyte humain par exemple, la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) représentent 50 % des phospholipides membranaires, la sphingomyéline (SM) 18 % et le cholestérol 23 %. Cette composition est en outre asymétrique entre les deux feuillets : PS et PE sont à 80 % dans le feuillet interne. Le feuillet externe ne contient pas de PS (l'exposition de PS en surface cellulaire étant une propriété des cellules apoptotiques) mais 20 % de PE, SM et PC [829]. L'asymétrie de composition lipidique des membranes d'érythrocyte est assurée par Mrp-1 et une amino PL-translocase [550]. Il est notable que SM, PE, PI et PS sont résistants aux PLA2 de venin d'abeille, contrairement à la PC [830].

C. 3. a) Généralités et métabolisme membranaire

• Les phospho diacyl glycérolipides

Métabolisme

La biosynthèse des glycérolipides (PC, PE, PI, ...) dérive du glycérol-3-phosphate et dihydroxyacétone-phosphate qui produisent aussi le plasmalogène, via les CTP, phosphocholine-cytidylyltransférases (CCTα ou β) et l'acétyl-CoA alkyl-lysoglycero-3-phosphocholine-acétyltransferase [831]. De plus, une phospholipase (certainement iPLA2) hydrolyse les PC (hydrolyse de l'acyle sn-1) en glycéro-phosphocholines qui sont ensuite excrétées [832].

Les membranes phospholipidiques sont susceptibles de subir un remodelage par l'action combinée de phospholipide-acetyltransférases et de phospholipases. Principalement présentes dans le RE (peu dans la membrane plasmique), ces enzymes utilisent comme substrat un monoacyl-glycérol-PC et un acyl-CoA saturé ou insaturé selon la position libre et le type d'enzyme [833]. Ces remodelages (élongation, désaturation de chaîne) passent par des intermédiaires acyl-CoA et sont favorisés par une protéine cytosolique (ACBP ?). Il semble que la synthèse d'acyl-CoA pour ce mécanisme existe sous forme ATP-dépendante et indépendante [834].

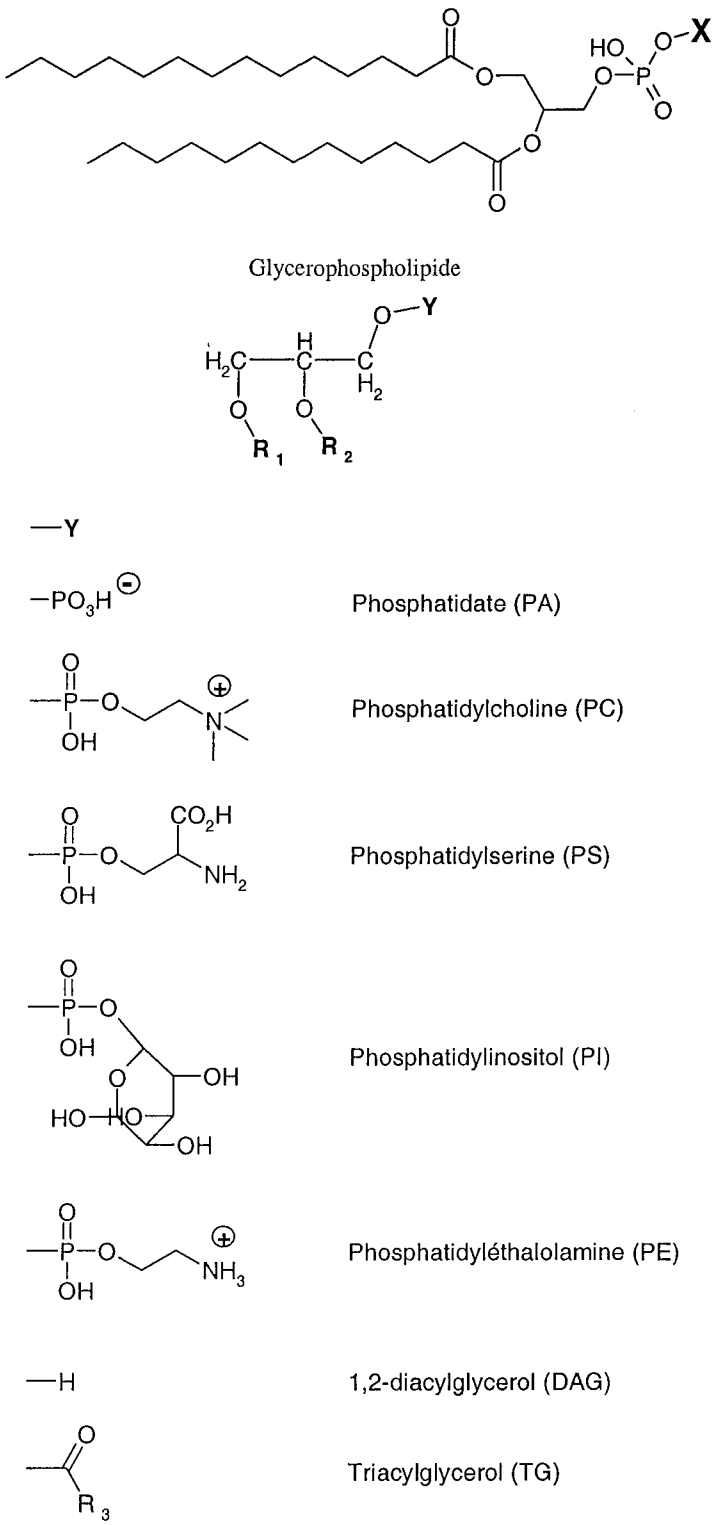


Figure 53 Structure chimique des principaux lipides et phospholipides

Etude structurale

Les membranes biologiques sont des systèmes complexes dont l'étude au niveau moléculaire est particulièrement délicate, puisque les techniques cristallographiques, par exemple, ne peuvent être réalisées qu'en absence d'eau, rendant ainsi mal compte de la réalité

physiologique de ces systèmes. Les principaux moyens d'analyse impliquent donc différentes techniques de modélisation moléculaire, validées et affinées par les données physico-chimiques apportées par RMN, RX, spectroscopies IR, Raman, de fluorescence. On utilise ainsi principalement la dynamique moléculaire qui simule les atomes par l'équation classique de Newton. On décrit ainsi des interactions covalentes (définies par la longueur de liaison, ses angles, constante dihédrale), des interactions non covalentes (électrostatiques et de Van der Waals pour lesquelles on assigne une charge partielle et des paramètres d'attraction ou répulsion pour les atomes). A l'aide de différents champs de force (diverses paramétrisations et simplifications des données précédentes), on étudie par dynamique moléculaire des interactions molécule par molécule. La complexité de ces calculs limite l'utilisation de la dynamique moléculaire en temps et en taille de l'échantillon (de l'ordre de la ns pour quelques nm de 100 à 200 molécules de lipides). Autre technique de modélisation, la dynamique stochastique ne simule explicitement qu'un lipide ou un petit groupe de lipides. On étudie alors l'effet de l'environnement (eau, lipides) sur cet échantillon, avec une échelle de temps moins restreinte qu'en dynamique moléculaire. Les méthodes de Monte Carlo sont d'autres algorithmes décrivant plus l'état d'équilibre que la dynamique.

Ces études utilisent souvent des membranes de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoylPC (DPPC) ou distéaroylPC (DSPC) comme modèle. Il a ainsi été établi un modèle de membrane fluide de DPPC dans l'eau en quatre régions (Figure 54).

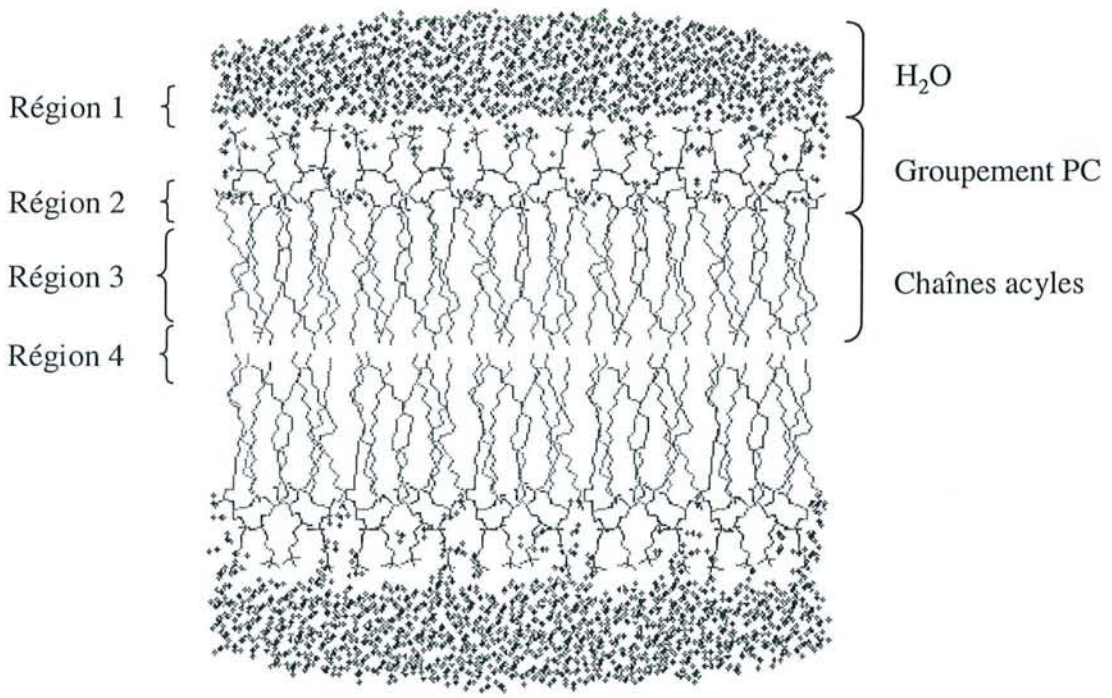


Figure 54 Modèle de bicouche phospholipidique d'oléyl-palmitoyl-PC

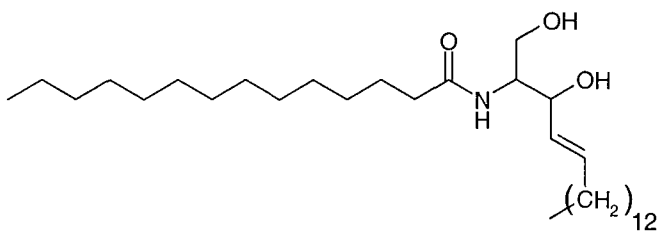
La bicouche est entourée de molécules d'eau représentées en billes. Le complexe a été soumis à une minimisation d'énergie qui montre la limite de pénétration de l'eau dans la membrane (d'après [835])

La région 1 est constituée d'eau perturbée par les têtes polaires des lipides (coquille en forme de clathrate pour DMPC, fortes interactions avec PE). La région 2 est la plus dense du système. L'eau y est sous forme de coquille autour des têtes polaires ; le coefficient de diffusion des petites molécules y est le plus faible. La région 3 commence au carbonyle de la chaîne lipidique et constitue la limite de pénétration de l'eau. Constituée de chaînes partiellement ordonnées, elle a une densité comparable à l'hexadécane. La région 4 est peu

dense (densité proche du décane), très hydrophobe et très peu ordonnée. Ce modèle décrit une membrane fluide, prépondérante physiologiquement. Les lipides peuvent en effet exister sous trois états physiques : gel, cristal liquide, et cristal. Seuls les deux premiers sont fluides et physiologiques. Une membrane binaire DMPC / DSPC (1:1) est ainsi sous forme de gel à 10 °C, réellement fluide à 55 °C et mixte vers 38 °C. L'état fluide cristal liquide est symétrique car il existe une orientation des molécules en couches, liquide car les molécules ont une grande mobilité (diffusion latérale), et solide car ces molécules s'orientent dans la même direction.

- **Les sphingolipides**

Leur synthèse dérive des céramides. SM et PC sont les phospholipides majoritaires du feuillet externe des membranes plasmiques. La PC (70 à 80 % des phospholipides membranaires) a un acyle long en sn-1 (souvent le palmitate) et un mono- ou polyinsaturé en sn-2 (1,1 à 1,5 double liaison cis par molécule) tandis que la SM a un seul acyle variable de C16:0 à C24:1Δ15 (0,1 à 0,35 double liaison cis par molécule) (Figure 55).



Sphingophospholipide

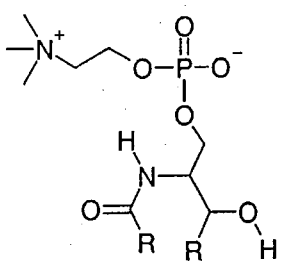
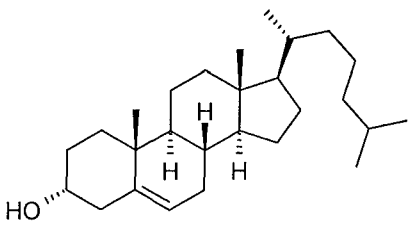


Figure 55 Structure générale de la sphingomyéline

- **Le cholestérol**

Il provient du 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMGcoA). Régulateur important de nombreuses enzymes, le cholestérol est lui-même régulé par l'acyl-CoA-cholestérol-acyltransférase (ACAT) et la formation de sels biliaires (tauro- et glycocholates). Les différentes phases membranaires décrites précédemment (gel, liquide cristal) sont très sensibles à la présence de cholestérol qui désordonne la phase gel mais ordonne la phase liquide cristal et facilite ainsi les transitions de phase. Par ailleurs, les membranes plasmiques cellulaires présentent des domaines riches en cholestérol d'environ 10 nm de diamètre en phase gel et mixte mais pas en phase très fluide (55 °C). Le nombre, mais pas la taille, des domaines augmente avec la température [836]. Des modélisations de membranes mixtes phospholipides / cholestérol ont montré qu'il agit considérablement sur la structure membranaire (augmente de 2,5 Å l'espace inter-lamellaire et de 1 Å la hauteur de la bicouche)

et la dynamique lipidique (constante de diffusion réduite de 3 fois), à l'échelle de la ns sur une membrane de DPPC / cholestérol (8:1) [837]. Dans une membrane de DMPC à volume constant (16 DMPC, 16 cholestérol, 664 H_2O), l'aire par molécule de DMPC est doublée en présence de cholestérol, à l'état cristallin ou fluide [838]. Enfin le cholestérol semble sélectif de certains lipides : il interagit plus avec des SM saturées qu'avec des PC à longues chaînes (désorption plus faible), ce qui n'est plus vrai avec une SM insaturée [839]. Il module enfin l'activité d'enzymes associées aux membranes, directement ou par son effet sur le comportement des phospholipides.



Cholesterol

- **Les membranes phospholipidiques ont une composition dynamique**

Les groupements acyles des PL ne sont pas statiques, mais changent dynamiquement en fonction des conditions cellulaires. Ce remodelage implique 4 réactions d'acylation chez les mammifères, qui ne nécessitent pas forcément la formation d'acyl-CoA intermédiaire et qui peuvent bénéficier d'activités ACS particulières. Le remodelage est ainsi assuré par : **(i)** une activité acyl-CoA-lysoPL-acyltransférase, particulièrement impliquée dans l'accumulation de PUFA dans les PL dans la mesure où elles sont sélectives des acyl-CoA de PUFA comme donneur d'acyle, avec du lysoPC ou lysoPI comme accepteur ; **(ii)** le système de transacylation dépendant du CoA, qui procède d'un transfert direct de l'acyle d'un PL à un lysoPL de façon dépendante du CoASH, mais sans génération d'acide libre. Ce système est très sélectif de l'AA, du LA et du stéarate comme acyle et de PI comme accepteur préférentiel. L'acyl-CoA-lysoPA-acyltransférase (LPAAT) participe à ce système. C'est une protéine de 66 kDa à activité ACS indépendante de l'ATP. Elle assure aussi une fonction lysoPL spécifique en sn-2. Elle est responsable d'un remodelage de 25 % des PI et de 5 % des PC en 30 min dans des microsomes hépatiques [840]. ; **(iii)** le système de transacylation indépendant du CoA, transférant l'acyle d'un diacyl-PL à un lysoPL sans cofacteur supplémentaire, sélectif des PUFA de C20 à C22 ; **(iv)** une activité lysoPL / transacylase, qui transfère l'acyle unique d'un lysoPL à un autre, formant ainsi un diacyl-PL et une glycéro-3-PC.

C. 3. b) Existence de microdomaines membranaires (rafts) et conséquences biologiques

Des domaines de structure lipidique particulière ont récemment été découverts, bouleversant ainsi le concept de modèle membranaire uniforme. Ces domaines peuvent être envisagés comme des « radeaux » (rafts), flottant dans la membrane fluide.

On peut ainsi observer une séparation de phases avec un mélange DPPC / PC et DPC / SM. DPPC et SM sont concentrés dans une phase « solid-like », alors qu'une phase liquide désordonnée est enrichie en PC (ou DPPC selon les cas). Cette séparation de phase dépend de

la concentration en SM ou DPPC, mais les concentrations nécessaires sont inférieures à celles qu'on trouve dans la membrane plasmique [841]. Plus que la tête polaire, ce sont surtout les chaînes acyles qui gouvernent les affinités lipidiques, les chaînes saturées ordonnées s'associant mal aux chaînes insaturées mobiles et volumineuses. Ainsi la SM est essentiellement constituée d'AG saturés (palmitate et oléate, tandis que l'AA y est rare), alors que la PE est surtout composée d'AA et d'oléate [842].

Outre la SM, le cholestérol est un autre composant important des microdomaines membranaires. Il existe une corrélation entre les stérols induisant la formation de domaines et ceux qui augmentent la résistance aux détergents, et entre le packing des stérols et leur effet membranaire : les stérols augmentant la formation de domaines et diminuant leur sensibilité aux détergents induisent le plus fort packing, et *vice versa* [843]. Le packing influe aussi sur la perméabilité : des membranes contenant 50 % de cholestérol sont 2 fois moins perméables à l'eau que celles qui n'en contiennent pas. A l'inverse, les AG insaturés augmentent la perméabilité à l'eau au niveau des têtes polaires (2 fois plus pour le palmitate ou le myristate que pour l'oléate) [844]. Comparativement aux autres membranes cellulaires, les rafts sont ainsi enrichis en cholestérol, et sont l'unique localisation de lactosyl-céramide et de SM (Tableau 9) [845].

LIPIDES	COMPOSITION LIPIDIQUE DE LA CELLULE COMPLETE (%)	COMPOSITION LIPIDIQUE D'UNE VESICULE (%)	REPARTITION DES LIPIDES DANS LA VESICULE (%)
Phospholipides			
Phosphatidyl éthanolamine	28,8	18,8	5,7
Phosphatidyl choline	22,85	10,9	5,1
Phosphatidyl sérine	2,21	2,7	9,6
Phosphatidyl inositol	4,61	1,8	5,5
Cardiolipine	1,81	ND	ND
Sphingomyéline	1,11	14,2	96,2
Cholestérol	11,61	31,9	26,4
Triglycérides	23,41	ND	ND
Glycolipides neutres			
Cérébrosides	1,61	8,7	45,3
Antigène Forssman	1,11	6,3	56,6
Lactosyl céramide	0.21	2,6	100
Glycolipides acides			
Sulfatides	0,51	2,6	56,5
Gangliosides	0,25	2	66,47

Tableau 9 Composition lipidique des rafts
ND : non déterminé (d'après [845])

Les rafts sont visibles dans des cellules vivantes. On a ainsi montré sur des fibroblastes des domaines contenant 25 à 125 protéines transmembranaires HLA-I, de rayon de 70 à 600 nm [846]. Dans d'autres cellules, on détecte des microdomaines d'un diamètre moyen de 0,7 μm (0,2-2 μm) qui représentent 13 % de la surface membranaire. Une sonde constituée d'un acyle saturé a une mobilité importante mais confinée à ces domaines, tandis qu'une sonde à chaîne acyle insaturée diffuse dans des régions non confinées de la cellules [280]. La SM représente 5 % des PL du foie, 10 % de l'estomac et 16 % des poumons. Comme elle est spécifique des rafts, on peut supposer que ces taux tissulaires sont proportionnels à la quantité de rafts. En plus des affinités relatives des lipides, la formation

des rafts est favorisée par certaines protéines, comme NAP-22, par exemple, qui peut induire la formation de domaines riches en cholestérol dans des liposomes PC / cholestérol [847].

• Protéines et voies associées

Outre les lipides, les protéines sont une autre composante importante des rafts. Elles y sont associées de 3 façons :

- ▶ Protéines liées au glycophosphatidylinositol (GPI-protéines)
- ▶ Protéines ayant intrinsèquement une forte affinité pour ce type d'environnement protéique
- ▶ Protéines acylées (myristoylées et/ou palmitoylées)

Ainsi, de nombreuses protéines palmitoylées se retrouvent au niveau des rafts [848]. Afin de déterminer la proportion de protéines palmitoylées se trouvant dans ces domaines, on a comparé la palmitoylation de protéines de cellules de Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) à leur traduction [849]. Ensuite est réalisée une purification des rafts. Les résultats montrent l'existence de 20 à 25 protéines majeures dans les rafts, nombreuses à être acylées. (Figure 56).

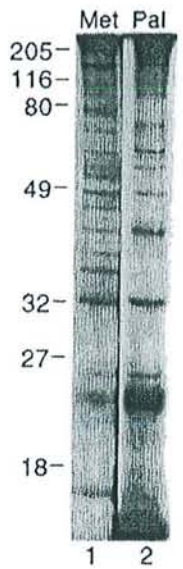


Figure 56 Protéines palmitoylées au niveau des rafts de cellules MDCK [849]

Les protéines acylées se retrouvent donc largement au niveau des rafts. Néanmoins, certaines protéines n'ayant pas subit d'acylation s'y retrouvent également et toutes les protéines palmitoylées ne se situent pas forcément à ce niveau [850]. La palmitoylation n'est donc pas la seule force motrice de la localisation cellulaire de ces protéines.

Les rafts peuvent être schématisés comme suit (Figure 57).

Ils seraient des sortes de plate-formes de concentration de protéines ayant la même destination cellulaire. Parmi les protéines acylées présentes dans les rafts, on note les protéines impliquées dans la transduction du signal, telles que les protéines G ou des protéines de la famille des Tyrosine-Kinases Src, ce qui suggère que les rafts puissent être impliqués dans le signaling [851]. L'activation des lymphocytes T passe aussi par les rafts : lorsque leurs récepteurs CD3 et CD28 sont simultanément stimulés, une réorganisation de la membrane s'effectue, formant une agrégation de rafts au niveau de la zone de contact avec l'antigène [852]. En concordance, l'agrégation expérimentale de ces rafts suffit à activer les lymphocytes T. Les rafts interviennent encore dans l'endocytose [853] et l'exocytose des

protéines nouvellement formées. La localisation des protéines SNARE dans les rafts est ainsi associée au contrôle de l'exocytose [854].

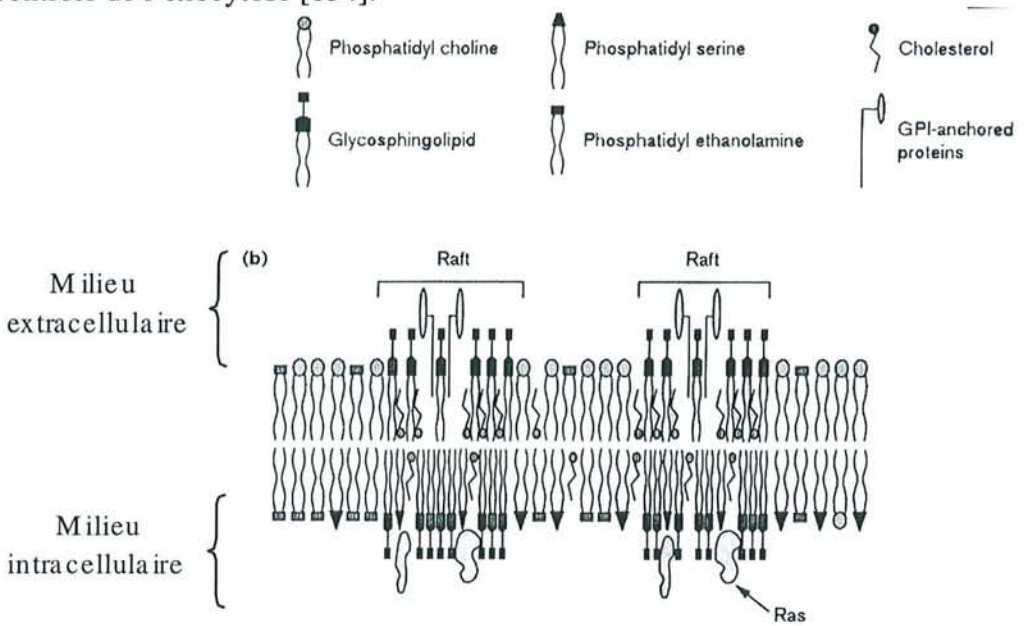


Figure 57 Schéma d'un raft et des protéines associées [855]

L'incubation de lymphocytes T avec des PUFA modifie la composition lipidique des cellules, en se concentrant dans les PE du feuillet interne des membranes. Ils modifient aussi la composition des rafts, qui tendent à compenser l'arrivée de chaînes acyles insaturées désorganisantes par une augmentation de la proportion de C16:0 et une diminution de C18:2. Les cellules compensent aussi le déplacement de protéines affines pour les rafts, comme Lck et LAT (linker for activation of T cells) qui sont retrouvées dans d'autres fractions mais dont le taux est inchangé dans les rafts [856]. Ce déplacement associé à une modification de la composition lipidique cellulaire ne touche pas toutes les protéines des rafts puisque contrairement à Lck et Fyn, CD48, GM-1 et CD59 ne migrent pas [857].

L'existence de domaines membranaires de composition lipidique particulière a été démontrée de plusieurs manières: directement par microscopie et utilisation d'analogues lipidiques fluorescents ou indirectement par l'utilisation de leurs propriétés particulières de solubilisations par les détergents, et par la détection des protéines préférentiellement associées à ces régions. De nombreuses protéines et enzymes sont ainsi associées à des fragments microsomiaux isolés en gradient de saccharose après solubilisation au triton à froid (DRM, pour detergent resistant membranes). Les techniques d'études étant très différentes et concernant soit des cellules intactes soit des préparations membranaires, il est difficile de savoir si toutes ces observations relèvent des mêmes domaines membranaires, d'autant qu'il existe des structures clairement distinctes des rafts mais qui en partagent certaines propriétés : les cavéoles.

- **Les cavéoles : cas particulier des rafts**

Parmi les microdomaines membranaires, il existe une structure spécifique : la cavéole [858]. La cavéole est définie comme étant une invagination de la membrane plasmique d'environ 60 nm. Cette invagination se retrouve au niveau de nombreux types cellulaires. Il

semblerait que les cavéoles dérivent directement des rafts puisque leur composition est très proche (Figure 58).

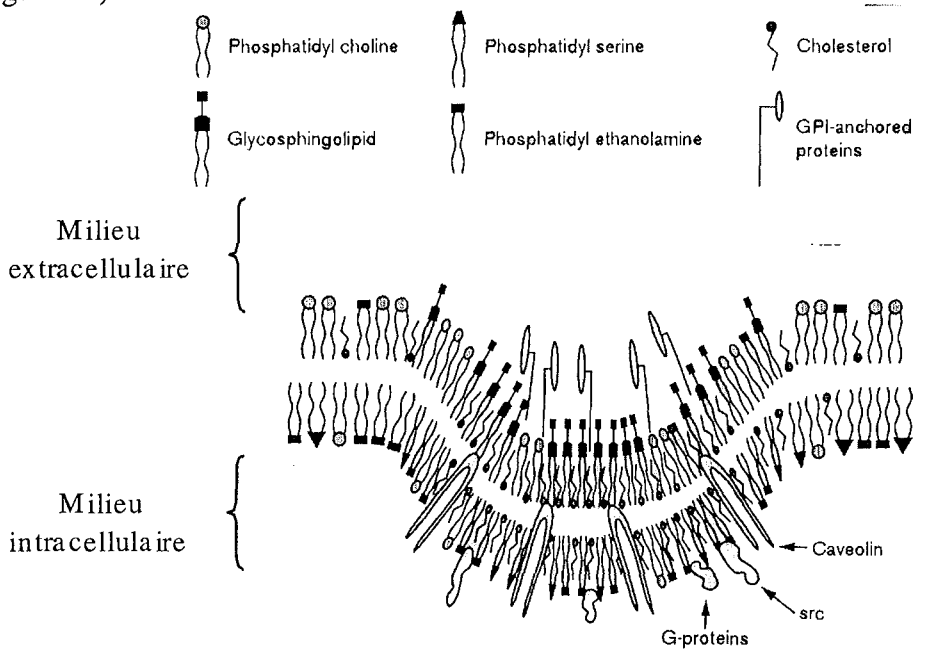


Figure 58 Schématisation de la cavéole et de ses protéines associées [855]

Outre leur forme, elles se distinguent cependant des rafts par l'association avec une protéine : la cavéoline. En plus de sa capacité à se lier au cholestérol et aux glycosphingolipides, cette protéine semble pouvoir causer une fusion des rafts entraînant la création de la structure cavéolaire [859],[773]. Cette protéine de 21 kDa intervient dans l'architecture de la cavéole, dont la formation ne dépend donc pas uniquement de la composition lipidique. La cavéoline possède un domaine de 33 acides aminés hydrophobes et trois résidus cystéine palmitoylés. Le rôle de cette palmitoylation n'est pas connue : elle n'est pas responsable de la localisation de la protéine au niveau de la cavéole [860], mais plutôt de sa capacité à interagir avec ses partenaires protéiques [861],[828],[773]. Il existe trois isoformes de cette protéine : les cavéolines (Cav) 1, 2 et 3, ayant des distributions tissulaires différentes. On trouve la Cav-1 et la Cav-2 dans les adipocytes et les cellules endothéliales. Par contre, la Cav-3 est spécifique des muscles [862],[863].

Des protéines G sont d'autres hôtes de ces domaines membranaires. Certaines ne sont pas distribuées de façon homogène dans la membrane plasmique, mais typiquement concentrées dans des microdomaines ressemblant à des vésicules dans de nombreux types cellulaires. La partie Nt de Giα doublement acylée (myristate, palmitate) est suffisante pour cibler la membrane plasmique (membrane / cytosol 80:20 %), et se trouve colocalisée avec Cav-1 qui ne reconnaît Gα que si elle est palmitoylée [814]. La protéine Gq est concentrée dans les cavéoles où elle fixe directement Cav-1, tandis que Gi et Gs sont localisées dans les autres rafts [864].

L'invagination cavéolaire apparaît appropriée pour participer aux phénomènes d'endocytose dans les cellules épithéliales. Outre ses fonctions dans les processus cellulaires normaux, l'endocytose médiée par la cavéole a aussi été exploitée par des agents pathogènes afin de pénétrer les cellules animales [865],[866]. Les cavéoles pourraient aussi contrôler le flux sanguin autour de la surface des cellules et répondre par une activation des voies de la transduction du signal [865]. Enfin, la cavéole et la cavéoline sont impliquées dans la

morphogenèse des domaines des membranes plasmiques. Ce mécanisme est illustré dans le développement des muscles squelettiques où des groupes de cavéoles semblent être le point de départ de la formation des tubules T [867].

- **Implications dans l'inflammation**

La démonstration de l'existence des rafts est trop récente pour que des liens clairs aient pu être établis avec les processus inflammatoires. On note cependant que chez les cellules dendritiques, le signaling de CD40 (kinases Src dont Lyn, TRAF-2 et -3, ERK) aboutissant à la production d'IL-1α et β est initiée dans les rafts [868].

La transduction du signal LPS pourrait passer par les rafts, puisque son récepteur CD14 est une GPI-protéine [869]. En revanche, EP2 n'est pas associé aux rafts dans les cardiomyocytes, où on peut détecter une colocalisation des adénylate cyclases AC-5 et -6 avec β1AR et β2AR [870].

A la surface cellulaire, IIA-sPLA2 est fixée aux glypicanes (protéines associées à la migration nucléaire), située dans des domaines ponctuels et colocalisée avec Cav-2. Des cotransfections de glypicanes et de IIA-sPLA2 augmentent la libération d'AA et de PGE2 [871].

Enfin, dans des fibroblastes activés par le PMA ou l'IL-1β, COX-2 présente une localisation partagée entre les rafts et les membranes du RE et de l'enveloppe nucléaire (40 : 60 %). Sa présence dans les rafts augmente avec le temps d'incubation, ce qui montre qu'il s'agit d'une translocation. Elle forme dans les rafts un complexe catalytiquement intact avec Cav-1 [872]. Si on ignore les conséquences de cette translocation, on peut néanmoins supposer qu'elle pourrait être à l'origine des couplages fonctionnels décrits, soit en amont de COX (PLA2), soit en aval (PGES).

III. PRESENTATION DU PROJET

Il est aujourd'hui bien établi que le mode d'action principal des AINS repose sur l'inhibition des COX. Cependant, la détermination du pouvoir inhibiteur d'une molécule et de ses énantiomères sur la synthèse des PG *in vitro* ne permet pas de prédire de façon fiable leurs effets anti-inflammatoires et antalgiques *in vivo* [873],[874],[875]. L'action pharmacologique comme la survenue d'effets secondaires des AINS semblent donc relever de mécanismes plus complexes qu'une simple inhibition de COX, et nous émettons l'hypothèse de l'intervention de métabolites.

Notre projet d'étude repose donc sur deux questions : les effets pharmacologiques des AINS pourraient-ils impliquer des métabolites de ces médicaments ; existe-t'il d'autres cibles que COX pour les AINS ou leurs métabolites qui pourraient participer tant aux propriétés anti-inflammatoires qu'aux effets secondaires ?

Parmi les métabolites des AINS, les conjugués paraissent les plus intéressants : c'est en effet le métabolite majoritaire et même rapidement la forme prépondérante du médicament, en ce qui concerne le glucuronide. Il s'agit en outre d'une molécule circulante qui peut gagner tout l'organisme et accéder au site inflammatoire. L'acyl-CoA est un autre conjugué d'intérêt, dans la mesure où il constitue lui un métabolite intracellulaire qui peut donc être concentré au lieu de production. Sa nature chimique lui confère une forte réactivité, et on sait que les dérivés acyl-CoA endogènes sont impliqués dans diverses voies du métabolisme lipidique, si importantes dans l'inflammation.

Notre étude s'articulera en trois parties fondamentales :

1. Synthèse des métabolites conjugués, glucuronide et acyl-CoA, en utilisant le KPF comme AINS modèle.
2. Recherche de leur effet sur les COX, en s'intéressant en particulier à sa réversibilité, eu égard à la forte réactivité des composés.
3. Etude de l'interaction du KPF-CoA avec différentes protéines, et caractérisation des formations d'adduits qui en résulte. Nous chercherons alors à identifier les cibles de cette molécule ainsi qu'à comprendre les implications biologiques de l'acylation.

Ces travaux nécessiteront des quantités importantes de métabolites, ce qui nous oriente vers la mise au point d'une synthèse chimique du KPF-CoA. Les thioesters du CoA sont des molécules instables s'hydrolysant rapidement et très sensibles aux nucléophiles. Nous envisageons donc également la synthèse d'un analogue non hydrolysable et non acylant du KPF-CoA, afin d'obtenir des informations mécanistiques quant à l'effet du métabolite.

L'étude des effets des conjugués sur les COX nécessitera dans un premier temps la validation d'un modèle cellulaire. Nous testerons ensuite nos métabolites comme inhibiteurs potentiels. Leur réactivité nous engage à envisager une formation d'adduits intracellulaires qui pourraient influencer la production de PG ; nous nous intéresserons donc spécialement à la réversibilité des effets. Les résultats obtenus nous amèneront alors à approfondir l'étude de l'interaction du KPF-CoA avec les COX, en utilisant cette fois des enzymes purifiées. Nous soumettrons enfin ces observations à une analyse structurale et chimique fine par modélisation moléculaire.

L'effet particulièrement intéressant du KPF-CoA nous amènera à le comparer à celui d'acyl-CoA endobiotes, et à établir la cinétique et le profil d'expression des ACS *in vivo* ainsi que dans un modèle cellulaire.

Nous analyserons finalement la réactivité du KPF-CoA envers différentes protéines. Ceci nous amènera à proposer l'existence d'un domaine d'interaction avec les acyl-CoA, conservé chez de nombreuses protéines, et à prédire des mécanismes d'acylation. Nous pourrons alors identifier certaines cibles intracellulaires du KPF-CoA, et aborderons finalement les conséquences biologiques de cette acylation, en nous intéressant en particulier à la localisation subcellulaire des adduits.

Lorsque les travaux de cette étude ont fait l'objet d'un manuscrit, nous ne présenterons dans le chapitre « Résultats » que les résultats majeurs, ainsi que la discussion critique de leurs implications biologiques et pharmacologiques. Pour obtenir plus de détails et de précision, le lecteur est invité à se référer aux-dits manuscrits, faisant clôture à chaque sous-chapitre.

IV_MATERIEL ET METHODES

A. Réactifs et matériel

A. 1. Réactifs et produits

Les **solvants** ont été fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne)
Tous les **réactifs et produits** ont été obtenus chez Sigma (La Verpillière, France), sauf :
Le **KPF** racémique, ses énantiomères purs (R)- et (S)- ainsi que l'acide benzoyl-1,4-phényl-2-butyrique employé comme standard interne (SI) pour les dosages en CLHP des énantiomères du KPF sont fournis par Rhône Poulenc, Paris.
Les **COX purifiées** : Cayman Chemical, Ann Arbor, MI
Les **milieux de culture** cellulaire Dulbecco modifié par Eagle (DMEM), tampon phosphate salin (PBS), glutamine, Gentamicine et amphotéricine B, sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté pour la culture cellulaire : Gibco BRL (Cergy Pontoise).

A. 1. a) Biologie moléculaire

RT: Omniscript RT Kit, Qiagen SA, Coutaboeuf, France
PCR : Hot Star Taq, Qiagen
Enzymes pour la biologie moléculaire (Ligase, Enzymes de restriction) : Gibco BRL
Agarose, bromure d'Ethidium, Marqueurs de taille nucléotidiques, Inhibiteur de Rnase (Rnase out), dNTP, oligo dT(12-18), Trizol : Gibco BRL
Primers : MWG Biotech GmbH, Ebersberg, Allemagne
Plasmides : Qiagen
Résine IMAC : TALON (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)

A. 1. b) Anticorps

Anticorps anti-KPF, anti-ACS-1 et anti-ACS-5 : don du Pr. E. Benoît, Ecole Vétérinaire, Lyon
Anticorps monoclonaux anti-COX-1 : (160110, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)
Anticorps polyclonal anti-COX 2 (PG26, Oxford Biomedical Research, Oxford, MI)
Anticorps polyclonal anti-Cav-1 : (C37120, Transduction Laboratories)
Anticorps polyclonal anti-iPLA2 : (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)
Anticorps polyclonal anti-iNOS : (SC-650, Santa Cruz Biotechnology,)
Anticorps monoclonaux anti-penta-His: Qiagen (34660)
Anticorps monoclonaux secondaires anti-IgG de Lapin, Souris ou Chèvre, couplés à la phosphatase alcaline : Sigma (A3812)

A. 2. Matériel

Chromatographie liquide haute performance (CLHP) : Chaîne Waters (St-Quentin en Yvelines) composée d'une : pompe 590, d'un détecteur spectrophotométrique à barrettes de diodes 996, piloté par le logiciel Millenium installé sur PC.
Colonne analytique : C18 RadialPak 8x 100 mm incluse dans un module RCM-8 (Waters)
Colonne semi-préparative: Merck Lichrosorb RP-18 column, (7μm, 250*10 mm)
RMN : Spectromètres Bruker AC 250 ou Bruker DRX 400.
***Electrophorèse** : Ready Gell Cell (BioRad), Mini Cell X Cell II (NOVEX), générateur Bio-Rad, Hercules, Californie, USA)*

Transfert semi-sec : Trans-Blot SD (BioRad)
Transfert liquide :
Membrane de nylon® : Immobilon-P (Sigma)
Spectrophotomètre : UV 1601 L5-50 (Schimadzu)
PCR :
Lecteur de plaques : Dynatech MR 5000 piloté par un PC

A. 3. Lignées cellulaires

Les différentes lignées utilisées proviennent de la collection européenne de cultures de cellules (ECACC), Salisbury, UK.

Cellules 3T3-L1 : fibroblastes embryonnaires murins
Cellules J774.2 : macrophages murins
Cellules HepG2 : cellules d'hépatome humain
Cellules BPAEC : cellules endothéliales d'aorte pulmonaire bovine

Bactéries compétentes : TOP10F'. Invitrogen, Groningen, Hollande

A. 4. Animaux

Rats Wistar mâles (Charles River et Iffa Credo, France) pesant environ 175 à 200 g et sont placés 5 par cage. Les animaux sont dans une enceinte thermorégulée à 24°C +/- 1°C soumise à un cycle obscurité- lumière de 12 h/12 h et reçoivent eau et nourriture *ad libitum.* Toutes les expériences sont conformes à la réglementation et aux normes éthiques en vigueur.

B. Synthèse et caractérisation des métabolites

B. 1. Biosynthèse des glucuronides

Le glucuronide de KPF est obtenu après incubation de chaque énantiomère de l'AINS avec les UGT de microsomes hépatiques de rats induits au phénobarbital, immobilisés dans des billes d'alginate [876]. Se référer au paragraphe IV_B. 3. pour la préparation des microsomes.

B. 1. a) Immobilisation des enzymes

Dans la glace, on ajoute 2 mL d'une solution aqueuse de 60 mg d'alginate de Na à 2 mL de microsomes (environ 20 mg/mL de protéines) et 2 mL de tampon Tris-HCl 100 mM, pH = 7,4 contenant 10 mM de $MgCl_2$. Par un goutte-à-goutte de ce mélange dans une solution aqueuse de $BaCl_2$ à 2 % (m/v), on forme des billes qu'on laisse reposer 15 min. Après les avoir recueillies sur un tamis, on les lave à l'eau puis avec le même tampon. Les billes sont ensuite reprises dans un tampon contenant 4 % (m/v) de polyéthylène-imine (PEI) et ajusté à pH = 7,4 par ajout d'HCl 6 N, et agitées pendant 15 h.

B. 1. b) Biosynthèse et purification des glucuronides

Avec ces billes, on incube sous agitation 7,8 mg d'UDP-GA et 3 mg de R- ou S-KPF dans 1 mL de tampon acétate/$MgCl_2$ à 100 mM, pH = 6,5 contenant 4 mg de saccharonolactone (inhibiteur des glucuronidases). Après 2 h à 37 °C, on prélève le milieu qui contient les glucuronides formés et on l'on acidifie par 1,8 mL d'un mélange TCA 0.4 M / Glycine 0,5 M à pH = 2,2. Les billes peuvent alors être réutilisées 1 ou 2 fois dans les mêmes conditions.

La purification est réalisée par CLHP semi-préparative, avec un éluant H_2O/ acétonitrile/TFA (60:40:0,04, v/v) et un débit de 2.5 mL/min (λ = 290 nm). La purification est suivie en parallèle en CLHP analytique, avec un éluant (65:35:0,04) à 1.5 mL/min (λ = 254 nm).

B. 2. Synthèse chimique de l'acyl-CoA

La synthèse du KPF-CoA est obtenue en mélangeant une solution de 122 mg de rac-KPF dans 11 mL de CH_2Cl_2 sec à laquelle on ajoute 56 μL de 2,6-lutinine, et une solution de 50 μL de chloroformiate d'éthyle dans le CH_2Cl_2 sec. Le mélange est agité environ 1 h à 20 °C. On surveille l'avancement de la réaction en CLHP analytique en phase réverse, avec un éluant H_2PO_4/HPO_4 9 mM, pH = 5,5 / MeOH (55:45) à 1,5 mL/min (λ = 254 nm).

Dès que tout le KPF initial a disparu, le mélange est évaporé sans chauffage. Le résidu sec est alors repris dans 9 mL de THF et soigneusement homogénéisé, avant d'ajouter 37 mg de CoASH dans 9 mL d'H_2O. On ajuste immédiatement le mélange à pH = 6,2 (environ 100 μL de soude 5 N), et on incube sous agitation à 20 °C. La réaction est suivie en CLHP dans les mêmes conditions que préalablement. Lorsqu'il ne reste plus de CoASH, le mélange est concentré par évaporation, jusqu'à obtenir environ 4 mL d'un lait blanchâtre.

La purification est obtenue en 2 ou 3 étapes selon le produit recherché : on réalise dans un premier temps une vingtaine d'extractions contre l'hexane. La phase aqueuse est enfin soumise à une CLHP semi-préparative, avec un éluant H_2PO_4/HPO_4 9 mM, pH = 5,5 / MeOH (65:35) à 2,5 mL/min (λ = 280 nm). Une seule étape de cette chromatographie suffit à séparer les réactifs du KPF-CoA. Si on cherche à séparer les 2 diastéréoisomères du KPF-CoA, le produit purifié est alors à nouveau soumis à la même CLHP, en collectant la sortie de colonne par fractions de 0,7 min. L'analyse des fractions en CLHP analytique permet de définir l'identité des produits.

B. 3. Synthèse microsomiale de KPF-CoA

B. 3. a) Préparation des microsomes

Les foies de Rat sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem dans un tampon Tris-HCl (1 mM) saccharose (0,25 M) ajusté à pH = 7 avec HCl. Une première centrifugation de 1000 g pendant 15 min à 4°C permet d'éliminer les noyaux (culot) et les fractions interstitielles. Une seconde centrifugation à 10000 g à 4°C permet de séparer le culot de mitochondries du surnageant. Puis une ultracentrifugation du surnageant à 100 000 g à 4 °C pendant 1 h est effectuée pour obtenir un culot correspondant aux microsomes. Le culot est récupéré, homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur manuel de Dounce, aliquoté dans des tubes et conservé à –20° C jusqu'au dosage des protéines microsomiales pour l'étude de la thioestérification.

B. 3. b) Formation du KPF-CoA

Les microsomes sont activés par du Triton X-100 (4 mg/mL) (rapport Triton/ protéines = 0,15) pendant 15 min dans la glace. L'action du détergent permet la perméabilisation des microsomes. La synthèse est ensuite réalisée sur 20 μL de microsomes (100 μg de protéines) en suspension dans 12,5 μL d'une solution contenant de l'ATP (0,5 mM) et de $MgCl_2$ (0,09mM) dilués dans 1000 μL de tampon Tris-HCl (150 mM). On ajoute ensuite 20 μL de KPF racémique (12,5 mM) puis 15 μL d'une solution contenant du CoASH (0,01 mM) et du dithiothréitol (0,05 mM) dilués dans 1200μL de tampon. Après 1 h d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par addition de 100 μL d'acétonitrile et

centrifugation 10 min à 20000g. Les produits de la réaction sont analysés dans les conditions de CLHP décrites ultérieurement.

B. 4. Cristallogenèse du KPF-CoA

Le développement des cristaux de KPF-CoA a été étudié par la technique de la goutte suspendue, utilisée pour la cristallogenèse des protéines, au Laboratoire de Cristallographie et Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques de Nancy (LCM3B). 2 μL de KPF-CoA 2 mM sont ainsi ajoutés à 2 μL de solution de cristallisation, sur une lamelle de verre préalablement silanisée (incubation pendant 1h à 90 °C avec du diméthyl-dichloro-silane à 2% dans du trichloroéthane). Celle-ci est alors retournée sur un puits contenant 500 μL de la même solution de cristallisation. La lamelle et le puits sont alors fermés hermétiquement par un joint de vaseline. Les puits sont alors stockés dans des salles conditionnées.

C. Méthodes analytiques

C. 1. CLHP

C. 1. a) Dosage du KPF

Après addition d'une quantité connue de standard interne à l'échantillon, le dosage du KPF racémique est réalisé en CLHP analytique, avec un éluant H_2O/acétonitrile (50:50), avec un débit de 1,5 mL/min. La calibration est obtenue par la mesure du rapport des aires des pics de KPF et de standard interne, pour une gamme de usuelle de 1 à 100 μM.

C. 1. b) Dosage des métabolites

KPF-Glc et KPF-CoA sont dosés via le KPF libéré par hydrolyse, après incubation avec de la soude 0.5 N pendant 2 h à 37 °C. Le KPF est alors quantifié comme précédemment.

C. 2. ELISA

C. 2. a) Dosage des PGE2, 6kPGF1α, PGF2α

PGE2, 6kPGF1α ou PGF2α sont quantifiés par les kits « Correlate EIA Kit », Assay Designs, Inc, Ann Arbor MI. Le dosage repose sur une compétition entre la PG de l'échantillon et une PG commerciale couplée à la phosphatase alcaline avec une gamme de 1250 à 78 pg /mL de PGE2, 5000 à 80 pg/mL de 6kPGF1α et 7500 à 12 pg/mL de PGF2α. Les PG sont fixées par un premier anticorps anti-PG de Lapin, lui-même reconnu par un anticorps anti-Lapin immobilisé au fond du puits. Le produit de l'enzyme, en présence de para-nitrophényl-phosphate permet une mesure de l'intensité de coloration à 405 nm. La courbe d'étalonnage est obtenue par transformation semi-logarithmique. Chaque dosage est précédé de la détermination de la dilution de l'échantillon à effectuer.

C. 3. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée à partir d'une courbe étalon de sérum albumine bovine (BSA) allant de 0 à 12,5 μg/mL selon la méthode de Bradford. Les protéines réagissent avec le réactif coloré de Biorad pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 595 nm après 2 min d'incubation.

D. Biochimie des protéines

D. 1. Activité des COX purifiées

L'activité des COX isolées est déterminée par le dosage des PGF2α du milieu, issues de la réduction chimique de PGH2 par le $SnCl_2$. Le milieu contient également de l'hème et un cosubstrat réducteur de l'enzyme pour favoriser son activité.

Pour tester les inhibiteurs, 30 µL d'enzyme ($6{,}8.10^{-13}$ mol) sont ajoutées à 250 µL de tampon phosphate 50 mM contenant 1 mM de phénol, 1 µM d'hématine et 0,5 mg/mL de $SnCl_2$ et 30 µL d'inhibiteur à concentration donnée. Après incubation à 20 °C pendant des durées variables, on ajoute 30 µM d'AA pendant 5 min à 37 °C. L'incubation est irréversiblement stoppée par addition de 20 µL d'HCl, puis le milieu est neutralisé par de la soude normale avant dosage des PG. Un contrôle est réalisé pour chaque temps de pré-incubation à cause de la forte instabilité de l'enzyme.

D. 2. Western blot des protéines

Les échantillons sont repris avec une solution dénaturante (Laemmli) composée de 4 % SDS, 20 % glycérol, 10 % 2-mercaptoéthanol, 3 % de bleu de bromophénol, 0,125M de Tris-HCl pH = 6,8. La migration en gel d'acrylamide est réalisée dans un tampon d'électrophorèse constitué de 14,4g/L de Glycine, 3g/L de Tris-base, 1g/L de SDS. La tension appliquée est de 100 V durant la migration dans le gel de concentration, puis de 150 V dans celui de migration. Pour les protéines de petite taille (< 30 kDa), la migration est réalisée en tampon Tris/Tricine, constitué de 18 g/L de Tricine, 1 g/L de SDS et 12,1 g/L de tris-base.

Le transfert sur membrane de Nylon est obtenu en mode semi-sec, avec un tampon contenant 56,3 g/L de glycine, 12,1 g/L de Tris-base, 10% de méthanol, ajusté à pH 7,4. Un transfert optimum est obtenu par 12V pendant 1 h. La membrane est alors traitée comme suit :

▶ mise en contact avec une solution d'albumine à 3% dans le tampon de lavage (PBS-Tween 20 à 0,2% d'azide de sodium) pendant 7 h sous agitation modérée pour la saturation des sites aspécifiques.

▶ ajout du premier anticorps après élimination de l'albumine, contenant 0,2 % d'azide de sodium. Celui-ci évite la prolifération des bactéries Gram négatif.

▶ rinçage de la membrane 5 fois 5min avec le tampon de lavage, puis ajout du second anticorps couplé à la phosphatase alcaline (1 h).

▶ rinçage de la membrane 5 fois 5min au tampon de lavage, puis à l'eau distillée. On dépose alors 1 mL de substrat de la phosphatase (BCIP/NBT), dont le produit coloré en rose-violet précipite.

D. 3. Immunoprécipitation

Cette technique constitue une méthode de purification immunologique. On utilise ainsi un anticorps aussi spécifique que possible de la protéine recherchée, qui est incubé avec l'extrait cellulaire. On ajoute ensuite de la protéine A ou G, protéine procaryotique fixant toutes les Ig de mammifères, couplée de manière covalente à un polymère osidique de haut PM. Nous utilisons ici la protéine G couplée au Sépharose, qui permet donc la décantation finale du complexe ternaire {Protéine : Anticorps : Protéine G-Sépharose}.

Les protéines que nous étudions sont membranaires. Nous avons donc choisi de les solubiliser dans un premier temps, pour éviter tout problème de masquage d'épitope. Pour augmenter la spécificité de la fixation de la protéine G à l'anticorps, nous réalisons en outre une première étape de fixation des sites aspécifiques (« pre-clearing »), en mettant

préalablement en contact l'extrait cellulaire et la Protéine G. Toutes les étapes sont réalisées dans la glace et les centrifugations à 4 °C, pour éviter les protéolyses et dégradations des protéines. Le protocole se résume donc ainsi :

1) Solubilisation des protéines membranaires

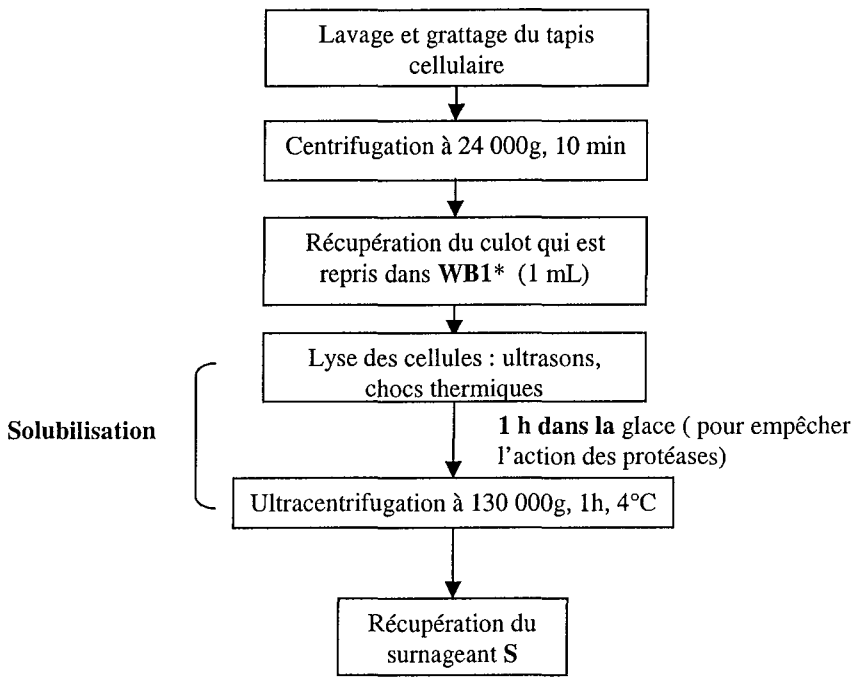


Figure 59 Immunoprécipitation : Solubilisation des protéines membranaires

* Composition des tampons **WB1** à **3** : cf tableau ci-dessous

2) « Pre-clearing »

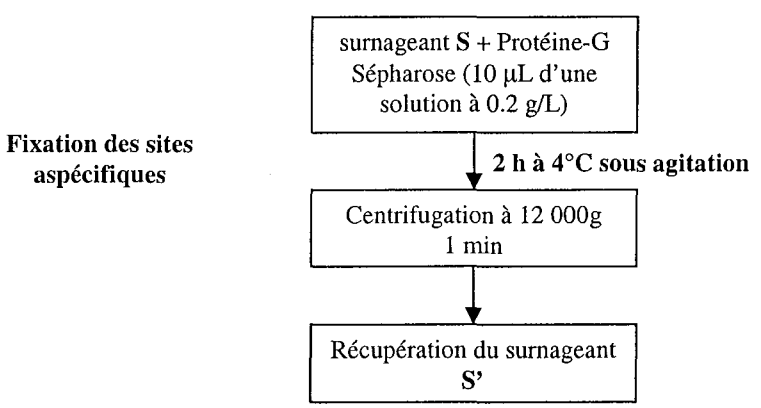


Figure 60 Immunoprécipitation : Pré-clearing

3) Immunoprécipitation

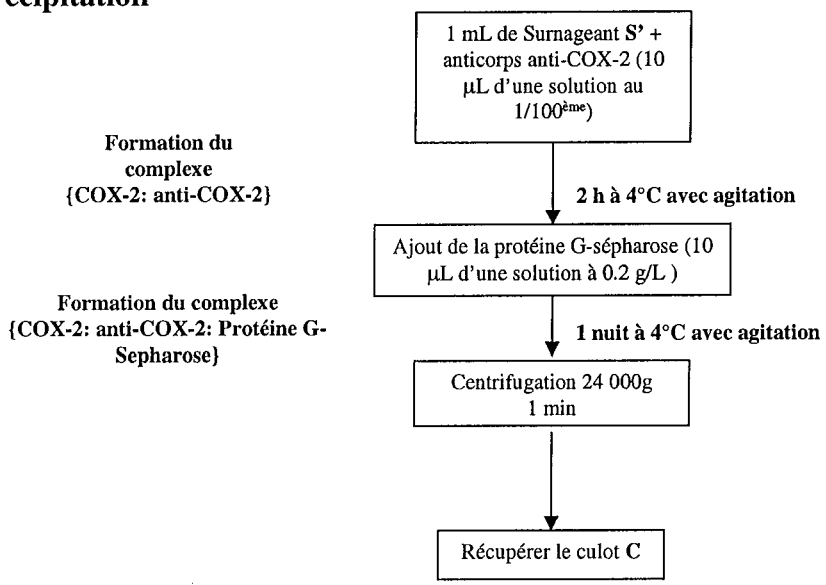


Figure 61 Immunoprécipitation

4) Lavages

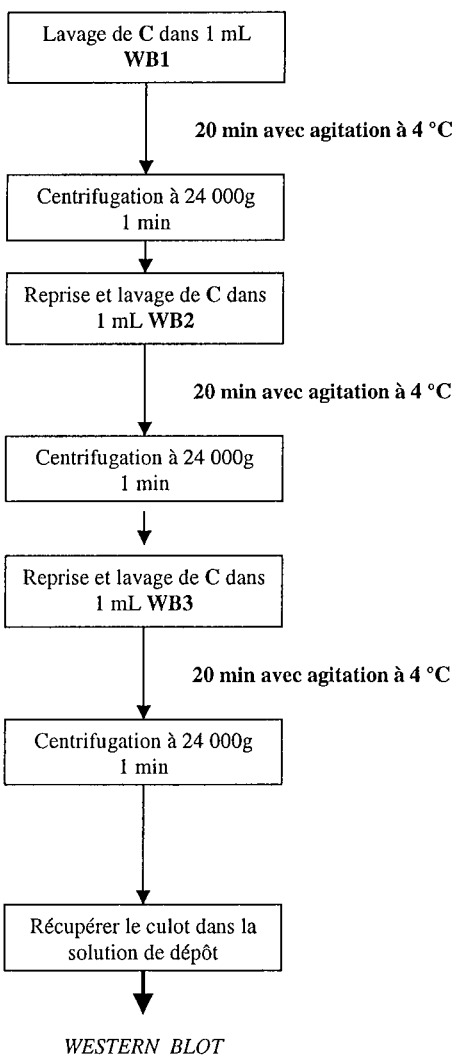


Figure 62 Immunoprécipitation : Lavages du produit de purification

Compositions des tampons de lavages et de solubilisation :

	WB1	WB2	WB3
NaCl	88 mg	292 mg	/
Igepal	100 µL	10 µL	10 µL
Déoxycholate	50 mg	5 mg	5 mg
Tampon phosphate 50 mM pH 7,4	10 mL		

D. 4. Préparation des rafts

Dans un premier temps, les cellules mises en culture dans des boîtes de pétri de diamètre 15 cm sont grattées dans 5 ml de PBS. En général, quatre boîtes confluentes sont utilisées afin de réaliser cette purification. Une fois récupérées, elles sont centrifugées pendant 10 min à 1200 rpm. Toutes les opérations suivantes sont réalisées dans la glace afin de minimiser l'action des protéases. Le culot cellulaire obtenu est repris dans 600 µL de tampon de raft froid (25 mM de MOPS et 0,15 M de NaCl) complété à 1 % de Triton X100 dilué au ½ dans de l'eau distillée à 40 °C et 1 mM de PMSF (inhibiteur des protéases à sérine) (17,4 mg de PMSF dilué dans 2 mL d'éthanol). Le tout est versé dans un Dounce de 2 mL utilisé pour bien homogénéiser la solution par une dizaine de va-et-vient. L'extrait est ensuite déposé dans un tube à ultracentrifuger et mis dans la glace. L'extrait cellulaire est incubé durant un temps variable, dans de la glace. Ensuite, un gradient de saccharose est réalisé dans le tube à ultra centrifuger. On ajoute :

- 600 µL d'une solution de saccharose à 80 % (80g de saccharose dans 100 mL de tampon de raft) en homogénéisant bien par va-et-vient avec l'extrait cellulaire.
- 3 mL de solution de saccharose à 30% très délicatement (l'interface doit être visible).
- 1 mL de solution de saccharose à 5% (l'interface doit être visible).

Le tube est alors ultracentrifugé pendant une nuit à 4 °C à 120 000 g. Après cette ultracentrifugation, un nuage opaque situé à l'interface des solutions de saccharose à 5 et 30% est visible. On collecte enfin le contenu du tube par fractions d'environ 400 µL à partir du haut. Le protocole peut se résumer comme suit :

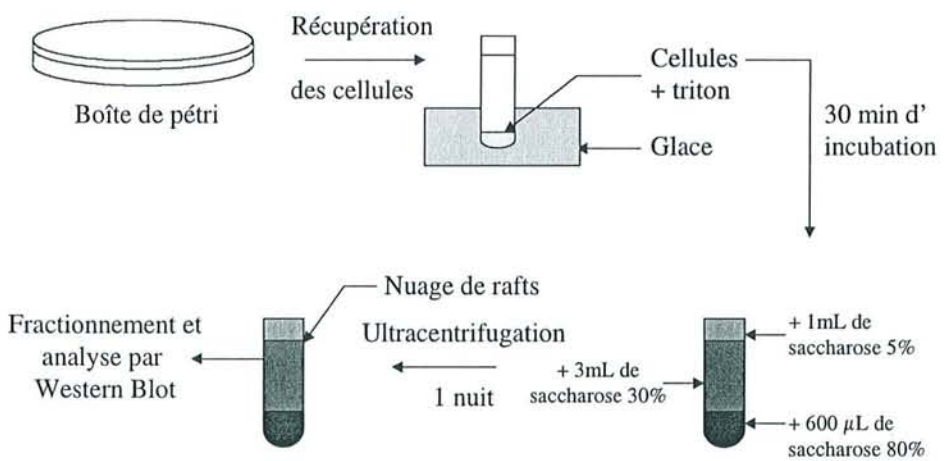


Figure 63 Schéma du protocole de préparation des rafts cellulaires

D. 5. Modifications chimiques de la SAH

D. 5. a) Acétylation de K199

L'acétylation spécifique de K199 par l'aspirine est obtenue en utilisant un ratio molaire de 6 en faveur de l'aspirine [877]. On incube donc 1,2 g de SAH avec 19,5 mg d'aspirine, dans 124 mL de tampon phosphate 0,1 M à pH = 7,4, pendant 24 h à 37 °C sous agitation. On réalise ensuite une série de dialyses à 4 °C durant 72 h contre de l'eau. On s'assure de la complète élimination de l'aspirine résiduelle par son dosage après extraction par le dichloroéthane puis contre-extraction avec un tampon HCO_3^-/CO_3^{2-}. L'aspirine alors concentrée en phase aqueuse est analysée en spectrométrie de fluorescence (λex = 300, λem = 410 nm).

D. 5. b) Nitration de Y411

La nitration quasi-spécifique de Y411 est obtenue en utilisant un ratio molaire de 4 en faveur du tetranitrométhane (TNM) [878]. Une solution de TNM dans l'éthanol (4 mg/mL) est incubée pendant 1 h avec la SAH dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, pH = 8. Les dialyses sont réalisées comme précédemment.

E. Formation et détection des adduits du KPF

E. 1. Formation des adduits

E. 1. a) Avec des protéines purifiées

- **SAH**

On ajoute 20 μL de KPF-CoA à concentration voulue dans 500 μL de SAH à concentration donnée dans un tampon phosphate 50 mM, pH = 7,4. Après un temps d'incubation variable à 20 °C, on additionne 10 μL d'H_3PO_4 pur, puis 500 μL d'eau, et enfin 5 mL d'acétonitrile. L'échantillon est soigneusement vortexé entre chaque ajout. Le mélange est homogénéisé par retournement puis centrifugé à 15000 rpm pendant 10 min. On élimine le surnageant et on reprend le culot par 5 mL d'Et_2O/MeOH (1:3). Après agitation au vortex, on centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions. Cette étape de reprise du culot et centrifugation est répétée 10 fois. On s'assure finalement que le dernier surnageant ne contient plus de KPF, par analyse en CLHP. Les culots sont alors séchés à l'azote.

- **COX**

Les COX purifiées (6.10^{-11} mol) sont incubées dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 contenant 1 μM d'hématine, 300 μM de diéthyl-dithiocarbamate et 0,1 % de Tween 20 avec 2.10^{-10} mol de KPF-CoA. Après un temps d'incubation variable à 20 °C, les échantillons sont analysés par Western blot comme décrit au paragraphe IV_D. 2.

- **Autres protéines**

5 μg des autres protéines purifiées analysées (GST, G6PDH) sont incubées dans un tampon phosphate 50 mM, pH = 7,4 avec 0,1 mM de KPF-CoA durant 1 h, avant analyse par Western blot comme décrit au paragraphe IV_E. 3.

E. 1. b) Avec des protéines microsomiales

Pour un marquage significatif et une détection aisée des adduits par Western blot, on utilise les conditions optimales suivantes :

100 μg de protéines microsomiales sont incubées en tampon phosphate 50 mM, pH = 7,4 avec 25 μg de KPF-CoA dans un volume total de 50 μL (0,5 mM de KPF-CoA) pendant 1-2 h à 20 °C. 10 μL de l'échantillon sont ensuite analysés par Western blot (§ IV_E. 3.)

E. 1. c) Avec des protéines cellulaires

Les conditions sont les mêmes que pour les protéines microsomiales, sauf qu'on utilise ici des cellules intactes.

E. 2. Analyse des adduits par CLHP

Les culots précédents sont hydrolysés par ajout de 600 μL de soude 0,5 N, pendant 3 h à 37 °C. On ajoute alors 400 μL d'eau, 60 μL d'H_3PO_4 pur et 20 μL de standard interne à 50 μg/mL, avant de réaliser une extraction contre l'Et_2O. La phase organique est enfin prélevée, évaporée puis analysée en CLHP comme décrit au paragraphe IV_C. 1. a) .

E. 3. Analyse des adduits par Western blot

Le protocole est similaire à celui décrit au paragraphe IV_D. 2. Pour augmenter la résolution lors du transfert, et pour préserver au maximum les adduits, le transfert est réalisé en mode liquide. On utilise alors un tampon contenant 15 g/L de Glycine, 3 g/L de Tris Base et 20 % de MeOH, sans ajuster le pH. On applique une tension de 80 V pendant 50 min, et on ajoute un pain de glace dans la cuve pour limiter l'échauffement produit par effet Joule.

La solution de dépôt est modifiée afin de pouvoir se passer de mercaptoéthanol, qui hydrolyse esters. Il est ainsi composé de 375 g/L de SDS, 125 mg/L de bleu de bromophénol et 0,2 % de glycérol, dans le tampon Tris-HCl pH = 6,8 classique. L'anticorps anti-KPF est dilué au 1/6000, et l'anticorps secondaire au 1/5000.

F. Culture cellulaire et utilisation des lignées

F. 1. Entretien des cellules

Selon le type cellulaire et l'expérience réalisée, différents milieux sont utilisés, mais tous sont au moins constitués de milieu DMEM supplémenté par de l'amphotéricine B à 0,25 μg/mL final, de la gentamicine à 80 μg/mL et de la glutamine à 4mM.

▶ milieu de prolifération (tout type cellulaire) : on ajoute 10 % de SVF.

▶ milieu d'induction de COX-2 pour les J774: on ajoute 2.5 % SVF et 1 μg/mL de LPS.

▶ milieu de différenciation des adipocytes : les fibroblastes 3T3-L1 sont différenciés en adipocytes grâce à un milieu DMEM-insuline à 10% de sérum de veau fœtal contenant en outre du 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) et de la dexaméthasone, qui induisent la différenciation.

Les cellules post-confluentes (2 j) sont placées dans un milieu dont la composition est la suivante :

IBMX :	0,5 mM
Dexaméthasone :	0,25 μM
Insuline :	1 μg /mL

Après deux jours d'incubation, le milieu est éliminé et les cellules sont reprises dans un milieu contenant 1μg/mL d'insuline pendant 15 jours. On considère que la différentiation des adipocytes est atteinte quand apparaissent des gouttes lipidiques dans le milieu.

Les cellules sont repiquées à confluence, en général à raison de 10^6 cellules par boîte de 75 cm^2, soit environ 1 fois par semaine. Les fibroblastes 3T3 ont cependant une croissance très rapide et il est primordial qu'ils n'atteignent jamais la confluence pour éviter toute différenciation anarchique. Ils sont donc repiqués tous les 2-3 jours. La différenciation en adipocytes est obtenue post-confluence, en utilisant les milieux ci-dessus.

F. 2. Perméabilisations cellulaires

L'éclatement des cellules pour les expériences de « broken-cells » est obtenu par 30 pulses de 1s à 30 W. Pour minimiser l'action protéolytique, les cellules avaient été reprises dans du PBS contenant les inhibiteurs de protéases suivant : PMSF à 0,5 mM, 6-amino-hexanoate 100 mM, N-éthyl-maléimide 10 mM et 0,01 mM de chlorhydrate de benzamidine. L'analyse de l'activité COX est alors mesurée sur 150 μg de cet extrait cellulaire.

F. 3. Expériences d'inhibition des COX cellulaires

L'expérience est réalisée en 2 étapes : étude de l'effet immédiat des inhibiteurs puis analyse du recovery. Les cellules sont réparties en boîtes stériles de 12 puits, à raison de 270 000 cellules par puits. Elles sont traitées pour favoriser l'expression d'une COX donnée, la veille de l'expérience. Après élimination du milieu, elles sont ensuite incubées dans un premier temps dans du PBS contenant les inhibiteurs à concentration variable, durant 30 min. On ajoute alors le substrat des COX, l'AA, en concentration saturante (30 μM finale). Après 15 min, on prélève le surnageant (les cellules formant un tapis) qu'on congèle à –20 °C pour le dosage ultérieur des PG. Pour tester la réversibilité de l'effet des inhibiteurs, on rince ensuite délicatement le tapis cellulaire avec du PBS pendant 40 min, pour éliminer toute trace de l'inhibiteur préalablement incubé. On ajoute enfin à nouveau l'AA à 30 μM pour 15 min, avant de prélever le milieu en vue du dosage de PG (Recovery). Le schéma suivant résume ce protocole, où l'étape de recovery est signalée par un cadre grisé :

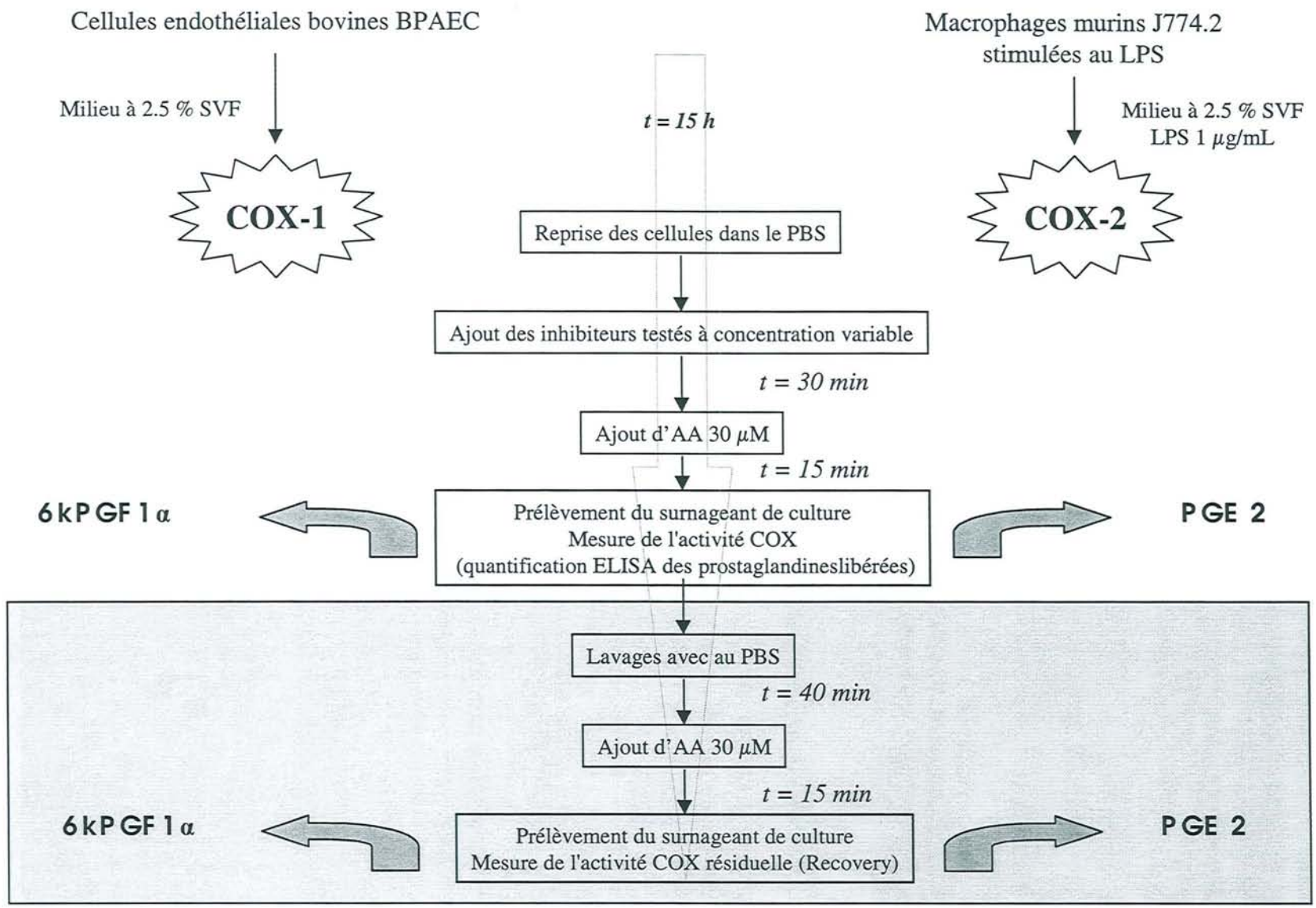


Figure 64 Schéma du protocole d'étude des métabolites de KPF sur les COX cellulaires

G. Biologie moléculaire

G. 1. Etude de l'expression d'enzymes *in vivo* chez le Rat

Les Rats témoins ainsi que les rats traités au LPS sont sacrifiés par décapitation pour ces différentes études.

G. 1. a) Extraction d'ARN

Environ 50 mg des tissus analysés (cortex, hypothalamus et foie) sont broyés à l'aide d'un ultraturax dans 1 mL de Trizol et incubés 5 min à température ambiante. Le Trizol est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui isole les ARN, l'ADN et les protéines dénaturées du reste de la suspension. 200 µL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est vortexé 15 secondes puis incubé 15 min à température ambiante. Cette étape permet de séparer l'ADN des autres composants cellulaires. Après une centrifugation à 16000 g à 4 °C pendant 30 min, deux phases se sont formées. La phase aqueuse supérieure contient l'ADN et les ARN, la phase organique contient tous les débris cellulaires et les protéines sont localisées à l'interface. La phase supérieure est prélevée et on y ajoute 500 µL d'isopropanol qui permet la précipitation des ARN. Le mélange est agité par retournements et incubé 10 min avant d'être centrifugé 10 min à 12000 g. Après aspiration du surnageant, le culot est lavé à l'éthanol 75% puis centrifugé 5 min à 7500 g. Le culot d'ARN est séché puis resuspendu dans 30 µL d'eau stérile (cortex et hypothalamus) et 100 µL (foie). Enfin cette solution est chauffée 5 min à 65 °C, ce qui permet de délier les ARN (suppression des structures secondaires).

G. 1. b) Dosage d'ARN

Les acides nucléiques ont la propriété d'absorber à 260 nm. Il existe une corrélation entre la concentration en ARN d'une solution et la densité optique mesurée:

1 unité de DO à 260nm correspond à 40µg/mL d'ARN

La pureté de l'échantillon peut-être vérifiée par le rapport de la DO_{260}/DO_{280}. La densité optique à 280 nm correspondant à la concentration en protéines, on estime que la solution est pure si le rapport est compris entre 1,5 et 2. La concentration de la solution estimée, l'ARN est conservé à –80 °C.

G. 1. c) RT-PCR semi-quantitative

- *Transcription reverse (RT)*

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une réaction qui permet d'obtenir une grande quantité d'un fragment d'ADN double brin. Ceci est permis par deux amorces d'ADN, une sens et une anti-sens, qui encadrent la séquence voulue. Le brin matrice doit être de l'ADN. L'ARN extrait des cellules ne peut donc pas être utilisé tel quel et doit être transformé en ADN par une Reverse Transcriptase. Le mélange réactionnel est constitué de la façon suivante:

	Volume par réaction (µL)	Concentration finale
Tampon RT 10X	2	1X
Mix de dNTP (10 mM chaque)	2	0,5 mM chaque
Amorce Oligo dT	1	1µM
Inhibiteur de RNase	2,5 µL d'une solution au 1/10ème	
Omniscript RT	1	
ARN	variable	qsp 2µg
Eau RNase free	variable	
Volume final	20	

La réaction se fait à 37°C pendant 60 min. L'enzyme est ensuite inactivée par un chauffage pendant 5 min. Les produits obtenus peuvent être conservés à –20°C.

- ***Polymerase Chain reaction** (PCR)*

Elle se fait sur un volume de 100µL. Le volume ajouté doit être au maximum égal à 10% du volume final soit 10 µL.

	Volume par réaction (µL)	Concentration finale
Tampon 10X	10	1X
dNTP (10mM chaque)	2	200 µM chaque
Amorce directe *	5	0,5 µM
Amorce réverse *	5	0,5 µM
Amorce directe GAPDH *	3,25	0,325 µM
Amorce réverse GAPDH *	3,25	0,325 µM
Hot Star Taq	0,5	2,5 U
Eau	variable	qsp 100µL
ADN	variable	1µg
Volume final	100	

* 5 µL d'une solution à 100 pmol/µL diluée au 1/10

La Hot Star Polymérase est latente. Elle est activée par 15 min à 95°C.
Le programme de PCR est le suivant:

Temps	Température	Fonction
15 min	95°C	Activation de la Taq polymérase
45 secondes	**94°C**	Séparation des 2 brins d'ADN
45 secondes	**Tm**	Hybridation des amorces
1 min	**72°C**	Elongation
Nombre de cycles	*30*	*Amplification*
10 min	72°C	Elongation finale

Afin d'obtenir une analyse semi-quantitative de la transcription des protéines étudiées, on réalise l'amplification en duplex avec celle d'une protéine dont le taux de transcription est relativement constant : la GAPDH.

Pour vérifier l'efficacité de l'amplification, 18 µL du mélange sont déposés sur un gel d'agarose à 1,2 % contenant 2,5 µL de BET. Un marqueur de taille est déposé en parallèle

pour vérifier que la taille du produit obtenu correspond à celle attendue. Après migration, le gel est photographié et numérisé. L'analyse densimétrique est obtenue grâce au logiciel Scion.

- ***Conception des amorces***

Pour chaque isoenzyme d'ACS, les amorces ont été dessinées de façon à cibler le plus spécifiquement possible le messager. On a ainsi réalisé des alignements multiples de séquences nucléotidiques de Rat avant de tester différents couples de primers s'hybridant dans les régions les moins conservées des ACS. Plusieurs couples d'amorces possibles sont définis à l'aide du logiciel MacVector. Les couples d'amorces candidats sont ensuite testés par simulations de PCR (logiciel Amplify 1.2) afin de vérifier leur qualité : sites de fixation sur la matrice, formation de dimères, longueur et nombre de fragments et détermination de la température optimale d'hybridation. Les amorces sont finalement soumises à une recherche de similitude contre la Genbank [879]. par l'algorithme BLAST (Basic Local Alignement Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) [880] afin de confirmer leur spécificité. Le couple d'amorces retenu est celui qui possède le meilleur appariement, la reconnaissance la plus spécifique et des températures d'hybridation compatibles.

Il a été vérifié que chacun des amplicons incluait au moins 2 exons pour abroger toute contamination génomique. La position des introns est obtenue dans la banque EID (The Exon-Intron Database of Eucaryotic Organisms, http://intron.bic.nus.edu.sg/exint/exint.html), et d'après la littérature pour les ACS [881]. L'organisation des gènes n'est souvent connue que chez l'Homme, on a donc réalisé des alignements de séquence en supposant que la position des introns était conservée chez les 2 espèces.

ACS-1

```
Direct : 5'-GATTGACATTCGGCAGTACG-3'
Reverse : 5'-CATTTGACACCTGAATCCC-3'
Tm= 57 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 274 bp
Nombre d'introns dans la partie correspondante du gène : 1
```

ACS-2

```
Dir : 5'-ATCGGACTTGGGCCAGTTTT-3'
Rev : 5'-GTGCCCACTTTACAGTCATGC-3'
Tm= 59 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 395 bp
3 introns
```

ACS-5

```
Dir : 5'-TTTTATTTTTAACTTCTTGTTTTCCC-3'
Rev : 5'-TGCGATGGCTTGTATCCTTTA-3'
Tm= 55 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 389 bp
3 introns
```

ACS-3

```
Dir : 5'-AACAAATTTAAGGACAAAAGACTAT-3'
Rev : 5'-GTGGGACCAAAGAGACGATAT-3'
Tm= 57 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 402 bp
```

ACS-4

```
Dir : 5'-GGGAAGAAGGACAGCC-3'
Rev : 5'-AATTGATATCTAATAATGCCG-3'
Tm= 54 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 393 bp
3 introns
```

COX-2

```
Dir : 5'-TCCAGATCACATTTGATTGACAG-3'
Rev : 5'-TGTGGGAGGATACATCTCTCC-3'
Tm= 59 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 443 bp
2 introns
```

GAPDH

```
Dir : 5'-ACGGATTTGGCCGTATTGGCCGC-3'
Rev : 5'-TGGTCCTCAGTGTAGCCCAGGAT-3'
Tm= 67 °C
Longueur théorique de l'amplicon: 816 bp
5 introns
```

G. 2. Cinétiques de la transcription d'enzymes *in vitro*

La cinétique de transcription des enzymes étudiées chez les macrophages en réponse au LPS est obtenue en incubant les cellules J774 pendant différentes périodes avec 1 μg/mL de LPS. On s'assure que le milieu de culture n'arrive jamais à épuisement en le changeant quand les temps d'incubations dépassent la semaine. Il a préalablement été vérifié que le milieu changé régulièrement (milieu et LPS frais) donnait les mêmes résultats que la conservation du même milieu, sur des échelles de temps compatibles avec la viabilité cellulaire.

Les primers ont été dessinés afin d'être le plus spécifique possible de l'isozyme étudiée. Ceux de COX-2 et e la GAPDH sont issus de la littérature.

COX-2

```
Dir : 5'-AAAACCTCGTCCAGATGCT-3'
Rev : 5'-GGCTGTTTTGGTAGGGCTGTGG-3'
Longueur théorique de l'amplicon: 244 bp
```

GAPDH

```
Dir : 5'-CCATCAACGACCCCTTCATTCACC-3'
Rev : 5'-GAAGGCCATGCCAGTGAGCTTCC-3'
Longueur théorique de l'amplicon: 605 bp
```

ACS-4

```
Dir : 5'-ATAGACATCCCTGGAGCAGATA-3'
Rev : 5'-AAGTGGAAAGTTGTACTTA-3'
Longueur théorique de l'amplicon: 321 bp
1 intron
```

ACS-2

```
Dir : 5'-CTCTTACTCAATGGTGGTC-3'
Rev : 5'-CTGTTGCTTTTATAAAACCTG-3'
Longueur théorique de l'amplicon: 410 bp
4 introns
```

iPLA2

Dir : 5'-AGGGCAACAAGGTGAAGAAACTC-3'
Rev : 5'-CCTCTCGGTGCTCATAGATGTAGAC-3'
Longueur théorique de l'amplicon: 345 bp
2 introns

cPLA2

Dir : 5'-AGGGGCTTTATTCCACACG-3'
Rev : 5'-CCTTTTCCTTCAAACTACTCAGGG-3'
Longueur théorique de l'amplicon: 420 bp

G. 3. Clonage et expression recombinante du sous-domaine IIIA de la SAH

G. 3. a) Conception des amorces de clonage

Les cellules utilisées sont issues d'hépatomes humains. Comme point de départ, nous disposons de la séquence protéique humaine du domaine d'acylation putatif de l'albumine. La séquence nucléotidique correspondante est obtenue grâce à l'outil "Back Translation" disponible sur le site d'Infobiogen (http://www.infobiogen.fr). La séquence trouvée est alignée avec la séquence de l'ARNm d'albumine humaine, disponible au National Center for Biotechnological Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) sous la référence (*NM_000477*) par le programme d'alignement multiple ClustalW (http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl). Ceci permet de vérifier que les deux séquences sont bien identiques.

Les amorces sont définies aux extrémités du domaine et ajustées pour obtenir un Tm moyen compatible avec ceux de chaque amorce. Elles seront utilisées pour sélectionner le domaine à partir de l'ADN des hépatomes par PCR.

Les couples d'amorces candidats sont testés par simulations de PCR (logiciel Amplify 1.2) afin de vérifier leur qualité : sites de fixation sur la matrice, formation de dimères, longueur et nombre de fragments. La température optimale d'hybridation est déterminée par le logiciel Hypercard. Les amorces sont soumises à une recherche de similitude par l'algorithme BLAST contre la Genbank. Ceci permet de prédire d'éventuelles hybridations avec d'autres cibles. Enfin le couple d'amorces retenu est celui qui possède le meilleur appariement, la reconnaissance la plus spécifique et des températures d'hybridation compatibles
Les amorces finalement utilisées ont les séquences suivantes:

HSA dir : 5'-CTTGTGGAAGAGCCTCAG-3' (soit les 18 premières bases de la séquence)
HSA rev : 5'-GTATGTTTCATCGACTTCC-3' (soit les 19 bases correspondant aux 19 bases en 3' de la séquence)

La simulation de PCR donne un amplicon théorique *HSA simple* de 356 bp. La température optimale d'hybridation est de 50,2 °C.

G. 3. b) Culture des cellules et extraction d'ARN

Les cellules d'hépatome proviennent d'une lignée HepG2 cultivée à raison de 1 million de cellules par boîte, dans un milieu de culture classique contenant 10% de SVF.

Le culot cellulaire est resuspendu dans 500 µL de Trizol et incubé 5 min à température ambiante. Le Trizol est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Il isole les ARNs, l'ADN et les protéines dénaturées du reste de la suspension. 100 µL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est vortexé 15 secondes puis incubé 15 min à température ambiante. Cette étape permet de séparer l'ADN des autres composants cellulaires. Après une centrifugation à 12000 g pendant 15 min, deux phases se sont formées. La phase aqueuse

supérieure contient l'ADN et les ARN, la phase organique contient tous les débris cellulaires et les protéines sont localisées à l'interface.

La phase supérieure est prélevée et on y ajoute 250 µL d'isopropanol qui fait précipiter l'ARN. Le mélange est agité par retournements et incubé 10 min avant d'être centrifugé 10 min à 12000 g. Après aspiration du surnageant, le culot est lavé à l'éthanol 70 % puis centrifugé 5 min à 7500 g. Le culot d'ARN est séché à l'évaporateur rotatif à 40 °C puis resuspendu dans 40 µL d'eau stérile avant dosage. On obtient ainsi environ 500 µg d'ARN pour 10^6 cellules. Enfin cette solution est chauffée 5 min à 65 °C, pour délier les ARN (suppression des structures secondaires)

G. 3. c) RT-PCR

La PCR (Polymerase Chain Réaction) est une réaction qui permet d'obtenir une grande quantité d'un fragment d'ADN double brin. Ceci est permis par deux amorces d'ADN, une sens et une anti-sens, qui encadrent la séquence voulue. Le brin matrice doit être de l'ADN. L'ARN extrait des cellules ne peut donc pas être utilisé tel quel et doit être transformé en ADN par une Reverse Transcriptase. Cette enzyme est fournie dans le kit Omniscript RT de Qiagen. Le mélange réactionnel est constitué des produits ci-dessous :

	Volume par réaction (µL)	**Concentration finale**
Tampon RT 10X	2	1X
Mix de dNTP (10 mM chaque)	2	0,5 mM chaque
Amorces OligodT	1	1µM
Inhibiteur de RNase	2,5 µL d'une solution au 1/10ème	
Omniscript RT	1	
ARN	variable	qsp 2µg
Eau RNase free	variable	
Volume final	20	

La réaction se fait à 37 °C pendant 60 min. L'enzyme est ensuite inactivée par une augmentation de température à 93 °C pendant 5 min. Les produits obtenus peuvent être conservés à –20 °C.

La PCR est réalisée à l'aide de la Hot Star Taq de Qiagen, dans un volume de 100 µL. Si l'ADN utilisé comme brin matrice provient d'une RT-PCR, le volume ajouté doit être au maximum égal à 10 % du volume final soit 10 µL.

	Volume par réaction (µL)	**Concentration finale**
Tampon 10X	10	1X
dNTP (10mM chaque)	2	200 µM chaque
Amorce directe diluée 10ème	5	0.5 µM
Amorce réverse diluée 10ème	5	0.5 µM
Hot Star Taq	0.5	2.5 U
Eau	variable	qsp 100µL
ADN	variable	Inférieur à 1µg / réaction
Volume final	100	

La Hot Star Polymérase est latente. Elle est activée par 15 min à 95 °C.

Le programme de PCR est le suivant:

Temps	Température	Fonction
15 min	95°C	Activation de la Taq polymérase
45 secondes	**94°C**	Séparation des 2 brins d'ADN
45 secondes	**Tm**	Hybridation des amorces
1 min	**72°C**	Elongation
Nombre de cycles	*30*	*Amplification*
10 min	72°C	Elongation finale

Afin de vérifier l'efficacité de l'amplification, 10 μL du mélange sont déposés sur un gel d'agarose à 2 % contenant 2.5 μL de BET. Un marqueur de taille est déposé en parallèle pour vérifier que la taille du produit obtenu correspond à celle attendue.

G. 3. d) Clonage du fragment d'albumine

• Présentation

Afin de faire exprimer le domaine par les bactéries, la séquence correspondante sera clonée dans le plasmide d'expression pQE-70 de Qiagen. Celui-ci contient un site de clonage multiple avec plusieurs sites de restriction et une séquence correspondant à 6 histidines (Tag-histidine) qui précède plusieurs codons stop. Le Tag-Histidine, situé en C-Terminal de la protéine, permet une purification rapide de celle-ci. Le plasmide contient aussi le promoteur du phage T5 qui permet une surexpression de la protéine et une partie de l'opéron lactose qui permet un contrôle précis de ce promoteur par l'IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactoside).

Le cadre de lecture de l'insert doit être impérativement respecté. Pour cela, une technique consiste à utiliser deux sites d'enzyme de restriction différents afin d'insérer le fragment dans le sens correct. Des sites de restriction internes conduiraient soit à rallonger, soit à couper la séquence désirée. Ces sites doivent donc être ajoutés aux extrémités de la séquence mais ne doivent pas exister à l'intérieur.
Nous avons ainsi choisi d'utiliser les sites SphI et BglII, inclus dans le plasmide pQE-70 de Qiagen.

Une première PCR est réalisée avec les amorces du domaine exact afin de vérifier que la séquence obtenue est de la taille attendue et que l'amplicon est unique. On ajoute alors à ces amorces les sites de restriction.
Les nouvelles amorces sont synthétisées en incluant la séquence du site de restriction en 5':

HSA express dir : - 5'-**GCATG**CTTGTGGAAGAGCCTCAG-3'
HSA express rev : - 5'-**AGATCT**GTATGTTTCATCGACTTCC-3'

Une simulation permet de vérifier qu'il ne se forme pas de dimères et un BLAST confirme qu'elles ne reconnaissent que l'albumine.
Les tailles des amplicons obtenus sont conformes à celles attendues : 348 bp pour les primers *HSA simple* (356 bp théorique), 360 bp pour *HSA express* (367 bp théorique).

• Préparation de l'insert

Les fragments d'ADN amplifiés à partir de ces amorces auront les sites de restriction insérés à leurs extrémités. Le protocole de PCR est le même qu'avec les amorces *HSA simple* avec une température d'hybridation de 53,5°C. La taille du fragment attendue est de 367 bases (356 précédemment). La différence de taille avec le fragment sans les sites de restriction est perceptible sur un gel d'agarose à 3%.

• Digestion du vecteur et de l'insert

La digestion du vecteur et de l'insert par les deux enzymes de restriction SphI et BglII donne des extrémités cohésives différentes qui permettent l'insertion directionnelle de l'insert dans le vecteur. Les enzymes sont fournies par Gibco et requièrent des tampons de pH différents.
La digestion par les deux enzymes se fait en 2 étapes: on fait d'abord agir SphI puis BglII.

	Volume (µL)	Quantité
Tampon 2 10X	4	
Eau stérile	variable	
Vecteur	variable	14,12 µg
SphI	4	40 unités enzymatiques
Volume final	40	

SphI a la particularité de ne plus être active après 1 h d'incubation, ce qui permet d'ajouter BglII. 4,5 µL de tampon 3 et 2,9 µL de BglII soit 29 UE sont additionnés au mélange précédent et l'incubation est prolongée de 2 h à 37°C.

L'insert est traité de la même façon: 16 µL de tampon 2, 23,8 µg d'insert et 4 µL de SphI (40 UE) pendant 70 min à 37 °C puis ajout de 18 µL de tampon 3 et 4,5 µL de BglII (45 UE).

Afin d'éliminer les sels des tampons de digestion, les enzymes et les fragments digérés, l'insert et le vecteur sont purifiés par précipitation différentielle. Pour un volume de 100 µL, on ajoute 100 µL d'eau et 300 µL d'un mélange de phénol/chloroforme (1:1). La solution est centrifugée à 12000 g pendant 5 min et la phase aqueuse est prélevée. Enfin, l'ADN est précipité par de l'acétate de sodium (2 M final) et de l'isopropanol (150 µL). Le mélange incube 10 min à température ambiante sous agitation puis est centrifugé à 12000 g pendant 15 min à 4 °C. Une fois le surnageant éliminé, le culot est rincé à l'éthanol 70 %, séché et repris dans 200 µL de tampon Tris-EDTA (10 mM de Tris et 1 mM d'EDTA).

• Ligation

L'incorporation de l'insert dans le vecteur est assurée par une ligase qui va lier les extrémités complémentaires entre elles. Le rapport vecteur / insert est d'environ 3 afin d'augmenter le rendement de la réaction.

Tampon de ligation 5X	4 µL
Vecteur	0,2 µg
Insert	0,071 µg
T4 DNA ligase	2 µL (2 UE)

Le mélange incube toute une nuit à température ambiante.

• Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries utilisées sont des *E. coli* déjà compétentes, résistantes à la tétracycline et à la streptomycine. Le génotype de la souche est :

(F'{*lac*I^q Tn*10* (Tet^R)} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L *end*A1 *nup*G).

- milieu de culture:

Le plasmide contient le gène codant pour une β-lactamase conférant la résistance à l'ampicilline. L'ampicilline et la tétracycline seront ajoutées au milieu de culture afin de sélectionner les bactéries *E. coli* ayant intégré le plasmide. Le milieu utilisé est du LB-Agar à une concentration de 40 mg/mL stérilisé et complémenté en ampicilline (50 μg/mL) et en tétracycline (10 μg/mL) à partir de solution aqueuse de 50 mg/mL et 10 mg/mL respectivement. Ce milieu est réparti dans des boîtes de pétri stériles.

- *transformation des cellules:*

Les étapes sont réalisées sur glace. 5 μL du mélange de ligation sont ajoutés à un aliquote de cellules Top10 décongelé (10^9 cellules). L'ensemble est rapidement mélangé puis incube 30 min dans la glace. Le mélange est porté à 42 °C pendant 30 s (choc thermique qui permet l'entrée du plasmide dans les cellules) puis laissé 5 min sur glace. 250 μL de milieu SOC sont ajoutés. Il s'agit d'un milieu riche qui permet aux cellules de réparer les dommages créés lors du choc thermique. Les bactéries incubent 1 h à 37 °C sous une légère agitation (225 rpm).

Différents volume de cette suspension sont déposés sur les boîtes de culture (10, 20, 50 μL par boîtes). Celles-ci sont placées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

• Sélection des clones positifs

Les colonies qui poussent sur ces milieux ont intégré le plasmide. Cependant, ces souches ne possèdent pas de système de sélection permettant de différencier les clones ayant intégré un plasmide natif de ceux possédant le plasmide avec l'insert. Plusieurs colonies, sélectionnées au hasard seront testées par deux méthodes:
- digestion du plasmide à l'aide d'une enzyme possédant des sites de restriction dans l'insert;
- Western blot et révélation avec un anticorps anti-Tag-Histidine.

Digestion du plasmide

- Purification grossière du plasmide: protocole adapté d'après le kit Miniprep de Qiagen

Chaque colonie est prélevée, mise dans un tube contenant 7 mL de milieu de culture et incubée toute la nuit à 37 °C. Le tube est centrifugé à 6000 g à 4 °C pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans 0.6mL de tampon P1 (il permet d'éviter un choc osmotique lors de l'ajout du tampon P2) puis vortexé.
- ajouter 0,6 mL de tampon P2 (tampon de lyse), agiter par retournement 5 fois, incuber 5 min à température ambiante
- ajouter 0,6 mL de tampon P3 (tampon de neutralisation), agiter par retournement 5 fois, incuber 5 min sur glace
- centrifuger à 24000 g à 4 °C pendant 15 min
- ajouter 1,6 mL de phénol/chloroforme (1:1), vortexer 1 min
- centrifuger à 24000 g à 4 °C pendant 5 min
- prélever le surnageant et y ajouter 1,6 mL de Chloroforme, vortexer

- incuber sous agitation pendant 10 min puis centrifuger pendant 3 min
- prélever le surnageant et y ajouter 6 mL d'EtOH pur et de l'acétate de sodium (0,3 M)
- incuber à – 20 °C pendant 15 min
- centrifuger pendant 15 min et éliminer le surnageant
- laver le culot à l'EtOH et laisser sécher
- reprendre dans 50 µL d'eau ultra pure.

- Digestion

Elle est réalisée avec l'enzyme StyI.

Composants	Volume
Tampon 6 10X	2 µL
Eau	6 µL
Plasmide purifié	10 µL
StyI	3,3 µL soit 8,25 unités enzymatiques
RNase A	1 µL
	22,3

Le mélange incube 70 min à 37°C puis un échantillon est déposé sur un gel d'agarose à 1.2%. Le plasmide natif ne contient qu'un seul site de coupure de StyI, ce qui donne un fragment de 3427 paires de bases. Un plasmide contenant l'insert donne plusieurs bandes de longueurs 2869, 751 et 152 bp.

Western Blot

Chaque colonie est inoculée dans un tube stérile contenant 7 mL de milieu de culture. Celui-ci est mis à incuber pendant une nuit à 37 °C. 2,5 mL de cette suspension sont prélevés et ensemencés dans un tube contenant du milieu LB à 20g/L stérile, de l'ampicilline (50 µg/mL) et de la tétracycline (10 µg/mL), de l'IPTG à 1 mM final. Ce composé induit la transcription de l'insert cloné dans le plasmide en stimulant le promoteur de celui-ci. Le mélange incube 4 à 5 h à 37 °C sous agitation. La suspension cellulaire est centrifugée 2 min à 15000 g.

L'expression de la protéine est analysée par Western blot. On prélève un aliquote du culot auquel on ajoute 10 µL de Bleu de dépôt concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 5 min puis déposé sur un gel d'acrylique. On dépose les échantillons sur un gel à 14 %. Pour évaluer la taille de la protéine, on utilise un jeu de marqueurs de taille de faible PM (6,4 à 66 kDa) et un standard constitué de cytochrome C (PM = 13 kDa). Après transfert, la membrane est incubée une nuit avec l'anticorps anti-penta-His, puis 1 h avec le second anticorps (dilution au 1/7500ème).

G. 3. e) Amplification des clones positifs et purification du plasmide recombinant

L'amplification des clones exprimant le domaine IIIa de l'albumine est nécessaire pour plusieurs raisons:

- confirmer l'expression protéique
- comparer les taux d'expression des différents clones afin de sélectionner le plus productif
- congeler des aliquotes de culture pour des manipulations ultérieures
- purifier le plasmide recombinant du clone le plus efficace pour confirmer par séquençage la présence de l'insert.

Le milieu utilisé contient du LB à 2 % et les antibiotiques tétracycline (10 µg/mL) et ampicilline (50 µg/mL). Une pré-culture est réalisée sur 1 clone qui est mis en suspension dans 10 mL de milieu et incubé pendant 1 nuit à 37°C sous une légère agitation. 5 mL de cette suspension sont ensuite transférés dans 100 mL de milieu dans une flasque de 1000 mL afin d'assurer une bonne oxygénation de la culture. Celle-ci est incubée pendant 1 nuit à 37°C sous agitation.

G. 3. f) Définition du temps du culture optimum en présence d'IPTG

25 mL de culture des clones positifs en phase de croissance (DO = 0,09) sont incubés 2, 3, 4, 5 et 6 h en présence de 1 mM d'IPTG, sous agitation à 37 °C. On centrifuge alors le milieu à 15000 g pendant 5 min à 4 °C. Le culot est repris dans de l'eau, on prélève un aliquote de la suspension pour lequel on dose les protéines totales, avant analyse de la même quantité de protéines pour chaque temps par Western blot.

G. 3. g) Détermination de la solubilité de la protéine

Un aliquote du milieu de culture est incubé pendant 30 min à 37 °C avec du lysozyme (1 mg/mL final). On s'assure de la lyse des cellules en les soumettant encore à 4 pulses d'ultrasons d'1 min, dans la glace. On sépare ensuite un culot de cellules non lysées d'un surnageant constitué des cellules lysés par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 4 °C. On traite ensuite le surnageant par centrifugation à 12000 g pendant 20 min à 4 °C, pour séparer un culot constitué des corps d'inclusion, et un surnageant de protéines solubles. Les 2 fractions finales sont analysées par Western blot.

G. 3. h) Solubilisation des corps d'inclusion et purification de la protéine recombinante

Les corps d'inclusions préparés comme précédemment sont traités soit par des détergents (mélange de déoxycholate, Igepal et Tween 20 à 1 %), soit par des quantités croissantes d'urée (2, 3, 4, 6, 8 M final). Après homogénéisation et incubation 2 h à 20 °C sous agitation, on sépare à nouveau un culot et un surnageant par centrifugation à 12000 g pendant 20 min à 4 °C. Les fractions sont alors analysés par Western blot.

G. 3. i) Construction des mutants du domaine d'acylation de l'albumine

La mutagenèse dirigée est basée sur l'utilisation d'amorces de PCR mutées au niveau des codons voulus. Les codons mutés sont choisis de manière à modifier le moins possible la région initiale. Ceci minimise le nombre de mésappariements. Par rapport à la séquence du domaine étudié, la S489 est proche de l'extrémité 3'. La synthèse du mutant S489→A consiste à allonger uniquement l'amorce *HSA express/rev* et à remplacer le codon TCA en GCA.

La synthèse des mutants R410 et Y411 est plus complexe. Comme ils sont situés vers le milieu de la séquence, l'allongement de l'amorce *HSA express/dir* n'est pas envisageable. La synthèse se fera en 2 étapes. Tout d'abord, on synthétise des amorces directes qui débutent quelques résidus avant R410 et Y411. Celles-ci comportent des codons mutés: R410→A (CGT→GCT) et Y411→A (TAC→GCC). Une première PCR est réalisée en utilisant l'une ou l'autre de ces deux amorces et l'amorce *HSAexpress/rev* (PCR "mega-primers") selon les conditions décrites précédemment et en utilisant les Tm suivants:

Couple d'amorce	Tm
R410A/dir et *HSAexpress/rev*	53,7
Y411A/dir et *HSAexpress/rev*	53,7
HSAexpress/dir et S489A/rev	55,9

Ceci donne un fragment qui sera utilisé comme une grande amorce ("mega-primer") lors d'une deuxième PCR couplée avec l'amorce *HSA express/dir.*

Les "mega-primers" contiennent chacun un site de restriction à leur extrémité. La reconstitution du mutant se fait en utilisant l'amorce *HSA express/dir* qui possède l'autre site de restriction. La matrice d'ADN utilisée est obtenue à partir d'une PCR avec les amorces *HSA simple.* Elle ne comporte pas de sites de restriction. De cette manière, après PCR, les seuls fragments qui pourront s'insérer dans le plasmide seront ceux qui possèdent les deux sites de restriction. Cette restriction exclut automatiquement la matrice d'ADN et les amorces seules.

Cependant cette méthode nécessite d'ajuster les conditions de PCR. Il s'agit de trouver un compromis entre les concentrations respectives de chaque amorce, la température d'hybridation et le nombre de cycles de PCR.

Après plusieurs tentatives, le protocole suivant a été retenu en modifiant les quantités d'ADN et des amorces par rapport à une PCR classique:

- matrice d'ADN (HSAsimple): solution précédente diluée au 1000ème soit
- primer HSAexpress/dir: dilué au 1000ème soit 0,01 pmol/μL
- méga-primer: utilisé pur

Produits	Tube 1	Tube2
Tampon 10X	10 μL	10 μL
dNTP	1 μL	1 μL
Amorce HSAexpress/dir 1000ème	2 μL	2 μL
Mega-primer R410A pur	3 μL	3 μL
Hot Star Taq polymérase	0,5 μL	0,5 μL
Eau	73,5 μL	63,5 μL
Matrice (HSAsimple)	10 μL de 1/10ème	10 μL de 1/1
Total	100 μL	100 μL

Après plusieurs essais, le programme de PCR retenu est le suivant:

Temps	Température	Fonction
15 min	95°C	Activation de la Taq polymérase
4 min	**94°C**	Séparation des molécules double brin
4 min	**65°C**	**Phase d'hybridation, allongée à cause de la longueur du méga-primer**
1 min	**72°C**	Phase d'élongation
Nombre de cycles	*15*	
10 min	72°C	

Les amplicons obtenus ont la taille attendue :

Fragment	HSAexpress	S489A	R410A	Y411A
Taille théorique	372	372	287	284
Taille mesurée	367	371	294	291

G. 4. Clonage et expression recombinante des DBD et LBD de PPARγ murin

G. 4. a) Amplification sélective des domaines de PPARγ

• Conception des amorces

Les séquences de l'ARNm correspondant aux protéines PPARα, β et γ chez la Souris sont obtenues à la banque Swissprot (http://www.expasy.ch) sous les références NM_011144, U10375, U01664 respectivement. Un alignement des séquences des trois isoformes nous permet de choisir les amorces dans les régions les moins conservées entre les trois isoformes, puisque nous souhaitons cloner spécifiquement PPARγ.

• *Pour le DBD, les amorces ont la séquence suivante :*

- **DBD dir** : 5'-TTCTAACTCCCTCATGGC-3' *Tm = 53,7 °C*
- **DBD rev** : 5'-CTCCTTCTCGGCCTGT-3' Tm = 54,3 °C

Avec 2 µL de cDNA et 30 cycles d'amplifications avec un Tm de 54 °C, on obtient un amplicon unique de 270 bp (taille théorique : 270 bp)

• Pour le LBD, les séquences des deux amorces sont les suivantes :

- **LBD dir2** : 5'-TATCGACCAGCTGAACCCA-3' Tm = 56,7°C
- **LBD rev** : 5'-GGTGGGACTTTCCTGCTA-3' Tm = 56°C

Une seule bande est bien obtenue mais il faut utiliser 15 µL de cDNA avec un Tm de 56 °C pour obtenir en plus une bande de faible intensité. La taille calculée est celle attendue (850 bp). Pour améliorer l'efficacité de la réaction et diminuer la quantité d'ADN à utiliser, on a donc construit une amorce de RT, notée oligo*, qui n'est autre que la séquence complémentaire de l'amorce LBD rev. Cette amorce utilisée à la place de l'oligodT lors de la RT devrait permettre une hybridation sur les ARN qui nous intéressent seulement. De plus, la spécificité de la réaction serait meilleure. Sa séquence est donc la suivante :

- **Oligo*** : 5'-CCACCCTGAAAGGACGAT-3' Tm = 56 °C

Une nouvelle PCR est réalisée, avec les amorces dir2 et rev du LBD, mais en utilisant cette fois l'oligo* pour la RT. 2 µL de cDNA et 30 cycles avec un Tm de 56 °C, produisent une bande unique d'intensité correcte. La bande obtenue a une taille d'environ 855 bp (852 bp théorique).

Les couples d'amorce ainsi définis nous permettent donc d'amplifier le cDNA de chacun des domaines recherchés, en ciblant spécifiquement PPARγ.

• Culture de cellules

L'isoforme PPARγ est prépondérante dans les adipocytes. Afin de renforcer la spécificité de notre amplification, nous allons donc travailler sur des fibroblastes murins 3T3-L1 différenciés en adipocytes.

• Extraction des bandes du gel d'agarose

La totalité des produits de PCR obtenus est déposée sur un gel d'agarose. Environ 100 μL sont déposés par puits pour les deux fragments, LBD et DBD. Deux bandes sont donc obtenues, correspondant aux deux amplicons que permettent d'amplifier les amorces préalablement construites.

Les bandes sont ensuite excisées du gel grâce à un scalpel, après environ 30 min de migration. Les deux morceaux de gel sont déposés dans des tubes eppendorf et pesés.

En considérant que 100 mg de gel correspondent à environ à 100 μL, V est défini comme le volume de gel correspondant. 3V de tampon du Kit d'extraction (QIAquick Cat.28704) sont ajoutés. Les tubes incubent ensuite 10 min à 50 °C, de manière à dissoudre totalement l'agarose. V d'isopropanol est alors ajouté. L'échantillon est ensuite déposé sur une colonne d'extraction. Celle-ci est centrifugée 1 min à 11000 g et à 25 °C. 750 μL de PE sont alors ajoutés au sommet de la colonne. Après une incubation de 5 min, la colonne est de nouveau centrifugée dans les mêmes conditions. Une nouvelle centrifugation à 12000 g pendant 2 min permet de s'assurer que tout le PE est éliminé. L'ADN est ensuite élué dans un tube eppendorf par 30 μL de EB. Après incubation une min à température ambiante, l'élution est permise par une centrifugation à 12000 g pendant 2 min à 25 °C. L'ADN est ensuite dosé.

G. 4. b) Clonage des fragments de PPARγ

• Présentation

Les deux fragments vont être exprimés chez *E. coli.* Pour cela, la séquence de chaque fragment va être insérée dans un plasmide d'expression. Nous disposons du vecteur pQE-70 de Qiagen. Celui-ci contient une cassette de clonage dans laquelle se trouvent différents sites de restriction, notamment pour BamHI, BglII, HindIII, SphI. Pour chaque fragment, deux enzymes de restriction sont utilisées afin d'orienter l'insertion dans le plasmide. On s'assure que les fragments ne contiennent pas au sein de leur séquence des sites de restriction pour les enzymes utilisées afin de ne pas cliver la séquence désirée.

• Synthèse de l'insert

L'utilisation du vecteur pQE-70 permet de synthétiser une protéine portant un Tag-histidine du côté carboxy-terminal. Or l'étude de la structure tridimensionnelle de nos fragments montre que cette position n'est pas très judicieuse.

En effet, en ce qui concerne le DBD, la partie carboxy-terminale du domaine est très proche d'un grand sillon de l'ADN. Or le Tag-histidine est chargé positivement et l'ADN est chargé négativement. Il est fort probable qu'une interaction puisse se créer entre les deux à ce niveau. Par contre, du côté amino-terminal, le Tag-histidine serait beaucoup plus éloigné de l'ADN.

De même, pour le LBD, la partie carboxy-terminale est très proche de la poche de liaison du ligand, alors que la partie amino-terminale est beaucoup plus éloignée. Il serait donc plus prudent d'ajouter le Tag-histidine du côté amino-terminal, afin d'éviter de bloquer l'accès au site de fixation.

- Le LBD contient dans sa séquence un site de restriction pour BglII. Il va être cloné à l'aide de SphI et HindIII. Il faut ajouter en amino-terminal le Tag-histidine que l'on souhaite incorporer. Celui qui était déjà présent dans le vecteur va être clivé puisque le site de restriction pour HindIII se situe après. Par contre, les codons stop présents dans la structure du plasmide sont conservés (Figure 65).

- Le DBD contient des sites de restriction pour HindIII et BglII. L'utilisation de ces enzymes étant impossible, le fragment va être cloné avec SphI et BglII. Le tag-histidine sera ajouté du côté amino-terminal grâce aux amorces. Il faut néanmoins ajouter une séquence stop avant le site de restriction pour BglII afin d'éviter la synthèse du Tag-histidine présent dans le vecteur.

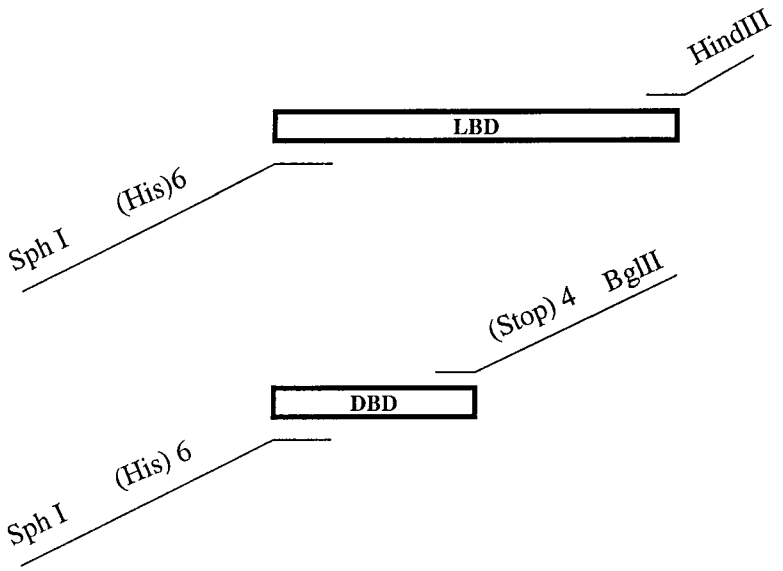


Figure 65 Représentation schématique des constructions des inserts

Le début de la séquence du plasmide pQE-70 montre le site de restriction pour SphI. L'enzyme coupe directement après l'ATG. Le cadre de lecture est donc correct, il est inutile d'ajouter des bases afin de le modifier.
Les amplifications réalisées à partir des premières amorces construites ont permis d'obtenir les fragments que l'on cherche spécifiquement chez PPARγ.
De nouvelles amorces permettant le clonage dans le vecteur et l'expression des domaines précis sont construites à partir des séquences des amplicons obtenus précédemment. Elles seront utilisées directement sur les amplicons extraits du gel.

Insert LBD

On utilise les amorces suivantes :

- **LBD exp dir :**

  5'-GCATGCATCACCATCACCATCACGGCTCTGCTGATCTGCG-3' Tm= >75 °C

- **LBD exp rev :**

  5'-AAGCTTATACAAGTCCTTGTAGATCTCCTGGAACAGGGGG-3' Tm= 72,5 °C

Les Tm sont très élevés et incompatibles avec l'étape d'élongation (même température). Nous avons donc testé différentes conditions d'amplification, en utilisant différents Tm et concentrations en Mg^{2+}. Finalement 2 µL de cDNA obtenu après RT utilisant l'amorce oligo* permettent l'apparition d'une bande unique d'intensité correcte après 30 cycles, avec des Tm de 60 ou 64 °C, avec ou sans la solution Q d'optimisation de Qiagen. La taille de l'amplicon attendu est 850 bp, conformément à la taille prédite.

Insert DBD

Les séquences des amorces sont les suivantes :

- **DBD exp dir :**

5'-GCATGCATCACCATCACCATCACGGCATTGAGTGCCGAGT-3' Tm= >75 °C

➢ **DBD exp rev :**

5'- AGATCTCAGCTAATTAAGCTTACTCGGCCTGTCGATCCCG-3' Tm= 73,6 °C

La PCR réalisée à partir de l'amplicon de sélection, lui-même obtenu après utilisation de l'amorce oligo* en RT n'a pas donné d'amplification. L'addition de solution Q ou de diverses concentrations de Mg^{2+} a été sans influence. Nous avons alors utilisé l'amplicon obtenu après RT amorcée par l'oligodT classique, sans davantage de résultat. Cherchant si un seul des 2 primers pouvait être responsable de l'échec, nous avons testé toutes les combinaisons de couplages des amorces DBD dir/rev, que nous avions montrées efficaces, avec les amorces DBD exp dir/rev, à différents Tm. Ceci nous a permis de conclure que le primer DBD exp dir était fonctionnel, avec 2 µL de cDNA et 34 cycles à 60 °C :

Amorce dir	Amorce rev	V_{ADN} (µL)	Tm (°C)	Nb de cycles	Amplicon mesuré	Amplicon théorique
DBD dir	DBD rev	2	60	34	275	270
DBD exp dir	DBD rev	2	60	34	280	280
DBD dir	DBD exp rev	2	60	34	Ø	280

DBD exp rev étant vraisemblablement en cause, nous avons alors dessiné un autre primer reverse. Quatre nucléotides sont tronqués en 3' car il est impossible de supprimer des nucléotides en 5' sans altérer le site de restriction. Les quatre nucléotides coupés correspondent à des G ou des C qui élèvent fortement la température d'hybridation des amorces. La nouvelle amorce obtenue est appelée DBD exp rev2 :

➢ **DBD exp rev 2 :** 5'- AGATCTCAGCTAATTAAGCTTACTCGGCCTGTCGAT-3'
Tm=69,5 °C , et la taille de l'amplicon attendu est de 293 bp.

Après plusieurs tentatives infructueuses, on utilise comme matrice l'amplicon obtenu avec les primer LBD dir/rev, comme pour le LBD :

ADN matrice	V_{ADN} (1µL)	Tm (°C)	Nb de cycles
Issu de la RT avec l'oligodT	2	68	34
amplicon	1	60	34
amplicon	1	64	34
amplicon	1	68	34

On n'obtient aucune bande dans avec les premières conditions, par contre trois pour les secondes (100, 210 et 280 bp) et une unique de 100 bp pour les 2 dernières. La taille théorique de la bande est de 293 bp. Ici la bande qui s'en rapproche le plus est celle de 280 bp. Pour le clonage, on utilisera donc l'amplicon comme matrice, avec un Tm de 60 °C, en limitant le nombre de cycle à 30. La bande de 280 bp sera séparée des autres par extraction du gel d'agarose.

- **Digestion par les enzymes de restriction**

Pour les deux fragments, l'enzyme de restriction SphI est utilisée, or cette enzyme n'est plus active après 1 h d'incubation. Dans les deux cas, on fera donc agir SphI en premier.

- Pour le LBD :

	Insert	Vecteur
Tampon 10 X (µL)	2,5	2,5
Eau (µL)	0	0,2
ADN (µL)	24	2
SphI (µL)	0,5	1,1
70 min à 37°C		
HindIII (µL)	0,6	1,2
70 min à 37°C		

- Pour le DBD :

	Insert	Vecteur
Tampon 10 X (µL)	3	10,3
Eau (µL)	0	60
ADN (µL)	27	8,5
SphI (µL)	1	4,5
70 min à 37°C		
BglII (µL)	1,1	4,6
70 min à 37°C		

Afin d'éliminer les sels des tampons de digestion, les enzymes et les fragments digérés, l'insert et le vecteur sont purifiés par précipitation différentielle. 300 µL de phénol-chloroforme sont ajoutés. Une centrifugation à 12000 rpm pendant 5 min permet de récupérer l'ADN dans la phase aqueuse. L'ADN est ensuite précipité par ajout d'acétate de sodium (2 M final) et d'isopropanol (150 µL). Le mélange incube 10 min à température ambiante sur un balancier puis est centrifugé à 12000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Une fois le surnageant éliminé, le culot est lavé à l'éthanol pur, séché, puis repris dans 50 µL de Tris-EDTA (10 mM de Tris et 1 mM d'EDTA). L'ADN est ensuite dosé.

G. 4. c) Sélection des clones positifs

20 colonies sont testées par fragment et par souche de bactérie. Chaque colonie testée est inoculée dans un tube stérile contenant 5 mL de milieu de culture composé de 20 g/L de LB et de l'ampicilline à 50 µg/mL.

Les tubes sont ensuite disposés une nuit sur agitateur à 37 °C.

500 µL de chaque tube sont alors prélevés et ensemencés dans des tubes contenant 10mL de LB et de l'ampicilline. Les tubes ainsi obtenus sont placés à 37 °C sur agitateur jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit environ de 0,5 - 0,7.

L'ajout d'IPTG à 1 mM final permet alors d'induire la transcription de l'insert cloné dans le plasmide en stimulant le promoteur de celle-ci. La suspension incube 4 h à 37 °C sur agitateur. 2 mL de chaque tube sont ensuite centrifugés 2 min à 15000 g et à 4 °C. Le culot est repris dans 30 µL de Bleu de dépôt.

Le mélange est porté à ébullition avant le dépôt sur gel de polyacrylamide.

- Pour le LBD, la taille théorique de la protéine recombinante est environ de 32 kDa. La migration se fait sur un gel de polyacrylamide composé d'un gel de séparation à 12 % et d'un gel de concentration à 5%. Le tampon d'électrophorèse utilisé est du tampon tris-glycine.

- Pour le DBD, la taille théorique de la protéine recombinante est environ de 10,5 kDa. La migration se fait alors grâce à un gel de séparation à 15% et un gel de concentration à 5 %. Le tampon d'électrophorèse utilisé est du tampon tris-tricine.

Après transfert, la membrane est incubée avec l'anticorps anti-penta-His dilué au 1/1500ème. Le second anticorps est un anti-IgG de Souris, couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/7500ème.

H. Modélisations

H. 1. Modélisations mathématiques des courbes et statistiques

L'inhibition de COX a été déterminée en utilisant l'équation suivante, analogue à la fonction de Hill :

$$Y = \frac{a-d}{1+\left(\frac{X}{c}\right)^b} + d$$

où X et Y représentent respectivement les concentrations molaires en inhibiteur et le pourcentage d'inhibition, et où a, b, c et d sont des paramètres, à déterminer dans chaque cas. La modélisation des résultats expérimentaux par ce modèle est réalisée par minimisation de la fonction objective, définie comme la somme des écarts quadratiques entre valeurs expérimentales et théoriques.

$$\Omega = \sum_1^n p_i \times \left(Yi_{\exp} - Yi_{th}\right)^2 \quad \text{i = 1 à n points expérimentaux}$$

Le meilleur résultat est obtenu pour un coefficient de pondération p_i égal à $1/Y_{exp}$. Cette équation est utilisée pour modéliser la courbe sigmoïdale entre concentration et réponse et pour estimer les IC_{50} à partir des valeurs des paramètres.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel StatView 5 (Abacus Concept, SAS Institute). Les tests utilisés sont précisés dans les résultats, lorsque nécessaire.

H. 2. Modélisation moléculaire et exploitation de séquences protéiques

H. 2. a) Docking

Les expérience de docking moléculaire ont été réalisées à l'aide du programme de docking flexible Sculpt v.3.0 [882]. Les détails du docking des métabolites dans les sites de COX pourront être trouvés dans le manuscrit β.

H. 2. b) Prédiction de structure par homologie

La structure tridimensionnelle d'une protéine peut être prédite à l'aide du programme Swiss Model. Celui-ci aligne la séquence de la protéine étudiée, soit avec celle d'un patron qu'on lui fournit, soit il recherche lui-même la meilleure identité de séquence dans la PDB. S'il trouve une séquence suffisamment proche (en pratique et si l'utilisateur n'interfère pas, il faut au moins 50 % d'identité), il attribue les coordonnées spatiales à chaque atome par homologie, en respectant des angles de torsion statistiquement valides. Il génère alors un fichier PDB qu'il renvoie à l'utilisateur.

H. 2. c) Mutagenèse

Elle est obtenue grâce au logiciel Swiss-PDB Viewer. Il attribue des angles de torsion statistiquement favorisés aux résidus modifiés. La conformation de la chaîne latérale peut encore être affinée par minimisation d'énergie.

H. 2. d) Analyse par HCA

- **Principe**

Les résidus de protéines ont par leur nature chimique une propension à se situer dans une structure secondaire donnée. Les hydrophobes sont ainsi plutôt associés à une structure précise (Figure 66).

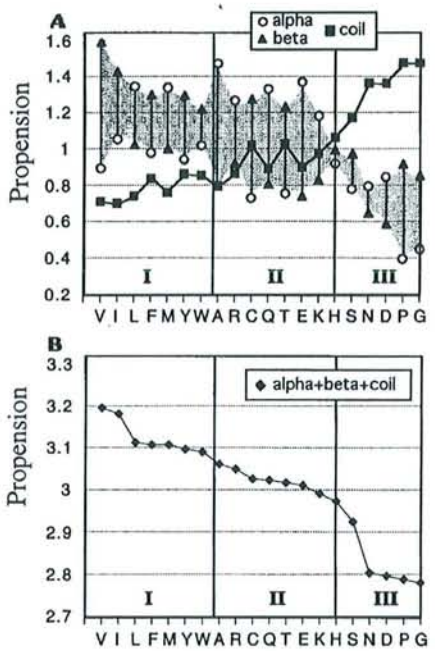


Figure 66 Propension des acides aminés à se situer dans une structure secondaire [883]

La propension est définie par le % d'un résidu dans une structure donnée par rapport au total des résidus dans cette structure. On définit ainsi 3 classes : **I** : Résidus situés surtout dans les hélices et les brins, **II** : Résidus situés surtout dans les hélices ou les brins, **III** : Résidus associés aux coudes.

On peut aussi classer les résidus de protéines en fonction de leur accessibilité au solvant. Il apparaît ainsi que les hydrophobes sont les plus enfouis ou les plus packés (Figure 67).

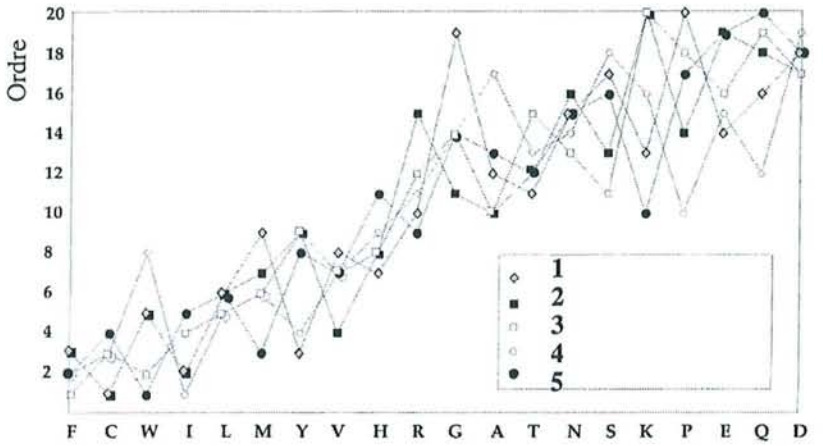


Figure 67 Classements des résidus selon leur accessibilité moyenne au solvant [884]

(**1**) : Poupon et al., 1998 ; (**2**) : Rose et al., 1985 ; (**3**) : Wertz & Scheraga, 1978 ; (**4**) : Robson et Osguthorpe, 1979 ; (**5**) : Guy et al., 1985

On voit ainsi que les résidus hydrophobes sont plutôt au cœur des protéines, tandis que les polaires sont plutôt en périphérie. Au niveau structural, c'est justement ce cœur protéique qui est fondamental. Dans une même famille de protéines, ce sont les résidus enfouis et hydrophobes qui sont les plus conservés (Figure 68).

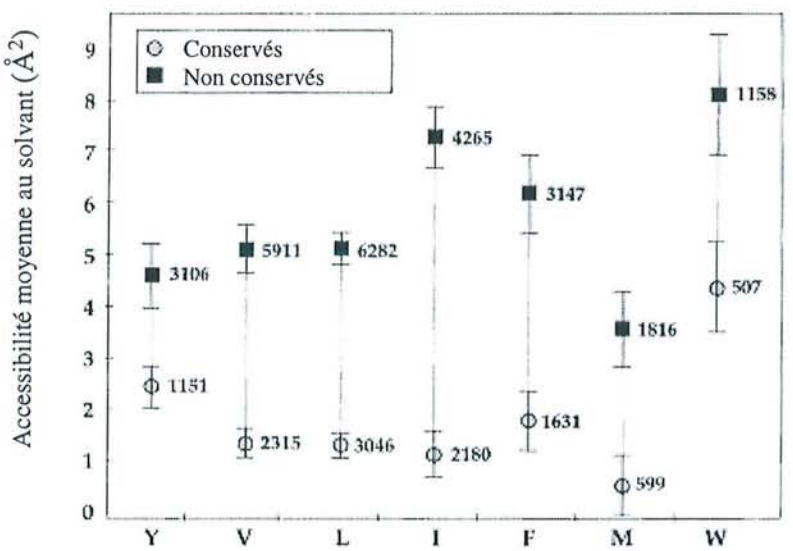


Figure 68 Accessibilité des résidus hydrophobes relativement à leur conservation dans une famille protéique [883]

La figure représente les expositions au solvant des hydrophobes de la famille des tryptases. A côté des points indiquant les moyennes, figure le nombre de résidus concernés.

La méthode HCA utilise ces propriétés des hydrophobes pour définir des topohydrophobes : résidus de cœur de protéines, statistiquement plus conservés que les autres dans une famille, et structuralement cruciaux (Figure 69).

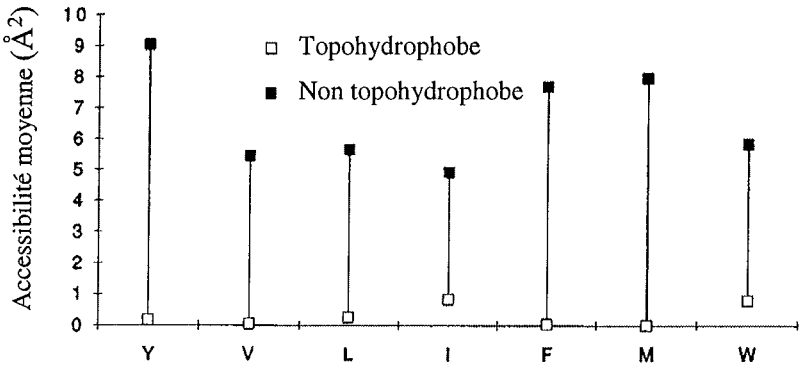


Figure 69 Accessibilité des résidus hydrophobes selon leur position structurale [884]

Les topohydrophobes sont organisés en amas dans les structures secondaires, et ce sont justement ces amas qu'on recherche et compare par HCA. L'apport de la détection de ces topohydrophobes est donc double : (**i**) un amas révèle un packing, ce qui permet d'utiliser HCA comme outil de prédiction de structures secondaire : les hélices apparaissent comme des amas horizontaux, les feuillets comme des groupes verticaux. (**ii**) Par alignement de profil HCA de protéine, il est possible de définir les résidus structuraux conservés dans une famille ou de prévoir si telle protéine appartient à telle famille, par la conservation des amas hydrophobes.

• Méthode

La Figure 70 propose un schéma du principe d'HCA.

(a) Les séquences ne sont pas représentées de façon linéaire, mais sur un support hélicoïdal. Les hélices sont représentées avec leur angle de 20°, chaque pas comporte 3-4 acides aminés (hélice α parfaite).

(b) Cette disposition de la séquence permet de mettre en évidence la proximité d'acides aminés éloignés dans la séquence primaire, mais voisins en 3 dimensions.

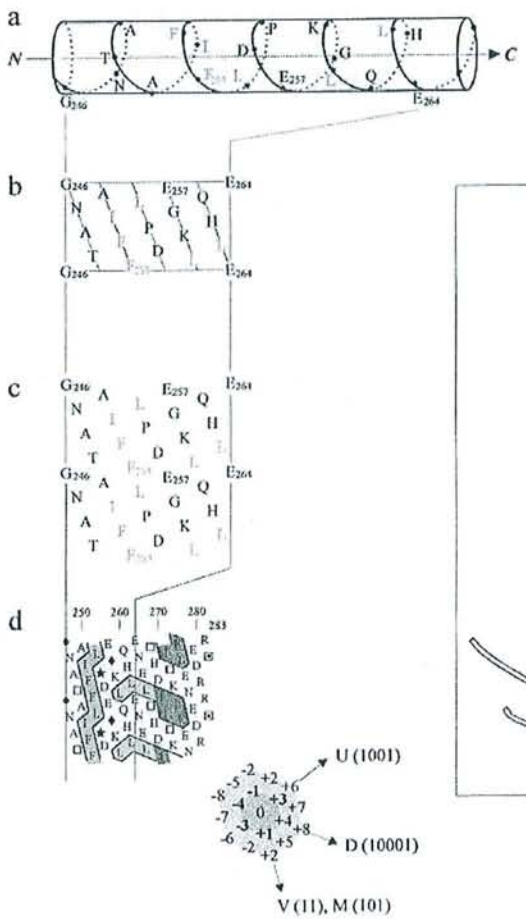
(c) L'agencement est alors dupliqué afin d'assurer une continuité et de visualiser les acides aminés proches dans la séquence.

(d) On schématise les amas d'acides aminés topohydrophobes en les entourant. Un amas de type vertical, dans le sens de la progression de la chaîne polypeptidique, est souvent représentatif d'un brin β, à l'opposé d'amas «horizontaux » correspondant plutôt à des hélices α.

1D

```
246 ...GNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLENEDRRS... 283
    ...♦NA□AIFFL★DEGKLQHLENEL□HDII□KFLENEDRR⊡...
    ...00000111100000100100001000110011000000...
```

2D



3D

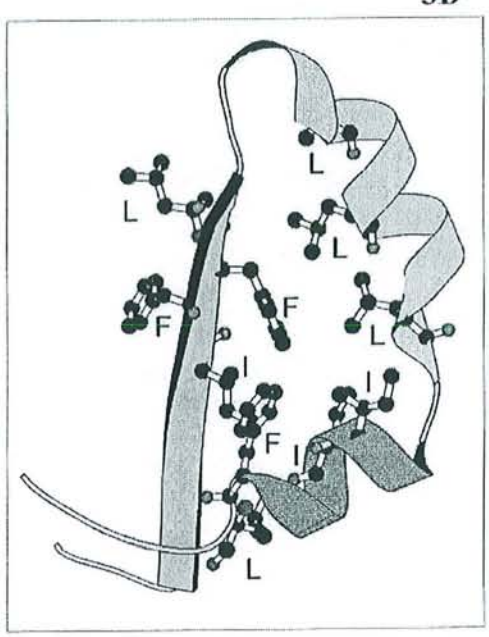


Figure 70 Principe de la méthode HCA, de la séquence primaire d'une protéine à sa structure tridimensionnelle [883]

On attribue des symboles pour les acides aminés aux propriétés structurales particulières, souvent situés dans les coudes :

- ★ : la proline, qui confère la plus grande contrainte à la chaîne polypeptidique et termine souvent les structures secondaires.
- ◆ : la glycine, qui laisse une liberté importante à la chaîne.
- ⊡ et □: la sérine et la thréonine respectivement : Ces 2 acides aminés polaires peuvent masquer leur polarité en créant des liaisons hydrogènes avec les carbonyles de la chaîne principale, particulièrement à l'intérieur des hélices.

HCA permet, dans cet exemple, de prédire la structure secondaire de la séquence et également de mettre en évidence la proximité et l'orientation des acides aminés hydrophobe vers le cœur de la structure.

A. Synthèse et caractérisation de l'acyl-CoA de KPF et de son analogue non hydrolysable

L'étude de l'implication des métabolites de KPF dans ses effets pharmacologiques nécessite de disposer de quantités importantes de ces molécules. Il nous est aussi imposé de les obtenir avec un taux de pureté maximum pour abroger toute participation de la molécule mère. La préparation des glucuronides est réalisée selon la méthode de Haumont [876], en utilisant des UGT immobilisées en billes d'alginate. On obtient ainsi le glucuronide de chaque énantiomère de KPF par incubation des enzymes avec le R- ou le S-KPF, avec une très bonne pureté [885].

La synthèse et la purification énantiospécifique du KPF-CoA n'étant pas décrites, nous avons donc commencé par ce travail.

A. 1. Synthèse du KPF-CoA

Il s'agit d'une synthèse en deux étapes dérivant de la méthode de Goldman et Vagelos [886]. Cette méthode est rapide car elle ne requière qu'une seule étape de purification (Figure 71).

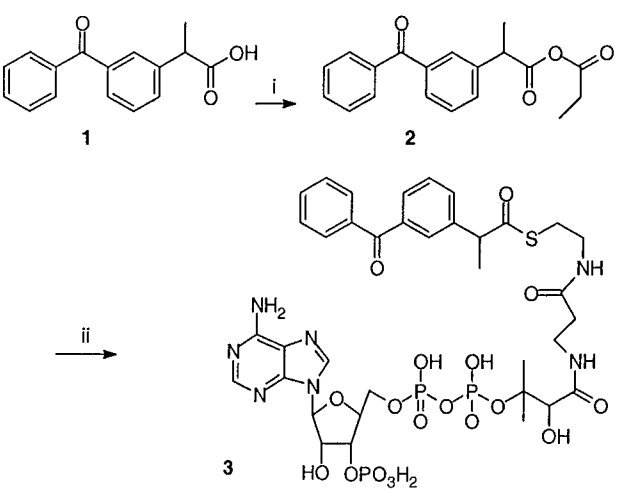


Figure 71 Schéma réactionnel de la synthèse du KPF-CoA

Réactifs: i, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 puis $ClCO_2Et$, 20 °C, 1h
ii, THF, CoASH, H_2O, pH = 6,2, 20 °C, 2h.

Elle consiste en une activation de la fonction carboxylique du KPF (**1**) par le chloroformiate d'éthyle (composé **2**), avant l'addition du CoASH. Les détails expérimentaux sont développés dans la publication α. Etant donnée la stéréosélectivité marquée des effets pharmacologiques des profènes, nous avons cherché à obtenir les acyl-CoA de chaque énantiomère de KPF. La synthèse énantiospécifique à partir des énantiomères purs de KPF s'est révélée irréalisable à cause d'une épimérisation intervenant durant la formation du composé, comme nous l'avons observé en suivant la cinétique du pouvoir rotatoire et par dérivation des produits de synthèse après hydrolyse. L'épimérisation est très rapide, y compris

à basse température. Des essais de synthèse à –20 °C et – 80 °C ont en effet montré qu'elle est même plus rapide que la formation du KPF-CoA dans ces conditions (résultats non montrés). La préparation a donc été réalisée à partir du KPF racémique. On obtient ainsi les deux diastéréoisomères de KPF-CoA qui sont ensuite purifiés et séparés en phase réverse par CLHP semi-préparative. La séparation des diastéréoisomères est très efficace et permet une pureté énantiomérique > 98 % (Figure 72).

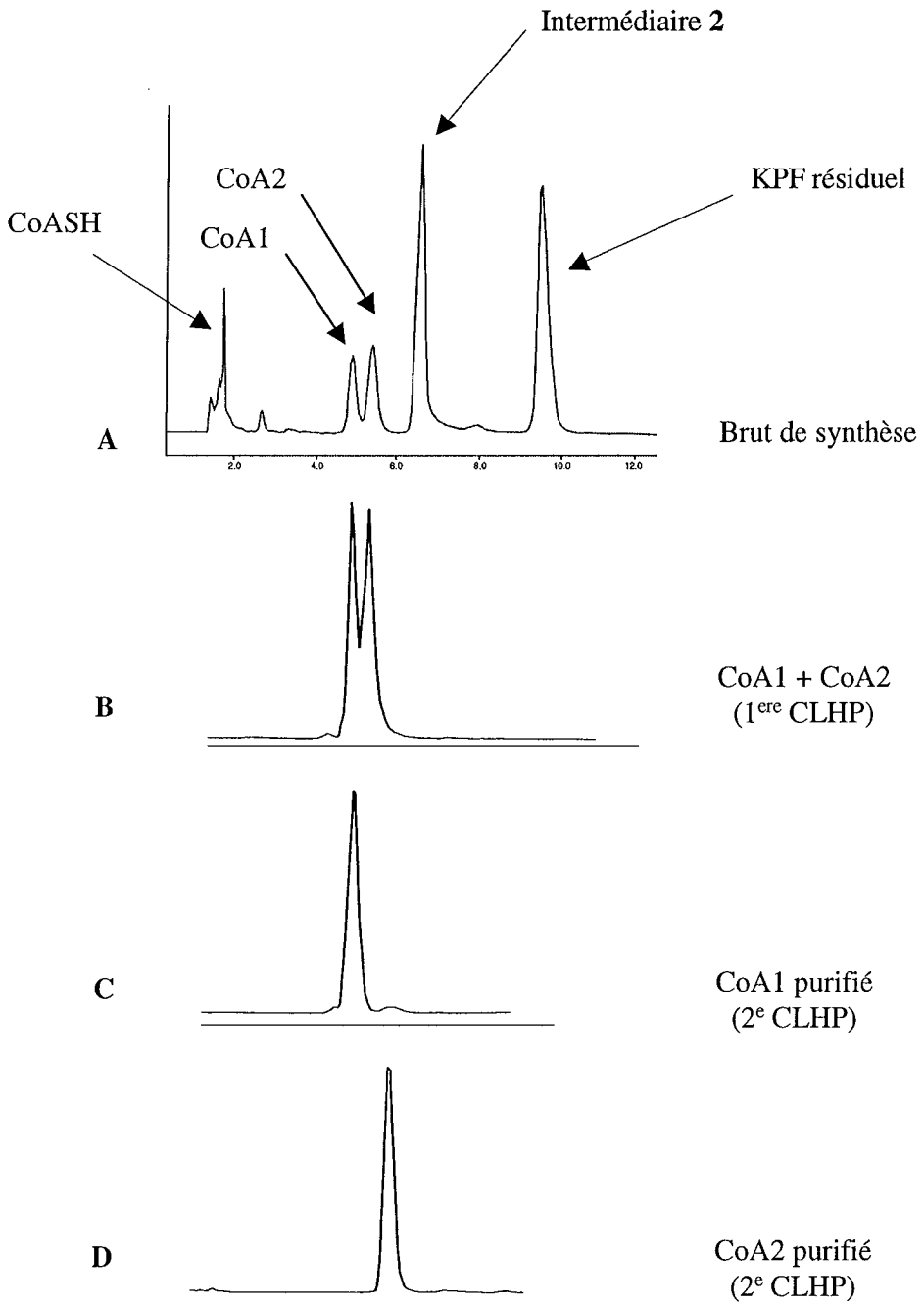


Figure 72 Chromatogramme analytique des étapes de purification du KPF-CoA

A : Brut de synthèse présentant les réactifs L'intermédiaire 2 est présenté Figure 71. **B :** 1ère étape de purification : obtention des 2 diastéréoisomères de KPF-CoA. **C, D :** 2ème étape de purification : obtention de l'acyl-CoA de chaque énantiomère de KPF pur.
Eluant H_2PO_4/HPO_4 9mM, pH=5,5 : 55 %, MeOH : 45 % ; débit : 1,5 mL/min ; λ=254 nm.

L'analyse structurale rigoureuse des deux énantiomères de KPF-CoA a été obtenue par RMN hétéronucléaire bidimensionnelle (^{1}H / ^{13}C) et RMN du ^{31}P (Annexes X). Nous n'avons pas pu attribuer la configuration de chaque éluat chromatographique de **3** à cause de l'épimérisation observée dans les essais de synthèse énantiospécifique : elle conduit en effet approximativement au même mélange diastéréoisomérique quel que soit l'énantiomère de KPF utilisé.

L'activité AINS-CoA synthétase est quasi-spécifique de l'énantiomère R. Nous avons donc pensé pouvoir utiliser la synthèse microsomiale pour résoudre cette attribution : le produit dont le temps de rétention correspondrait à celui obtenu par synthèse microsomiale serait ainsi le R-KPF-CoA. La préparation de KPF-CoA dans ces conditions donne effectivement un produit chromatographique unique, correspondant au 2^{e} pic. Malheureusement, l'incubation des microsomes avec le produit correspondant au premier comme au second pic résulte toujours en une présence du seul 2^{e} pic, révélant une forte épimérisation allant du produit du 1er pic vers celui du 2^{e}. Cette inversion de configuration unidirectionnelle empêche donc toute conclusion quant à l'assignation d'une stéréochimie du KPF-CoA.

Nous avons alors travaillé à la cristallisation de ce composé afin de déterminer la configuration absolue par diffraction des rayons X. Le screening de différentes solutions favorisant la cristallisation de protéines, par combinaison de toutes les concentrations, (Tableau 10) a permis d'identifier 2 tampons où croissent des cristaux de KPF-CoA. Ces cristaux apparaissent avec 0,5 et 1 mM de KPF-CoA à 20 °C en 15 j, où ils atteignent environ 125*160 μm. Pour obtenir de plus gros cristaux, nous avons cherché à affiner le screening autour des 2 solutions favorables, en faisant varier le taux de polyethylène-glycol (PEG) de 16 à 20 % et celui d'acétate de Zn ou de Ca entre 0,15; 0,2 et 0,25 M. Nous n'avons malheureusement obtenu que des polycristaux dans ces conditions. Ces résultats préliminaires sont cependant encourageants, et les mêmes concentrations sont actuellement testées à 6 °C.

	Concentrations testées	Solutions où croissent des cristaux de KPF-CoA	
PEG 8000	16, 18, 20 %	18 %	18 %
Cacodylate	0.1 M	0,1 M	0,1 M
Acétate de Zn **ou**	0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,15 M	0,1 M	0
Acétate de Ca	0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,15 M	0	0,1 M

Tableau 10 Compositions des solutions efficaces testées pour la cristallisation du KPF-CoA
Les solutions testées résultent de toutes les combinaisons des concentrations des produits de la première colonne.

L'attribution de configuration n'ayant pas pu être obtenue, les acyl-CoA des deux énantiomères de KPF seront donc dénommés CoA1 et CoA2, en référence à leur ordre de rétention chromatographique dans la suite de cette étude.

A. 2. Synthèse de l'analogue non acylant (NAK)

La forte réactivité des acyl-CoA nous a conduit à synthétiser un analogue du KPF-CoA (NAK) afin de disposer d'une molécule structuralement similaire mais stable et privée de la capacité d'acylation.

Cette synthèse en quatre étapes consiste en l'activation du carboxyle du KPF en chlorure d'acyle (composé **4,** Figure 73), suivie de l'addition du CH_2 par le diazométhane (**5**). On active alors le CH_2 apporté par le diazométhane par de l'HCl sec avant de purifier le produit obtenu (**6**) en phase normale par CLHP préparative. Le CoASH est finalement ajouté

et le produit final, NAK (**7**), est purifié en phase réverse par CLHP semi-préparative. Les détails expérimentaux sont présentés dans la publication α. Contrairement à la synthèse du KPF-CoA, les conditions de purification chromatographique n'ont pas permis la séparation des deux diastéréoisomères de (**7**). Les différents intermédiaires réactionnels et le produit final ont été caractérisés par RMN du H, analyse élémentaire et spectrométrie de masse haute résolution (Publication α).

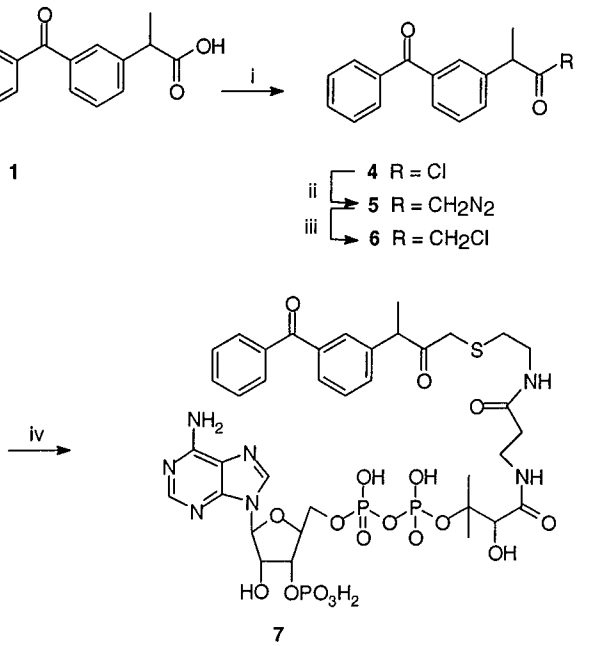


Figure 73 Schéma réactionnel de la synthèse de l'analogue non acylant du KPF-CoA, NAK

Réactifs: **i**, $ClCO_2Cl$, 20 °C, 1 h; **ii**, diazald, 0°C, 2h; **iii**, HCl anhydre dans Et_2O; **iv**, CoASH, H_2O/DMF, $CsCO_3$, 20 °C, 24h.

La première étape de notre travail nous permet ainsi de préparer l'acyl-CoA de KPF en quantités importantes, avec un taux de pureté supérieur à 99 %. Nous avons obtenu la séparation des deux diastéréoisomères, ce qui va nous permettre une étude impliquant la stéréochimie de nos métabolites. Nous disposons enfin d'un analogue non hydrolysable et non acylant de ce métabolite. Cette molécule est structuralement aussi proche que possible du KPF-CoA (il n'y a qu'un groupement CH_2 supplémentaire), et nous pouvons raisonnablement supposer qu'elle aura des affinités tout à fait comparables pour un site de fixation donné (membrane ou protéine).

A. 3. Publication α

Synthesis and biological testing of acyl-CoA-ketoprofen conjugates as selective irreversible inhibitors of COX-2

Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10:753-757

Levoin N, Chretien F, Lapicque F, Chapleur Y

Pergamon

Bioorganic & Medicinal Chemistry 10 (2002) 753–757

BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY

Synthesis and Biological Testing of Acyl-CoA–Ketoprofen Conjugates as Selective Irreversible Inhibitors of COX-2

Nicolas Levoin,[b] Françoise Chrétien,[a] Françoise Lapicque[b,*] and Yves Chapleur[a,*]

[a]*Groupe SUCRES, Unité Mixte 7565 CNRS—Université Henri Poincaré-Nancy 1, BP 239, F-54506 Nancy, Vandoeuvre, France*
[b]*Unité Mixte 7561 CNRS—Université Henri Poincaré-Nancy 1, BP 187, F-54506 Nancy, Vandoeuvre, France*

Received 11 July 2001; accepted 17 September 2001

Abstract—Ketoprofenoyl-CoA thioester **3** was synthesized by coupling ketoprofen to coenzyme A using the mixed anhydride method. Diastereoisomeric compounds **3a** and **3b** corresponding to the enantiomers of ketoprofen, were obtained in optically pure form by preparative HPLC. A non-acylating analogue, *rac*-3-(3-benzoylphenyl)-2-oxo-butanoyl-CoA (**7**) was also prepared. The biological evaluation suggested that **3a** and **3b** are reversible inhibitors of COX-1 and irreversible inhibitors of COX-2. Compound **7** appears to be a poor but selective inhibitor of COX-1. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Prostaglandins are active mediators of inflammatory responses and also provide cytoprotection in the stomach and intestine. The key enzyme of their biosynthesis is prostaglandin H2 synthase (PGHS or cyclooxygenase, COX), which converts arachidonic acid to PGH2, further metabolised by specific synthases and isomerases to give various prostanoids. COX exists as two isoforms: in most tissues, COX-1 is expressed constitutively and COX-2 is transiently up-regulated by pro-inflammatory mediators and down-regulated by corticosteroids. Numerous works in this area suggest that constitutive COX-1 protects the GI tract, whereas inducible COX-2 mediates inflammation. However, COX-2 is also involved in ulcer healing, renal physiology, female reproductive process,[1] and even in the resolution of the inflammatory response.[2,3]

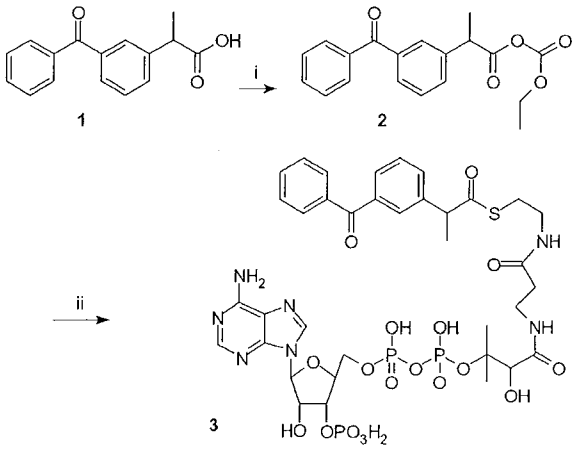
Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used for the treatment of inflammation and articular diseases. Their pharmacological activity is mainly attributed to a competitive inhibition of COX. As many other xenobiotics, NSAIDs undergo two metabolic phases following their absorption: functionalisation, for example oxidative phase, and conjugation, consisting of the addition of various small hydrophilic molecules. For most drugs, these metabolic pathways are hydroxylation and glucuronic acid conjugation. Conjugation to glycine,[4] lipids incorporation,[5] and inversion of configuration[6] are observed in vivo for certain NSAIDs, and point out a particular conjugation to coenzyme A, acting as an intermediate for these reactions.

Acyl-CoA from diverse drugs have been shown to inhibit several enzymes like acetyl-CoA carboxylase,[7] glutathione S transferase [8] and COX.[9] Since acyl-CoA are chemically activated carboxylic acids, their effects may be due to their acylating properties and occur by covalent binding. Adduct formation has been actually demonstrated for fibrate derivatives which acylate unknown proteins.[10,11] This ability of adduct formation is particularly important in the case of carboxylic acid-containing xenobiotics, since their acyl chain retains the pharmacological activity and carries the reactive molecule to definite pharmacological targets.

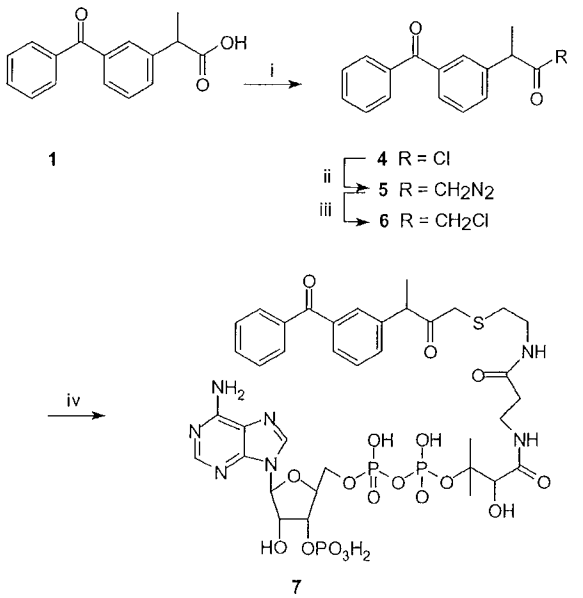
The aim of this study was to prepare ketoprofenoyl-CoA **3** and its analogue **7** in order to study their effects on COX. Pharmacological activity often depends on the absolute configuration of chiral centres in the molecule, particularly for NSAIDs for which (*S*) enantiomer is a more potent inhibitor of COX than its (*R*) antipode.[12,13] Therefore, we describe in this paper the synthesis of **3** starting from ketoprofen, and the separation step giving pure (*S*) and (*R*) diastereoisomers. In order to highlight the inactivation mechanism of COX by acyl-CoA, an analogue of ketoprofenoyl-CoA was designed. Thus the replacement of the thioester group

*Corresponding authors. Tel.: +33-383-59-2619; fax: +33-383-59-2621; e-mail: francoise.lapicque@medicine.uhp-nancy.fr (F. Lapicque); Tel. +33-383-91-2355 fax: +33-383-91-2479; e-mail: yves.chapleur@mesceb.uhp-nancy.fr (Y. Chapleur)

0968-0896/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0968-0896(01)00330-3



Scheme 1. Reagents: (i), 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 then $ClCO_2Et$, rt, 1 h; (ii), THF, CoASH, H_2O, Ph = 6.6, rt, 2 h.



Scheme 2. Reagents: (i), $ClCO_2Cl$, rt, 1 h; (ii), diazald, 0 °C, 2 h; (iii), anhydrous HCl in Et_2O; (iv), CoASH, H_2O/DMF, $CsCO_3$, rt, 24 h.

by a thiomethylene keto group would provide a non-acylating species. It was assumed that such a slight modification would not affect the recognition of the inhibitor by COX. The compound selected was *rac*-3-(3-benzoylphenyl)-2-oxo-butanoyl-CoA (**7**).

Results

The synthesis of compound **3** was performed by coupling *rac*-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid (ketoprofen [KPF] **1**) to coenzyme A (CoASH) using the mixed anhydride method[14] (Scheme 1). Formation of the rather unstable compound **2** was almost achieved quantitatively within 1 h. When at most 10% of the starting compound **1** was detectable by HPLC monitoring, CoASH was added to the reaction mixture. The formation of compound **3** was monitored by HPLC. After 2 h of reaction, compound **2** completely disappeared. The organic solvent was evaporated under reduced pressure and unreacted **1** was extracted from the aqueous layer using hexane. Diastereoisomeric compounds **3a** and **3b** were obtained in optically pure form after two preparative HPLC steps. The first one allowed the separation of the mixture of diastereoisomers **3** from residual reactants; the second one gave pure **3a** and **3b**. In order to assign the absolute configuration to compounds **3a** and **3b**, the same synthesis was carried out starting from optically pure *R*-KPF. However both diastereoisomers were obtained, and the same result was obtained starting from optically pure *S*-KPF.

Therefore, an epimerisation reaction occurred during the overall process, as reported by Carabaza.[15] As roughly the same diastereoisomeric mixture was obtained whatever the KPF enantiomer used as the starting material, assignment of one configuration to one chromatographic eluate of **3** could not be done at this stage. Microsomial biosynthesis with rac-**1** using R-AINS-specific Acyl-CoA synthetase [16] produced only compound **3b**, but incubation of **3a** or **3b** with the microsomes resulted in the presence of the only **3b**, suggesting an epimerisation, due to epimerase activity.[15] It cannot, therefore, be concluded that compound **3b** is (*R*) ketoprofenoyl-CoA. Crystallization of each compound **3a** and **3b** is currently under investigation to provide a definitive answer to this issue.

The synthesis of compound **7** was based on the final alkylation of coenzyme A using the chloromethylketone analogue **6** of KPF. The synthesis of **7** is outlined in Scheme 2. Ketoprofenyl chloride **4**, obtained by reaction of oxalyl chloride with **1**, was treated with diazomethane to give *rac* 3(-3-benzoylphenyl)-2-oxo-diazobutane (**5**). Conversion of the crude resulting diazo group to the corresponding chloride by reaction of an anhydrous ethereal solution of hydrogen chloride, gave the compound **6** in 95% overall yield. Alkylation of coenzyme A by the compound **6** was performed in a water–dimethylformamid mixture in the presence of caesium carbonate. An optimised H_2O/DMF ratio of 3:14 gave the best result. Contrary to **3**, neither analytic nor semi-preparative HPLC allowed diastereoisomeric purification of **7**.

Biological Evaluation

The biological specificity of the two isoforms of COX reported before can be used to obtain more efficient NSAIDs without gastro-intestinal side effects. Most classical NSAIDs are reversible or time-dependent reversible inhibitors, except aspirin which acetylates Ser530 of COX-1 (Ser516 of COX-2). They generally inhibit both COX-1 and COX-2 to different extents; for this reason, extensive studies were conducted in recent years for the development of new molecules that selectively inhibits COX-2.[17] These studies were based on crystal structure determinations of the enzymes:[12,18]

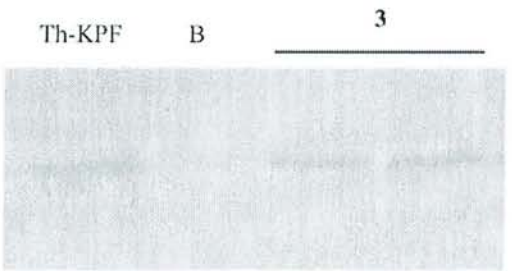


Figure 1. Detection of KPF adducts after 1.5 h incubation of COX-2 with **3**. Th-KPF: chemical adduct of KPF on Thyreoglobulin (positive control), **B:** COX-2 + KPF, **3:** COX-2 incubated with compound **3**.

Table 1. $IC_{50}(\mu M)$ values of ketoprofen derivatives for COX-1 and COX-2[a]

Compd	COX-1[b,c]	Rec COX-1[b,d]	COX-2[b,c]	Rec COX-2[b,d]
(*R*) **1**	0.695	> 10,000	80	> 10,000
(*S*) **1**	0.003	> 10,000	5	> 10,000
3a	0.043	900	71	107
3b	0.083	140	55	108
7	0.317	> 10,000	5000	> 10,000

[a]COX inhibitions were performed as described in biological assays.
[b]Average of four determinations.
[c]Immediate inhibition.
[d]Remaining inhibition after recovery.

the most striking difference between the isoforms is that the active site of COX-1 is more stable and less bulky than COX-2. [19,20] Therefore, most selective inhibitors of COX-2 display steric groups that hinder their binding on the active site of COX-1.

The results reported in Table 1 show that acyl-CoA **3a** and **3b** are good inhibitors of both COX-1 and COX-2 with an IC_{50} one order of magnitude higher than the *S* enantiomer of the parent drug. It is worth noting that they do not present the marked enantioselectivity of KPF, probably due to epimerisation. Reversibility of the inhibition was tested by recovery experiments, where inhibitors were carefully removed before measuring the enzymatic activity. COX incubated with (*R*) or (*S*) **1** recovered thus, almost all their catalytic capacity ($IC_{50} > 10,000$), as expected from reversible inhibitors. In contrast, COX incubated with **3a** or **3b** were still inhibited: very weakly for COX-1, since IC_{50} values were higher in recovery experiment than during immediate inhibition, but strongly for COX-2, with comparable values of IC_{50} in both conditions. Thus, **3a** and **3b** appear essentially reversible inhibitors of COX-1 and completely irreversible inhibitors of COX-2.

Compound **7** was shown to be a slight inhibitor of both COX and to be COX-1 selective. As expected, it is a reversible inhibitor and this argues for an acylation mechanism responsible for the irreversible inhibition of COX-2 by KPF acyl-CoA. In fact, incubation of COX-2 with **3** resulted in the formation of KPF adducts, as revealed by Western blot experiments, using anti-KPF antibody (Fig. 1). The maximum rate of acylation was achieved within 1 h and adducts were stable since no clear difference in labelling was observed by varying the incubation time at room temperature from 1 to 11 h (Fig. 2). This confirms that acylation is certainly at the origin of the irreversible inhibition of COX-2 by ketoprofenoyl-CoA.

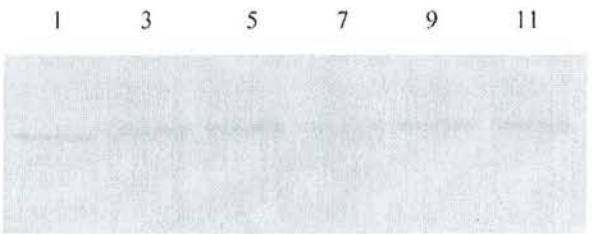


Figure 2. Kinetics of KPF adducts formation. COX-2 was incubated for 1, 3, 5, 7, 9, and 11 h with **3** before Western blotting.

Conclusion

The present work reports the synthesis and the enantiomeric purification of ketoprofenoyl-CoA (**3a**, **3b**) and its non-acylating analogue **7**. The biological evaluation of compound **3** showed that it is an irreversible selective inhibitor of COX-2. This result contributes to better understand the mechanism of action of NSAIDs and their anti-inflammatory properties. It is also meaningful for the research in articular therapeutics, and the development of more efficient drugs without side effects.

Besides, acyl-CoA are key intermediates in many biochemical pathways, acting as cofactors of enzymes and as intermediates of protein modification, for example palmitoylation. A convenient way to provide these intermediates and their non-acylating analogues is of large interest to elucidate biological processes.[21,22]

Experimental

General indications

FTIR spectra were recorded on Perkin-Elmer Spectrum 1000 on NaCl windows or KBr pellets. ^1H NMR and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker AC 250 or on a Bruker DRX 400 spectrometer. Unless otherwise stated, all spectra were recorded in D_2O. Attribution of ^{13}C signals are based on the *J*-modulated spin-echo sequence and/or heteronuclear two-dimensional techniques. Mass spectra were recorded on a Trio 1000 Thermo Quest spectrometer in the electron impact mode or a Platform Micromass in the electro spray mode. Elemental analyses were obtained from the Service Central de Microanalyse du CNRS, Vernaison (France). Analytical thin-layer chromatography was performed on Merck 60F 254 pre-coated silica gel plates. Preparative chromatography was performed on silica gel 60 (230–40 mesh ASTM). Analytic reverse phase HPLC was performed on a C18 column (Waters RadialPak 8×10 mm in Waters RCM module), using at flow rate of 1.5 mL min^{-1} and a mobile phase of MeOH (45%), 9 mM phosphate buffer pH = 5.5 (55%). Elution was monitored at 254 nm, using Waters 996 photodiode

array detector and Waters 510 pump. Semi-preparative reverse phase HPLC was performed on a Merck Lichrosorb RP-18 column, (7 μm, 250×10 mm), at a flow rate of 2.5 mL min-1, and a mobile phase of MeOH (35%), 9 mM phosphate buffer pH = 5.5 (65%) by injections of 700 μL and monitoring at 290 nm.

2-(3-Benzoylphenyl)propionyl-CoA (3). To a solution of *rac*-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid [ketoprofen (KPF)] (**1**) (122 mg, 0.48 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added 2,6 lutidine (56 μL, 0.48 mmol) and ethyl chloroformate (46 μL, 0.48 mmol) in anhydrous dichloromethane (3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere. The reaction was monitored by analytical HPLC. After 1 h of reaction compound **1** (retention time 9.5 min) was no longer detectable and only compound **2** (retention time 6.4 min) was present. The solution was concentrated to dryness and the crude residue was diluted in anhydrous THF (9 mL). A solution of coenzyme A (36.8 mg, 0.048 mmol) in water (9 mL) was then added. The pH of the resulting solution was adjusted to 6.2 using NaOH (5M) and stirred under a nitrogen atmosphere at room temperature. The reaction was monitored by analytical HPLC. After 2 h, CoASH (retention time 1.3 min) disappeared and two peaks corresponding to the diastereoisomers of ketoyl-CoA **3** appeared (retention time 4.7 for **3a** and 5.2 min for **3b**). The mixture was then concentrated under reduced pressure to give a milky liquid. The aqueous layer was extracted with hexane (10×10 mL) and concentrated. The residue was purified by semi-preparative HPLC to yield the compounds **3a** and **3b** as amorphous white powder. The compound obtained after chromatography was washed ten times with MeOH in order to remove inorganic phosphate. Compound **3a**: ^{1}H NMR (400 MHz): δ 0.55 (s, 3H, CH_3), 0.69 (d, 3H, J=2.5Hz, CH_3), 1.32 (d, 1H, J=7 Hz, CH_3), 2.11 (br m, 2H), 2.79 (m, 1H), 2.86 (m, 1H), 3.15, (br m, 4H), 3.37 (dd, 1H, J_{gem}=9.5 Hz, $^3J_{HP}$=5 Hz, CH_2OP), 3.66 (dd, 1H, CH_2OP), 3.84 (s, 1H, *C*HOH), 3.90 (m, 1H, $CHCH_3$), 4.09 (br m, 2H, *H*-5rib, *H5*′rib), 4.43 (br m, 1H, *H*-4rib), 5.07 and 5.20 (br m, 2H, *H*-2rib, *H*-3rib), 6.08 (d, 1H, J=6 Hz, *H*-1rib), 7.40 (m, 9H, Ph), 7.99 (s, 1H, *H*-2ad), 8.21 (s, 1H, *H*-8ad), ^{31}P NMR: δ −11 (d, 1P, ^2J=20 Hz), −10.5 (d, 1P), 2.73 (s, 1P). Compound **3b**: ^{1}H NMR (400 MHz): δ 0.46 (s, 3H, CH_3), 0.65 (s, 3H, CH_3), 1.00 (d, 1H, J=7 Hz, CH_3), 2.07 (br m, 2H), 2.58 (br m, 2H), 2.95, (br m, 2H), 3.34 (br m, 1H, CH_2OP), 3.53 (m, 1H, $CHCH_3$), 3.64 (br m, 1H, CH_2OP), 3.81 (s, 1H, *C*HOH), 4.06 (br m, 2H, *H*-5rib, *H5*′rib), 4.37 (br m, 1H, *H*-4rib), 4.80 (br m, 2H, *H*-2rib, *H*-3rib), 5.97 (d, 1H, J=6 Hz, *H*-1rib), 7.10 (m, 9H, Ph), 7.91 (s, 1H, *H*-2ad), 8.27 (s, 1H, *H*-8ad). ^{31}P NMR: δ −10.8 (d, 1P, ^2J=20 Hz), −10.4 (d, 1P), 2.68 (s, 1P).

3-(3-Benzoylphenyl)-2-oxo-chlorobutane (6). KPF (**1**) (1.27 g, 5 mmol) was dissolved in oxalyl chloride (3 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h, and then concentrated to dryness. The crude residue of rac-2-(3-benzoylphenyl)propionyl-chloride (**4**) was coevaporated twice with toluene. The dried residue was dissolved in diethyl ether and added dropwise to freshly prepared diazomethane (generated from 7.2 g diazald in diethyl ether at 0 °C). The resulting solution was allowed to stand for 2 h at 0 °C. The reaction mixture was quenched with heptane and the solution was concentrated to dryness, and led to the crude compound **5**, which was used without purification in the next step. To a solution of the crude compound **5** in anhydrous diethyl ether was added dropwise a saturated etheral solution of hydrogen chloride (8 mL of a solution obtained by extraction of 12 M HCl with diethyl ether and drying over magnesium sulphate). The resulting solution was stirred for 1 h at room temperature and the solvent was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using hexane/diethyl ether 3:2 (v:v) to give 1.35 g of compound **6**. An analytical sample was recrystallised from ethyl ether. R_f 0.17 (hexane/diethyl ether 3:2); IR: 1734,1657 cm^{-1} ; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 1.48 (d, 3H, J=7 Hz, CH_3), 4.05 (d, 1H, J_{gem}=15 Hz, CH_2Cl), 4.12 (d, 1H, CH_2Cl), 4.15 (q, 1H, *CH*), 7.63 (m, 9H, Ph); ^{13}C NMR (62.9 MHz, $CDCl_3$): δ 17.81 (*C*H_3), 47.34 (*C*H_2Cl), 49.69 (*C*H), 128.43, 129.16, 129.52, 130.07, 131.69, 132.73 (9C, *C*H Ph), 137.26, 138.45, 139.69 (3C, *C* Ph), 196.21, 201.78 (2C, *C*O); EIMS (*m*/*z*): 288 (7%) $(M+2)^+$, 286 (19%) $(M)^+$. Anal. calcd for $C_{17}H_{15}ClO_2$: C,71.21; H,5.27; Cl,12.36. Found: C,71.06; H,5.17; Cl, 12.56.

3-(3-Benzoylphenyl)-2-oxo-butanoyl-CoA (7). Co-enzyme A disodium salt (90 mg, 0.12 mmol) was dissolved in water (300 μL) then diluted with DMF (1.4 mL). The resulting solution was added dropwise to a suspension of compound **6** (40 mg, 0.14 mmol) and Cs_2CO_3 (52 mg, 0.16 mmol) in DMF (1 mL). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was monitored by analytic HPLC. The retention time for **7** was 3.7 min. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by semi-preparative HPLC. ^{1}H NMR: δ 0.53 (s, 3H, CH_3), 0.72 (s, 3H CH_3), 1.06 (d, 1H, J=7 Hz, CH_3), 2.22 (br m, 4H), 2.96 (m, 2H), 3.23 (br m, 2H), 3.39 (dd, 1H, J_{gem}=9.5 Hz, $^3J_{HP}$=5 Hz, CH_2OP), 3.71 (dd, 1H, CH_2OP), 3.87 (m, 2H), 4.12 (br m, 2H, *H*-5rib, *H5*′rib), 4.44 (br m, 1H, *H*-4rib), 4.66 (br m, 2H, *H*-2rib, *H*-3rib), 5.97 (d, 1H, J=6 Hz, *H*-1rib), 7.18 (m, 9H, Ph), 7.96 (s, 1H, *H*-2ad), 8.35 (s, 1H, *H*-8ad); ^{13}C NMR: δ 19.66 (*C*H_3keto), 20.80, 23.73 (2C, *C*H_3CoA), 33.44, 38.08, 38.17, 40.7 (5C, *C*H_2), 41.16 (*C*$(CH_3)_2$), 51.10 (*C*HOH), 53.10 (*C*HCH_3), 68.37 (d, ^2J=4 Hz, *C*-5rib), 74.68 (d, ^2J=6 Hz, CH_2OP), 76.58 (d, ^2J=3.5 Hz, *C*-3rib), 77.03 (d, ^3J=3.5 Hz, *C*-2rib), (m, *C*-4rib), 89.37 (*C*-1rib), 121.18 (*C*-5ad), 131.20, 131.88, 132.21, 132.73, 135.73, 135.45, 136.15 (9C, *C*HPh), 139.00, 139.89 (2C), 142.43 (*C*-8ad), 142.68 (*C*-6ad), 151.85 (*C*-2ad), 155.44, 158.08 (2C), 176.17, 177.41 (2C, *C*Oamide), 201.26, 211.67 (2C, *C*O); ^{31}P NMR: δ −11 (d, 1P, ^2J=20 Hz), −10.5 (d, 1P), 2.73 (s, 1P); ESMS negative mode (*m*/*z*): 1016.2 $(M-H)^-$.

Biological assays

COX assays were conducted using intact cells expressing preferentially COX-1 or COX-2: BPAEC cells for COX-1

and LPS stimulated J774.2 for COX-2 (1μg/mL for 14 h).[23] We checked for reversibility of inhibition by recovery experiments.[24] All tests were performed in 12 wells plates (27×10^4 cells per well). After 30 min pre-incubation of cells and tested compounds, arachidonic acid 30 μM was added for 15 min, then supernatants analysed for 6-keto-PGF 1 α (BPAEC) and PGE2 (J774.2) contents. Cells were then washed twice for 40 min, and arachidonic acid 30 μM was added for 15 min to test COX activity recovery, quantifying prostaglandins as previously. 6-keto-PGF 1 α and PGE2 concentrations in supernatants were determined by EIA from Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA.

Analysis of COX-2 adducts by SDS-PAGE and Western blot

Purified COX-2 (6×10^{-11} mol) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) in 1 μM hematine, 300 μM diethyl dithiocarbamate and Tween 20 0.1% 50 mM pH = 7.4 phosphate buffer were incubated for various times at 20 °C with **3** (2×10^{-10} mol). Samples were mixed with Laemmli reagent (final concentration 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue in Tris buffer). SDS-PAGE was performed using 9% acrylamide for separating gel and 4% stacking gel. Proteins were transferred onto Immobilon P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) by semi-dry electroblotting, using a 0.75 M glycine, 0.1 M Tris, 10% MeOH buffer adjusted to pH = 7.4, for 1 h at 12 V. Blots were saturated with 3% BSA in 0.04% Tween 20 in PBS. Immunodetection was performed using rabbit anti-KPF polyclonal antibody diluted 1/6000 and secondary goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated 1/5000. Anti-KPF antibody and KPF-thyreoglobuline were kind gift of Pr. E. Benoit (Ecole Nationale Vétérinaire, Lyon, France).

Acknowledgements

N.L. and F.L. wish to thank the Association de Recherche sur la Polyarthrite (ARP 1999-2000) and the Contrat de Programme en Recherche Clinique du CHU de Nancy (CPRC 1999) for financial support. Warmly dedicated to Pr Gérard Descotes on occasion of his retirement.

References and Notes

1. Langenbach, R.; Loftin, C.; Lee, C.; Tiano, H. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1237.
2. Gilroy, D. W.; Colville-Nash, P. R.; Willis, D.; Chivers, J.; Paul-Clark, M. J.; Willoughby, D. A. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 698.
3. Rossi, A.; Kapahi, P.; Natoli, G.; Takahashi, T.; Chen, Y.; Karin, M.; Santoro, M. G. *Nature* **2000**, *403*, 103.
4. Tanaka, Y.; Shimomura, Y.; Hirota, T.; Nosaki, A.; Ebata, M.; Takasaki, W.; Shigehara, E.; Hayashi, R.; Caldwell, J. *Chirality* **1992**, *4*, 342.
5. Sallustio, B. C.; Meffin, P. J.; Knights, K. M. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 1919.
6. Aberg, G.; Ciofalo, V. B.; Pendleton, R. G.; Ray, G.; Weddle, D. *Chirality* **1995**, *7*, 383.
7. Kemal, C.; Casida, J. E. *Life Sci.* **1992**, *50*, 533.
8. Silva, C.; Loyola, G.; Valenzuela, R.; García-Huidobro, T.; Monasterio, O.; Bronfman, M. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 143.
9. Neupert, W.; Brugger, R.; Euchenhofer, C.; Brune, K.; Geisslinger, G. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 487.
10. Hertz, R.; Bar-Tana, J. *Biochem. J.* **1988**, *254*, 39.
11. Sallustio, B. C.; Nunthasomboon, S.; Drogemuller, C. J.; Knights, K. M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *163*, 176.
12. Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. *Nature* **1996**, *384*, 644.
13. Bhattacharyya, D. K.; Lecomte, M.; Rieke, C. J.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2179.
14. Goldman, P.; Vagelos, P. R. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2620.
15. Carabaza, A.; Suesa, N.; Tost, D.; Pascual, J.; Gomez, M.; Gutierrez, M.; Ortega, E.; Montserrat, X.; Garcia, A. M.; Mis, R.; Cabre, F.; Mauleon, D.; Carganico, G. *Chirality* **1996**, *8*, 163.
16. Brugger, R.; Garcia Alia, B.; Reichel, C.; Waibel, R.; Menzel, S.; Brune, K.; Geisslinger, G. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1007.
17. Dannhardt, G.; Kiefer, W. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 109.
18. Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. D. *Nature* **1994**, *367*, 6460.
19. Luong, C.; Miller, A.; Barnett, J.; Chow, J. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 927.
20. Xiao, G.; Chen, W. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6801.
21. Khalil, E. M.; Cole, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6195.
22. Mishra, P. K.; Drueckhammer, D. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 758.
23. Mitchell, J. A.; Akarasckereenont, P.; Theimermann, C.; Flower, R. J.; Vane, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 1169316.
24. Laneuville, O.; Breuer, D. K.; De Witt, D. L.; Funk, C. D.; Smith, W. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *271*, 927.

B. Les métabolites conjugués du KPF comme inhibiteurs des COX

Une participation éventuelle des métabolites dans l'effet des AINS impliquerait très probablement la cible biologique majeure de ces médicaments que constitue COX. Nous allons donc éprouver notre hypothèse en nous focalisant en premier lieu sur les conséquences de la mise en contact de ces métabolites avec les COX.

B. 1. Les métabolites accèdent aux COX intracellulaires

Des travaux préliminaires ont permis la mise au point des systèmes d'étude utilisant des lignées cellulaires exprimant fortement l'une ou l'autre des deux isoformes de COX : lignée de cellules endothéliales d'aorte pulmonaire bovine (BPAEC) pour COX-1, lignée de macrophages murins (J774.2) activés avec une quantité optimale de 1 µg/mL de LPS pour COX-2 (Tableau 11). Les métabolites conjugués sont des molécules hydrophiles, puisque le métabolisme tend à les éliminer par les urines ; on calcule ainsi des logP théoriques de 0,6 pour le KPF-Glc et –2,4 pour le KPF-CoA contre 3 pour le KPF. Cette forte hydrophilie des métabolites nous a fait craindre une difficulté de passage membranaire, et nous a d'abord conduit à travailler au contact direct des enzymes, après lyse des cellules aux ultrasons (broken cells). Comme le montre le Tableau 11, l'accroissement de la capacité de production de PG est beaucoup plus sensible chez les cellules intactes que chez les cellules lysées, puisqu'on perd environ 50 % de l'activité COX quelle que soit la concentration en LPS. Cette sensibilité aux ultrasons ou à la lyse cellulaire est essentiellement le fait de la COX inductible, comme le suggère l'écart moindre observé avec les cellules témoins.

	Cellules intactes	**Cellules lysées**	**Cellules intactes**	**Cellules lysées**
	[PGE2] (ng/mL)		Facteur d'augmentation de la synthèse de PGE2	
TEMOIN	7,91 ± 0,5	6,31 ± 0,3		
LPS 1 µg/mL	47,68 ± 0,8	20,2 ± 0,8	*6*	3,2
LPS 10 µg/mL	23,99 ± 0,7	9,8 ± 0,7	3	*1,5*
LPS 50 µg/mL	28,89 ± 0,9	14,03 ± 0,2	3,6	2,2

Tableau 11 Production de PGE2 par les macrophages intacts ou lysés, en réponse au LPS

Les cellules sont lysées par 30 pulses de 1 s à 30 W. Moyenne et esm de n = 3 expériences indépendantes

Cette importante perte d'activité nous a amené vers des modèles plus cytoconservateurs, comme la perméabilisation des cellules par la saponine. Différentes concentrations en saponine et temps de pré-incubation ont été comparés et les conditions d'étude ont été optimisées. Pour cela nous avons suivi la perméabilisation de cellules J774.2 en présence de bleu trypan et de différentes concentrations en saponine. Le bleu trypan, molécule volumineuse de 873 g/mol a le double intérêt de conférer une couleur bleue aux

cellules dans lesquelles il pénètre, et d'avoir une taille comparable à la plus grosse molécule que nous étudions : le KPF-coA. Nous mesurons ainsi l'augmentation du nombre de cellules bleues en fonction du temps de contact des cellules avec la saponine et le bleu trypan. Prévoyant une incubation des métabolites de 30 à 45 min, nous convenons de choisir une concentration en saponine permettant d'observer 100 % de cellules bleues (donc assurément perméabilisées) entre 30 et 45 min : obtenir ce taux plus précocement risquerait peut-être de provoquer une cytolyse. Les cinétiques de perméabilisation présentée (Figure 74) nous ont ainsi conduit à choisir une concentration en saponine de 0,22 mg/mL.

Quatre études indépendantes (cultures cellulaires différentes à des passages différents) à différentes concentrations de saponine (2,5 à 0,05 mg/mL) ont prouvé l'innocuité de cet agent de perméation sur la production cellulaire de PGE2.

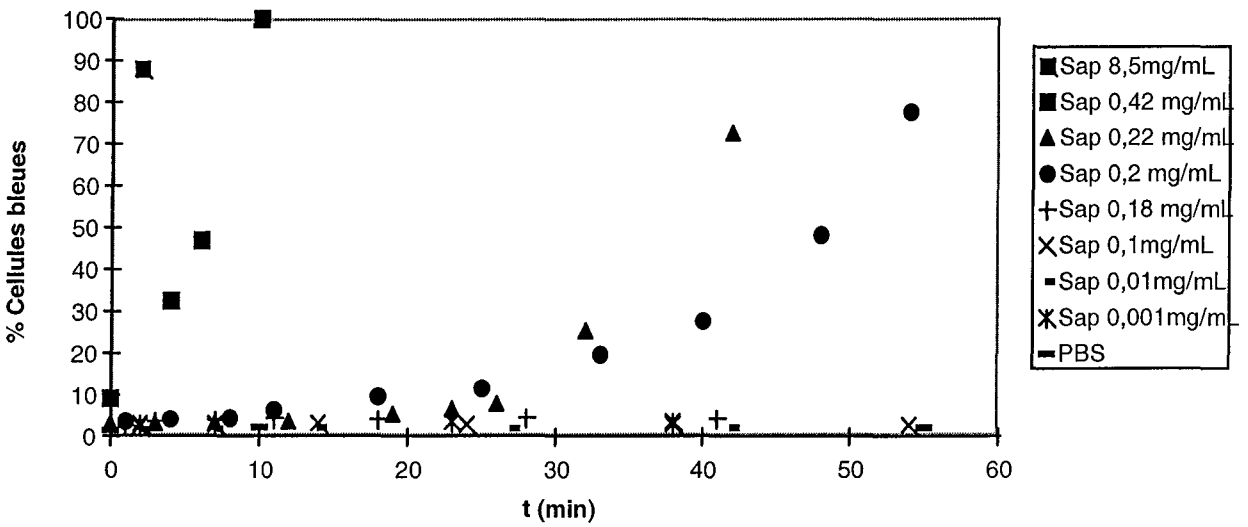


Figure 74 Cinétiques de perméabilisation des cellules J774.2 par la saponine

Comme le montre la Figure 75, on obtient des inhibitions par le KPF et ses métabolites tout à fait comparables entre cellules intactes et perméabilisées. La seule différence entre les 2 modèles réside dans le taux de PG produites, de 25 % inférieures avec les cellules intactes à cause de l'absence des PG intracellulaires [887]. Cette étude préliminaire permet à la fois de conclure que les métabolites conjugués de KPF sont capables de pénétrer dans des cellules (cellules endothéliales et macrophages), et que dans les conditions expérimentales qui sont les nôtres (concentration en substrat AA, durée et température d'incubation), cette pénétration cellulaire n'est pas limitante quant à l'effet des métabolites de KPF sur la production de PG. Pour la suite de cette étude, nous travaillerons donc avec des cellules intactes qui constituent le modèle le plus proche de la réalité biologique. Nous avons par ailleurs vérifié la stabilité des produits dans les conditions expérimentales et n'avons pas détecté d'hydrolyse dans le milieu de culture à 37 °C après 2 h d'incubation, c'est-à-dire à une température et une durée supérieures à celles utilisées dans l'étude.

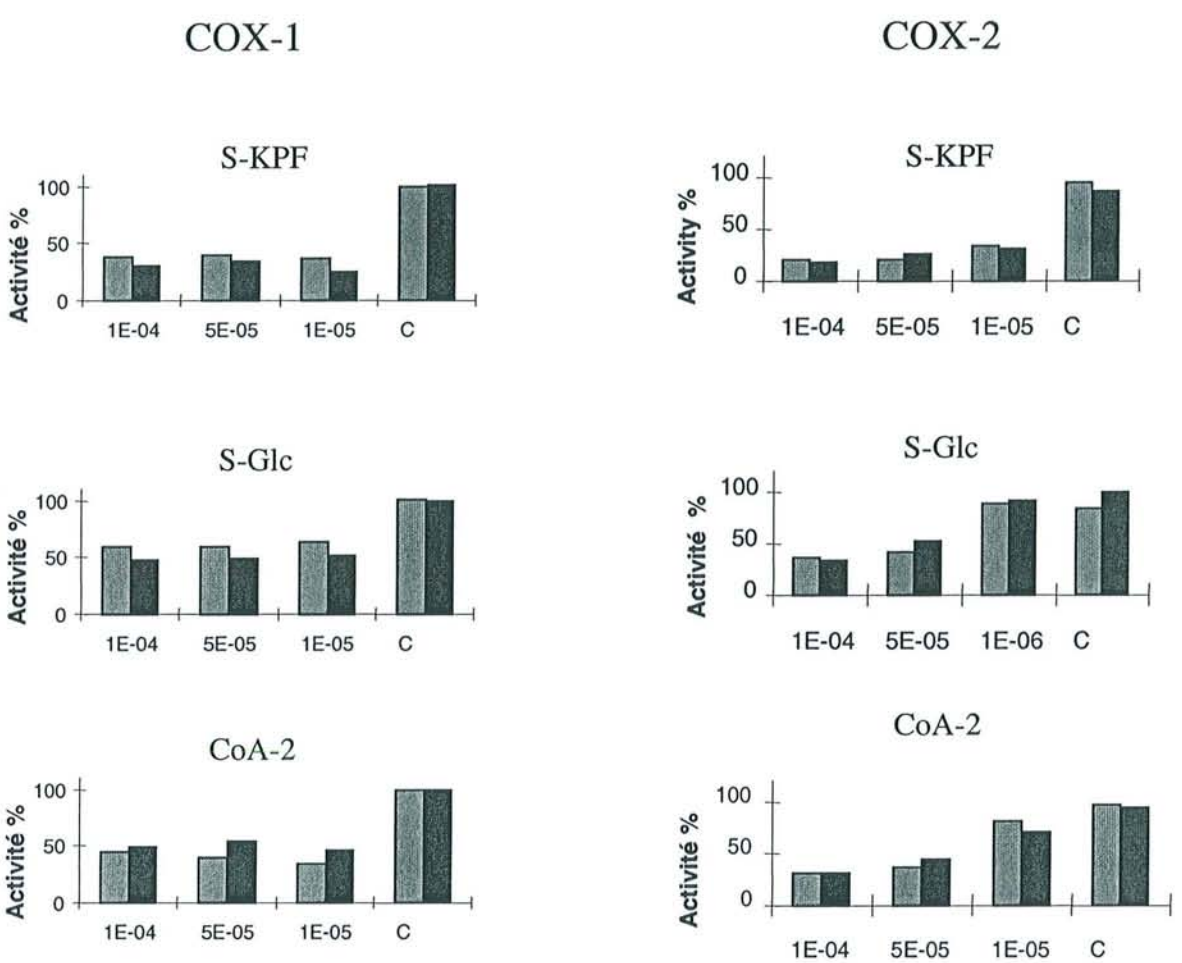


Figure 75 Inhibition des activités COX par le S-KPF, S-KPF-Glc et un énantiomère de l'acyl-CoA de KPF (coA-2).

Cellules intactes (▫) ou perméabilisée (■). Les concentrations en inhibiteurs sont indiquées en M. C : contrôle. L'activité COX-1 est étudiée dans les BPAEC en mesurant la production de 6kPGF1α (activité essentiellement COX-1) ; l'activité COX-2 chez les J774 activés au LPS, en quantifiant les PGE2 (activité principalement COX-2).

B. 2. Effet de l'albumine sur l'inhibition des COX par le KPF

Les métabolites conjugués du KPF sont des molécules polaires qui pénètrent certainement dans les cellules en empruntant des transporteurs. Le KPF, molécule hydrophobe, pourrait traverser les membranes par diffusion passive, mais nous avons vu dans le chapitre II_B. 2. b) que l'absorption cellulaire de molécules hydrophobes comme les AG était essentiellement assurée par un transport actif, dans lequel l'albumine pouvait avoir un rôle important. L'albumine est aussi connue pour favoriser le passage membranaire des AINS en s'adsorbant sur la membrane plasmique. La présence de SAH pourrait donc avoir plusieurs conséquences, d'effet opposé en terme d'inhibition des COX : en diminuant leur concentration libre, elle pourrait fort logiquement limiter l'efficacité des AINS. Par contre, en favorisant le passage membranaire et l'absorption cellulaire de ces molécules hydrophobes, elle peut à l'inverse augmenter leur capacité d'inhibition en facilitant leur mise en contact avec les enzymes intracellulaires. Nous avons donc cherché à savoir si l'albumine pouvait avoir une influence sur l'inhibition de COX par le KPF. Cette inhibition a été mesurée sur

COX-1 et COX-2 dans nos lignées cellulaires (Figure 76). Comme le montre le Tableau 12, la présence d'albumine augmente considérablement l'efficacité des 2 énantiomères de KPF comme inhibiteurs de COX-2 mais pas de COX-1.

IC50 (μM)	COX-1	COX-2
R-KPF	0,7	80
R-KPF:SAH	0,7	1,5

IC50 (μM)	COX-1	COX-2
S-KPF	0,003	5,5
S-KPF:SAH	0,003	0,6

Tableau 12 Influence de la fixation à l'albumine sur l'inhibition des COX par le KPF

L'albumine est mise en contact avec l'AINS avant l'incubation avec les cellules, selon un rapport de 2 pour 1 en faveur de la protéine. Les IC50 sont la moyenne de 2 ou 3 expériences indépendantes.

A ce stade de l'étude, on ne peut pas distinguer un effet propre à COX-2 plutôt qu'au type cellulaire. L'endocytose de l'albumine par des cellules endothéliales est néanmoins un processus connu [476] ; il est donc vraisemblable que ce ne soit pas seulement une pénétration cellulaire conduite par l'albumine qui explique l'accroissement d'efficacité du KPF chez les macrophages. Il s'agirait plutôt d'un approvisionnement en inhibiteur favorisé pour COX-2 mais pas pour COX-1.

B. 3. Le glucuronide est inhibiteur essentiellement réversible des COX

Les métabolites conjugués des profènes, et du KPF en particulier sont des molécules réactives aptes à former des adduits. Différents travaux ont ainsi montré l'acylation de protéines plasmatiques et intracellulaires par ce métabolite. On peut cependant supposer que la partie KPF de la molécule pourrait constituer une tête chercheuse qui l'orienterait vers la cible protéique majeure de l'AINS que représente COX. Dans cette hypothèse, on peut s'attendre non seulement à une inhibition de type compétitive classique, mais peut être aussi à une acylation du site actif qui conduirait probablement à une inactivation de l'enzyme. Afin de tester cette possibilité, nous avons étudié l'effet des métabolites de 2 manière complémentaires : **(i)** effet immédiat, en mesurant après pré-incubation de 30 min des cellules avec le métabolite, le taux de PG produites par l'addition d'AA saturant pour 15 min, **(ii)** effet résiduel, après élimination des métabolites du surnageant par lavages des cellules à l'issue de l'expérience précédente, et mesure de la production résiduelle de PG après un nouvel ajout du substrat AA pendant 15 min (« recovery ») [888]. Le recovery permet ainsi de mettre en évidence la nature réversible (activité COX restaurée) ou irréversible (activité diminuée par rapport au témoin) d'une inhibition apparue dans la première étape.

B. 3. a) Activité COX-1

L'incubation des cellules BPAEC avec le glucuronide de chaque énantiomère de KPF révèle une inhibition immédiate de COX-1, puisqu'on mesure une diminution de la production de 6kPGF1α qui dépend de la concentration en métabolite (Figure 76). Cette inhibition respecte la stéréosélectivité de la molécule parent, le KPF, que nous avons testé en parallèle et qui est conforme à la littérature [524]. Le ratio des IC50 R/S est ainsi de 520 pour le glucuronide et 240 pour le KPF (Tableau 13). La présence de la partie osidique augmente donc même cette stéréosélectivité.

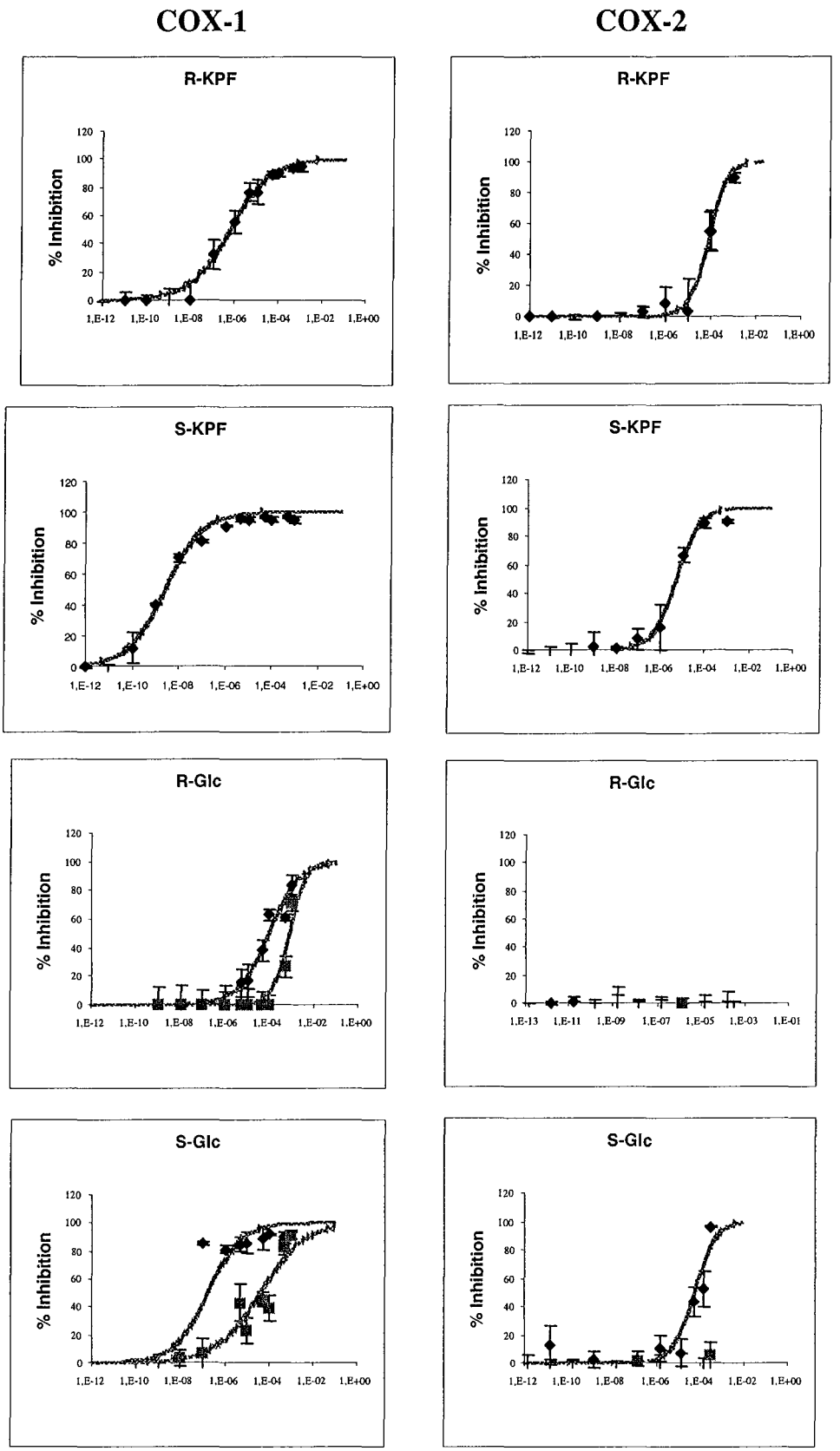


Figure 76 Inhibition de la production de PG cellulaires par les énantiomères du KPF et de son glucuronide

L'inhibition de COX-1 est analysée par la production de 6kPGF1a par les BPAEC, COX-2 par la production de PGE2 par les J774 à 1 µg/mL LPS. On distingue l'inhibition immédiate (◆) du recovery (■). Chaque point est la moyenne de n = 3 à 4 expériences distinctes.

	COX-1			COX-2	
	Effet immédiat	Recovery		Effet immédiat	Recovery
R-KPF	$6{,}95.10^{-7}$	$> 10^{-2}$		$8{,}02.10^{-5}$	$> 10^{-2}$
S-KPF	$2{,}88.10^{-9}$	$> 10^{-2}$		$5{,}46.10^{-6}$	$> 10^{-2}$
R-Glc	$9{,}89.10^{-5}$	$7{,}92.10^{-4}$		$> 10^{-2}$	$> 10^{-2}$
S-Glc	$1{,}89.10^{-7}$	$4{,}58.10^{-5}$		$5{,}7.10^{-5}$	$> 10^{-2}$
CoA1	$4{,}31.10^{-7}$	$6{,}47.10^{-5}$		$7{,}09.10^{-5}$	$1{,}07.10^{-4}$
CoA2	$8{,}37.10^{-8}$	$1{,}4.10^{-5}$		$5{,}5.10^{-5}$	$1{,}08.10^{-4}$
NAK	$3{,}17.10^{-7}$	$> 10^{-2}$		$5{,}02.10^{-3}$	$> 10^{-2}$

Tableau 13 Tableau récapitulatif des IC50 des molécules testées comme inhibiteurs des COX (IC50 en M) Les conditions expérimentales sont celles détaillées dans les Figure 76 et Figure 77.

L'analyse du recovery de COX-1 pré-incubée avec le KPF montre que l'enzyme a récupéré toute son activité après rinçages des cellules : l'AINS est inhibiteur réversible, conformément à ce que décrit la littérature pour d'autres aryl-propionates comme l'ibuprofène [455]. En ce qui concerne les glucuronides, la réversibilité est moins claire. On note en effet un recouvrement important de la capacité enzymatique, mais il existe toujours une inhibition. Afin de juger l'importance de cette inhibition résiduelle, on peut calculer l'IC50 correspondante et la comparer avec celle de l'inhibition immédiate. Elle est de 8 à 240 fois supérieure, respectivement pour le R- et le S-Glc, ce qui impose de considérer l'inhibition de COX-1 par le glucuronide comme essentiellement réversible, même s'il existe une faible composante irréversible. Le plus faible recovery noté pour le R-Glc est à relativiser par rapport à l'importance de l'IC50 (presque 1 mM).

B. 3. b) Activité COX-2

Les macrophages non stimulés au LPS ont une production de PG essentiellement due à l'activité COX-1, COX-2 étant très faiblement exprimée à l'état basal. Ils produisent ainsi 13 ng/mL de PGE2 dans nos conditions. Après 15 h d'incubation avec 1 μg/mL de LPS, cette production passe à 100 ng/mL, soit une production 8 fois supérieure à l'activité basale, essentiellement due à COX-2 inductible. Cet important accroissement de l'activité COX permet de considérer notre modèle cellulaire comme un bon système d'étude de COX-2, même s'il existe une participation de COX-1 à la production de PGE2.

Le glucuronide de KPF est inhibiteur de l'isozyme inductible de COX, et conserve la stéréosélectivité du KPF. Néanmoins, l'énantiosélectivité est moins marquée que pour COX-1 : le ratio des IC50 R/S est de 14.

Le KPF et son glucuronide sont inhibiteurs totalement réversibles de COX-2, comme le montre l'analyse du recovery. Il est cependant probable qu'une composante irréversible soit associée à l'inhibition par le S-Glc, comme nous l'avons observé avec COX-1, mais que nous ne sommes pas capable de la détecter dans ces conditions, où les IC50 sont déjà assez fortes.

B. 4. L'acyl-CoA est inhibiteur irréversible sélectif de COX-2

B. 4. a) Mise en évidence de la sélectivité pour COX-2 dans un système cellulaire

L'effet des 2 énantiomères de l'acyl-CoA de KPF (CoA-1, CoA-2) ainsi que l'analogue non acylant NAK a été étudié comme pour le glucuronide. Ce métabolite est lui aussi inhibiteur des 2 isozymes de COX (Figure 77), mais il se distingue du KPF et du glucuronide par plusieurs aspects.

Il est d'abord sujet à une énantiosélectivité de COX-1 comme de COX-2 nettement moindre. On ignore la configuration de chaque produit ; il est donc impossible de dire s'il s'agit d'un ratio R/S ou S/R, mais le ratio des IC50 chute au minimum à 5 et 1,3 pour COX-1 et COX-2 respectivement.

Autre particularité majeure du KPF-CoA : le recovery des activités COX n'est jamais total. En ce qui concerne COX-1, l'IC50 qu'on peut mesurer est 150 à 170 fois supérieure à l'IC50 de l'inhibition immédiate. En revanche, le recovery de COX-2 est quasiment nul, comme l'illustre la parfaite superposition des courbes d'inhibition immédiate et de recovery (Figure 77). Les IC50 sont alors seulement 1,5 et 2 fois supérieures, ce qui suggère que l'inhibition qu'on observait en présence de KPF-CoA est toujours aussi efficace après élimination du métabolite du milieu. Le KPF-CoA apparaît ainsi comme un inhibiteur essentiellement réversible de COX-1 mais totalement irréversible de COX-2.

Le NAK est quant à lui assez faiblement inhibiteur des 2 isozymes, et comme on pouvait s'y attendre totalement réversible. Le produit testé est un mélange énantiomérique, mais en considérant le cas extrême où il ne serait constitué que de l'un des énantiomères de KPF, et si on en juge par le rapport des ratios d'IC50, il est sélectif de COX-1 d'au moins un facteur 10 par rapport au KPF.

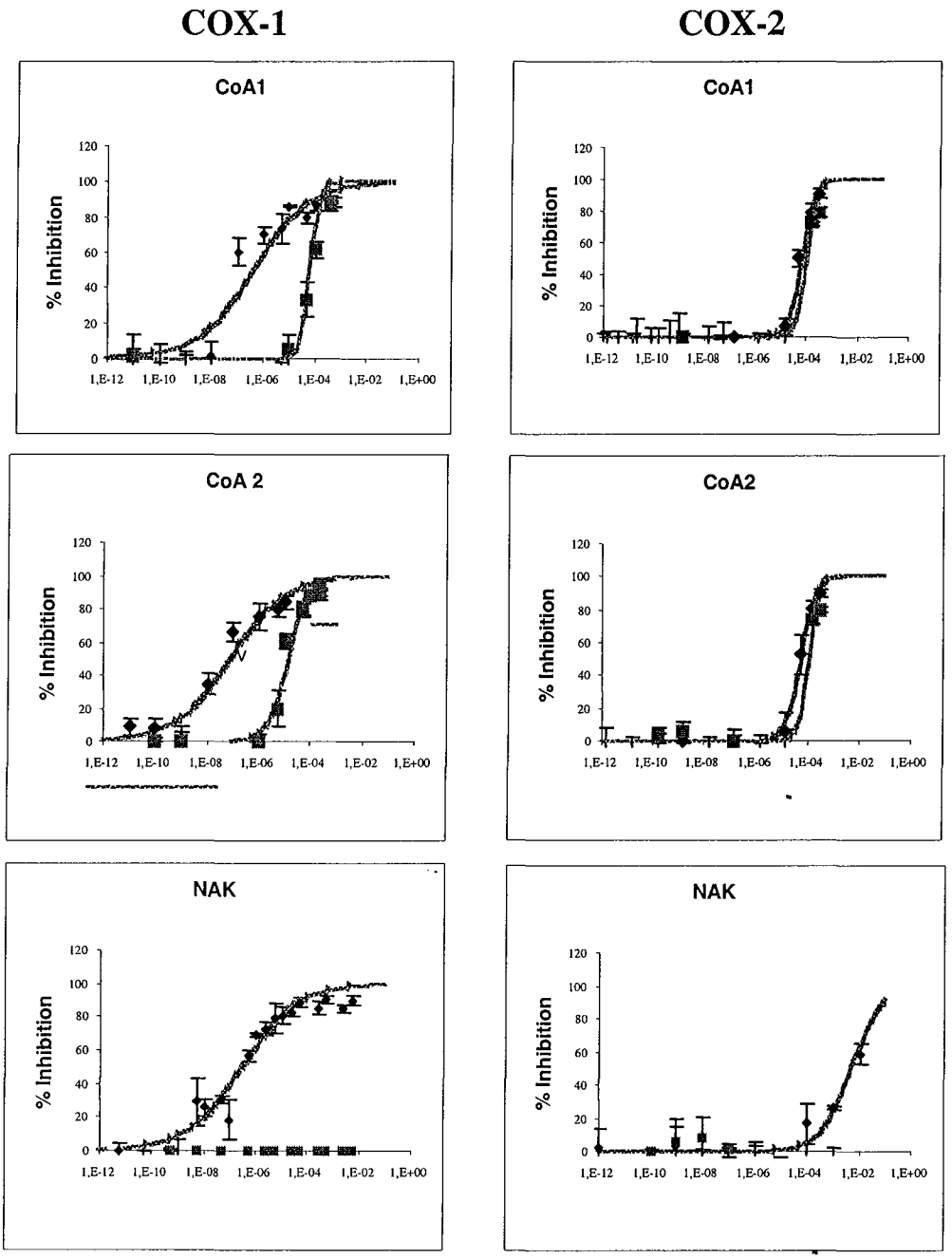


Figure 77 Inhibition de la production de PG cellulaires par les énantiomères du KPF-CoA et son analogue non hydrolysable

L'inhibition de COX-1 est analysée par la production de 6kPGF1a par les BPAEC, COX-2 par la production de PGE2 par les J774 à 1 μg/mL LPS. On distingue l'inhibition immédiate (◆) du recovery (■). Chaque point est la moyenne de n = 3 à 4 expériences distinctes.

B. 4. b) Caractérisation d'une inhibition qui dépend du temps avec les enzymes purifiées

Nous avons vu que l'incubation de cellules intactes avec le KPF-CoA résulte en une inhibition irréversible de la production de PGE2, attribuée à une inactivation de COX-2. Pour confirmer cette explication, il nous fallait évaluer l'influence du temps d'incubation et de la concentration en inhibiteur sur la cinétique d'inactivation. Ceci a été réalisé à l'aide d'enzymes purifiées, pour lesquelles l'activité est mesurée par ELISA, en quantifiant la PGF2α issue de la réduction chimique de PGH2 produite par l'enzyme [889]. On pré-incube les COX pendant une durée variable avec différentes concentrations en KPF-CoA avant d'ajouter le substrat AA en concentration saturante (30 μM) pendant 5 min à 37 °C. L'activité enzymatique est exprimée en pourcentage d'un témoin réalisé simultanément pour chaque temps afin de minimiser les erreurs expérimentales. La diminution de l'activité des COX (Figure 78) confirme l'effet inhibiteur direct du KPF-CoA sur les deux isoformes de COX. L'inhibition dépend du temps et de la concentration en inhibiteur, ce qui prouve son irréversibilité; la dépendance du temps est principalement marquée avant 2 min, traduisant un processus rapide. Comme on pouvait s'y attendre, l'inhibition réversible du S-KPF suivie parallèlement s'exprime par un plateau atteint même sans pré-incubation, t_0 à 7.10^{-8} M ($IC50_{(COX-1)} = 10^{-8}$ M; $IC50_{(COX-2)} = 2.10^{-7}$ M dans nos conditions).

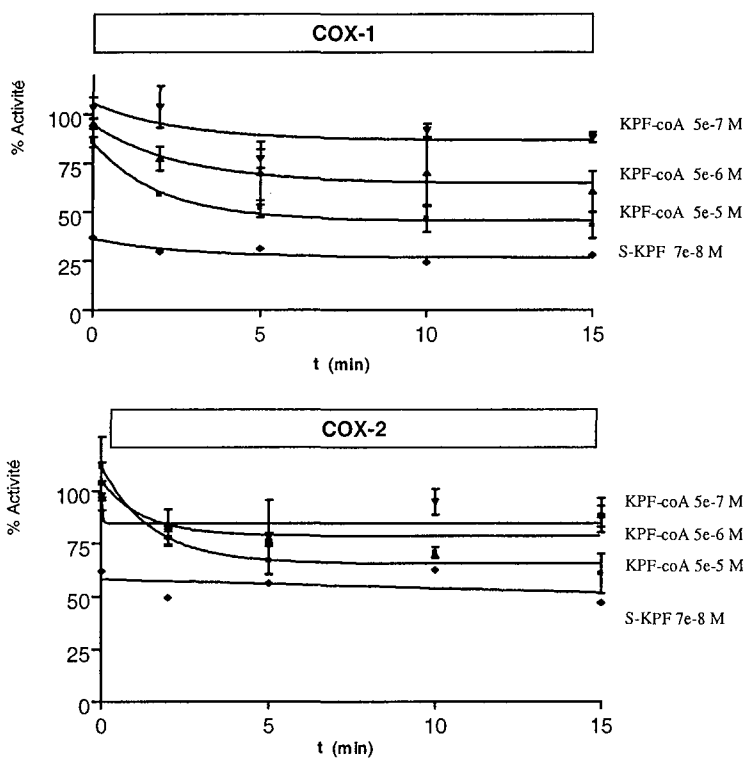


Figure 78 Cinétique de l'activité des COX en présence de KPF-CoA ou de S-KPF

(chaque point est la moyenne de n=3 expériences indépendantes, avec représentation de l'écart type)

Contrairement à ce que nous avons observé dans des systèmes cellulaires complets cependant, les deux isoformes de COX sont ici inhibées irréversiblement par le KPF-CoA, même si à 2 min, la dépendance du temps est légèrement plus marquée pour COX-2 (Tableau 14).

vitesse d'inhibition (% / min)	50 μM	5 μM	0.5 μM
COX-1	8,9	8,9	0
COX-2	16,7	10,2	0

Tableau 14 Vitesse d'inhibition des COX purifiées après 2 min de pré-incubation avec le KPF-CoA

Cette étude prouve ainsi que le KPF-CoA est capable d'inhiber directement et irréversiblement COX, contrairement au KPF dont ce métabolite est issu. Nous nous sommes assuré que le KPF-CoA ne s'hydrolysait pas dans ces conditions. La dépendance du temps ne traduit donc pas celle d'une hydrolyse du métabolite qui génèrerait l'inhibiteur KPF. Dans la même optique, nous avons cherché un effet de la partie CoA de la molécule et avons noté une inhibition réversible due au coenzyme A seul, avec une IC_{50} de l'ordre de 5.10^{-4} M pour les deux isoformes. On observe le même effet dans un système cellulaire complet (IC_{50} de l'ordre de 10^{-3} M chez le macrophage J774 activé au LPS). Cette propriété est due à la fonction thiol de la molécule puisque le désulfocoenzyme A est inactif. Le coenzyme A a cependant une faible efficacité et n'est plus inhibiteur dès 10^{-4} M. La diminution d'activité COX observée avec le KPF-CoA, à concentrations toujours inférieures à 10^{-4} M ne peut donc lui être imputée.

B. 5. Conclusion

Cette première partie de l'étude confirme que les métabolites conjugués du KPF sont capables de pénétrer dans des cellules et d'y inhiber COX-1 et COX-2. En ce qui concerne le glucuronide, l'inhibition conserve l'énantiosélectivité de la molécule mère, le S-Glc comme le S-KPF étant plus puissants que leur antipode R. La stéréosélectivité, tant pour le KPF que pour le glucuronide est plus marquée pour COX-1 que pour COX-2, ce qui parait conforme aux caractéristiques structurales des 2 isozymes, avec COX-1 au site actif plus étroit et plus rigide que COX-2, donc plus straingeant. La présence d'un groupement supplémentaire sur l'inhibiteur limite donc plus son efficacité envers COX-1 que COX-2. Le S-Glc est ainsi 30 fois moins efficace que le S-KPF envers COX-1, mais seulement 10 fois moins efficace avec COX-2.

En ce qui concerne l'acyl-CoA, l'IC50 mesurée en inhibition immédiate est comparable à celle du glucuronide de l'énantiomère S du KPF, pour les 2 isozymes, avec une quasi-absence d'énantiosélectivité. Le recovery souligne un autre comportement unique du KPF-CoA : l'inhibition dont il est responsable est irréversible, totalement pour COX-2 et partiellement pour COX-1 cellulaires. Une explication possible à l'inhibition partiellement irréversible de COX-1 cellulaire pourrait s'appuyer sur le système d'étude même. Il faut en effet bien noter que nos systèmes d'expression des COX sont des lignées exprimant en fait les 2 isozymes, même si dans nos conditions l'une ou l'autre COX est toujours largement prépondérante. Nous nous sommes certes placé dans les conditions les plus favorables à l'isozyme voulue, utilisant un temps d'incubation des macrophages avec le LPS permettant une induction quasi-maximale de COX-2 et un milieu pauvre en SVF pour les cellules endothéliales afin d'éviter une induction de cette même COX-2. De plus, nous quantifions des PG sélectivement associées à une COX donnée, puisqu'il existe un couplage préférentiel entre PGIS et COX-1 [373], comme entre PGES et COX-2 [332]. Il n'en est pas moins vrai que les BPAEC expriment un taux basal de COX-2, de même que les J774.2 activés par le LPS expriment toujours COX-1. Ainsi la part d'inhibition irréversible constatée avec les BPAEC

pourrait s'expliquer par une inhibition de COX-2 faiblement exprimée, mais peut aussi être en partie irréversible.

L'utilisation d'enzymes isolées confirme que l'inhibition due au KPF-CoA est directement associée aux COX, et que, comme lors de toute inhibition irréversible, son intensité dépend du temps de mise en contact entre l'inhibiteur et la protéine ainsi que de la concentration en inhibiteur. Les enzymes purifiées permettent aussi de supposer que l'inhibition en partie irréversible de la production de 6kPGF1α par les BPAEC soit bien le fait de COX-1 et pas de COX-2 basales, puisqu'on rapporte une inhibition irréversible de COX-1 purifiée, qui n'est pas contaminée par l'autre isozyme. Dans les conditions que nous avons utilisées, il est cependant impossible d'évaluer l'importance relative d'une inhibition réversible et d'une composante irréversible.

Le Tableau 15 résume ainsi l'état de nos connaissances quant à l'inhibition des activités COX par les métabolites de KPF.

	COX-1			COX-2	
	cellulaire	purifiée		cellulaire	purifiée
KPF-Glc	rev	/		rev	/
KPF-CoA	rev	irrev		irrev	irrev

Tableau 15 Effet qualitatif des métabolites conjugués du KPF sur les COX cellulaires et purifiées

Rev : inhibition essentiellement réversible, **irrev :** inhibition reversible, / : non déterminée

Les acyl-CoA sont une forme activée d'acides carboxyliques et sont capables d'acyler des protéines. L'inhibition de nature irréversible que nous avons pu mettre en évidence avec les COX pourrait résulter d'une telle acylation. De surcroît, l'analogue NAK est inhibiteur purement réversible, confirmant cette hypothèse. Pour l'étayer plus avant, nous avons cherché s'il était possible de détecter des adduits sur ces COX par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-KPF.

C. L'acylation du site actif de COX-2 à l'origine de l'inhibition irréversible

C. 1. Formation d'adduits avec les COX purifiées

L'incubation des COX isolées avec le KPF-CoA résulte en une fixation covalente du KPF, comme le montre la Figure 79. Une pré-incubation des enzymes avec leur substrat arachidonate révèle un phénomène de compétition, suggérant que l'acylation ait lieu précisément dans le site actif. La nécessité d'utiliser des agents de stabilisation comme le diéthyldithiocarbamate et le cofacteur de l'enzyme (hème) pour observer l'acylation confirme que cette interaction est spécifique et nécessite une conformation native de l'enzyme (résultats non rapportés). L'acylation est observée pour les 2 isozymes. Le KPF-Glc est lui aussi capable de former des adduits avec COX-2. Cette acylation explique donc certainement l'irréversibilité d'inhibition des enzymes purifiées.

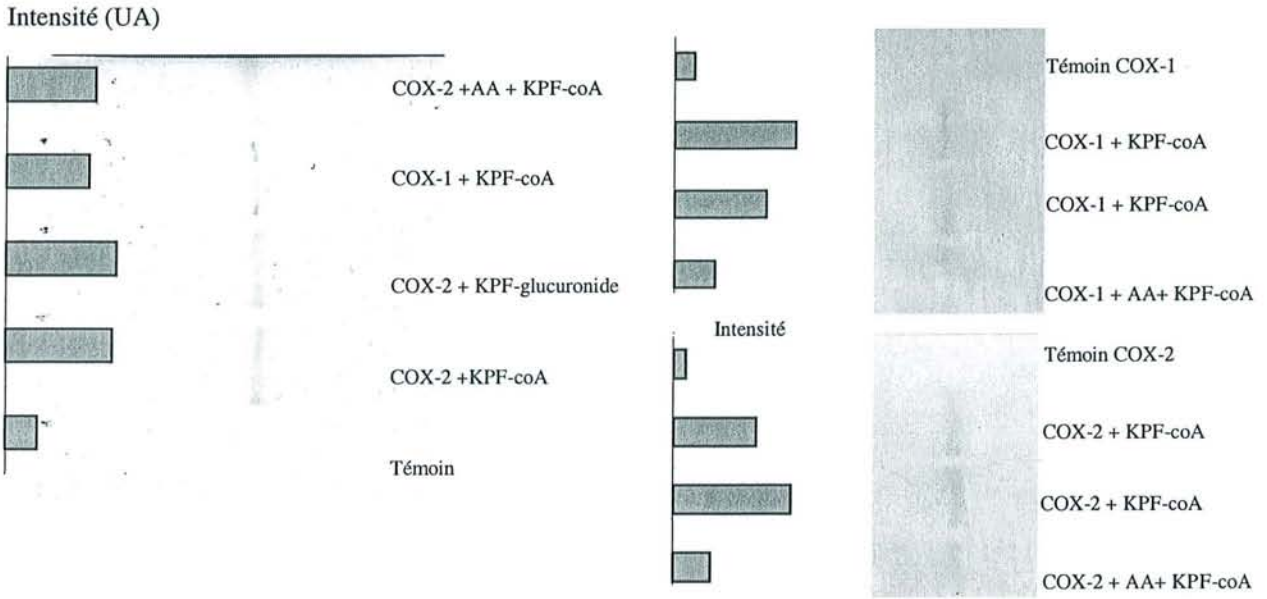


Figure 79 Western blots des COX purifiées incubées avec les métabolites de KPF

COX : $5{,}8.10^{-11}$ mol. Compétiteur AA : $5{,}2.10^{-10}$ mol. Les KPF-CoA et KPF-Glc utilisés sont des mélanges énantiomériques : $5{,}2.10^{-10}$ mol. Révélation par anticorps anti-KPF

C. 2. Détection d'adduits intracellulaires

Nous nous sommes ensuite attaché à détecter cette formation d'adduit *in situ*, d'une part afin de s'assurer que ce phénomène peut également être rencontré dans des conditions plus physiologiques, d'autre part pour tenter de comprendre les différences de résultats d'inhibition avec nos métabolites en conditions cellulaires, exposés précédemment. Dans cet objectif, il nous fallait être capable de purifier les COX après incubation des cellules avec nos métabolites, pour ensuite chercher si elles sont adduites. Il est impératif que nous puissions séparer les 2 isozymes ; nous avons donc opté pour une purification immunologique.

C. 2. a) Mise au point d'un protocole d'immunoprécipitation de COX-2 chez les macrophages

Nous avons développé un protocole de purification des COX par immunoprécipitation. Selon ce procédé, l'extrait cellulaire solubilisé est incubé avec un anticorps anti-COX-2 puis avec une protéine G couplée au Sepharose. Après centrifugation, on récupère donc un culot constitué du complexe ternaire {COX-2 : Anti-COX-2 : ProtéineG/Sepharose} qui est finalement lavé par différentes solutions détergentes. Nous avons optimisé le protocole quant au nombre de cellules nécessaires pour obtenir une quantité de protéine suffisante à un bon marquage de COX-2, et vérifié la spécificité de l'anticorps aux concentrations utilisées (Figure 80).

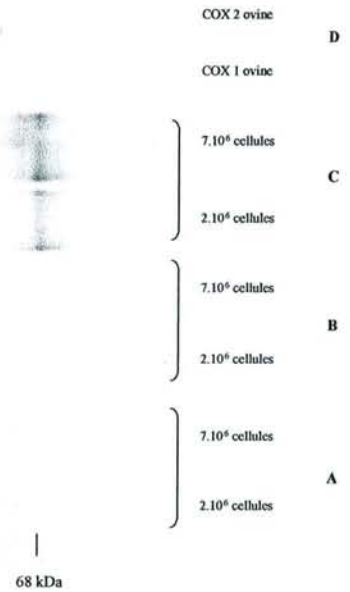


Figure 80 Spécificité de l'anticorps anti-COX-2 dans le protocole d'immunoprécipitation de COX-2

La membrane est révélée par un anticorps anti-COX-2. **A :** Témoin d'immunoprécipitation: pas d'anti-COX-2 durant la purification, montrant l'absence de faux positif **B :** Surnageant d'immunoprécipitation, montrant l'efficacité de la protéine G car il ne contient pas de COX-2 qui ne serait pas fixée **C :** Immunoprécipitation de COX-2 (culot d'immunoprécipitation), **D :** spécificité de l'anti-COX-2 pour COX-2 par rapport à COX-1.

Nous nous sommes enfin attaché à optimiser le rendement de la purification, en particulier au niveau de la solubilisation de COX-2 (Figure 81). L'efficacité de la purification a été vérifiée par coloration de la membrane au rouge ponceau : aucune bande autre que l'anticorps et la protéine G elle-même ne sont révélées (Figure 82).

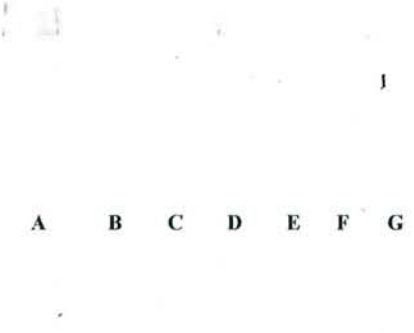


Figure 81 Analyse des pertes en protéine durant les étapes d'immunoprécipitation

Révélation de la membrane par l'anti-COX-2
A : Immunoprécipitation de COX-2 à partir de 5.10^6 cellules, **B :** Témoin d'immunoprécipitation (pas d'anti-COX-2 durant la purification), **C :** Surnageant de la 1ère centrifugation à 24000 g, après grattage des cellules, **D :** Culot d'ultracentrifugation après solubilisation des protéines : l'essentiel de COX-2 a été efficacement solubilisé, **E, F, G :** Surnageant de centrifugation après incubation avec la protéine G (Quantité de protéines croissante, par concentration au TCA) : l'absence de marquage confirme l'efficacité de la protéine G aux concentrations utilisées

Figure 82 Analyse des pertes en protéine durant les étapes d'immunoprécipitation

coloration de la membrane précédente au rouge ponceau

C. 2. b) Immunoprécipitation de COX-2 adduite

L'application de cette purification de COX cellulaire consiste pour nous à incuber les cellules avec le KPF-CoA puis à l'éliminer du milieu par centrifugation. Après isolement des COX selon le protocole mis au point, nous révélons les produits de purification à l'aide de l'anti-KPF. Comme le montre la Figure 83A et C, l'incubation des cellules intactes résulte en une formation d'adduits du KPF avec COX-2. L'acylation est massive en présence de KPF-CoA et relativement importante avec le KPF-Glc ; elle est vérifiée sur les 2 types cellulaires, BPAEC et J774. En revanche on n'observe pas d'adduits avec COX-1, sauf un léger marquage après pré-incubation des macrophages avec le KPF-Glc. Une double révélation de la membrane confirme cependant que COX-1 a été effectivement purifiée (Figure 83B).

Cette expérience de détection d'adduits formés au niveau cellulaire permet donc une observation beaucoup plus pertinente que celle réalisée avec des enzymes purifiées. Elle montre une très forte sélectivité de l'acylation par les métabolites conjugués pour COX-2, quel que soit le type cellulaire. Elle montre aussi que le KPF-CoA est un agent acylant plus puissant que le glucuronide. Par analogie avec le tableau récapitulatif de l'effet des métabolites sur les activités COX (Tableau 15), le Tableau 16 résume ce que nous avons pu constater en terme de formation d'adduits.

	COX-1			**COX-2**	
	cellulaire	purifiée		cellulaire	purifiée
KPF-Glc	∅	/		Adduits	**Adduits**
KPF-CoA	∅	**Adduits**		**Adduits**	**Adduits**

Tableau 16 Formation d'adduits des métabolites de KPF avec les COX

∅ : pas d'adduits, / : adduits non recherchés, Adduits : adduits détecté, **Adduits** : adduits détectés en quantité importante

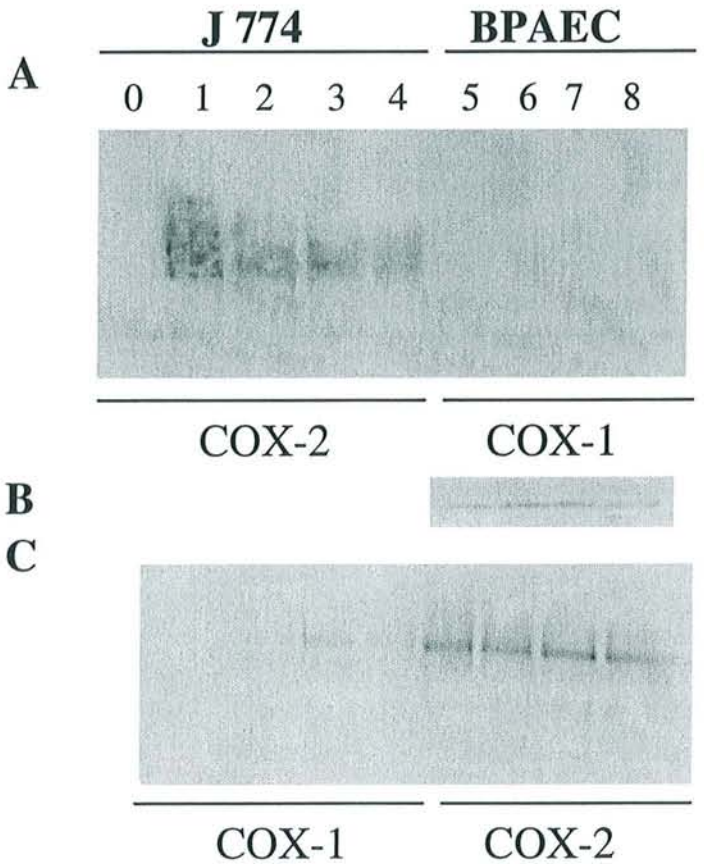


Figure 83 Mise en évidence de l'acylation sélective de COX-2 *in situ*

Les BPAEC ou les J774 sont incubées 2 h avec les métabolites de KPF avant immunoprécipitation de COX-1 ou COX-2. Les protéines purifiées sont ensuite analysées par Western blot en utilisant un anticorps anti-KPF (**A**, **C**) ou anti-COX-1 (**B**). **0**: pas de métabolite. **1,5**: KPF-CoA 1 mM. **2,6**: KPF-CoA 0.1 mM. **3,7**: KPF-Glc 1 mM **4,8**: KPF-Glc 0.1 mM

La comparaison du Tableau 15 et du Tableau 16 incite fortement à penser que l'inhibition complètement irréversible de la production de PGE2 dans les macrophages par le KPF-CoA est due à l'acylation de COX-2, puisque ce composé est responsable d'une acylation très importante, et inhibiteur totalement irréversible de COX-2, mais pas de COX-1 cellulaire, avec laquelle on ne détecte pas d'adduit. L'hypothèse est confirmée par la compétition que nous avons pu mettre en évidence avec l'AA. Cette hypothèse concorde aussi avec l'inhibition irréversible des enzymes purifiées, puisque cette fois les 2 isozymes sont acylées. Il nous faut néanmoins discuter de plusieurs incohérences apparentes de cette hypothèse.

En termes de différences de comportement entre protéines purifiées et cellulaires tout d'abord. S'il nous est impossible de juger de la contribution relative des composantes réversible et irréversible de l'inhibition des COX purifiées, nous ne constatons cependant pas de différence de marquage en terme d'adduits. Il semble donc que les 2 COX purifiées soient acylées avec la même efficacité dans ces conditions. De même, le KPF-Glc, qui était simple inhibiteur réversible dans le modèle cellulaire est capable de former des adduits avec COX-2 purifiée, à un taux similaire à celui du KPF-CoA. Il paraît donc très vraisemblable que les enzymes isolées présentent un caractère différent des enzymes natives. La solubilisation et la

purification des COX modifie probablement leur accessibilité et par conséquent leur sensibilité aux métabolites de KPF. Cette modification de comportement pourrait concerner davantage COX-1 que COX-2 dans la mesure où plusieurs études ont montré qu'elle est plus affine pour les membrane et plus dépendante de son environnement lipidique que COX-2.

Au niveau cellulaire ensuite, le KPF-CoA et le KPF-Glc, inhibiteurs essentiellement réversibles de COX-1, présentent cependant une légère composante irréversible, alors qu'on ne détecte guère de marquage de COX-1. L'explication vient probablement une nouvelle fois de l'importance des membranes pour COX-1 : on sait en effet que COX-1 est plus affine et plus sensible aux lipides que l'isozyme inductible [247], et on rapporte souvent des rendements de solubilisation et de purification après solubilisation beaucoup plus faibles. Même si nous sommes capable de détecter la protéine par l'anticorps anti-COX-1, il y a peut-être trop peu de protéines pour révéler des adduits avec l'anti-KPF, d'autant que la proportion de COX-1 adduites est probablement faible si on en juge par la faible composante irréversible de l'inhibition.

Enfin, le KPF-Glc est capable d'acyler assez efficacement COX-2 alors qu'il est inhibiteur essentiellement réversible de cette isozyme. Deux hypothèses peuvent expliquer cette contradiction. On pourrait d'abord l'imputer à la différence de temps d'incubation entre les 2 expériences : 30 min pour l'inhibition mais 2 h pour la formation d'adduits *in situ*. Ce délai supplémentaire pourrait donc favoriser un processus lent. Une autre possibilité serait que l'acylation n'ait pas lieu dans le site actif comme le KPF-CoA, mais ailleurs. En effet, plusieurs travaux suggèrent l'existence d'un second site de fixation pour les AINS et l'AA, ou plutôt d'un site primordial, chronologiquement parlant. On sait, par exemple qu'on peut fixer 2 mol d'un dérivé de l'indométacine ou du méfénamate par mol de monomère de COX [890]. Le sulindac comme l'ibuprofène pourraient aussi disposer de 2 sites de fixation, dont un dans le MBD. D'autres études évoquent un site dans le MBD qui rendrait compte des cinétiques d'inhibitions par les ISC. La fixation dans ce site du MBD précèderait celle du site actif [891]. Aussi avons-nous recherché ce site de fixation secondaire dans l'hypothèse où il pourrait rendre compte d'une acylation de COX-2 par le KPF-Glc ailleurs que dans le site actif. Ceci a été réalisé par modélisation moléculaire.

C. 3. Analyse structurale théorique de l'interaction des COX avec les métabolites de KPF

L'analyse du MBD de COX révèle l'existence d'un site de fixation potentiel situé selon le même axe que le site actif mais légèrement décalé et beaucoup moins volumineux. Il est formé par quelques chaînes latérales de l'hélice C (W100, I102, V103). Par modélisation, nous avons montré que ce site est capable de former un complexe stable avec le KPF. La partie hydrophobe est enfouie dans le site, et la fonction carboxyle pointe vers la cavité du MBD. Ce mode de fixation peut donc permettre aux métabolites conjugués d'être également pris en charge par ce site. C'est ce que montre le docking du KPF-Glc (Fig. 9, manuscrit β), où la partie KPF est à peu près dans la même conformation que le médicament seul. Elle est peut-être même favorisée par un pont salin formé entre K83 et le carboxyle de l'acide glucuronique (distance = 3,5 Å). Ce pont permet en outre un positionnement de la fonction ester du glucuronide par rapport à un nucléophile possible, Y115, compatible avec une acylation située en dehors du site actif.

Le docking du KPF-CoA est beaucoup moins précis et reproductible, à cause de la taille et de la flexibilité de la partie hydrophile. Il est donc fort probable que ce métabolite

n'adopte pas une conformation suffisamment sable et à durée de vie suffisante pour permettre une formation d'adduit sur ce site transitoire (Fig. 11, manuscrit β).

Cette étude théorique confirme donc la possibilité d'une fixation des AINS et de leurs métabolites à un autre site que le site actif, et permet d'expliquer comment le KPF-Glc peut former des adduits avec COX-2 sans que cela ne se traduise en inhibition irréversible. Il y aurait acylation dans un site précédent le site actif, alors que le KPF-CoA pénétrerait dans le site actif pour l'acyler avant d'avoir pu réagir avec le site du MBD. D'après nos résultats de modélisation, il acylerait alors probablement Y355.

C. 4. Conclusion

Le KPF-CoA est capable d'une inhibition irréversible des COX purifiées, qui s'accompagne d'une fixation covalente du KPF dans le site actif. Au niveau cellulaire, il inhibe COX-2 irréversiblement et l'acyle également ; il inhibe COX-1 de façon essentiellement réversible, en absence d'acylation apparente. Il convient cependant d'admettre que l'effet irréversible des acyl-CoA pourrait aussi s'expliquer par un stockage intracellulaire, que ce soit par insertion dans les membranes, mise en réserve dans les ACBP ou incorporation dans les lipides. L'absence de recovery pourrait alors s'expliquer par un relargage de ces réserves de KPF. Il est néanmoins peu probable qu'il existe une différence métabolique suffisante entre nos 2 lignées pour rendre compte d'un tel mécanisme. Nous avons vu que l'absence d'adduits avec les COX-1 pouvait s'expliquer par des difficultés analytiques, mais il faut aussi garder à l'esprit que les BPAEC expriment un taux basal de COX-2. La faible composante irréversible de l'inhibition pourrait donc être causée par cette COX-2.

Le glucuronide est essentiellement inhibiteur réversible, même s'il est capable d'acyler COX-2. Nous avons vu que cette acylation a lieu certainement ailleurs que dans le site actif et n'explique pas l'inhibition.

L'implication directe des COX a été démontrée grâce aux enzymes purifiées, mais il faut remarquer que les activités COX analysées dans nos systèmes cellulaires résultent en fait de plusieurs activités catalytiques. Quand nous parlons de COX-1, il s'agit d'une part d'une activité majoritairement COX-1, puisque COX-2 est exprimée à un taux basal, d'autre part de l'activité PGIS ainsi que d'un processus chimique spontané :

$$AA \xrightarrow{COX} PGH2 \xrightarrow{PGIS} PGI2 \xrightarrow{auto} 6kPGF1\,\alpha$$

Quand nous décrivons une activité COX-2, il s'agit là aussi d'une activité principalement due à COX-2 mais avec une participation de l'autre isozyme ainsi que de la PGES :

$$AA \xrightarrow{COX} PGH2 \xrightarrow{PGES} PGE2$$

Quantifiant le produit terminal de ces voies, les inhibitions observées peuvent aussi concerner la 2^{e} activité. Ainsi l'irréversibilité spécifique de COX-2 chez les macrophages pourrait venir de celle de PGES, tandis que PGIS n'y serait pas sensible, d'autant que ces deux enzymes sont phylogénétiquement bien distinctes. Cependant, l'utilisation d'enzymes purifiées a montré que l'irréversibilité de la diminution de production de PG peut sans doute être attribuée à COX, puisque dans ce cas nous ne mesurons que l'activité COX :

$$AA \xrightarrow{COX} PGH2 \xrightarrow{SnCl_2} PGF2\,\alpha$$

Plusieurs travaux suggèrent qu'au niveau cellulaire et à fortes concentrations en AA, ou en présence d'AA exogène plutôt qu'endogène, COX-1 soit plus efficace que COX-2 [892],[893], même si la manière de produire l'AA « endogène » peut fortement influer sur le résultat, comme la PG considérée [372]. Il n'est donc pas impossible que nous nous soyons placé dans des conditions défavorables à la mise en évidence d'une inhibition irréversible de COX-1. A plus faible concentration en substrat, peut être aurions-nous pu constater une part plus importante d'irréversibilité.

Quel que soit le système d'étude, il faut enfin remarquer que nous nous sommes toujours focalisé sur un produit enzymatique précis et appartenant à la classe des PG. Il est cependant possible que l'acylation de COX ne se traduise pas en une simple extinction de l'activité catalytique, mais en une modification du profil métabolique, à l'instar de l'aspirine. La fixation covalente de KPF sur COX-1 et/ou COX-2 pourrait ainsi être à l'origine de HETE ou de lipoxines. La participation des acyl-CoA à l'effet anti-inflammatoire des AINS pourrait alors être envisagée selon 2 voies :

- ► Inhibition durable de la production de médiateurs pro-inflammatoires (PG)
- ► Production de molécules anti-inflammatoires endogènes (15-HETE, lipoxines), par conversion de l'activité catalytique des COX ou aiguillage du métabolisme de l'AA vers d'autres enzymes (LOX, CYP).

Les mutants des COX à l'entrée du site montrent en effet l'importance capitale des résidus de la « bouche » d'accès. R120 est ainsi une position critique [253], comme Y355 [894],[278], qui est notre meilleur candidat à l'acylation. La sensibilité de COX-2 est inférieure à COX-1, mais la fixation covalente du KPF aboutit à une obstruction du site, et pas à une simple modification de la chaîne latérale des résidus. Une telle modification chimique est peut-être à rapprocher des adduits observés en présence d'AA [386, 387],[756] attribués aux lévuglandines [388, 895].

Y355F inhibe à 50 % l'activité *COX* en présence du substrat AA, et modifie le ratio PG / HETE avec le substrat 2-AG [276]. Si l'acylation ne résultait pas en une inactivation totale de l'enzyme, il est possible qu'elle puisse provoquer une telle modification du profil métabolique de l'enzyme. Ceci expliquerait alors le comportement enzymatique particulier des COX-2 après une longue incubation avec des AINS (hypothèse de la COX-3) [410, 411]. Mais c'est plus pour COX-1 que cette modification pourrait s'accompagner de nouveaux produits enzymatiques, puisque nous avons montré qu'elle est acylée sans que cela ne se traduise par une inhibition. Il est donc possible que son activité catalytique, en présence d'autres substrats que l'AA que nous avons testé, soit déplacée vers la production d'HETE ou de lipoxines.

C. 5. Manuscrit β

Elucidation of the mechanism of inhibition of cyclooxygenases by glucuronide and acyl-CoA conjugate metabolites of ketoprofen

Soumis à Molecular Pharmacology

Levoin N., Blondeau C., Grandcolas L., Chrétien F., Jouzeau J.Y., Benoit E., Netter P., Lapicque F.

Elucidation of the mechanism of inhibition of cyclooxygenases by glucuronide and acyl-coA conjugate metabolites of ketoprofen

Introduction

Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)s are widely used for the treatment of articular and inflammatory diseases. Their principal mode of action is through the inhibition of prostaglandin synthesis by cyclooxygenases (COX). COX exist as 2 isoforms, one constitutive, COX-1, and the second, COX-2, mainly inducible in response to inflammatory stimuli. Inhibition of the inducible enzyme has long been thought to be responsible for the beneficial properties of NSAIDs, while blocking the housekeeping functions of COX-1 would contribute to their gastro-intestinal side effects. This explanation appears today too simplistic, since COX-1 is also implicated in inflammation ([1,2]) whereas COX-2 is involved in intestinal homeostasis ([3]), and presents anti-inflammatory properties ([4, 5]). Besides, nor safety neither hazardous NSAIDs present a clear correlation between side effects and selectivity for both COX.

Most NSAIDs are extensively metabolised as acylglucuronides by UDP-glucuronosyltransferases (UGT) in liver before elimination into urine ([6,7]). UGT are a multigenic family of enzymes. Many isoforms of UGT present conjugation activity towards NSAIDs, either family 1 members (1A3, 1A9 and 1A6, [8]) or family 2 one (2B1 and 2B7, [9]). Several NSAIDs undergo other pathways of metabolism, as glycine conjugation ([10, 11]) and lipid incorporation ([12, 13]). Chiral inversion of the R enantiomer into its S antipode was also shown in the case of chiral molecules.This could constitute a metabolic activation since S enantiomers of chiral NSAIDs are more potent inhibitors of COX than their respective R antipode, *in vitro*. Thioester of coenzyme A (coA) is an obligatory intermediate for these particular pathways. Such a metabolite is produced by acyl-coA synthetases (ACS, EC 6.2.1.3) which exist as five isoforms and are expressed in many cells and tissues. At least ACS-1 and 2 accept NSAIDS as substrates ([14]), but other acyl-coA synthetases might be implied: three enzymes with xenobiotic coA ligase activity have indeed also been characterized ([15, 16]).

Drug glucuronides are chemically reactive molecules and were shown to be responsible for adduct formation on albumin as mefenamate ([17]) and ketoprofene (KPF, [18, 19]). Diflunisal is also capable to form adducts in perfused rat liver *via* glucuronidation ([20]). KPF glucuronides covalently bind UGT2B1 and are thus responsible for irreversible inhibition of the enzyme ([21]). Other drug glucuronides, as morphine ([22]) also bear pharmacological activity.

Endogenous fatty acyl-coA are high energy intermediates in the lipid pathway and are involved in many biochemical processes such as calcium ion fluxes, membrane trafficking, membrane targeting and association ([23, 24, 25]). They participate in gene regulation, interacting with transcription factors: yeast Fad R ([26]), HNF4α ([27]) even with E. coli RNA polymerase ([28]). They are also inhibitors of many enzymes, as UGT ([29]), glucose 6 phosphate transporter [30], mitochondrial adenosine translocase and citrate transporter, glucokinase, glucose 6 phosphatase, pyruvate dehydrogenase, acetyl-coA carboxylase, 3-methylglutaryl-coA reductase ([31]). Acyl-coA from xenobiotics are far less studied but have been shown inhibitors of acetyl-coA carboxylase ([32]), carnitine palmitoyl transferase I ([33]), glutathione S transferases ([34]) and COX ([35]). Since acyl-coA are chemically activated carboxylic acids, their effects may be due to their acylating properties and occur by covalent bounding. Such interaction have been proved for fibrate derivatives which acylate unknown proteins ([36, 37]).

The aim of the present study was to evaluate the possibility that NSAIDs metabolites could participate in their activity. On that purpose, we defined the potency of ketoprofen conjugates to inhibit COX, using glucuronides and acyl-coA of each enantiomer of KPF, as a model drug. In order to dissect the mode of inhibition and to test whether these reactive metabolites

were responsible for adduct formation, we analysed COX recovery after treatment with products and we synthesised a non hydrolysable analogue of acyl-coA (see molecules Fig. 1).

Materials and methods

Chemicals and reagents

AA was obtained from

All other chemicals and reagents came from Sigma (L'Isle d'Abeau, St. Quentin Fallavier, France).

Synthesis and analysis of KPF derivatives

KPF-Glc was prepared from phenobarbital treated rat liver microsomes that were immobilised on alginate beads according to Haumont et al. [38]. R or S-KPF was used as a substrate to obtain pure R or S-KPF-Glc, purified by semi-preparative HPLC (7 μm Lichrosorb RP18 column 250*10 mm, Merk, Darmstadt, Germany). The mobile phase consisted of acetonitrile/H_2O/trifluoro acetic acid (40:60:0.06) at a flow rate of 2.5 mL/min.

KPF-coA and non hydrolysable analogue NL-205 were synthesised chemically as described previously ([39]). Elementary analysis, HRMS, ^1H, ^{13}C and ^{31}P NMR spectra were in accordance with the proposed structure. Assignments were confirmed by double irradiation or two dimensional spectroscopy. Acyl-coA of both KPF enantiomers were obtained and purified in a stereospecific manner. However, we are not able for the time to know what purified product is what enantiomer. So that in the present paper, acyl-coA of KPF enantiomers will be named coA-1 and coA-2, without knowing if coA–1 corresponds to R-KPF-coA or S-KPF-coA and *vice versa.*

Purity and stability of KPF derivatives were tested by analytical HPLC, using a C18 column (Waters Radial Pack 8*10 mm in Waters RCM module), at a flow rate of 1.5 mL/min and a mobile phase of MeOH/9 mM phosphate buffer pH=5.5 (45:55). Elution was monitored at 254 nm, using a Waters 996 photodiode array detector and Waters 510 pump.

Inhibition of COX activity in culture cells

Bovine pulmonary aortic endothelial cells (BPAEC) and murine macrophages (J774.2) (The European Collection of Animal Cell Culture, Salisbury, UK) were grown to confluence in 24-well culture plates with DMEM supplemented with 10 % fetal calf serum, 4 mM glutamine, 50 μg/mL penicilline/streptomycine and 0.25 μg/mL amphothericine B. J774 were activated 14 h with LPS (1 μg/mL) in 2.5 % SVF DMEM for induction of COX-2 ([40]). Cells were incubated for 30 min with varying concentrations of tested inhibitors at 20 °C. Arachidonate (AA, 30μM) was then added and cells incubated for a further 15 min. Medium was removed and assayed for 6-keto PGF1α (BPAEC) or PGE2 (J774) content by ELISA (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Recovery activity of COX was then performed as reported by Laneuville et al. ([41]). Briefly, cells were washed twice for 45 min and AA (30 μM) was added for a further 15 min. Prostaglandins were quantified as previously. Media were checked for KPF-Glc, KPF-coA and KPF content to analyse possible metabolites hydrolysis and KPF appearance.

Permeabilised cells preparation

Cells prepared as described above were incubated with inhibitors in the presence of 0.02 % saponine. Trypan blue test evidenced that such a concentration allowed cells permeabilisation.

Kinetics of purified COX inhibition

Purified ovine COX-1 and COX-2 were obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Enzyme activity was measured by analysing PGF2α production as reported by ([42]). 250μL 50 mM phosphate buffer pH=7.4 containing 1mM phenol, 1 μM hematine and 0.5 mg/mL $SnCl_2$ was added 30 μL enzyme ($6,8.10^{-13}$ mol) and 30 μL inhibitor for time incubation at 20 °C. Then 30 μM arachidonate was added for 5 min at 37 °C. Incubation was stopped by addition of 20 μL N HCl and neutralized with N NaOH before ELISA. Controls were done for each sample time (0, 2, 5, 10 and 15 min).

Analysis of COX adducts by SDS-PAGE and western blot

Purified COX (6.10^{-11} mol) in 1 μM hematine, 300 μM diethyl dithiocarbamate and Tween 20 0.1 % 50 mM pH=7.4 phosphate buffer were incubated for 1 h at 20 °C with KPF-coA (2.10^{-10} mol). Samples were mixed with laemmli reagent (final concentration 2% SDS, 10% glycerol, 5 % 2-mercaptoethanol, 0.002 % bromophenol blue in Tris buffer). SDS-PAGE was performed using 9 % acrylamide for separating gel and 4 % stacking gel. Proteins were transferred onto Immobilon P membrane (Millipore, Bedford, MA) by electroblotting, using a glycine, Tris, 0.1 % MeOH adjusted to pH=7.4 for 1 h at 12 V. Blots were saturated with 3 % BSA in 0.04 % Tween 20 in PBS. Immunodetection was performed using anti-KPF polyclonal antibody obtained from rabbits immunized against KPF-thyreoglobuline by the method described by Maire-Gauthier et al., 1998 ([43]). Anti-KPF antibodies were diluted 1/6000 and the secondary goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated 1/5000.

Immunoprecipitation of COX

BPAEC and adherent activated J774 (5.10^6 cells) were incubated with KPF-coA or KPF-Glc (10^{-3} and 10^{-4} M final) for 2 h at room temperature. Product was then eliminated and cells washed twice with PBS. They were scrapped and centrifuged for 10 min at 24000g, and pellet was taken up in 1 mL 150 mM NaCl, 1 % Igepal, 0.5 mM deoxycholate 50 mM pH=7.4 phosphate buffer (WB). Cells were lysed by thermic chocks and ultrasounds, then membrane proteins were solubilised (1h30 in glace) and samples were ultracentrifugated (130000g, 1h at 4 °C). Supernatant was added 10 μL protein G-sepharose 0.2 g/L and incubated 2h at 4 °C on a rotating platform (preclearing). The suspension was then centrifuged for 1 min at 24000g. Supernatant was incubated with 10 μL of 1/100 anti-COX-1 or anti-COX-2 for 2 h before addition of 10 μL protein G-sepharose overnight at 4 °C. The suspension was then centrifuged at 24000g for 1 min and the supernatant carefully removed. The beads were resuspended in 1 mL WB and incubated for 20 min at room temperature on a rocking platform. Washing was repeated with 500 mM NaCl, 0.1 % Igepal, 0.05 % deoxycholate then 0.1 % Igepal, 0.05 % deoxycholate in phosphate buffer. Last pellet was taken up in gel loading buffer and analysed by western blot as described above, using anti-KPF. To check for the presence of immunoprecipitated COX-1 on the membrane, it was washed after revelation of anti-KPF and re blocked with HAS before being incubated with anti-COX-1 1/750 overnight.

Molecular modelling

Modelling and docking of KPF derivatives on COX were carried out with SCULPT v.3.0 [44] (MDL, CA); molecular graphics and protein analysis using RASMOL v.2.7.1.1[45]. The softwares were running on a PC computer.

The putative NSAID binding site of COX-2 membrane binding domain was studied from crystal structure of apo COX-2 (PDB ID: 5cox [46]). Docking experiments were conducted following 3 steps: (i) binding of KPF ethyl ester by tethering benzene moiety to I112, V103 and W100 then relaxing the compound to minimize global free energy (all backbone and sidechains were kept frozen), before tethering off and let minimization run again (ii) pasting

and overlaying KPF metabolites to the frozen complex obtained above using KPF as an anchor, then running minimization (iii) deleting KPF ethyl ester and minimize for a last run. This overall process was repeated 25 independent times. For KPF-coA, the coA moiety was also manually adjusted towards basic conserved residues of the membrane binding domain (H90, H95, K97) to analyse their possible interactions with phosphate groups of adenosine.
Docking at the active site was studied from holo COX-2 (PDB ID: 3pgh) complexed with fluriprofen, using the entire protein monomer. Binding and minimization were performed as described above, aligning KPF ethyl ester with flurbiprofen, then KPF metabolites. No significant difference was noted in complexes either nearest residues (S530, R120, E524, Y355) were thawed or frozen. Proposed structures presented in this article were thus obtained from frozen sidechains and backbone.

Results and discussion

Time-dependency of purified COX inhibition by KPF-coA

It has been reported that coA metabolite of ibuprofen [35] and salicylate [47] inhibits the production of prostaglandins in cellular models. Unfortunately, these studies did not analyse the mode of inhibition of the compounds, and it was not clear if the inactivation was actually due to the metabolite or to the NSAID released after hydrolysis. Besides, the use of aspirin to suppress COX-1 activity distorted the analyse of COX-2 which is also inhibited by aspirin [48].
In a first approach, we search here for a direct COX inhibition property of KPF-coA using purified enzymes and we investigated to detect adduct formation with this reactive metabolite. The use of isolated enzymes showed that KPF-coA is actually COX inhibitor. This effect was not due to a release of KPF, as we checked by HPLC (no hydrolysis of KPF-coA in these conditions). Pre incubation of COX with various concentrations of KPF-coA revealed an inhibition which is time and concentration dependant (Fig.2). On the contrary, reversible inhibition due to S-KPF is traduced by a plateau reached from the start of incubation. The time-dependency occurred mainly within the 2 first min, expressing a fast mechanism. Both isoform of COX are irreversibly inhibited by the compound with a similar potency, as compared with S-KPF. The time-dependency reported here is comparable to that of tetrasubstituted furanone DFU with 30 % inhibition of 2.3 μg COX-2 at 2 min with 10^{-4} M AA and $1{,}25.10^{-5}$ M compound [49]. It is however far less rapid than other reversible time-dependant inhibitors as NS-398 (90 % inhibition of 0.04 μg COX-2 with 20 μM AA and 20 μM compound [50], or indomethacine, (between 20 s for 50 % inhibition of 1 μg COX-2 with 50 μM AA and 5.10^{-5} M compound) [51].

In order to evaluate the possible participation of the coA moiety, we tested this cofactor alone and noted that it was slightly inhibitor of purified COX-1 and COX-2 (same IC50 of 5.10^{-4} M) (Fig.3). This inhibition is due to the thiol function since desulfocoenzyme A had no effect (data not shown). Such an inhibition of prostaglandin production with reduced thiol function has already been reported by Capdevila et al.[52]: glutathione, cysteine and DTT inhibits prostanoids synthesis between 1 mM too, without affecting overall rates of AA oxidation (generation of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid by COX). We did not use KPF-coA above 5.10^{-5} M to insure that inhibition was the only fact of KPF-coA and not of released coASH, which had no effect before 10^{-4} M.

Irreversible inhibition of COX is due to covalent linkage

Acyl-coA are high energy intermediates in biochemical pathways. They are frequently responsible for chemical modification of proteins, via enzyme catalysed mechanism or not (auto-palmitoylation of synaptosomal protein [53] and other proteins [54]). Since COX were irreversibly inhibited by KPF-coA, we search for such a reactivity of the compound using anti-KPF antibody. Incubation of purified COX with KPF-coA results in KPF adduct, as revealed by western blotting (Fig.4); both isoforms were subject to this chemical modification. Competition experiment using AA suggest that acylation occurs in the active site of COX. Thus, the covalent modification of the active site of the enzyme might be at the origin of the irreversible inactivation observed above.

In fact, we were surprised not to find any selectivity for COX-2 with KPF-coA. Indeed, ester or amide derivatives of AA that are substrates of COX are highly COX-2 selective [55], [56], as well as ester or amide substituted NSAIDs are far more COX-2 selective than the parent drug [57], [58]. This paradoxical result should be attributable to the use of purified and non lipidated enzymes leading to artefactual contact with KPF-coA. We decided thus to investigate the effect of KPF metabolites on complete cellular COX and cellular inflammation model. On that purpose, we used well-studied LPS activated macrophages (COX-2) and aortic endothelial cells (COX-1). Moreover, we chose to discriminate between the metabolites of each enantiomer of KPF: we thus used the thioester R and S-KPF-coA (coA-1 and coA-2), a non hydrolysable analogue of the product, NL 205, and the O-ester glucuronide R and S-KPF glucuronide, another reactive metabolite of the drug.

Effect of KPF metabolites on cellular COX

Drug metabolites could have effects on two sites: they could be active locally where they are synthesised (intracellularly) before their extracellular release. They may also be circulating forms of the drug, acting on their tissular and cellular targets. However, phase II metabolites are hydrosoluble conjugates, and their physico-chemical properties should be rate limiting for their cellular entrance, contrary to the drug which penetrate the cells partly by simple diffusion. In fact, calculation of their theorical logP gave 0.6 for KPF-Glc, –2.4 for KPF-coA and 3 for KPF. To test extra and intracellular effects, we have used two cellular models: one of intact cells, one other of permeabilized cells by 0.02 % saponine. The amount of prostaglandins produced after addition of 30 μM AA differed in the two systems: we observed an increase of between 25 % PGE2 (J774) and 6kPGF1α (BPAEC) with saponine treated cells comparing to intact cells. This difference is certainly due to intracellular PG that we can thus quantify, in addition to secreted PG, as described by [59].

Preliminary experiment consisting of incubation of both cell lineages (J774 and BPAEC) either intact or permeabilized revealed that glucuronide of S-KPF (S-Glc) and acyl-coA (coA-2) were inhibitor of COX in both models, and that their potency appeared to be exactly the same with studied product concentrations, whatever model was considered. This was also right for S-KPF (Fig.5). We analysed KPF-Glc, KPF-coA and KPF contents in media to check metabolite stability. We did not see any hydrolysis after 2h incubation at 37 °C. This result suggest that KPF metabolites are able to penetrate the cells and to inactivate intracellular COX; thus we decided to precise potency of KPF derivatives as COX inhibitor in intact cells.

Instantaneous inhibition and recovery of COX activity with KPF-Glc

LPS treated macrophages produced 100 ng/mL PGE2 instead of 13 ng/mL for non activated cells. This increase is only due to inducible COX-2 and traduced a strong expression of this

isoforms compared with COX-1. So the amount of PGE2 is here a good reflect of COX-2 activity (all the more than PGE2 is mainly produced by COX-2 [60]). KPF-Glc is inhibitor of both COX which showed a pronounced sensibility to S enantiomer (Fig. 6). This respect the well-known enantioselectivity of the parent molecule: R/S IC50 ratio of 14.5 for COX-2 and 240 for COX-1 (Table 1). R-Glc had no effect on COX-2 and was a poor inhibitor of COX-1 which was more enantioselective towards Glc than KPF (R/S IC50 ratio = 1160). S-Glc appears as a moderate inhibitor, with an IC50 between a magnitude upper than S-KPF for both COX.

KPF-Glc is known as a chemically reactive compound. It has been reported that it is responsible for adduct formation with certain proteins and therefore allowed irreversible inhibition of enzymes. We asked therefore if observed inhibition should be the consequence of such adducts and conducted COX recovery experiments on that purpose. This methodology consists in eliminating tested product after incubation with intact cells, and then measuring remaining COX activity after 45 min cell washing. Macrophage had recovered all their PGE2 production capacity after elimination of KPF-Glc. This traduces that S-Glc is a reversible inhibitor of COX-2.

The same experiment on BPAEC showed that 6kPGF1α production was not completely restored. Nevertheless, inhibition curve that we can draw according to product concentration beforehand incubated with cells evidences that a partial recovery occurred. It is even important since we can calculate an IC50 ratio of near 200 for recovery and immediate inhibition, as far as S-Glc is concerned. This partial recovery should traduce (i) either an inhibition essentially reversible (a slight irreversible component in the mode of inhibition of KPF-Glc which is predominantly reversible) (ii) or a completely reversible inhibition with non complete elimination of incubated product. The secondth hypothesis is all the more probable that IC50 are very low for COX-1 so that even a very small amount of inhibitor has still effect.

Instantaneous inhibition and recovery of COX activity with KPF-coA

Fig. 7 shows that KPF-coA is moderate inhibitor of both COX, with IC50 similar to that of S-Glc (Table 1). It differ however from KPF-Glc by its strong loss of stereoselectivity. CoA-1 and coA-2 have indeed very close IC50 whichever COX is considered. Using ibuprofenyl-coA, Neupert et al.[35] have also obtained this loss of enantioselectivity: R/S IC50 ratio of 10 and 0.5 for ibuprofenyl-coA respectively on COX-1 and COX-2 instead of 16 and > 250 for ibuprofen. This could be explained by intracellular configuration inversion due to epimerase activity, leading to an unique enantiomer. However, we didn't see any epimerisation in the medium, as far as KPF-coA or KPF was concerned. Another hypothesis is that the mode of inhibition should be different from that of KPF, as an acylation in the active site. Such a mechanism could in fact not be stereoselective, contrary to reversible binding of KPF by COX. The non hydrolysable analogue is a weak inhibitor of COX-2 but it shares approximately the same IC50 for COX-1 than KPF-coA or S-Glc. Curiously, this analogue seems selective towards COX-1 compared with KPF-coA.

Analysis of PGE2 production after incubation of macrophages with KPF-coA reveals that COX-2 had recovered no catalytic capacity after product elimination. Activity curve we can draw according to initial product concentration is even completely superimposable with this defined during immediate inhibition. This traduces that for a given metabolite concentration, COX-2 is as much inhibited in presence of the product as after its elimination and addition of 30 μM AA. This lasting inhibition is thus different from that of time-dependant NSAIDs as indomethacine, reversible inhibitor which dissociates slowly from COX but loss 25 % of its inhibition capacity in similar conditions.[41] It is so reasonable to suggest that KPF-coA could

act via covalent modification of the enzyme. This hypothesis is corroborated by non hydrolysable analogue of KPF-coA, immediate inhibitor of COX-2 but allowing a complete recovery.
COX-1 didn't present a total recovery, but immediate inhibition and recovery curves are very distant, as it was observed with KPF-Glc. The same interpretations could be proposed here, and we can not asses whether this inhibition is completely reversible or of mix type with modest effective irreversible inhibition. The slight lack of recovery observed in BPAEC could be the reflect of an irreversible inhibition of the small amount of basal COX-2 expressed in these cells [61], [62], [63]. S-Glc could also be a poor irreversible inhibitor of this COX-2, iven if we were not able to detect this in macrophage COX-2, due to the high IC50 value of the compound.
These experiment in intact cells therefore proved that KPF-coA is an irreversible inhibitor of COX-2, and a reversible (at least essentially reversible) inhibitor of COX-1. The coA moiety is not conflicting with COX binding of KPF-coA since NL205 is inhibitor. Moreover, its apparent selectivity towards COX-1 compared with KPF-coA confirms that acylation is probably the mode of inhibition of KPF-coA for COX-2: it is indeed weaker inhibitor than KPF-coA for COX-2, but of equal potency for COX-1 which we know essentially reversibly inhibited by each molecule.
The loss of enantioselectivity for COX-2 inhibition appears to have mixed origin: (i) an acylation mechanism which would not be stereoselective (ii) an epimerase activity could not be exclude since essentially reversible inhibition of COX-1 is indeed more enantioselective than COX-2, but less than the parent drug. Neupert et al. did not analyse the mode of action of ibuprofenyl-coA but we can notice the loss of enantioselectivity for R, S-ibuprofenyl-coA compared to the parent drug mainly for COX-2. We could thus suggest that ibuprofenyl-coA is probably irreversible inhibitor of COX-2 too.
As coASH alone was responsible for a slight inactivation of purified COX, we tested this cofactor on COX-2 from J774. CoASH appeared again as a poor reversible inhibitor (IC50 between 1 mM) which allowed total recovery of COX-2 activity (data not shown).

Selective acylation of COX-2 *in situ*

The use of isolated COX revealed that KPF-coA was able to acylate both isoforms. We next investigate if this acylation occurred also in cellular models. Immunoprecipitation conducted towards COX-2 of J774 or BPAEC intact cells treated with KPF metabolites gave the opportunity to constat that KPF is also covalently bound to the enzyme (Fig. 9). On the contrary, neither COX-1 from BPAEC nor from J774 appear chemically modified. Further incubation of the same membrane with COX-1 antibody confirm that this protein was effectively immunoprecipitated. Metabolites selectivity for COX-2 is in agreement with structural data about the enzyme compared to COX-1: its active site is hugger and less stable and could thus facilitate the penetration of such bulky molecule. Thus, the irreversible inhibition selective for COX-2 in intact cells is certainly the consequence of the selective adduct formation revealed here. However, S-KPF-Glc was also able to acylate COX-2 whereas it was only reversible inhibitor. An explanation should be that acylation did not occur in the active site of COX-2, contrary to KPF-coA. Indeed, Llorens et al.[64] described the existence of a putative secondth binding site localised in the membrane binding domain of COX prior to the active site. This cavity should be responsible for the time-dependency of reversible COX inhibitors. They suggest that any ligand of COX first bind this site before penetrating in the active site. Following this hypothesis, our reactive metabolites may acylate COX here differently according to the molecule. To test this possibility, we conducted molecular modelling experiment for docking KPF derivatives in different COX binding sites.

Structural basis of the interaction of COX with KPF metabolites

Analysis of crystal structure reveals an hydrophobic cluster around W100, V103 and I102 which can actually constitute a binding site. As Llorens et al.[64] who studied flurbiprofen, molecular docking showed that KPF should also bind this site. Moreover, hydrophilic moiety of KPF metabolites did not inhibit this proposed fixation, although slightly affecting the mode of hydrophobic part binding. It is even favourable, since hydrogen bounds and salt bridges can be created: Fig. 9 depicts the proposal complex of COX-2 membrane binding domain with KPF-Glc : KPF part of the molecule is still in the putative site while carboxylic function of glucuronide form a salt bridge with conserved K83. It is noteworthy that through the 25 complex modelled, orientation and packing of the metabolite was near constant and identical to this presented here. As far as adducts are concerned, the only postulated residue is Y115, as showed in Fig. 10. It is in fact in perfect orientation and distance from the ester function of the glucuronide to be acylated (distance of 3.5 Å). Moreover, conserved Y115 in COX-2 is absent in COX-1 where it is found as a near conserved L115.

Docking of KPF-coA gave greatly different results, leading to many different structures proposed for coA packing. In fact the long hydrophilic part could adopt a wide number of conformations, packed in the membrane binding domain, unfolded in the medium or interacting with polar residues outside the chore of the membrane binding domain. Due to this high mobility, we tried to orient manually the coA moiety towards basic residues. Such a conformation appeared energetically favourable, allowing salt bridges formation between ribose phosphate and H90 and pantheteine phosphates and Y91, without perturbing KPF binding, as proposed in Fig. 11.

The great difference between binding of both KPF metabolites in the membrane binding domain binding site disappears in the active site. Indeed, KPF-Glc and KPF-coA seem to bind here in a very similar manner, not far from that of KPF: the ester or thioester function interacting with the triade R120, E524, Y355. The 25 structures analysed clearly argues in favour of Y355 being the nucleophilic amino acid responsible for COX acylation (distance from thioester of KPF-coA of 3.7 Å (Fig. 13), from ester of KPF-Glc 2.7 Å) (Fig. 12).

Globally, these docking experiments actually provided a molecular comprehension for the interaction of KPF metabolites with COX-2. Both metabolites might bind COX-2 active site, with reactive function oriented to interact with Y355. But as suggested by Llorens and et al. [65], they should also bind the membrane binding domain prior to penetrating in the active site. Here, KPF-Glc could adopt a fixed and packed conformation allowing it to interact with Y115; this interaction might lead to an acylation of the residue. Fig. 14 suggests that a shift in torsion angle of Y115 due to its chemical modification does not close the access to the active site, another KPF-Glc molecule should nevertheless access the active site afterwards while be denied the possibility to acylate it due to local conformation changes following first acylation. In this scenario, COX-2 would be chemically modified but only reversibly inhibited by KPF-Glc.

On the opposite, KPF-coA bounded in the membrane binding domain binding site might have a very flexible packing which suppress the strong interaction with Y115 necessary to the reaction, but its docking in the active site permits acylation of Y355 and thus irreversible inhibition of the enzyme.

Conclusion

Administration of NSAIDs is faced with misunderstood interspecies and interindividual differences in response. Besides, safety differences exist between these drugs and no clear correlation could be established between these behaviours and selectivity for either COX if kept in mind the well documented dogma of dualism of COX isoforms functions. Finaly, R enantiomer of NSAIDs have anti-inflammatory and analgesic properties whereas they are very poor inhibitor of COX, *in vitro*; paracetamol presents also the same paradoxe. That is why we hypothesise that metabolism, particularly reactive metabolites should shed new light in this lack of understanding. We report in this study that conjugates metabolites of KPF are inhibitors of COX.

Xenobiotic glucuronide have been yet implicated in pharmacological activities as morphine glucuronide[66] and thought to be responsible for certain other drugs side-effects [67]. We reported here that KPF-Glc is inhibitor of both COX. Since we saw that ketoprofen glucuronide have the same effect on COX from intact or permeabilized cells, it appears that glucuronides are able to cross the plasmic membrane of cells. We can thus suggest that their effect is far negligible, despite their high IC50 comparing with the parent drug: they could thus access to COX of every tissue by plasmatic transport and be responsible for a lasting presence of anti-inflammatory molecule. Indeed, anti-inflammatory properties of NSAIDs last longuer than plasmatic presence of the drug. KPF-Glc is reversible inhibitor of COX-2, though being able to form adduct with the protein, It is essentially reversible inhibitor of COX-1 but we can not exclude a very slight irreversible effect on COX-1, probably by poorly acylating the active site. That way, glucuronide may explain interindividual differences in NSAID response, by variations of UGT activity [68]

Acyl-coA do not seem to exist extracellularly, so their effect is limited to inhibition of COX in the cell where they are formed. But this effect is quite important since we demonstrate here that this molecule is a selective and irreversible inhibitor of COX-2. The observed acylation is thus responsible for durable inhibition. Other NSAIDs might share this property: Simmons [69]et al., have described the expression of a paracetamol-sensitive COX induced by diclofenac long exposure. This result should be explained by the formation acyl-coA from diclofenac by macrophage ACS. The thioester would then acylate induced COX-2, and that way the modified active site should be sensible to paracetamol.

Competition experiment suggests that COX acylation occurs in the active site, but further studies will be necessary to characterise the region of covalent binding. Peptide mapping and site-directed mutagenesis are in progress to define amino acids implied in this mechanism.

In conclusion, this study suggest a novel mode of action for NSAIDs which have active phase II metabolites. They are probably more COX-2 selective than previously estimated, due to selective acylation by their coA metabolite. Participation of metabolism should also explain why new COX-2 selective inhibitors are less potent than hope in so far as their glucuronide are not COX inhibitor [70]. Their high structural specificity for COX-2 make certainly their metabolite to bulky for the active site, and make themselves probably poor substrates of ACS.

	COX-1		COX-2	
	Immediate inhibition	Recovery	Immediate inhibition	Recovery
R-KPF	$6{,}95.10^{-7}$	$> 10^{-2}$	$8{,}02.10^{-5}$	$> 10^{-2}$
S-KPF	$2{,}88.10^{-9}$	$> 10^{-2}$	$5{,}46.10^{-6}$	$> 10^{-2}$
R-Glc	$9{,}89.10^{-5}$	$7{,}92.10^{-4}$	$> 10^{-2}$	$> 10^{-2}$
S-Glc	$1{,}89.10^{-7}$	$4{,}58.10^{-5}$	$5{,}7.10^{-5}$	$> 10^{-2}$
CoA1	$4{,}31.10^{-7}$	$6{,}47.10^{-5}$	$7{,}09.10^{-5}$	$1{,}07.10^{-4}$
CoA2	$8{,}37.10^{-8}$	$1{,}4.10^{-5}$	$5{,}5.10^{-5}$	$1{,}08.10^{-4}$
NAK	$3{,}17.10^{-7}$	$> 10^{-2}$	$5{,}02.10^{-3}$	$> 10^{-2}$

Table 1. Calculated IC50 for tested inhibiors of COX. Calculation was done as described in M & M

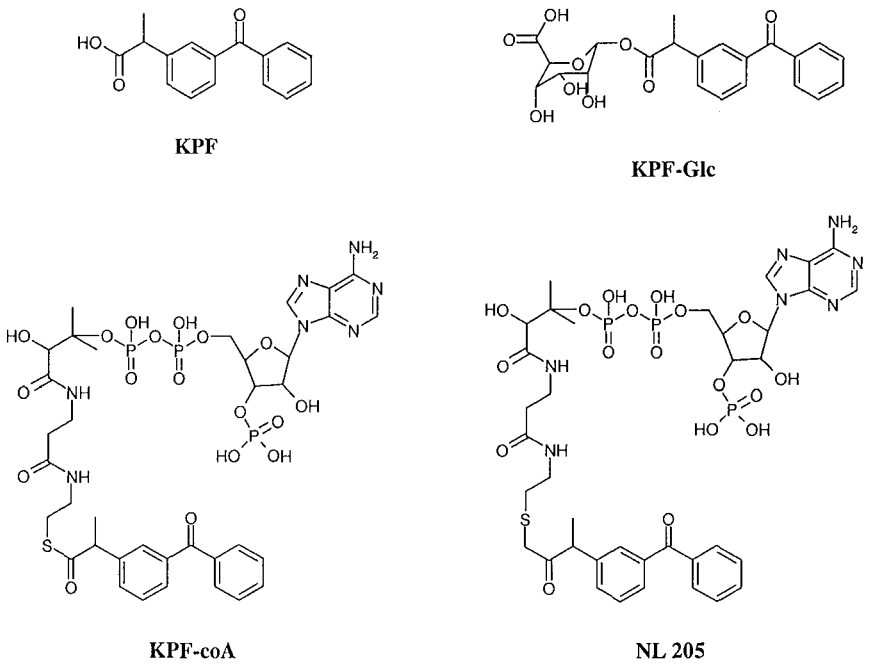


Fig. 1 Ketoprofen (KPF) derivatives tested in this study. KPF-Glc: glucuronide of KPF, KPF-coA: acyl-coA of KPF, NL 205: non hydrolysable analogue of KPF-coA.

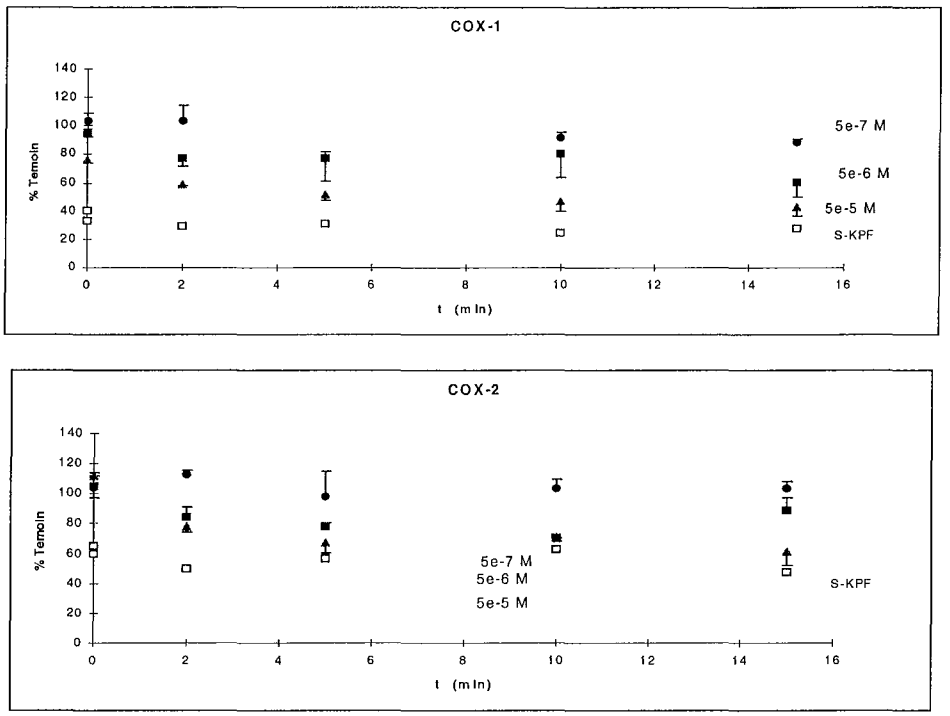


Fig. 2 Kinetics of purified COX inhibition by KPF-coA. Enzymatic activity was measured by PGF2α production after pre incubation of COX with inhibitor then adding 30 μM AA.

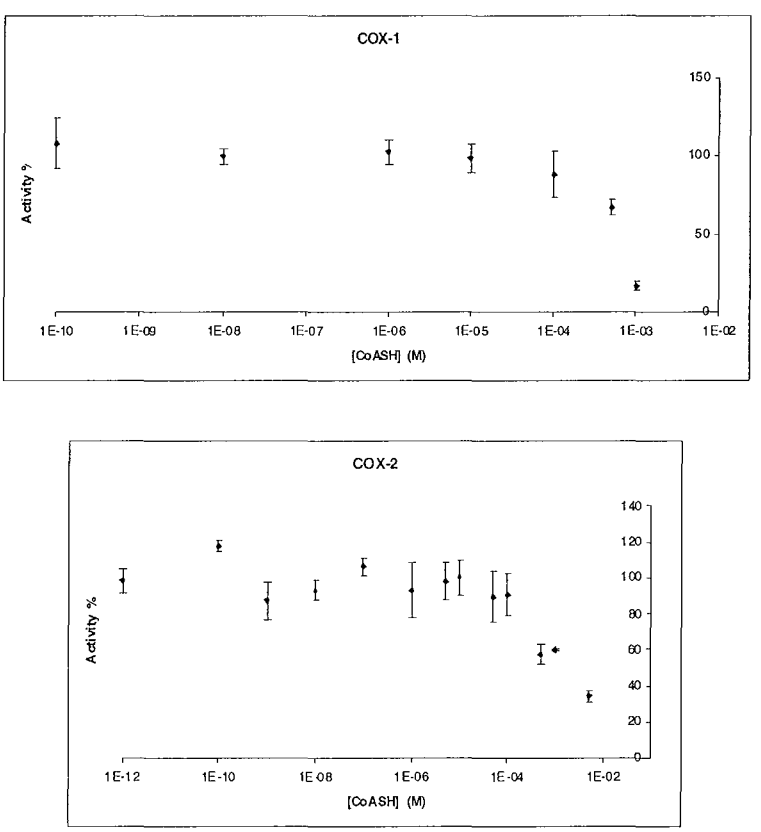


Fig. 3 Inhibition of purified COX by coASH. Activity was determined as above. COX were pre incubated 5 min with coASH

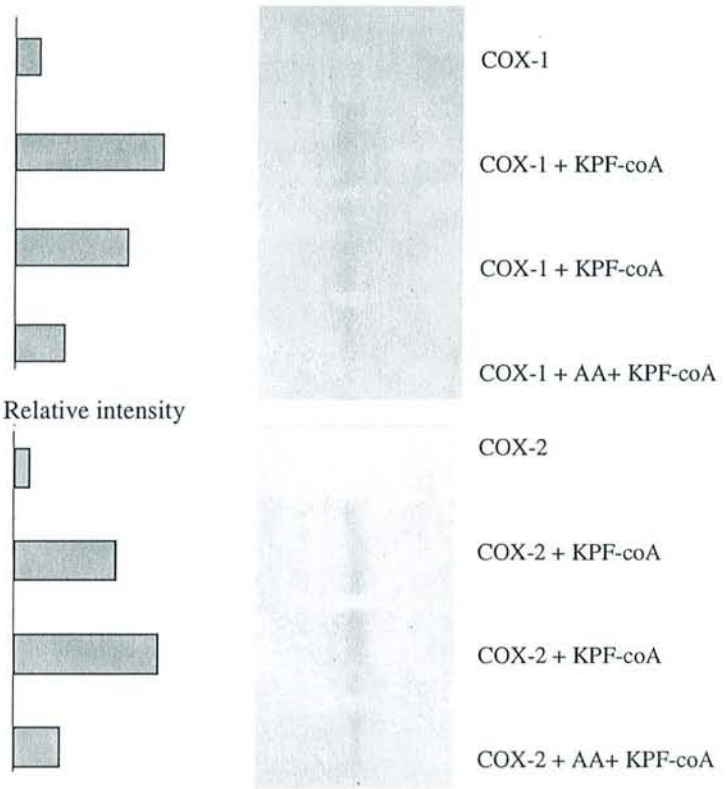


Fig. 4 KPF acylation of purified COX by KPF-coA (western blot). COX (6.10^{-11} mol) were incubated with KPF-coA (2.10^{-10} mol) for 1 h. In competition experiment, KPF or AA (5.10^{-10} mol) were added 5 min before KPF-coA

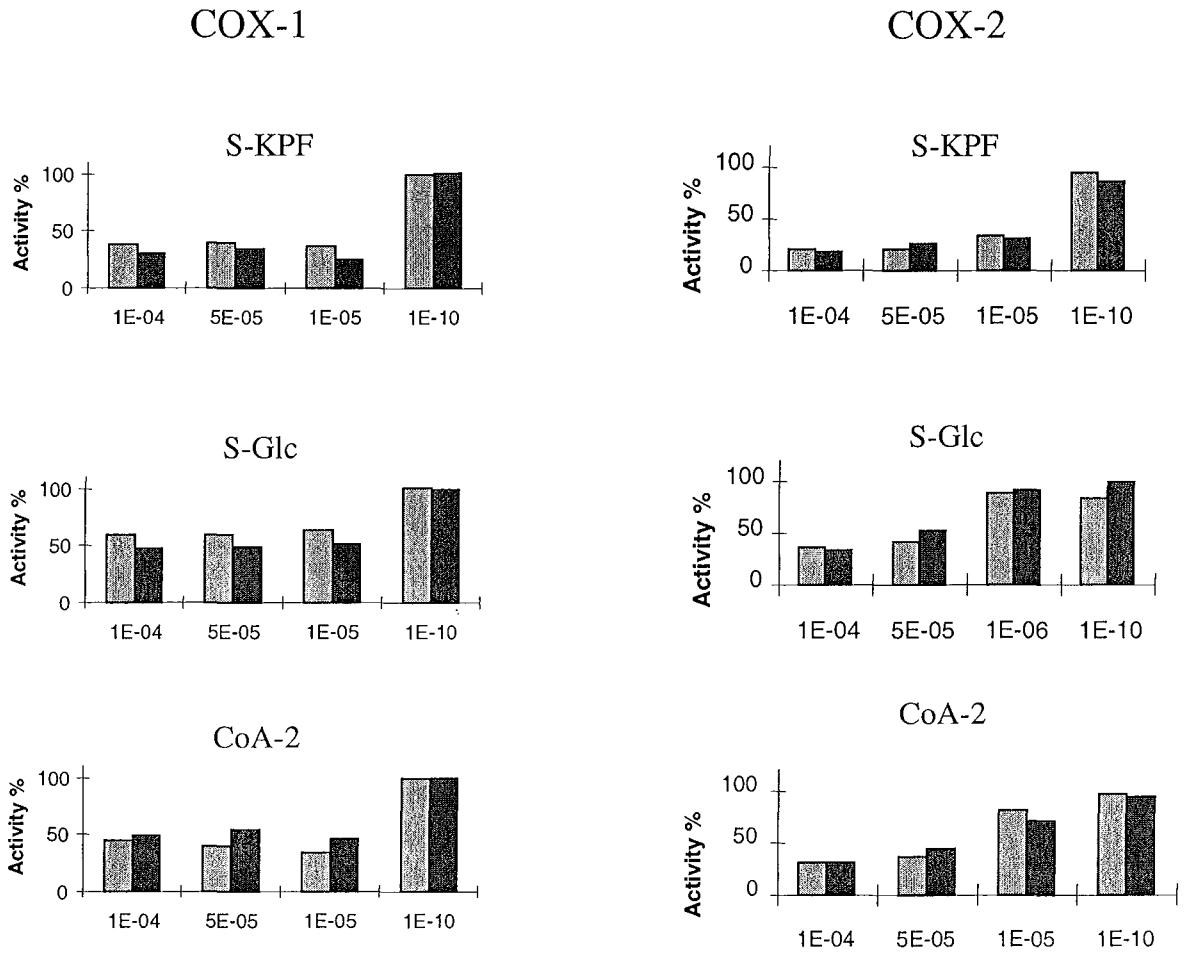


Fig. 5 Inhibition of COX activity by S-KPF, S-KPG-Glc and acyl-coA of an enantiomer of KPF (coA-2) in intact (□) or permeabilized cells (■). COX-1 was studied in BPAEC by measuring 6kPGF1α, COX-2 in LPS stimulated J774 by PGE2.

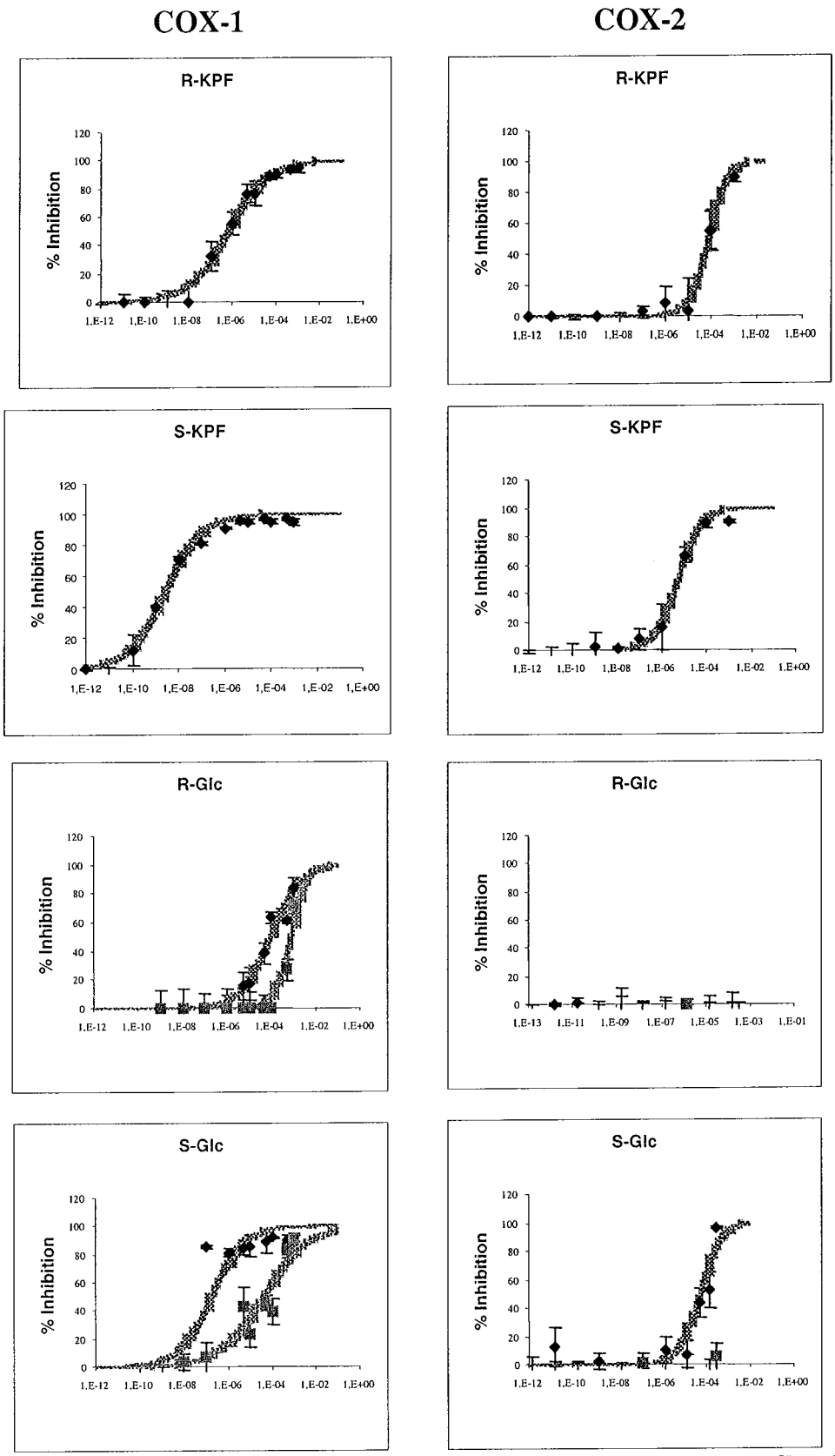


Fig. 6 Instantaneous inhibition by KPF and KPF–Glc then recovery of COX-1 (BPAEC) and COX-2 (J774 macrophages). Cells were incubated 30 min with compounds. Instantaneous inhibition was determined after adding 30 μM AA for 15 min. To analyse the recovery of COX activity, cells were then washed twice for 45 min then added again 30 μM AA for a further 15 min ( ) instantaneous inhibition, ( ) remaining inhibition after recovery

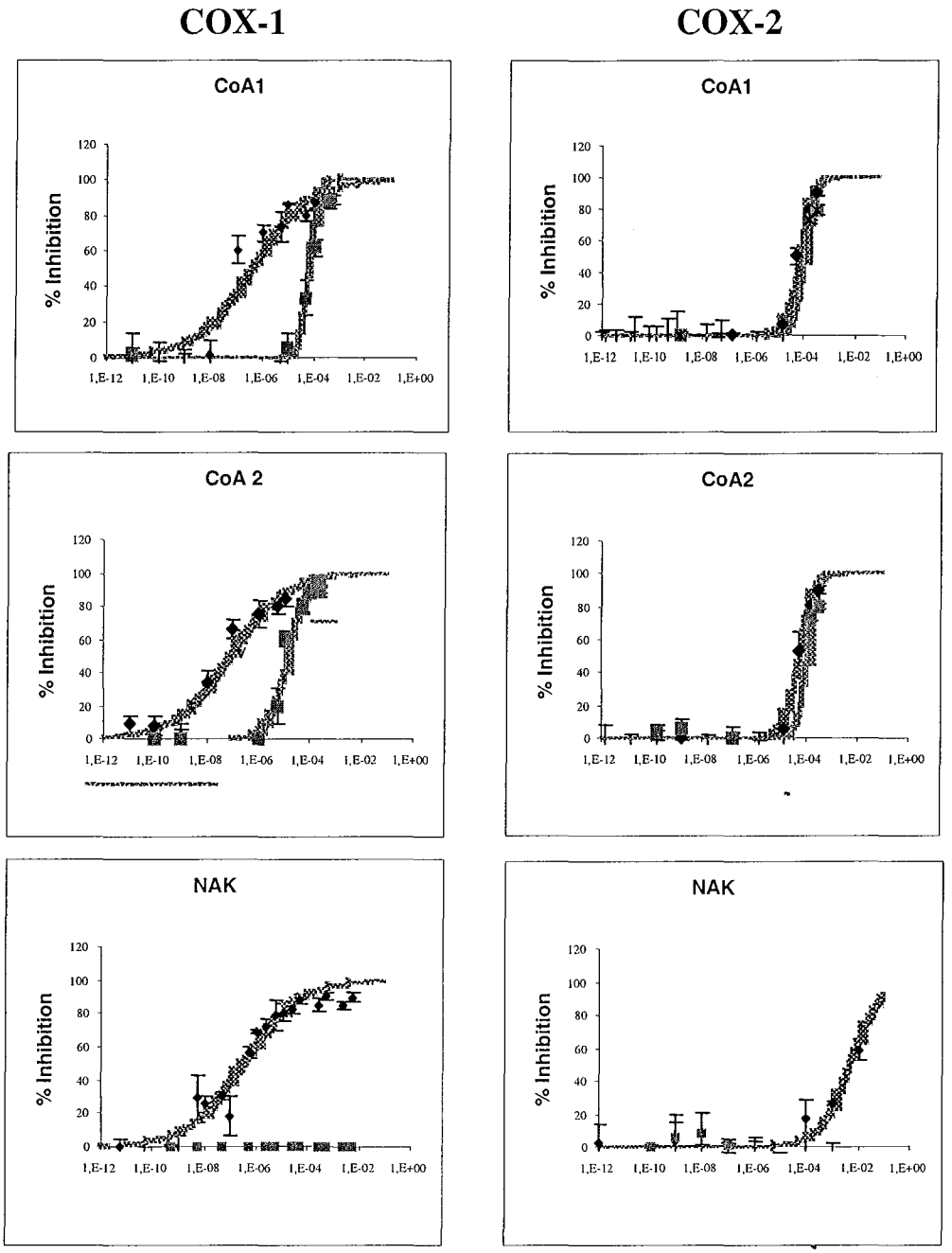


Fig. 7 Instantaneous inhibition by KPF-coA and non hydrolysable analogue NL205 then recovery of COX-1 (BPAEC) and COX-2 (J774 macrophages). Protocol was the same as above. ( ) instantaneous inhibition, ( ) remaining inhibition after recovery

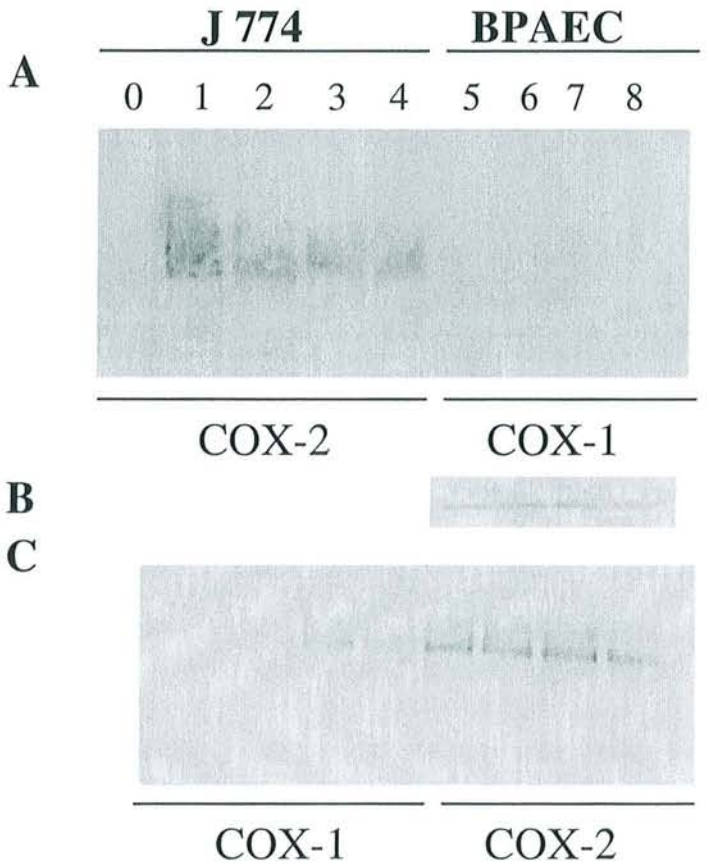


Fig. 8 Immunoprecipitation of COX from cells treated with KPF metabolites. BPAEC and J774 were incubated 2 h with KPF metabolites before immunoprecipitation of COX-1 and COX-2. Proteins were then analysed using anti-KPF antibody (A, C) or anti-COX-1 (B). **0**: without metabolite. **1,5**: KPF-coA 10^{-3}M. **2,6**: KPF-coA 10^{-4} M. **3,7**: KPF-Glc 10^{-3}M. **4,8**: KPF-Glc 10^{-4} M.

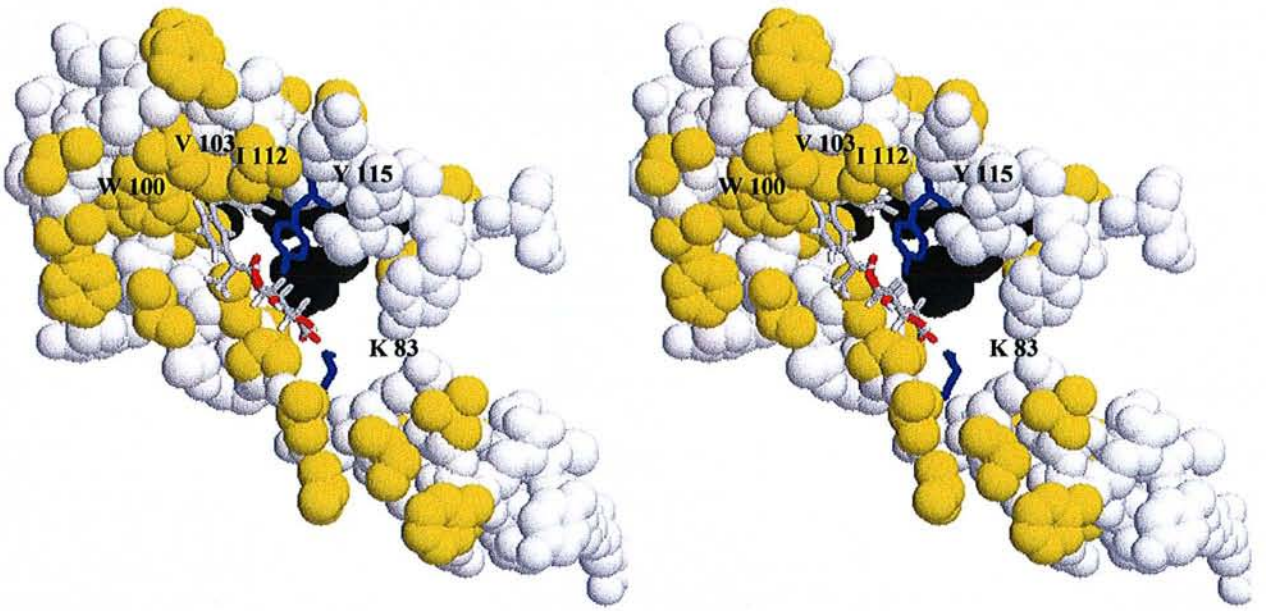


Fig. 9. Proposed complex of KPF-Glc with COX-2 membrane binding domain binding site. Sidechains of hydrophobic residues are yellow. R120, E524 and Y355 (entrance of the active site) are in black. Y115 and K83 are in blue sticks. KPF-Glc in CPK sticks

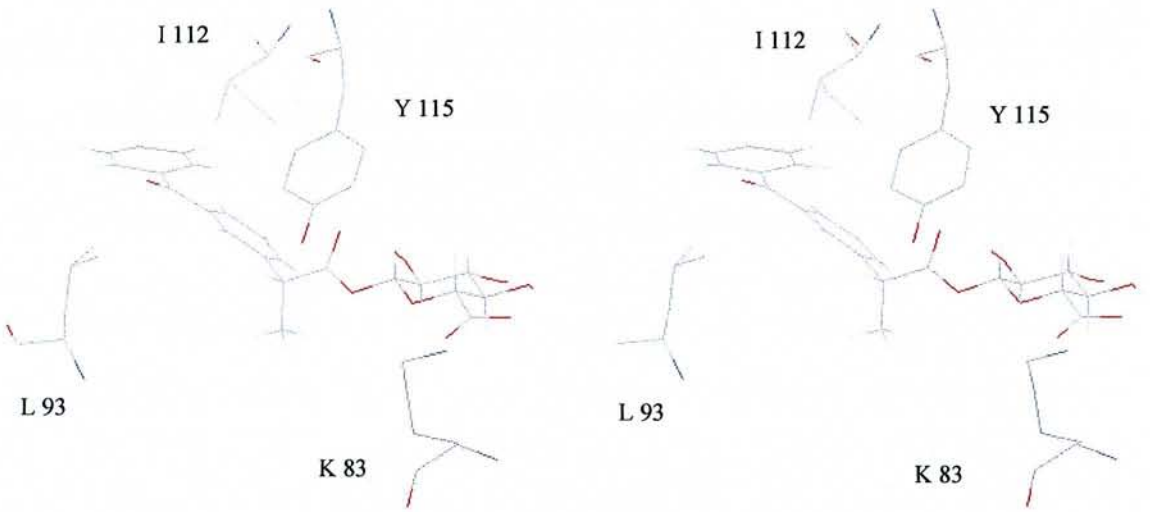


Fig.10. Detail from Fig. 9 showing the close contact between Y115 and KPF Glc (distance between OH of Y115 and ester group of KPF-Glc: 3.5 Å)

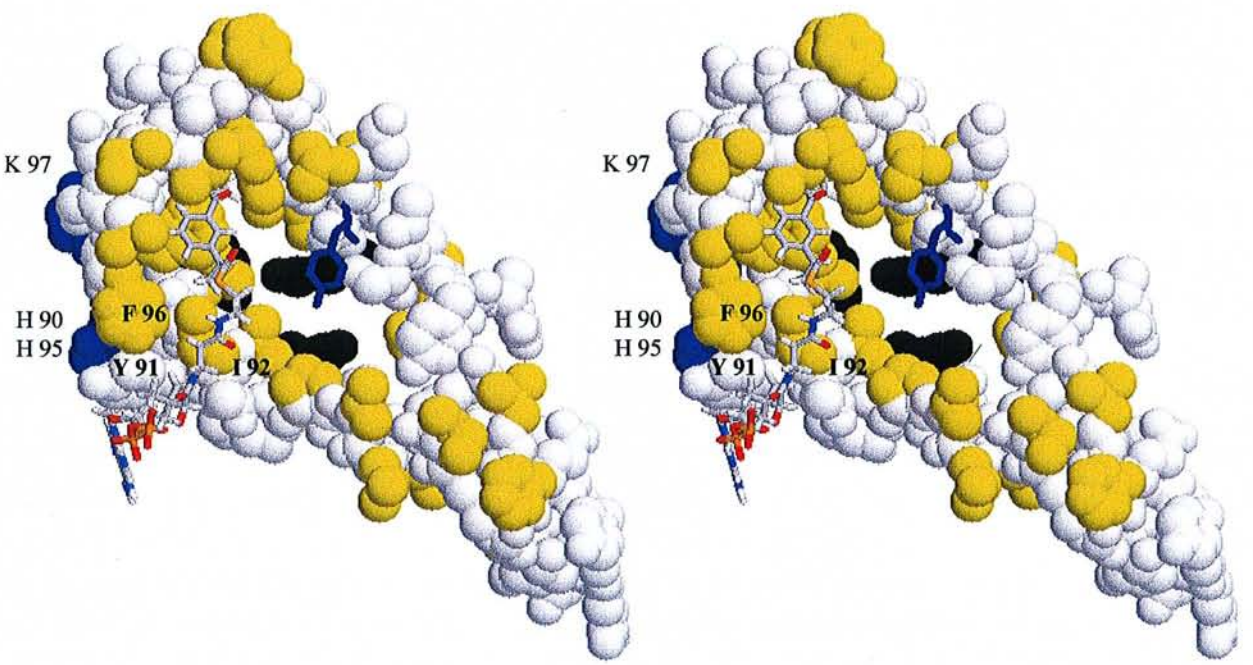
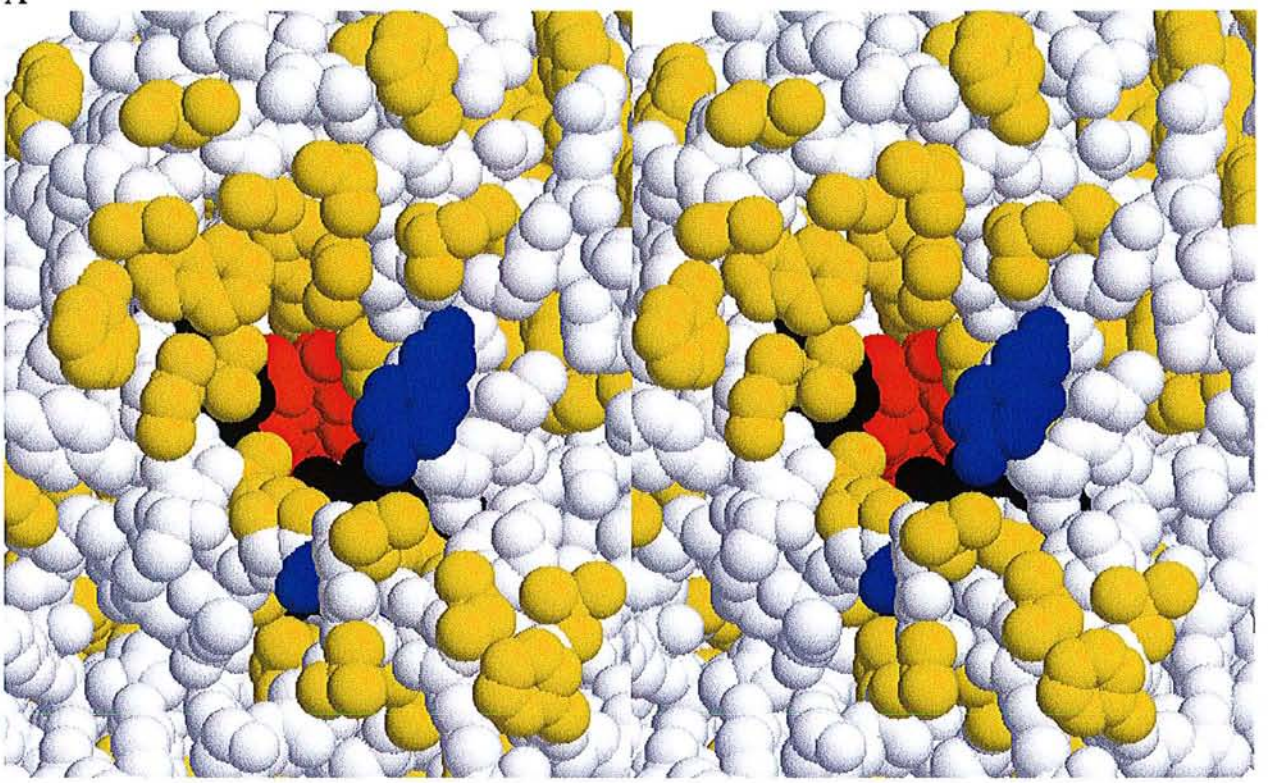


Fig. 11. Proposed complex of KPF-coA with COX-2 membrane binding domain binding site. Sidechains of hydrophobic residues are yellow. R120, E524 and Y355 (entrance of the active site) are in black. Basic residues boarding the outside domain (H90, H95, K97) are in blue. Y115 is in blue sticks. KPF-coA in CPK sticks

A



B

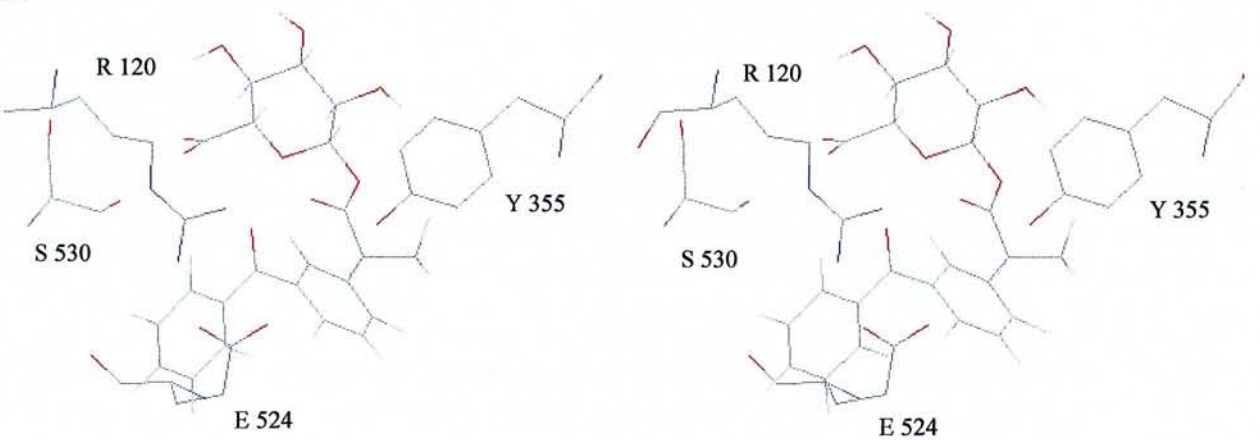


Fig. 12. **A:** Proposed complex of KPF-Glc with COX-2 active site view from the membrane binding domain . Sidechains of hydrophobic residues are yellow. R120, E524 and Y355 (entrance of the active site) are in black. Y115 and K83 are in blue. KPF-Glc in red. Only the glucuronide part is visible from this point of view.
B: Detail from A showing the close contact between Y355 and KPF Glc (distance between OH of Y355 and ester group of KPF-Glc: 2.7 Å)

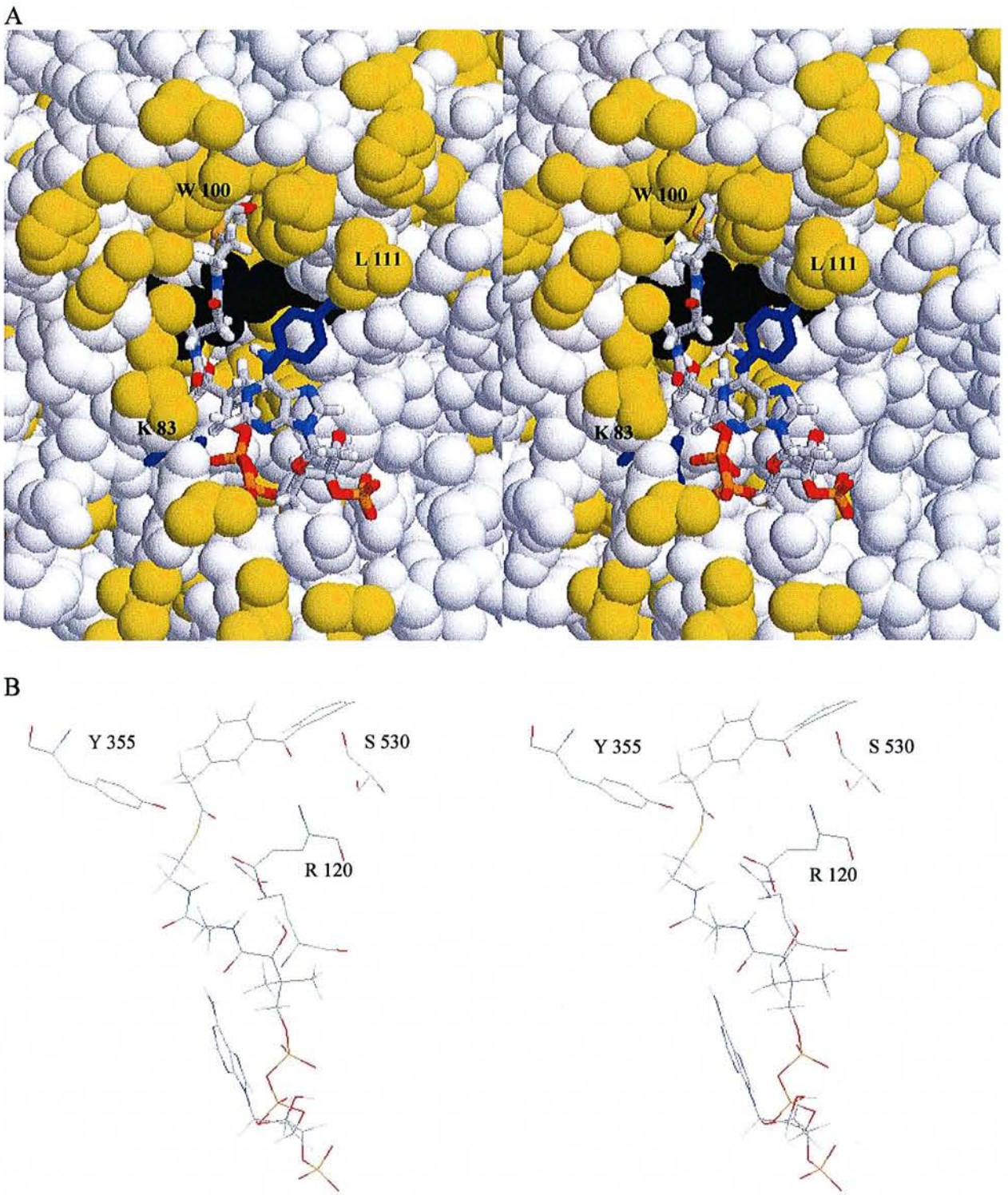


Fig. 13. **A:** Proposed complex of KPF-coA with COX-2 active site view from the membrane binding domain . Sidechains of hydrophobic residues are yellow. R120, E524 and Y355 (entrance of the active site) are in black. Y115 and K83 are in blue sticks. KPF-coA in CPK sticks. Only the coA part is visible from this point of view.
B: Detail from A showing the close contact between Y355 and KPF-coA (distance between OH of Y355 and thioester group of KPF-coA: 3.7 Å)

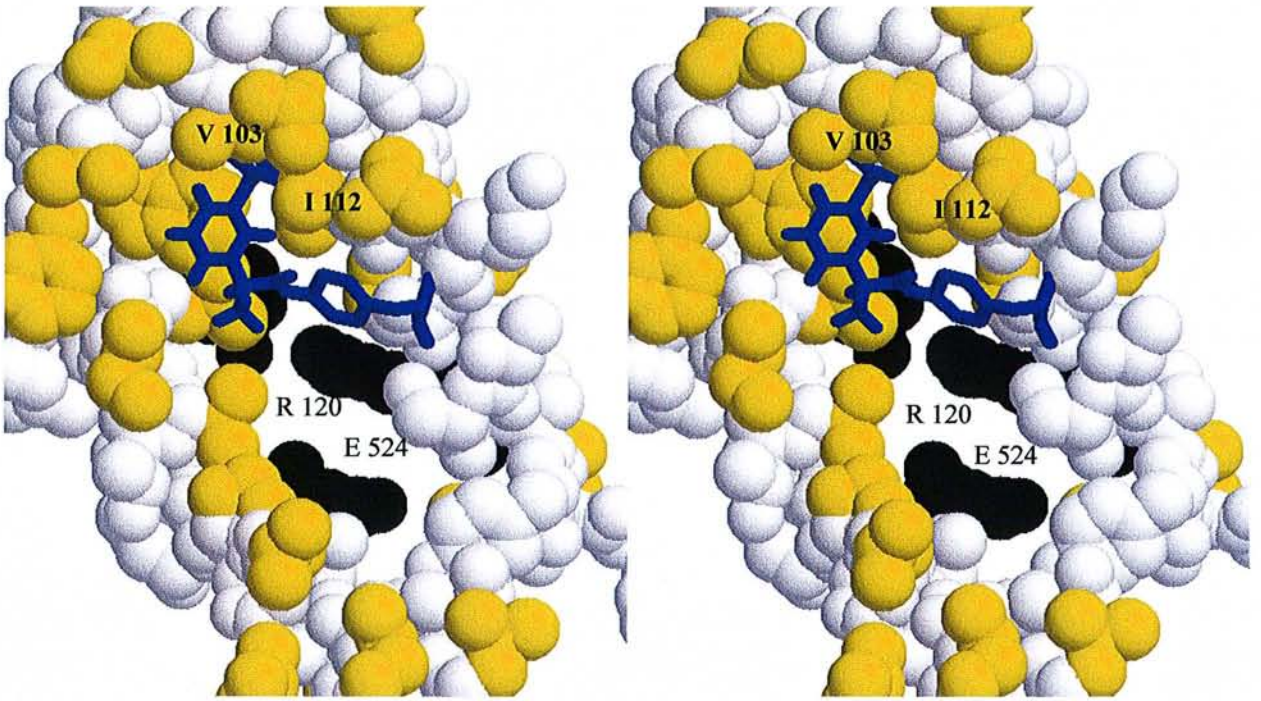


Fig. 14. Proposed structure for acylated COX-2 by KPF-Glc. Sidechains of hydrophobic residues are yellow. R120, E524 and Y355 (entrance of the active site) are in black. KPF-Y115 is in blue sticks.

[1] Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *PNAS* **95:** 13313-13318.
[2] Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, A. Ledford A, Lee CA (1995) Prostaglandin Synthase Gene Disruption Causes Severe Renal Pathology In the Mouse. *Cell* **83:** 473–482.
[3] Newberry RD, Stenson WF, Lorenz RG (1999) Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nature Medicine* **5:** 900 – 906.
[4] Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark , Willoughby DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine* **5:** 698 – 701.
[5] Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Santoro MG, Karin M (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I[kappa]B kinase *Nature* **403:** 103 – 18.
[6] Foster RT, Jamali F, Russell AS and Alballa SR. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in young and elderly arthritic patients following single and multiple doses (1988) *J Pharmac* **77:** 191-195.
[7] Foster RT, Jamali F, Russell AS and Alballa SR. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following single and multiple doses (1988) *J Pharmac* **77:** 70-73.
[8] Ebner T and Burchell B. Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family (1993). *Drug Metabolism and Disposition*, **21:** 50-55.
[9] Jin C, Miners JO, Lillywhite KJ, and Mackenzie PI (1993) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of a human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **264:** 475-479.
[10] Kasuya F, Igarashi K and Fukui M (1996). Participation of a Medium Chain Acyl-CoA Synthetase in Glycine Conjugation of the Benzoic Acid Derivatives with the Electron-Donating Groups. *Biochemical Pharmacology* **51:** 805-809.
[11] Tanaka Y, Shimomura Y, Hirota T, Nozaki A, Ebata M, Takasaki W, Shigehara E, Hayashi R, Caldwell J (1992). Formation of glycine conjugate and (-)-(R)-enantiomer from (+)-(S)-2-phenylpropionic acid suggesting the formation of the CoA thioester intermediate of (+)-(S)-enantiomer in dogs. *Chirality*. **4:** 342-8.
[12] Sallustio BC, Meffin PJ, Knights KM (1988). The stereospecific incorporation of fenoprofen into rat hepatocyte and adipocyte triacylglycerols. *Biochem Pharmacol.* **37:** 1919-23.
[13] Imhof DA, Logan CJ, Dodds PF (1985). Synthesis of 3-phenoxybenzoic acid-containing lipids via the monoacylglycerol pathway. *Biochem Pharmacol.* **34:** 3009-10.
[14] Sevoz C, Benoit E, and Buronfosse T (2000) Thioesterification of 2-Arylpropionic Acids by Recombinant Acyl-Coenzyme A Synthetases (ACS1 and ACS2) *Drug Metab Dispos* **28:** 398-402.
[15] Vessey DA and Kelley M (1998). Characterization of the monovalent and divalent cation requirements for the xenobiotic carboxylic acid: CoA ligases of bovine liver mitochondria. *BBA* **1382:** 243-248.
[16] Vessey DA, Kelley M and Warren RS (1999). Characterization of the CoA ligases of human liver mitochondria catalyzing the activation of short- and medium-chain fatty acids and xenobiotic carboxylic acids *BBA* **1428:** 455-462.
[17] McGurk KA; Remmel RP; Hosagrahara VP; Tosh D; Burchell B (1996) Reactivity of mefenamic acid 1-o-acyl glucuronide with proteins in vitro and ex vivo.*Drug Metab Dispos* **24:** 842-9.
[18] Dubois N, Lapicque F, Maurice MH, Pritchard M, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Abiteboul M, Siest G, and Netter P (1993) In vitro irreversible binding of ketoprofen glucuronide to plasma proteins. *Drug Metab Dispos* **21:** 617-623.
[19] Dubois-Presle N., Lapicque F., Maurice M.H., Fournel-Gigleux S., Magdalou J., Abiteboul M., Siest G., and Netter P. (1995) Stereoselective esterase activity of human serum albumin toward ketoprofen glucuronide. *Mol Pharmacol* 47: 647-653.
[20] Wang M and Dickinson RG (1998). Disposition and Covalent Binding of Diflunisal and Diflunisal Acyl Glucuronide in the Isolated Perfused Rat Liver . *Drug Metab Dispos* **26:** 98-104.
[21] Terrier N, Benoit E, Senay C, Lapicque F, Radominska-Pandya A, Magdalou J, Fournel-Gigleux S (1999) Human and Rat Liver UDP-Glucuronosyltransferases Are Targets of Ketoprofen Acylglucuronide. *Mol. Pharmacol.* **56:** 226-234.
[22] Osborne R; Thompson P; Joel S; Trew D; Patel N; Slevin M (1992) The analgesic activity of morphine-6-glucuronide. *Br J Clin Pharmacol* **34:** 130-8.
[23] Feron O, Michel JB, Sase K, and Michel T (1998) Dynamic Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Complementary Roles of Dual Acylation and Caveolin Interactions. *Biochemistry* 37: 193-200.
[24] Berthiaume L and Resh MD (1995) Biochemical Characterization of a Palmitoyl Acyltransferase Activity That Palmitoylates Myristoylated Proteins *J. Biol. Chem.* **270:** 22399-22405.
[25] Ford DA, Horner CC, and Gross RW (1998) Protein Kinase C Acylation by Palmitoyl Coenzyme A Facilitates Its Translocation to Membranes. *Biochemistry* **37:** 11953-11961.

[26] Raman N and DiRusso CC (1995) Analysis of Acyl Coenzyme A Binding to the Transcription Factor FadR and Identification of Amino Acid Residues in the Carboxyl Terminus Required for Ligand Binding . *J. Biol. Chem.* **270:** 1092-1097.
[27] Hertz R; Magenheim J; Berman I; Bar-Tana J (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* **392:** 512-6.
[28] Yokokawa M, Fujiwara A, Shimada H, Yasumasu I (1983) Inhibitory effect of long chain fatty acyl CoAs on RNA polymerase from Escherichia coli. *J Biochem (Tokyo)* **94:** 415-20.
[29] Yamashita A, Watanabe M, Tonegawa T, Sugiura T and Waku K (1995) Acyl-CoA binding and acylation of UDP-glucuronosyltransferase isoforms of rat liver: their effect on enzyme activity *Biochem. J.* **312:** 301–308.
[30] Simon R. Fox S.R., Lionel M. Hill L.M., Stephen Rawsthorne S and Matthew J. Hills M.J. (2000). Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (Brassica napus L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* **352:** 525–532.
[31] Faergeman NJ and Knudsen J (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem. J.* **323:** 1–12.
[32] Kemal C, Casida JE (1992). Coenzyme A esters of 2-aryloxyphenoxypropionate herbicides and 2-arylpropionate antiinflammatory drugs are potent and stereoselective inhibitors of rat liver acetyl-CoA carboxylase. *Life Sci.* **50:** 533-40.
[33] Kiorpes TC, Hoerr D, Ho W, Weaner LE, Inman MG and Tutwiler GF (1984). Identification of 2-tetradecylglycidyl coenzyme A as the active form of methyl 2-tetradecylglycidate (methyl palmoxirate) and its characterization as an irreversible, active site-directed inhibitor of carnitine palmitoyltransferase A in isolated rat liver mitochondria . *J. Biol. Chem.* **259:** 9750-9755.
[34] Silva C, Loyola G, Valenzuela R, García-Huidobro T, Monasterio O and Bronfman M (1999) High-affinity binding of fatty acyl-CoAs and peroxisome proliferator-CoA esters to glutathione S-transferases. Effect on enzymatic activity. *Eur. J. Biochem.* **266:**143-150.
[35] Neupert W, Brugger R, Euchenhofer C, Brune K and Geisslinger G (1997) Effects of ibuprofen and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases. *Br J Pharmacol* **122:** 487-492.
[36] Hertz R, Bar-Tana J (1988). The acylation of proteins by xenobiotic amphipathic carboxylic acids in cultured rat hepatocytes *Biochem. J* **254:** 39–44.
[37] Sallustio BC; Nunthasomboon S; Drogemuller CJ; Knights KM (2000). In vitro covalent binding of nafenopin-CoA to human liver proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* **163:** 176-82.
[38] Haumont, M.; Magdalou, J.; Ziegler, J.-C.; Bidault, R.; Siest, J.-P.; Siest, G. (1991) Immobilization of microsomes into alginate beads is a convenient method for producing glucuronides from drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*.**35:** 440-446.
[39] Levoin N, Chrétien F, Lapicque, F, Chapleur Y (2002) Synthesis and Biological Testing of Acyl-CoA⁻Ketoprofen Conjugates as Selective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10:** 753-757
[40] Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, and Vane JR (1993) Selectivity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs as Inhibitors of Constitutive and Inducible Cyclooxygenase. *PNAS* **90:** 11693-11697.
[41] Laneuville O, Breuer DK, Dewitt DL, Hla T, Funk CD, and Smith WL (1994) Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases- 1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs *J Pharmacol Exp Ther* **271:** 927-934.
[42] Janusz JM, Young PA, Ridgeway JM, Scherz MW,Enzweiler K, Wu LI, Gan L, Darolia R, Matthews RS, Hennes D, Kellstein DE, Green SA, TulichJL, Rosario-Jansen T, Magrisso IJ, Wehmeyer KR, Kuhlenbeck DL, Eichhold TH, Dobson RLM, Sirko SP and Farmer RW (1998) New Cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase Inhibitors. 1.7-tert-Butyl-2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran Derivatives as Gastrointestinal SafeAntiinflammatory and Analgesic Agents: Discovery and Variation of the 5-Keto Substituent, *Journal of Medicinal Chemistry* **41:** 1112-1123.
[43] Maire-Gauthier R, Buronfosse T, Magdalou J, Herber R, Besse S, Delatour P, Benoit E. Species-dependent enantioselective glucuronidation of carprofen (1998). *Xenobiotica* **28:** 595-604.
[44] Surles MC, Richardson JS, Richardson DC and Brooks FP Jr (1994). Sculpting proteins interactively: continual energy minimization embedded in a graphical modeling system. *Protein Sci* **3:** 198-210
[45] Sayle RA, Milner-White EJ (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* **20:** 374
[46] Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., Stallings, W. C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384:** 644
[47] Hinz B., Kraus V., Pahl A., Brune K (2000). Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274:** 197-202
[48] Schneider C and Brash AR (2000). Stereospecificity of Hydrogen Abstraction in the Conversion of Arachidonic Acid to 15R-HETE by Aspirin-treated Cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **275:** 4743-4746.
[49] Riendeau D; Percival MD; Boyce S; Brideau C; Charleson S; Cromlish W; Ethier D; Evans J; Falgueyret JP; Ford Hutchinson AW; Gordon R; Greig G; Gresser M; Guay J; Kargman S; Léger S; Mancini JA; ONeill G; Ouellet M;

Rodger IW; Thérien M; Wang Z; Webb JK; Wong E; Chan CC (1997). Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol*, **121:** 105-17.
[50] Ouellet M, Percival MD (1995) Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem. J.* **306**: 247–251
[51] Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K and Isakson PC (1999). Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J*, **339:** 607-14.
[52] Capdevila JH, Morrow JD, Belosludtsev YY, Beauchamp DR, DuBois RN, Falck JR (1995). The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible isoforms of prostaglandin H2 synthase are markedly affected by glutathione and glutathione peroxidase(s). *Biochemistry.* **34:** 3325-37.
[53] Duncan J.A. and Gilman A.G.(1996) Autoacylation of G Protein α Subunits. *J. Biol. Chem.* **271:** 23594-23600.
[54] Dunphy JT, Schroede H, Leventis R, Greentree WK, Knudsen JK, Silvius JR and Linder ME (2000) Differential effects of acyl-CoA binding protein on enzymatic and non-enzymatic thioacylation of protein and peptide substrates. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1485:** 185-198.
[55] Yu M., Ives D., and Ramesha C.S. (1997) Synthesis of Prostaglandin E2 Ethanolamide from Anandamide by Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **272:** 21181-21186.
[56] Kozak K.R., Rowlinson S.W., and Marnett L.J. (2000). Oxygenation of the Endocannabinoid, 2-Arachidonylglycerol, to Glyceryl Prostaglandins by Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **275:** 33744-33749.
[57] Kalgutkar A.S., Crews B.C., Rowlinson S.W., Garner C., Seibert K., Marnett L.J. (1998). Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science* **280:** 1268-1270
[58] Amit S. Kalgutkar, Brenda C. Crews, Scott W. Rowlinson, Alan B. Marnett, Kevin R. Kozak, Rory P. Remmel, and Lawrence J. Marnett (2000) Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *PNAS* **97:** 925-930.
[59] Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G (1999) Intracellular Measurement of Prostaglandin E2: Effect of Anti-inflammatory Drugs on Cyclooxygenase Activity and Prostanoid Expression. *Analytical Biochemistry* **271:** 18-28.
[60] Brock TG, McNish RW, and Peters-Golden M (1999) Arachidonic Acid Is Preferentially Metabolized by Cyclooxygenase-2 to Prostacyclin and Prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* **274:** 11660-11666.
[61] Hira K, Takayama H, Tomo K and Okuma M (1997). Protein-tyrosine-kinase-dependent expression of cyclo-oxygenase-1 and -2 mRNAs in human endothelial cells. *Biochem. J.* **322:** 373–377
[62] Karim S, Habib A, Lévy-Toledano S, and Maclouf J (1996). Cyclooxygenases-1 and -2 of Endothelial Cells Utilize Exogenous or Endogenous Arachidonic Acid for Transcellular Production of Thromboxane . *J. Biol. Chem.* **271:** 12042-12048.
[63] Jun-Yang Liou JY, Song-Kun Shyue SK, May-Jywan Tsai MJ, Chia-Lin Chung CL, Kuan-Yu Chu KY, and Kenneth K. Wu KK (2000). Colocalization of Prostacyclin Synthase with Prostaglandin H Synthase-1 (PGHS-1) but Not Phorbol Ester-induced PGHS-2 in Cultured Endothelial Cells . *J. Biol. Chem.* **275:** 15314-15320.
[64] Llorens O., Perez J.J., Palomer P. and Mauleon D. (1999). Structural basis of the dynamic mechanism of ligand binding to cyclooxygenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9:** 2779-2902.
[65] Rosenstock M, Danon A, Rubin M and Rimon G. (2001). Prostaglandin H synthase-2 inhibitors interfere with prostaglandin H synthase-1 inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Pharmacology* **412:** 101-108
[66] Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE, Pasternak GW (1989). Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther,* **251:** 477-83.
[67] Wieland E., Shipkova M., Schellhaas U., Schütz E., Niedmann P.D., Armstrong V.W. and Oellerich M. (2000). *Clinical Biochemistry.* Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? **33:** 81-159
[68] Strassburg C.P., Kneip S., Topp J., Obermayer-Straub P, Barut A., Tukey R.H., and Manns M.P. (2000). Polymorphic Gene Regulation and Interindividual Variation of UDP-glucuronosyltransferase Activity in Human Small Intestine. *J. Biol. Chem.* **275:** 36164-36171.
[69] Simmons DL, Botting RM, Robertson PM, Madsen ML and Vane JR (1999). Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *PNAS* **96:** 3275-3280.
[70] Deborah A. Nicoll-Griffith, James A. Yergey, Laird A. Trimble, José M. Silva, Chun Li, Nathalie Chauret, Jacques Yves Gauthier, Erich Grimm, Serge Léger, Patrick Roy, Michel Thérien, Zhaoyin Wang, Peppi Prasit, Robert Zamboni, Robert N. Young, Christine Brideau, Chi-Chung Chan, Joseph Mancini and Denis Riendeau (2000). Synthesis, characterization, and activity of metabolites derived from the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (MK-0966, Vioxx(TM)). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **10:** 2683-2686

D. Les acyl-CoA comme régulateurs négatifs de l'activité de COX-2 ?

La forte réactivité du KPF-CoA envers COX et sa sélectivité prononcée pour la forme inductible nous a amené à supposer que l'acylation par des acyl-CoA endogènes puisse constituer une forme de régulation négative de l'activité de COX-2. Dans cette hypothèse, nous avons cherché à définir le profil d'expression des ACS parallèlement à COX-2, ainsi que leur susceptibilité éventuelle à un stimulus inflammatoire comme le LPS. En gardant à l'esprit notre recherche sur les effets des AINS, nous avons ciblé la voie centrale. Nous avons donc dans un premier temps analysé l'expression des 5 isozymes de lcACS dans des homogénats de cerveau, *in vivo* chez le Rat. Nous avons dissocié le cortex de l'hypothalamus, lieu de régulation de la fièvre, donc lieu probable d'action antipyrétique.

D. 1. Expression et régulation de la transcription de COX-2 et des ACS par le LPS *in vivo* chez le Rat

L'analyse de l'expression des messagers 5 h après une administration ip de 50 μg/kg de LPS révèle la sensibilité de COX et de certaines isozymes d'ACS. COX-2 voit sa transcription augmentée dans l'hypothalamus, plus légèrement dans le foie et pas dans le cortex (Figure 84). On note une forte surexpression du transcrit d'ACS-2 et d'ACS-4 dans l'hypothalamus mais pas dans le cortex, comme COX-2. L'expression d'ACS-4 suit également celle de COX-2 dans le foie, où ACS-2 n'est pas exprimée. Bien que leur messager soit détectable, ACS-1 et ACS-5 sont insensibles au LPS, tandis qu'ACS-3 est légèrement réprimée dans le cerveau et surtout le foie.

Nous avons vérifié que ces enzymes étaient également traduites, par Western blot (Figure 85).

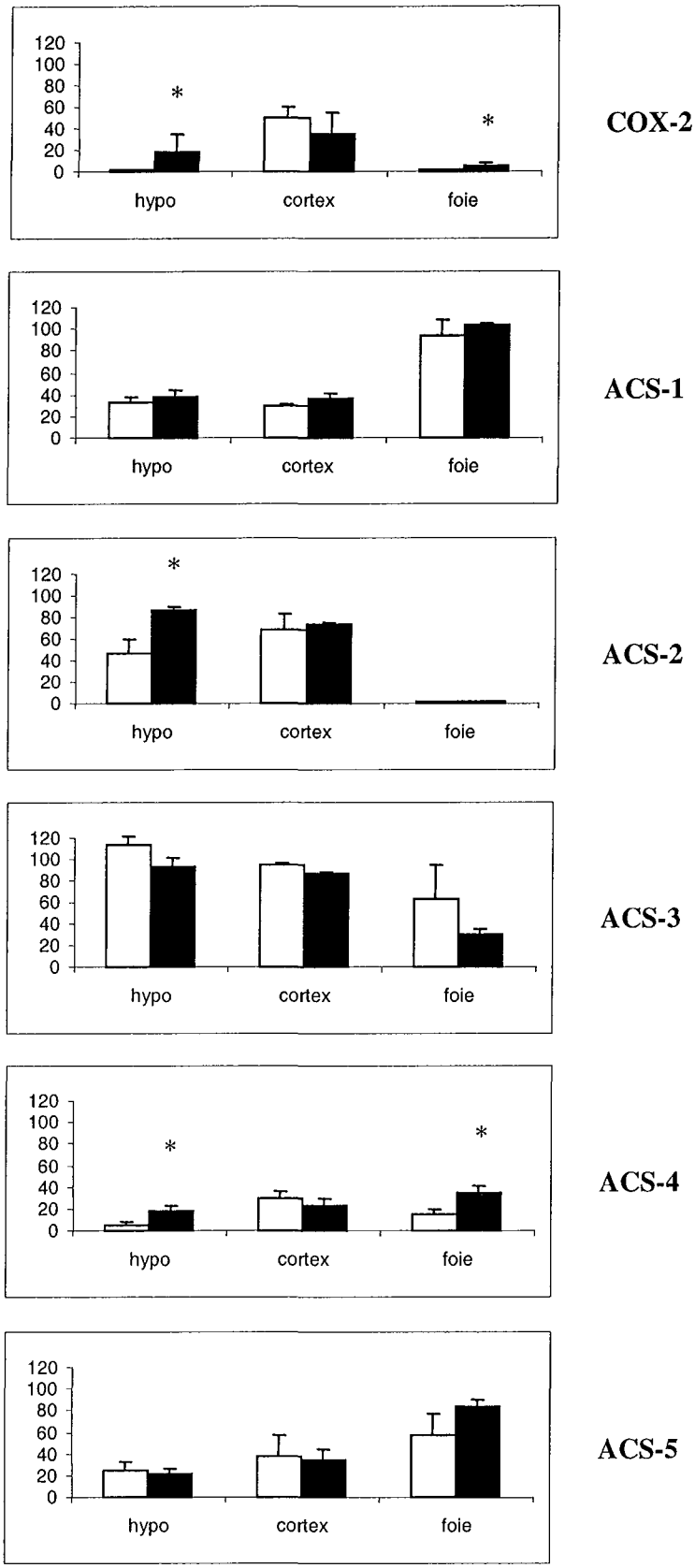


Figure 84 Effet du LPS sur l'expression de COX-2 et des ACS dans le cerveau et le foie, *in vivo* chez le Rat

□ : contrôle, ■ : Rats traités au LPS, 50 µg/kg, ip. Chaque barre est la moyenne de 4 à 5 individus. L'esm est indiqué et les * signalent les différences significatives selon le test de Wilcoxon apparié, avec $p < 0.05$. L'expression est exprimée en % de transcription de la GAPDH, estimée par mesure de la DO mesurée en gel d'agarose

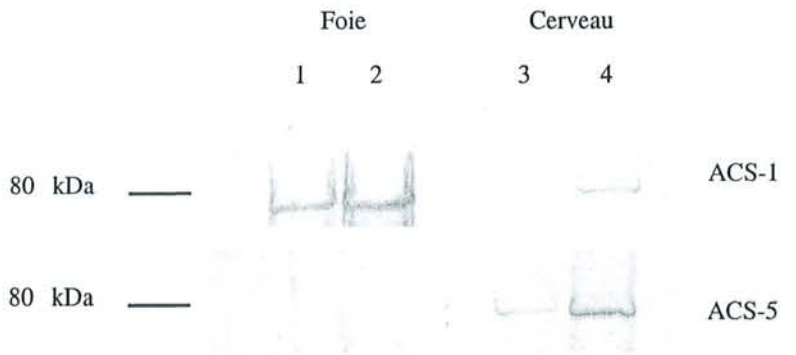


Figure 85 Expression d'ACS-1 et ACS-5 *in vivo* chez le Rat

Les microsomes de cerveau et de foie ont été analysés par Western blot, en déposant 5 (**1**, **3**) ou 20 μg (**2**, **4**) de protéines par puit, et révélation par anti-ACS-1 ou ACS-5 selon l'expérience

D. 2. Cinétique de la transcription d'enzymes de la voie COX et des ACS chez les macrophages en réponse au LPS

Nous avons ensuite cherché à affiner et prolonger notre cinétique, en simplifiant le système d'étude et en nous concentrant sur les 2 ACS sensibles, ACS-2 et ACS-4. Nous avons pour cela travaillé avec des macrophages murins activés au LPS.

La transcription basale chez les macrophages montre une forte expression de cPLA2 relativement à toutes les autres enzymes étudiées, en accord avec le schéma de réponse immédiate à un stimulus inflammatoire, où cPLA2 fournit l'AA à COX-1 exprimée à l'état basal (Figure 86).

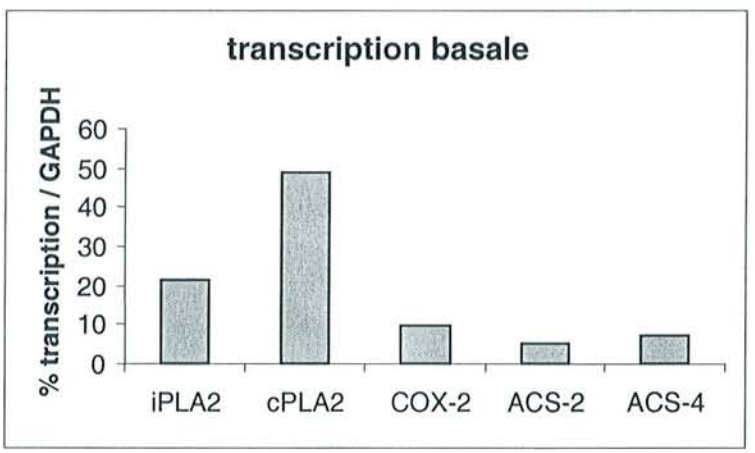


Figure 86 Expression basale des ACS et d'enzymes de la voie COX chez les macrophages J774.2

L'expression est exprimée en % de transcription de la GAPDH, estimée par mesure de la DO mesurée en gel d'agarose

Les phases dites initiale et tardive de réponse à un stimulus inflammatoire sont bien décrites dans la littérature (§ II_A. 2. c) où IIA-sPLA2, cPLA2 et COX-2 sont induites avec un certain délai (4-15 h). Nous débuterons donc notre étude cinétique à partir de cette phase tardive installée, soit à 15 h.

D. 2. a) Expression d'enzymes de la voie COX

Comme le montre la Figure 87, la transcription de COX-2 n'est pas à son apogée à 15 h mais continue à augmenter jusqu'à environ 40 h, où elle amorce une down-régulation jusqu'à 100 h. Cette réponse au LPS est cyclique puisqu'elle reprend à 100 h pour dessiner un pic d'expression quasi-superposable au premier, et à 200 h où la réponse semble cependant s'éroder. cPLA présente un taux d'expression comparable à COX-2 et les mêmes cycles d'up- et down-régulation. On constate aussi une légère avance temporelle sur l'expression de COX-2, évidente à l'état basal et vers 100 h. iPLA2 est fortement induite entre 0 et 20 h avant d'être elle-aussi down-régulée rapidement. Sa transcription augmente ensuite graduellement jusqu'à 200 h où elle se maintient à un niveau constant, mais toujours très inférieur à cPLA2.

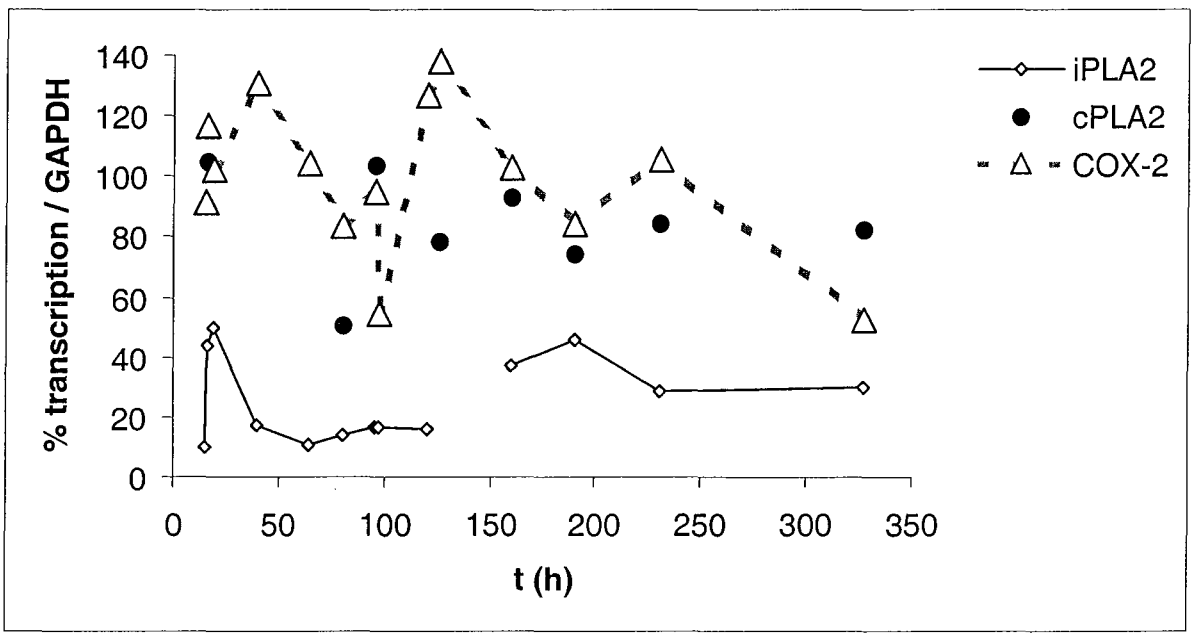


Figure 87 Cinétique de la réponse transcriptionnelle des macrophages J774 à 1 µg/mL de LPS (PLA2 et COX-2)

Les points ne sont pas reliés quand nous n'avons pas mesuré la transcription d'une enzyme à un temps donné, contrairement à COX-2.

Aux vues de ces profils d'expression, il est tentant de dire que la réponse inflammatoire est constituée de cycles transcriptionnels d'environ 100 h qui se répètent tant que dure le stimulus. Selon une logique fonctionnelle, l'enzyme responsable de l'approvisionnement de COX en substrat présente une réponse transcriptionnelle qui précède toujours celle de COX-2. Le profil et le taux d'expression d'iPLA2 est en accord avec différents travaux montrant qu'elle n'est pas impliquée dans cet approvisionnement en AA [176],[184]. Certains auteurs suggèrent qu'elle pourrait supplanter cPLA2 en phase tardive, quand la concentration calcique intracellulaire serait devenue insuffisante pour activer cPLA2. Son taux d'expression relatif à cPLA2, même à des temps aussi tardifs que les nôtres, ne supporte cependant pas ce rôle potentiel.

D. 2. b) Expression des ACS

Conformément à ce qu'on observait *in vivo* chez le Rat, l'expression des ACS-2 et -4 est sensible au LPS dans les macrophages murins. On note en effet une forte surexpression vers 15-17 h, maximale vers 24 h puis une down-régulation permettant un retour à un taux

d'expression basal en quelques 60 h (Figure 88). L'expression d'ACS-2 est toujours supérieure à ACS-4, presque double. Comme pour COX-2, la réponse au LPS est cyclique et on observe un nouveau pic d'expression maximal vers 100 h. Il est remarquable que le taux d'expression des 2 ACS atteint son apogée quand COX-2 est à son minimum transcriptionnel, vers 100 h. Cette concordance est répétée un cycle plus tard, vers 200 h.

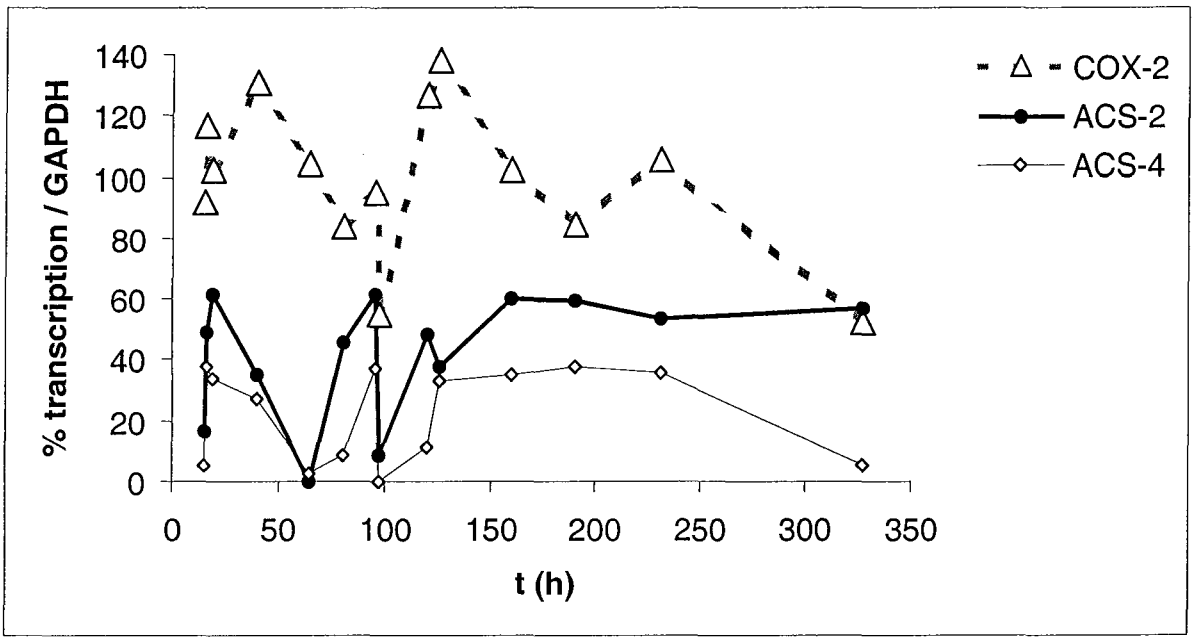


Figure 88 Cinétique de la réponse transcriptionnelle des macrophages J774 à 1 µg/mL de LPS (ACS)

D. 3. Effet des acyl-CoA endogènes sur l'activité des COX

Les produits des ACS, les lc acyl-CoA sont inhibiteurs de COX, mais la réversibilité de l'inhibition n'a jamais été étudiée, pas plus qu'une éventuelle sélectivité pour COX-2 par rapport à COX-1.

Pour tester ces possibilités, nous avons testé l'effet de 2 acyl-CoA à chaînes acyles très différentes : **(i)** AA-CoA, comme produit d'ACS-2 et préférentiel d'ACS-4, *a priori* le plus affine des acyl-CoA pour le site actif de COX, par analogie avec son substrat AA, **(ii)** acétyl-CoA, qui pourrait constituer une forme d'aspirine endogène.

Une étude préliminaire réalisée selon le même protocole que celui suivi avec les métabolites de KPF indique que l'effet immédiat de l'AA-CoA serait plutôt une activation de COX-2 qu'une inhibition, peut-être en générant après hydrolyse un substrat AA utilisé préférentiellement à l'AA exogène qu'on rajoute dans l'expérience (Figure 89). L'Ac-CoA n'a pas d'effet immédiat. Le recovery suggère une inhibition irréversible à forte concentration en AA-CoA comme en Ac-CoA, respectivement autour de 20 et 30 % à 0.5 mM. Malheureusement, des expériences ultérieures ont montré que l'AA-CoA est fortement détergent et qu'il est responsable d'un décollement des cellules. Par recovery, on perd ainsi des cellules durant les lavages et on observe une inhibition apparente. Nous avons alors mis au point un autre protocole, consistant à garder les cellules en suspension pendant les incubations et à les centrifuger pour les étapes de lavages. Malheureusement même dans ces conditions, l'effet détergent de l'AA-CoA est incompatible avec l'étude puisqu'il limite le culottage des cellules. Il ne reste donc que l'utilisation d'enzymes purifiées qui puisse

permettre d'analyser l'effet d'acyl-CoA sur les COX, avec les limites inhérentes à ce modèle, que nous avons constatées précédemment avec le KPF-CoA.

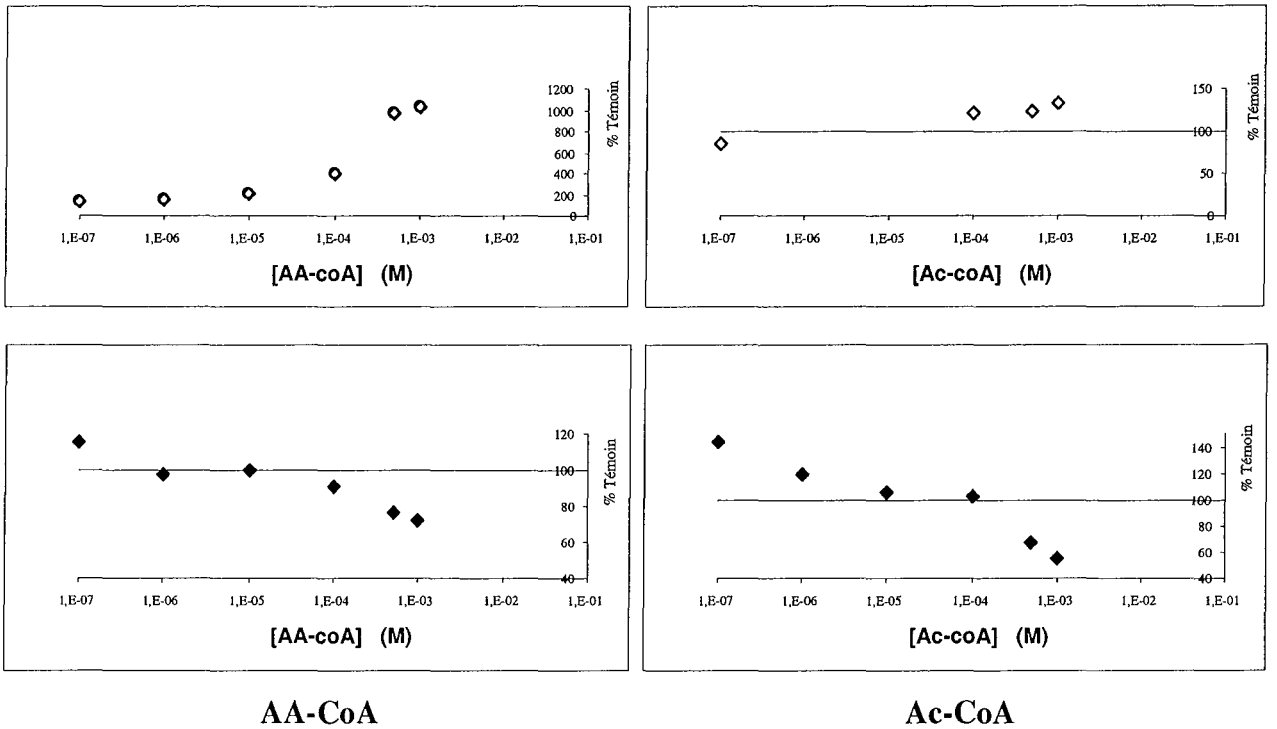


Figure 89 Effet d'acyl-CoA sur l'activité de COX-2 chez les macrophages au LPS

L'effet immédiat (**A**, **B**) et le recovery (**C**, **D**) de COX-2 induite chez les macrophages a été testé pour l'AA-CoA (**A**, **C**) et de l'Ac-CoA (**B**, **D**). Pour plus de lisibilité, les échelles des ordonnées débutent à 40 % en ce qui concerne les mesures de recovery.

Une autre façon d'étudier l'effet des acyl-CoA serait de les faire produire par les cellules elle-mêmes. Ceci aurait en outre l'avantage de respecter les voies métaboliques et les couplages fonctionnels intracellulaires. Malheureusement, les fortes concentrations en AA ont aussi des propriétés détergentes. Ces effets sont prévenus par la fixation préalable de l'AA à l'albumine (Figure 90). On ignore cependant quelle sera l'influence de cette fixation sur le métabolisme intracellulaire ultérieur ainsi que sur le dosage des PG, ce qui limite l'intérêt de cette solution

Ce travail visait à tester l'hypothèse selon laquelle les acyl-CoA endogènes pourraient avoir un rôle de régulateurs, par acylation sélective de COX-2. Certes, la régulation négative de l'activité de COX-2 est en premier lieu assurée par une nette down-régulation de son expression, entre 40 et 100 h chez les macrophages, mais la cinétique de son expression comparée à celle des ACS est compatible avec notre hypothèse. *In vivo* également, il existe une expression d'ACS co-régulée avec celle de COX-2, tout particulièrement d'ACS-2 et d'ACS-4. Les acyl-CoA n'étant *a priori* pas des métabolites circulants, un couplage fonctionnel entre COX et ACS ne peut s'établir que dans le même compartiment ; c'est ce que nous avons constaté chez le Rat. Il est remarquable que l'une des enzymes dont l'expression est la plus touchée par le stimulus est justement la plus sélective pour l'AA, formant ainsi l'AA-CoA qui serait *a priori* l'acyl-CoA endobiote le plus affine pour COX. Une surexpression coordonnée et fonctionnelle d'ACS-4 et de COX-2 a d'ailleurs été décrite dans

des adénocarcinomes de colon [896]. Le taux d'expression d'ACS-4 influe d'ailleurs sur la production de PG : des souris ACS-4 KO produisent ainsi 2 fois plus de 6kPGF1α, PGE2 et PGF2α que les souris sauvages [897].

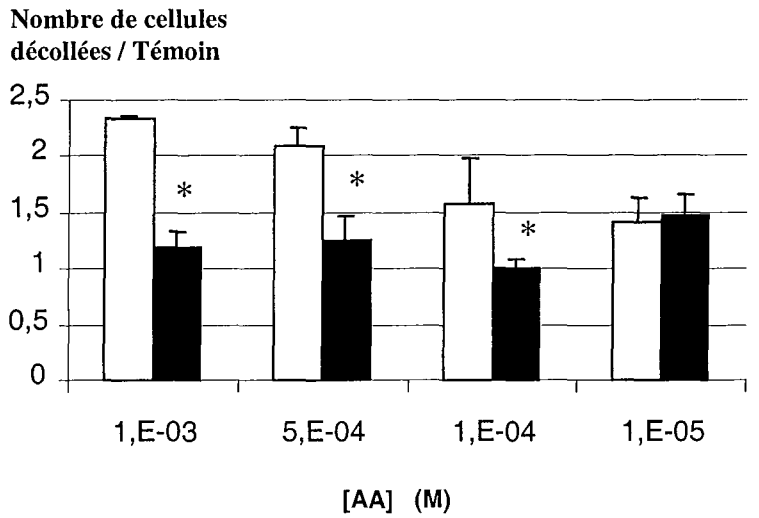


Figure 90 Effet de l'albumine et de l'arachidonate (AA) sur l'adhérence des macrophages

Chaque barre est la moyenne de 3 expériences indépendantes, avec représentation de l'écart type. * signale une différence significative (Wilcoxon apparié, $p < 0.05$)
□ : AA seul, ■ : AA + albumine

Dans notre hypothèse, il faut s'attendre à une induction d'ACS corrélativement à COX-2, mais il devrait aussi exister un décalage temporel dans l'expression des 2 types d'enzymes, ce qui permettrait à COX-2 d'être pleinement active dans un premier temps, avant d'être inactivée par les produits d'ACS. Si l'induction des ACS et de COX-2 est globalement initiée simultanément, le fait que le cycle de réponse des ACS soit 1,5 fois plus rapide que celui de COX-2 peut lui permettre une forte production d'acyl-CoA juste au moment où COX-2 initie un nouveau cycle, et de ce fait limiter la réponse pro-inflammatoire de ce cycle de COX-2.

Si nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet inhibiteur direct des acyl-CoA dans cette étude préliminaire, d'autres travaux de la littérature montrent que le palmitoyl-CoA, le stéaroyl-CoA, l'oléyl-CoA, linoleoyl-CoA et l'AA-CoA sont responsables d'une inhibition immédiate de COX [898],[302]. De plus, la consommation d'AA par les ACS limite la production de PG par COX [303].

La cinétique d'expression des ACS en réponse au LPS est elle-aussi tout à fait compatible avec l'hypothèse selon laquelle les acyl-CoA pourraient jouer un rôle régulateur négatif de l'activité de COX-2. Il est donc possible d'envisager la voie de régulation présentée Figure 91, par les combinaisons d'expression de cPLA2, COX-2 et des ACS.

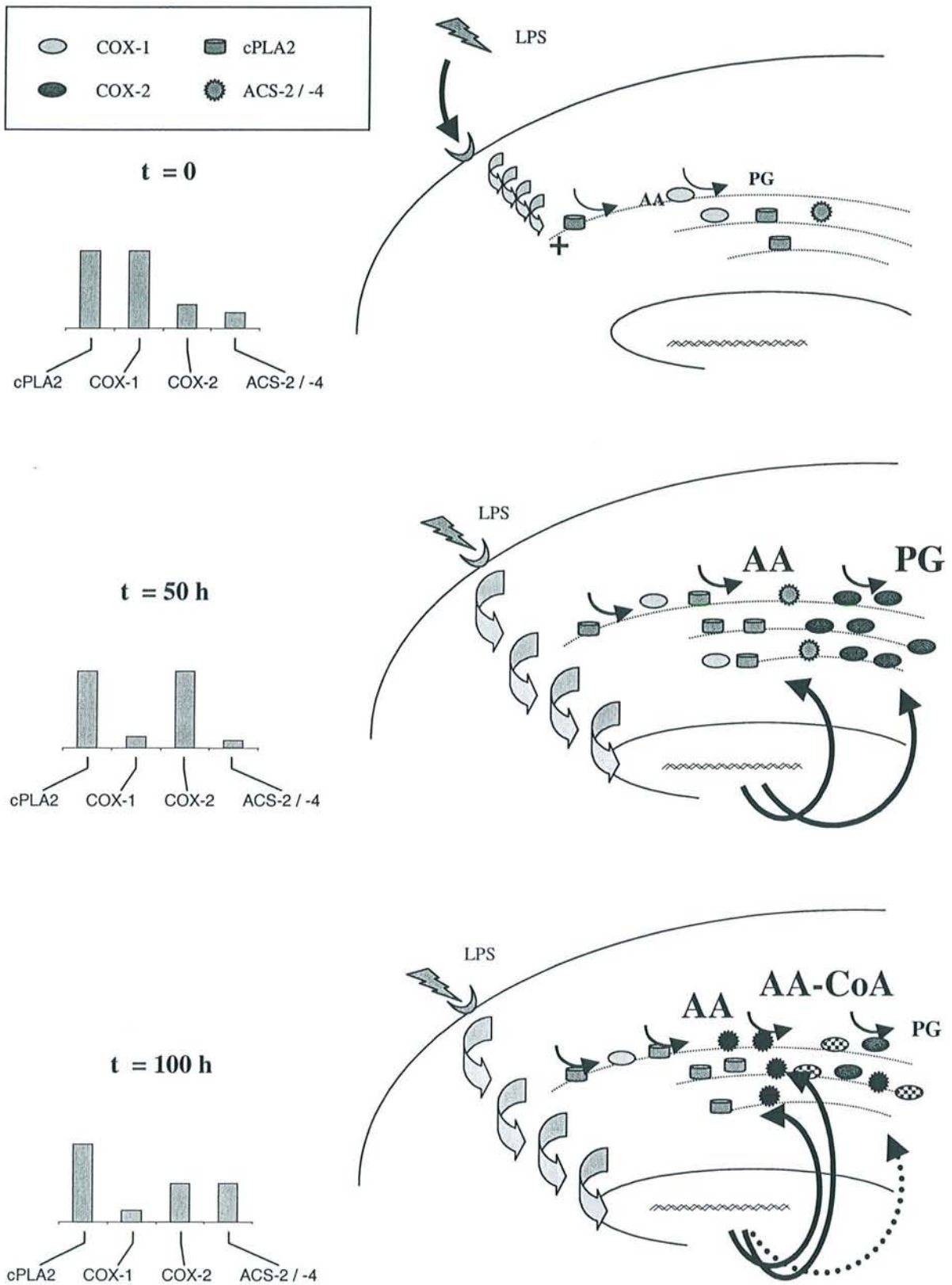


Figure 91 Modèle de la down-régulation de COX-2 chez les macrophages
A gauche sont schématisés les taux d'expression relatifs de chacun des acteurs de cette voie de régulation

E. Réactivité de l'acyl-CoA de KPF et identification de protéines cibles

Nous avons vu que COX-2 est acylée par le KPF-CoA, qui est responsable de son inhibition irréversible. L'un des objectifs de ce travail était de prospecter d'autres cibles protéiques éventuelles que COX. L'acylation par le métabolite acyl-CoA ouvre donc une piste que nous allons exploiter dans cette dernière partie de l'étude.

E. 1. Caractérisation de la réactivité avec l'albumine comme protéine modèle

L'albumine est un transporteur affine pour de nombreux ligands de nature chimique variée. Elle fixe les acyl-CoA avec une bonne affinité [899], sans qu'on sache s'il s'agit d'une fixation réversible ou non, et nous allons dans un premier temps l'étudier comme protéine modèle des interactions pour le KPF-CoA.

E. 1. a) Cinétique de la formation d'adduits

La recherche et la quantification d'adduits éventuels à la SAH sont réalisées par lavages et extractions successives de la protéine préalablement incubée avec le composé. Quand le surnageant de lavage ne contient plus de produit, on hydrolyse le culot protéique et on dose par CLHP le KPF relargué, témoin de la fixation irréversible. La SAH se révèle ainsi acylée par le KPF-CoA. La cinétique de formation d'adduits montre que l'acylation est rapide (50 % d'adduits avant 1 min) et que les adduits formés sont stables (au moins 90 min). Le taux d'adduits (% KPF adduit par rapport au KPF-CoA initial) est proche de 100 %. Différentes concentrations d'albumine indiquent que le taux d'acylation est maximal à partir de 5 g/L et atteint son maximum à 75 % (Figure 92). Diverses concentrations en KPF-CoA ne permettent pas d'observer de modification du taux d'adduit à 1g/L d'albumine, stable à 40 %. La pré-incubation de l'albumine avec l'analogue non hydrolysable du KPF-CoA inhibe la formation d'adduits à 45 % (résultat non montré). Ceci montre que l'acylation nécessite la fixation de l'acyl-CoA sur un ou des sites précis, et qu'elle ne résulte pas seulement de la forte réactivité chimique du composé.

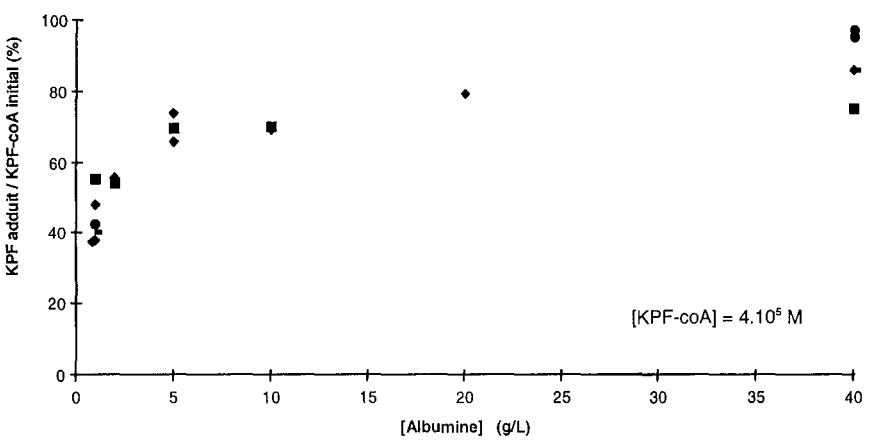


Figure 92 Influence de la concentration en albumine sur son acylation par le KPF-CoA

Différentes concentrations d'albumine sont incubées 20 min avec du KPF-CoA à 40 μM avant quantification des adduits. Chaque point correspond à une expérience.

E. 1. b) Définition des sites acylés

On sait que l'albumine fixe le palmitoyl-CoA sur 6 sites (dont 2 de forte affinité) [900], et que l'oléyl-CoA est fixé sur le site de la bilirubine (site IIA) [901], mais la nature de la fixation est inconnue. Les xénobiotes sont fixés dans les sous-domaines IIA et IIIA (Sites I et II) [902-904] qui sont aussi des sites de fixation des mcAG [905]. On a montré que les lcAG sont fixés par les mêmes sites que ces mcAG [906] ainsi que les lc acyl-CoA. Il semble donc raisonnable de prédire que le KPF-CoA est fixé dans les sous-domaines IIA et IIIA. On sait d'ailleurs que le KPF et son conjugué KPF-Glc sont fixés sur le site II, interagissant en particulier avec K199, au moins pour l'énantiomère R [907],[593].

Ces hypothèses ont guidé des expériences de docking du KPF-CoA à partir de l'albumine cocristallisée avec le myristate et triiodobenzoate TIB (PDB : 1bke [905]). Celles-ci ont permis de conclure que les sites TIB_1, Myr_3 et Myr_4 étaient compatibles avec le phénomène d'acylation, car ils contiennent des résidus basiques et acides reliés en réseau de liaisons hydrogènes ; ces liaisons permettant d'acidifier, donc d'activer des acides aminés nucléophiles. On s'est ensuite assuré de l'accessibilité au site pour la partie CoA très polaire et volumineuse. Cette analyse a révélé que les sites TIB_1 et Myr_4 sont très accessibles, contrairement à Myr_3 qui présente un certain encombrement stérique. La Fig. 6 du manuscrit γ illustre les résultats du docking moléculaire du KPF-CoA dans les différents sites de l'albumine (à gauche), et le mécanisme d'acylation déduit des distances séparant les résidus (à droite).

Nous nous sommes alors focalisé sur les deux meilleurs sites candidats, TIB_1 et Myr_4, et leur résidu nucléophile respectif K199 et Y411. Utilisant des méthodes préalablement décrites, nous avons spécifiquement acétylé K199 par l'aspirine [877] ou nitraté Y411 par le TNM [878]. La quantification des adduits formés sur ces albumines modifiées a révélé une inhibition de l'acylation par le rac-KPF-CoA de 25 % avec K199 acétylée, et de 16 % avec Y411 nitratée.

Ceci confirme donc les résultats obtenus par l'approche théorique : les sites I et II de la SAH sont des sites de fixation du KPF-CoA, et sont très probablement des sites d'acylation, selon les mécanismes que nous avons précédemment proposés.

E. 2. Etude de l'acylation de protéines

L'incubation de cellules intactes avec le KPF-CoA résulte en une importante formation d'adduits avec de nombreuses protéines de toute taille, mais surtout vers 20, 45, 55, 70, 90 et 150 kDa (Fig. 1, manuscrit γ). Nous avons tout d'abord cherché à définir la répartition subcellulaire des protéines cibles.

E. 2. a) Localisation subcellulaire des adduits

• Répartition entre protéines solubles et membranaires

Les fractions membranaires et cytoplasmiques séparées par centrifugation ont été incubées 2 h avec le KPF-CoA puis analysées par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-KPF. Comme le montre la Fig. 1C du manuscrit γ, une très large majorité des protéines marquées sont membranaires. Si on en juge par la mesure de la DO de la membrane ainsi révélée, les protéines cytoplasmiques représentent moins de 20 % des protéines acylées.

Nous avons vu que la palmitoylation de protéines est souvent impliquée dans leur association avec les membranes et que la nature de l'acyle semble cruciale pour leur localisation ou non dans les rafts. La présence d'une chaîne KPF, en elle-même ou en

compétition avec le palmitate n'est donc certainement pas sans influence. Pour affiner l'étude de la distribution des protéines adduites, nous avons donc cherché quelles pouvaient être les conséquences de l'acylation par le KPF sur l'association des protéines avec les rafts.

• Influence de l'acylation par le KPF : exclusion des rafts

Cette étude a nécessité dans un premier temps la mise au point d'un protocole de préparation et de détection des rafts.

Mise au point d'un protocole de préparation des rafts

Pour cela, nous avons tiré parti de leur propriété de résistance au triton à froid [908]. Brièvement, on incube les cellules un certain temps avec une solution de triton dans la glace. Dans ces conditions, la majorité des membranes et des protéines membranaires sont solubilisées, mais pas les rafts qui constituent des structures membrane/protéines isolées. On détecte les rafts par le marqueur protéique des cavéoles, Cav-1, comme il est d'usage dans la littérature. Cette protéine membranaire a l'avantage d'être quasi-spécifique des cavéoles, mais en revanche l'inconvénient de n'être représentative que d'un cas particulier de rafts que sont les cavéoles (Figure 93).

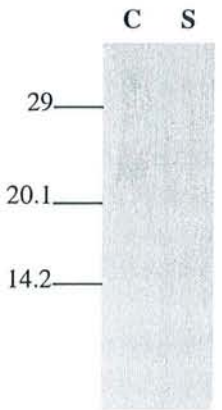


Figure 93 Caractérisation de l'insolubilité de Cav-1 dans le triton à froid

Cav-1 est utilisée comme marqueur des rafts et révélée par un anticorps anti-Cav-1. **C :** culot obtenu après centrifugation 15 min à 15000 g de cellules 3T3 incubées 20 min avec du triton 1 % dans la glace, **S :** surnageant

On les purifie alors par ultracentrifugation en gradient de saccharose, qui permet de concentrer les rafts vers 15-20 % de saccharose. La caractérisation des rafts est obtenue par Western blot, à l'aide d'anticorps anti-Cav-1.

La mise au point du protocole a principalement concerné le temps d'incubation et la concentration en triton pour un nombre de cellules donné, et dans un volume donné. L'analyse était en outre compliquée par la nécessité d'utiliser des conditions douces de préparation des échantillons à tester, afin de préserver les adduits que nous étudierons ultérieurement. Nous avons évité en particulier tout chauffage et l'emploi de mercapto-éthanol auxquels sont sensibles les adduits.

Dans un premier temps, nous avons fait varier la durée d'incubation, de 0 et 20 min avec du triton 1 %. L'essentiel de Cav-1 est alors détecté dans la fraction 10 du gradient de saccharose, fraction correspondant au culot constitué de débris et d'amas cellulaires insolubles (Figure 94). Ce culot n'a aucune signification quant à une quelconque fraction

cellulaire, alors que dans nos conditions, on pouvait s'attendre à retrouver les rafts, donc Cav-1, dans les fractions 2 à 4.

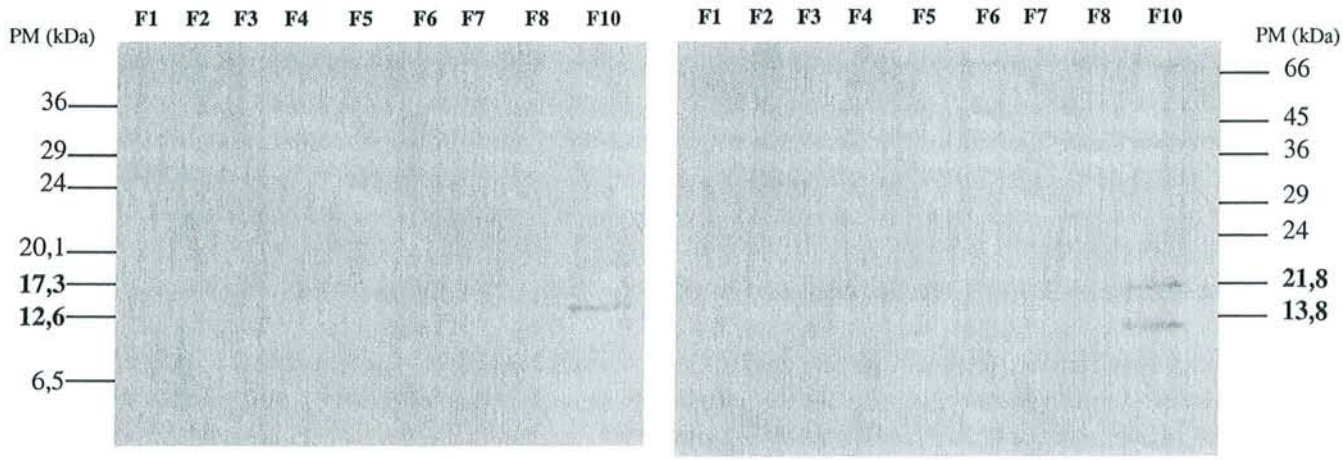


Figure 94 Fractionnement des cellules 3T3 en gradient de saccharose après incubation avec du triton 1 % à froid

Membrane de gauche : pas de pré-contact avec le triton, membrane de droite : fractionnement après 20 min de contact avec le triton

Le temps d'incubation et/ou la concentration en triton étant insuffisantes, nous avons alors testé la concentration en triton (1-3 %), pour une pré-incubation de 60 min. Avec 1 % de triton, on observe un marquage dû à l'anti-Cav-1 dans les fractions attendues (2 à 4 principalement). Cependant la taille des protéines est beaucoup plus importante que celle de Cav-1. On peut supposer que les protéines n'ont pas migré et sont restées associées aux rafts, à l'interface entre le gel de concentration et le gel de migration (Figure 95). Cette hypothèse semble confirmée par un léger marquage vers 22 kDa dans les échantillon traités à 3 % de triton, comme si la forte teneur en détergent avait en partie dissocié l'amas protéines/membranes.

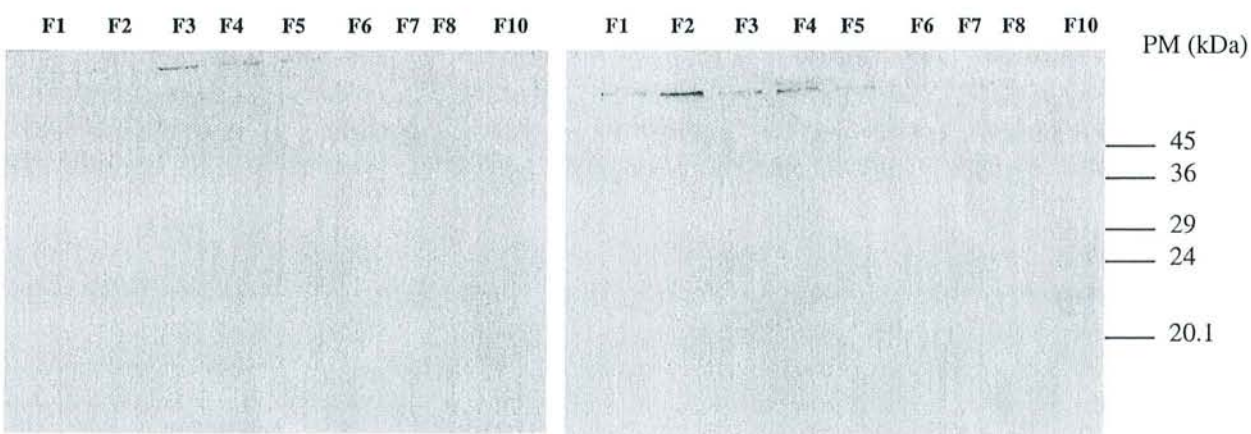


Figure 95 Fractionnement des cellules 3T3 en gradient de saccharose après incubation avec du triton à froid pendant 1 h

Membrane de gauche : les cellules sont incubées avec du triton 1 %, membrane de droite : avec du triton 3 %

D'autres travaux ont rapporté l'existence de bandes immunoréactives de haut PM, qui seraient constituées d'homo-oligomères de Cav-1. Ces complexes ne sont dissociables que par

ébullition [909]. Ce type de traitement nous étant interdit pour la caractérisation ultérieure des adduits, nous avons testé l'addition du dénaturant que constitue l'urée. Comme le montre la Figure 96, l'urée 8 M permet effectivement un marquage de bandes de taille correcte dans les bonnes fractions. Les bandes sont cependant encore réparties sur un nombre trop important de fractions, allant de la plus faible teneur en saccharose (fraction 1) vers les plus importantes (fraction 7 de la Figure 95), ce qui suggère qu'une concentration de triton 3 % soit peut-être trop importante et responsable d'une solubilisation partielle des rafts. A l'avenir, nous utiliserons des conditions intermédiaires, avec une pré-incubation de 1 h à 1 % de triton, en utilisant une solution de dépôt contenant 8 M d'urée. De plus, nous augmenterons la durée d'ultracentrifugation afin de concentrer les rafts dans le minimum de fractions.

Il nous est donc possible de préparer et détecter les rafts à partir de cellules 3T3. Nous allons maintenant pouvoir appliquer cette technique en comparant la localisation subcellulaire de nos adduits et celle des rafts, dans les adipocytes.

Figure 96 Purification des rafts de cellules 3T3

Les cellules sont incubées 1 h avec du triton 3 %, les échantillons repris dans de l'urée 8 M avant dépôt.

Rafts et protéines acylées par le KPF

Des adipocytes 3T3 sont incubés avec du KPF-CoA 0,1 mM pendant 2h. La fraction membranaire est ensuite mise en contact 1 h avec du triton 1 % avant centrifugation en gradient de saccharose. Chaque fraction est alors analysée par Western blot à l'aide de l'anti-KPF. Comme le montrent les Fig. 2 A et B du manuscrit γ, on détecte de nombreux adduits dans les dernières fractions (culot insoluble et protéines solubilisées) mais très peu dans les fractions 2 à 4 correspondant aux rafts. En fait, on ne révèle que 4 bandes de 15-20 kDa. La révélation ultérieure de la même membrane par l'anti-Cav-1 montre que si cette protéine est bien présente (fraction 2 essentiellement), elle est de taille supérieure aux 4 bandes susdécrites. La purification des rafts a donc été efficace, mais Cav-1 n'est pas l'une des protéines adduites dans les rafts.

Cette expérience révèle que quasiment aucune protéine acylée par le KPF n'est présente dans les rafts, alors qu'on les retrouve majoritairement dans les fractions correspondant aux protéines membranaires solubilisées. Il sera intéressant à l'avenir de savoir si l'acylation par le KPF ne concerne que les protéines absentes des rafts, ou si c'est l'acylation qui les exclut des rafts.

E. 2. b) Caractérisation de l'acylation des protéines membranaires

Nous avons ensuite cherché à caractériser chimiquement les adduits microsomiaux. Des expériences de compétition avec le KPF et différents dérivés du CoASH ont montré que la partie panthétéine du coenzyme est cruciale pour la reconnaissance des cibles, comme pour la plupart des protéines fixant les acyl-CoA. Le traitement des échantillons ou des membranes par le NEM et l'hydroxylamine montre que les adduits sont des esters et évoque l'implication de cystéines comme résidus acylés. Nous avons également pu mettre en évidence une compétition entre palmitoylation et acylation par le KPF, suggérant un site de fixation et d'acylation commun aux 2 acyl-CoA (Fig. 4, manuscrit γ).

E. 3. Recherche et définition d'un domaine d'interaction avec les acyl-CoA

Plusieurs de nos résultats montrent que l'acylation des protéines par le KPF-CoA requiert un site de fixation précis. Ce site pourrait être celui du palmitoyl-CoAdes protéines palmitoylées, comme le suggèrent nos expériences de compétition. Toute protéine connue pour être palmitoylée est ainsi une cible potentielle du KPF-CoA. Malheureusement, un domaine de palmitoylation n'a pas été caractérisé et il n'existe pas de consensus de séquence primaire permettant de prédire qu'une protéine pourra subir cette modification chimique. La seule piste qui nous soit proposée pour identifier les cibles du KPF-CoA est donc de tester les protéines connues pour être palmitoylées. Cette voie est cependant très limitative, et peu de ces protéines sont associées à l'inflammation.

Afin d'augmenter notre capacité de screening, nous avons supposé qu'il puisse exister un domaine de fixation et d'acylation par le palmitoyl-CoA, et avons cherché à le détecter par comparaison de séquences de protéines connues pour être palmitoylées ou pour interagir avec des lc acyl-CoA. Nous avons exclu des séquences testées celles d'enzymes utilisant les acyl-CoA comme substrat car aucun fold commun n'a été rapporté [910].

E. 3. a) Recherche d'un domaine commun chez les protéines interagissant avec les acyl-CoA

• Définition d'un domaine bidimensionnel

Nous avons utilisé le sous-domaine IIIA de l'albumine comme amorce de screening et recherché des similitudes de séquence par les outils classiques (φBLAST, ψBLAST, [880]). Ces techniques automatiques à haut débit n'ont pas permis de détecter de similitudes significatives intéressantes, quelle que soit la banque testée. Nous nous sommes alors tourné vers la méthode d'analyse bidimensionnelle d'amas topohydrophobes HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) [883, 884]. L'alignement des profils HCA de la SAH et d'autres protéines interagissant avec les lc acyl-CoA, comme certaines GST de mammifères, PLA2 de venin de cobra ou récepteur nucléaire de bactéries FadR suggère l'existence d'un domaine commun correspondant assez précisément au sous-domaine IIIA de la SAH (Fig. 7, manuscrit γ). Les résidus RY411 et S489 délimitent grossièrement ce domaine, ainsi que les amas topohydrophobes qui les flanquent.

- **Identification d'un fold de fixation des acyl-CoA (ACBD)**

Nous avons ensuite cherché si la conservation de ce domaine HCA bidimensionnel pouvait être corrélé à un fold, c'est-à-dire un repliement tridimensionnel précis constitué des mêmes éléments de structure secondaire. Outre l'analyse visuelle relativement subjective, nous avons utilisé le programme DALI permettant de scorer 2 superpositions tridimensionnelles, d'après les coordonnées spatiales des atomes. Nous avons ainsi pu confirmer l'existence d'un domaine commun chez nos 4 protéines, et détecter ce domaine chez d'autres protéines en screenant la PDB (manuscrit γ). Ce domaine est schématiquement constitué d'un plancher de 2 longues hélices α antiparallèles, sur lequel repose une poche elle-même formée de plusieurs petites hélices. L'ensemble a globalement la forme d'une hotte de vendangeur (ou de père Noël !).

E. 3. b) Etude de l'archétype de l'ACBD : expression du domaine IIIA de la SAH

La conservation d'une structure tridimensionnelle proche du sous-domaine IIIA de l'albumine chez différentes protéines fixant les acyl-CoA amène à penser qu'une étude fine de l'interaction de ce domaine avec le KPF-CoA pourrait apporter de précieux renseignements quant à l'acylation des protéines, en particulier au niveau catalytique. Elle permettrait aussi de vérifier notre hypothèse selon laquelle ce domaine constitue un fold conservé chez diverses protéines, auquel cas il devrait présenter une autonomie structurale et fonctionnelle propre. Nous avons donc travaillé à l'expression recombinante de ce domaine, isolé du reste de la SAH.

Nous avons cloné ce domaine à partir de cellules d'hépatome humain HepG2, dans un vecteur permettant la fusion d'un tag His en Ct (pQE-70, Figure 97).

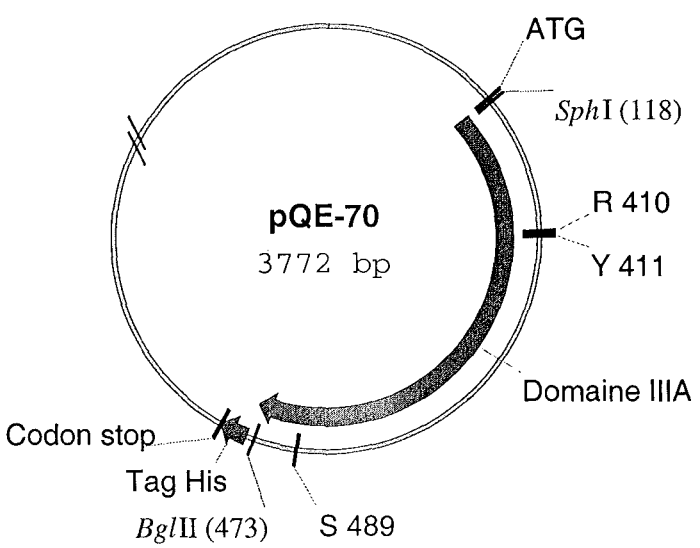


Figure 97 Schéma du système d'expression du domaine IIIA de la SAH

La position du tag a été proposée après modélisation de la protéine chimérique attendue. La structure obtenue permet effectivement de prédire qu'un tag situé en Ct sera vraisemblablement sans conséquence sur la capacité de fixation de ligand du domaine, contrairement à un tag Nt (Figure 98).

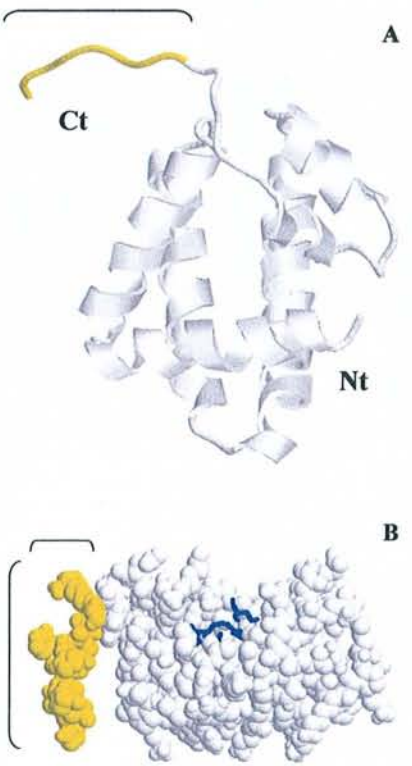


Figure 98 Modèle de structure tridimensionnelle du domaine IIIA chimérique construit

Le tag His et R498, S499 (traduction du site BglII) sont soulignés par les accolades. **A** : Domaine vu de dessus, **B** : domaine vu de profil ; l'entrée du site de fixation est représentée par R410, Y411 et S489 en tubes noirs

Des bactéries TOP10F' ont été transformées avec le mélange de ligation plasmide/insert, et quelques clones positifs ont été sélectionnés par Western blot (Figure 99). On révèle une protéine de PM apparent 20 kDa, contre 14.6 kDa pour le PM théorique de la construction. La présence du tag His modifie les propriétés électrophorétiques de la protéine, ce qui explique très probablement l'écart de taille.

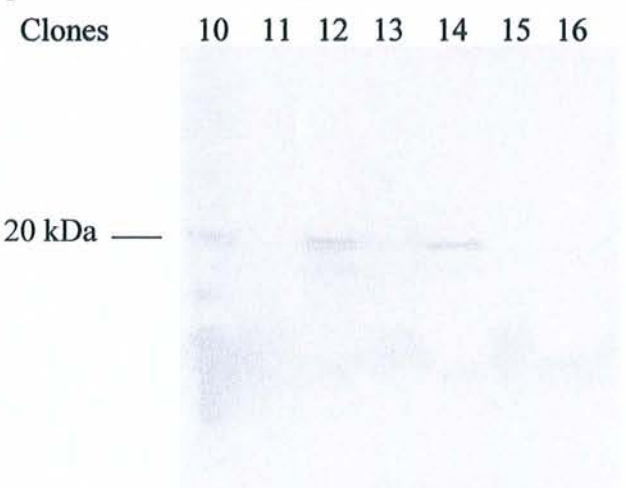


Figure 99 Expression du domaine IIIA de la SAH chez E. coli

Différents clones bactériens sont testés par Western blot à l'aide d'un anti-penta His

Un temps d'incubation de 4 h à 37 °C avec l'IPTG a donné un taux d'expression optimal de la protéine recombinante. La protéine n'est pas exprimée sous forme soluble mais présente en corps d'inclusion (Figure 100).

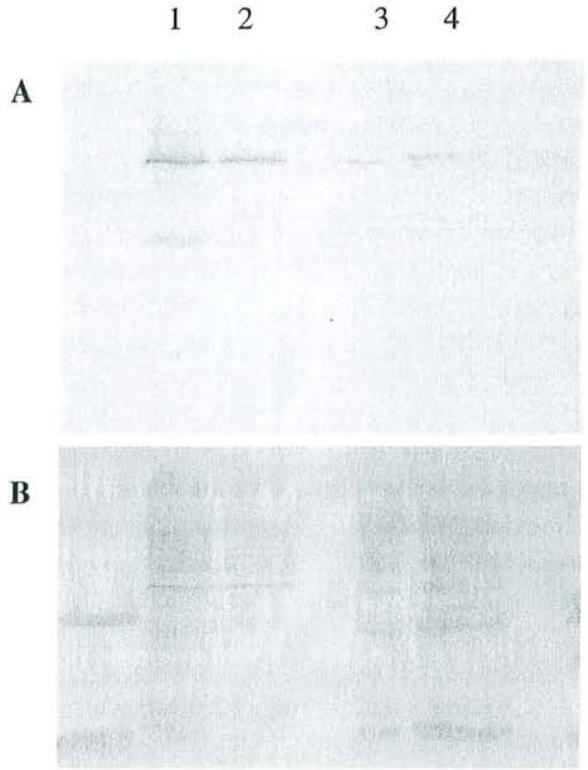


Figure 100 Analyse de la solubilité du domaine IIIA recombinant de la SAH

1, 2 : dépôt des corps d'inclusions obtenus par centrifugation à 12000 g pendant 20 min des cellules lysées par action du lysozyme et d'ultra sons. **3, 4 :** dépôt du surnageant de la centrifugation, correspondant aux protéines solubles. **A :** révélation à l'anti-penta His, **B :** coloration de la membrane au rouge ponceau

La purification de la protéine a été envisagée en conditions dénaturantes et non dénaturantes. En conditions dénaturantes, les bactéries sont lysées par agitation pendant 4 h dans l'urée 8 M à 20 °C puis l'extrait cellulaire est centrifugé pour éliminer les débris insolubles. Le clarifiat est alors directement déposé sur résine IMAC. Après lavages et élution, le produit de purification est dialysé pour éliminer l'urée. En conditions non dénaturantes, le clarifiat est dialysé pour éliminer l'urée avant le passage sur résine. Malheureusement, nous avons dans les 2 cas perdu une grande quantité de protéines, très probablement à cause d'un « cut-off » trop important de la membrane de dialyse utilisée (12-14 kDa).

Dans l'objectif de tester le mécanisme d'acylation proposé pour le domaine IIIA, impliquant R410, Y411 et S489, nous avons construit les mutants Ala correspondants. La position 489 est située en extrémité 3' de l'insert. La mutation a ainsi pu être simplement assurée par le primer. Les positions 410 et 411 sont en revanche en plein milieu de l'insert. Nous avons donc eu recours à la méthode d'extension par recouvrement (SOE, splicing by overlap extension, Figure 101). Les constructions ont été réalisées mais le clonage et l'expression sont en cours.

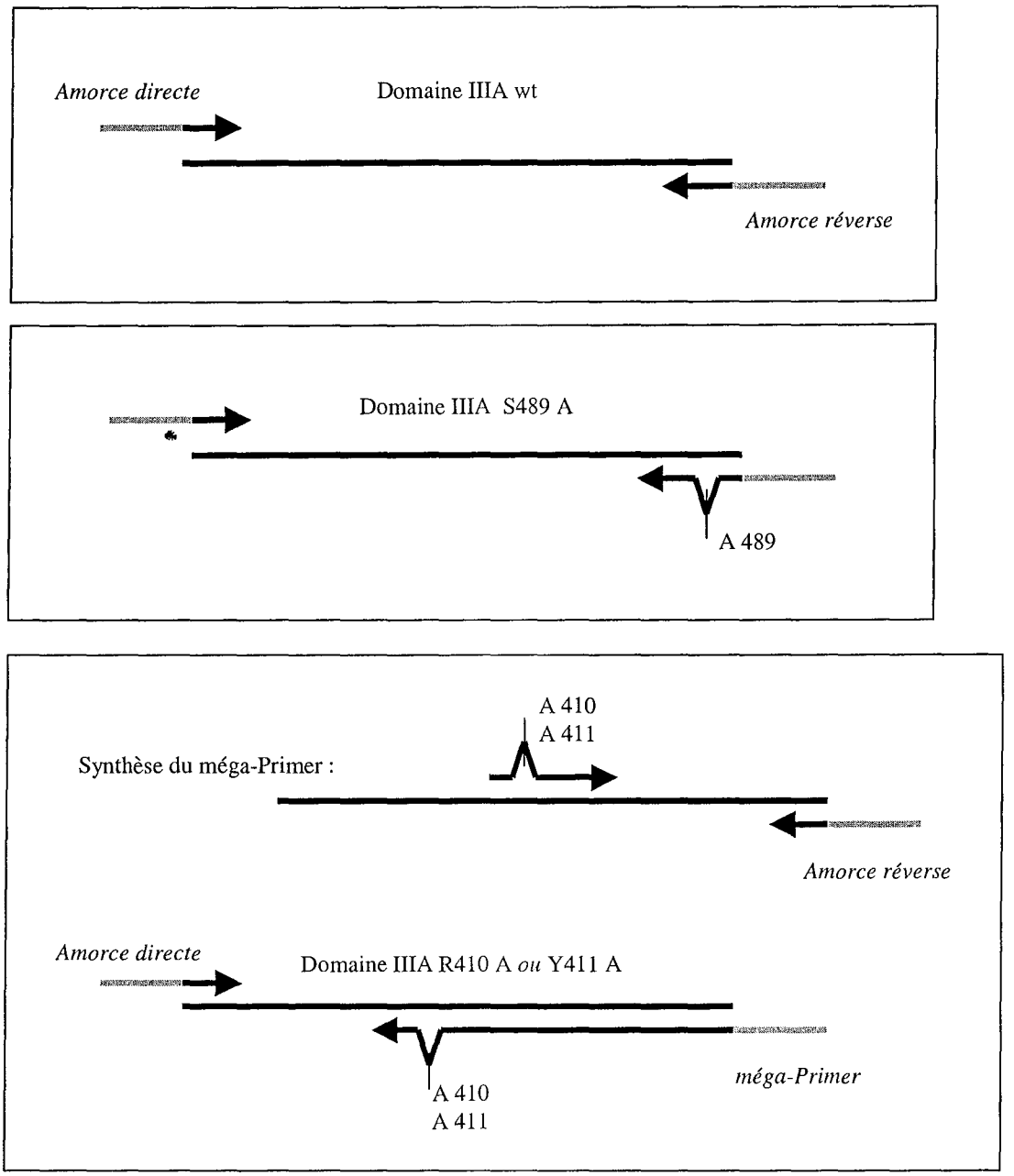


Figure 101 Principe de la construction des différents mutants du domaine IIIA de la SAH

E. 3. c) Implications fonctionnelles de la fixation des acyl-CoA : expression des DBD et LBD de PPARγ

Nous l'avons vu dans les rappels bibliographiques, le LBD de PPARα et γ fixe les lc acyl-CoA [729],[52], et les AINS sont ligands de PPARδ. Il y a donc tout lieu de penser que le LBD puisse fixer les acyl-CoA d'AINS. Le profil HCA du DBD des PPAR semble aussi pouvoir être aligné avec le domaine IIIA de la SAH. Nous envisageons donc de tester ces 2 domaines comme cibles potentielles du KPF-CoA, et de travailler à leur expression recombinante.

Afin d'être le plus spécifique possible de PPARγ, nous avons cloné les domaines en 2 étapes : **(i)** sélection de l'isoforme par utilisation de primers s'hybridant dans les régions les moins conservées des PPAR chez des cellules exprimant préférentiellement cette isoforme

(adipocytes), **(ii)** amplification de chaque domaine à partir de l'amplicon précédemment obtenu. Les 2 domaines ont été complémentés en 5' et en 3' pour insérer un tag His en Nt cette fois, afin de prévenir une obstruction du site de fixation du LBD et d'éloigner le tag au maximum de l'ADN en ce qui concerne le DBD (Figure 102).

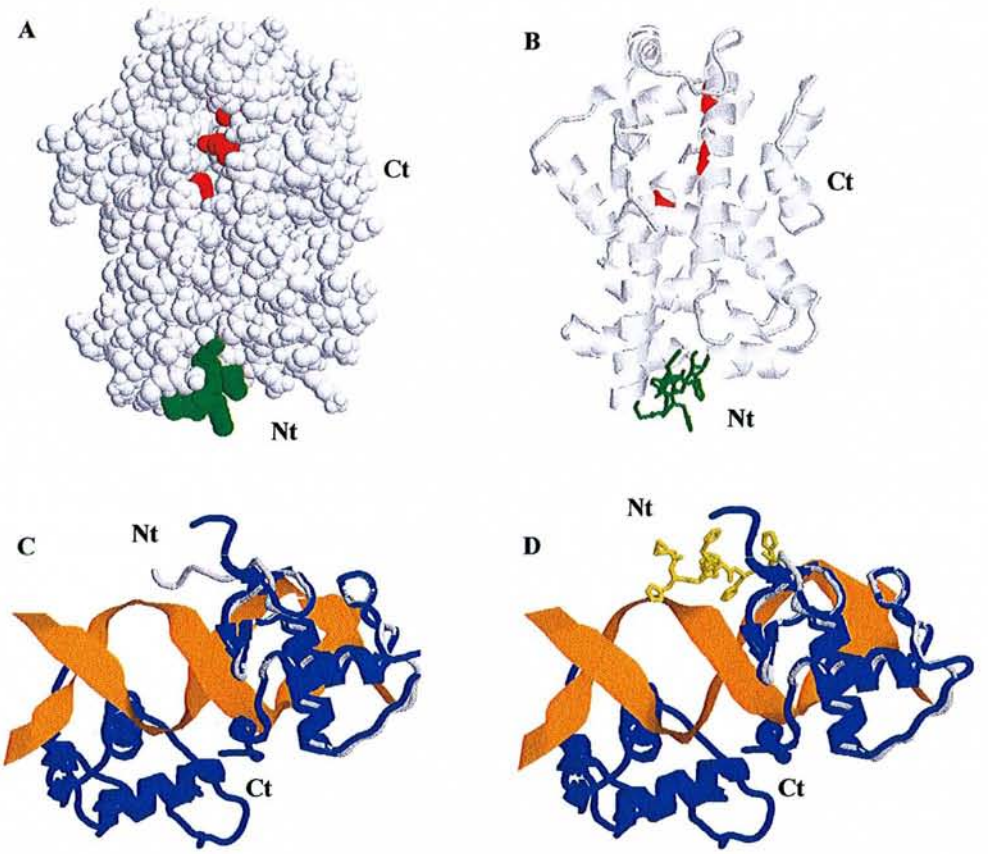


Figure 102 Modèle de structure tridimensionnelle des domaines de PPAR construits

A, B : 2 représentations du LBD, le tag est en gris clair et les résidus formant probablement l'entrée du site en gris foncé. **C, D :** complexe dimérique {ADN ; DBD}. Le DBD de PPAR a été obtenu par homologie avec RXR : la structure tridimensionnelle est modélisée d'après les coordonnées cristallographiques de RXR après mutation des résidus non conservés. Le monomère de droite est superposé à la construction portant le tag ; la superposition correcte suggère que la fusion n'interfère pas avec la capacité de fixation de l'ADN

Le clonage des 2 domaines a été réalisé selon les systèmes d'expression présentés Figure 103. On attend ainsi une protéine de 10,5 kDa pour le DBD et de 32 kDa pour le LBD. Nous n'avons pas encore confirmé l'expression des protéines recombinantes. La relative complexité structurale du LBD suggère en effet qu'il serait préférable d'obtenir une expression de la protéine sous forme soluble plutôt qu'en corps d'inclusion car le refolding pourrait être délicat. Il y a donc lieu d'optimiser les conditions d'expression des protéines recombinantes, en particulier en ce qui concerne la température de culture et la concentration en IPTG.

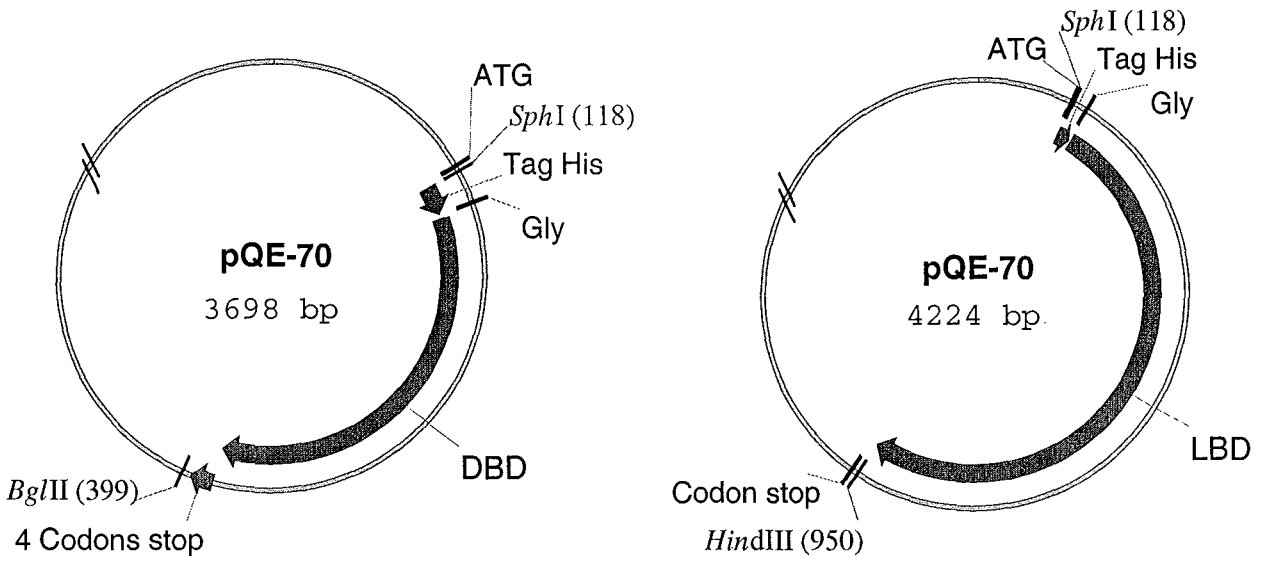


Figure 103 Schéma du système d'expression du DBD et du LBD de PPARγ

L'étude fine de l'interaction du KPF-CoA, voire d'acyl-CoA endogènes avec le sous-domaine IIIA de la SAH est assurément une étape cruciale pour démontrer la véracité et la pertinence biologique de l'ACBD. De même, l'analyse de son homologue chez PPAR permettrait de confronter notre hypothèse à un test fonctionnel, tout en se focalisant sur une cible pharmacologique d'importance majeure, en particulier quant à l'inflammation. Ces 2 approches de la caractérisation de l'ACBD n'ont malheureusement pas pu être amenées à leur terme dans le cadre de la présente thèse, mais ils constituent la mise au point des outils qui vont permettre la poursuite de l'étude.

E. 4. Identification de cibles particulières du KPF-CoA

Nous l'avons vu au paragraphe V_E. 3. a) la recherche de l'ACBD par l'utilisation des profils HCA constitue un outil de screening de sensibilité des protéines aux acyl-CoA, et nous permet de tester des protéines comme cibles potentielles du KPF-CoA, simplement d'après leur séquence primaire.

Certaines GST, comme celles de classe α décrites précédemment sont des candidats. L'incubation d'un pool de GST purifiées avec le KPF-CoA révèle effectivement une formation d'adduits. La faiblesse du signal suggère qu'une fraction seulement des protéines de l'échantillon soit acylée, en accord avec la spécificité d'isozyme prédite (Figure 104) ; il est cependant envisageable que cela ne traduise qu'une réactivité faible envers ces protéines.

L'hémoglobine est également cible du KPF-CoA. L'incubation de la protéine avec des concentrations croissantes d'hème n'a pas montré de compétition, ce qui signifie soit que le site de fixation de l'hème est différent du site de fixation de l'acyl-CoA, soit que l'hémoglobine utilisée était déjà sous forme holo (Figure 104).

La G6PDH est connue pour être inhibée par le palmitoyl-CoA. Comme le montre la Figure 104, elle est également adduite par le KPF-CoA.

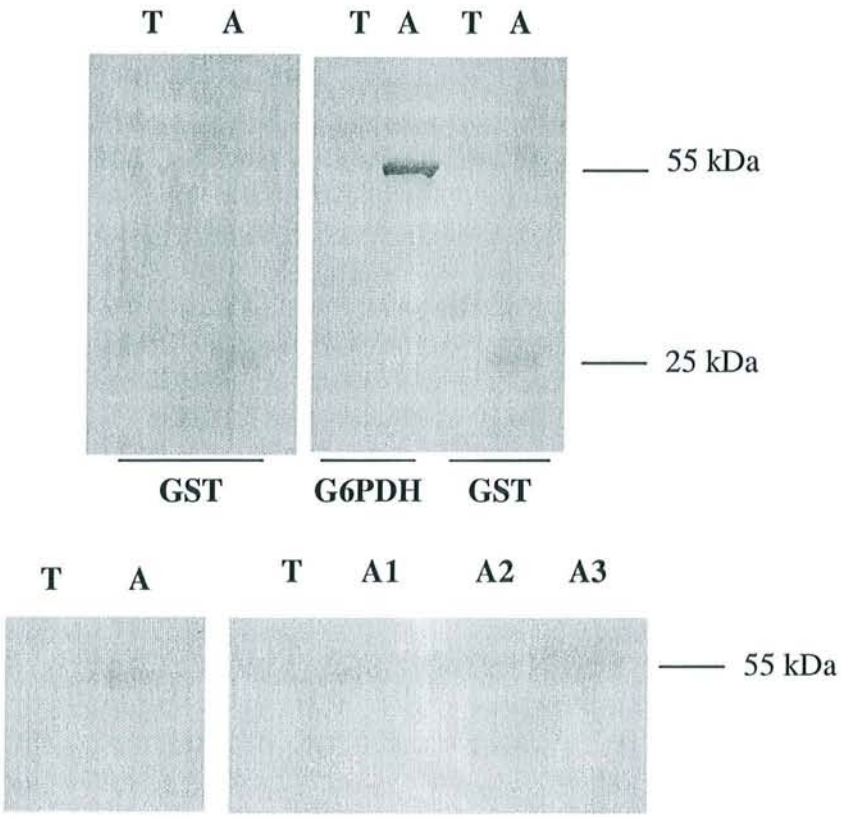


Figure 104 Acylation par le KPF-CoA de protéines solubles purifiées

5 μg de protéine purifiée est incubée 1 h avec le KPF-CoA puis analysée par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-KPF. On dépose à chaque fois la protéine seule (T) et la protéine mise en contact avec le métabolite (A). Les membranes supérieures montrent l'acylation d'un pool de GST et de G6PDH, les membranes du bas celle de l'hémoglobine. A1 à A3 correspondent à l'incubation de l'hémoglobine et de KPF-CoA en concentrations croissantes d'hème (0 ; 0,1 et 1 mM)

Mais nous l'avons vu, l'essentiel des cibles intracellulaires du KPF-CoA est constitué de protéines membranaires ; c'est donc plutôt parmi celles-ci que nous devons chercher nos cibles. Le mode opératoire se déroule en 2 étapes : **(i)** screening de séquences primaires de protéines membranaires pour rechercher l'ACBD, **(ii)** vérification expérimentale d'une acylation éventuelle par Western blot. L'expérience des COX nous a montré que l'utilisation de protéines purifiées pouvait provoquer des interactions artéfactuelles en ce qui concerne les protéines membranaires. Nous avons donc appliqué un protocole d'immunoprécipitation similaire à celui mis au point pour les COX afin de tester les prédictions de sensibilité.

Parmi les adduits de petite taille observés précédemment avec les adipocytes se trouvaient des protéines d'environ 20 kDa. Les cavéolines, en particulier Cav-1 sont bien exprimées par ces cellules et sont connues pour être palmitoylées. L'analyse de son profil HCA révèle la présence de l'ACBD en Ct. L'immunoprécipitation de Cav-1 à partir d'adipocytes incubés avec le KPF-CoA confirme qu'il s'agit là d'une cible (Figure 105).

Figure 105 Cav-1 est une protéine cible du KPF-CoA

Des adipocytes 3T3 intacts ont été incubés avec du KPF-CoA 0,1 mM. Après élimination du milieu, on solubilise les protéines avant de réaliser l'immunoprécipitation de Cav-1. L'analyse est obtenue par Western blot et révélation par l'anti-KPF. T : témoin constitué de cellules non incubées avec le KPF-CoA ; A : cellules en contacts avec le métabolite

La détection de cet adduit permet de confirmer l'exclusion des protéines acylées par le KPF hors des rafts observée au paragraphe V_E. 2. a) En effet, on peut détecter Cav-1 adduite dans les cellules mais pas dans les rafts, alors qu'il s'agit de sa localisation préférentielle. Il existe donc bien une incompatibilité entre acylation par le KPF et localisation dans les rafts, soit parce que l'acyl-CoA n'y accède pas, soit parce que cette modification chimique exclut les protéines des rafts.

Autre protéine porteuse de l'ACBD, ACS-1 est également adduite dans les adipocytes (Figure 106). Il est donc probable que cette enzyme soit normalement palmitoylée, et cette acylation pourrait être responsable de la translocation de l'enzyme dans les membranes. Nous avons vu en effet qu'une quantité très importante de la protéine est cytosolique, alors que l'essentiel de son activité enzymatique est membranaire [639].

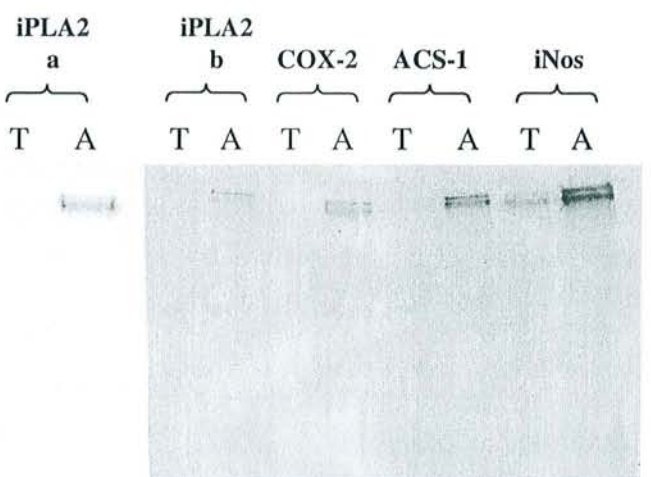


Figure 106 Identification d'adduits du KPF chez les adipocytes

Les cellules ont été traitées selon les mêmes conditions que la Figure 105

Nous avons ensuite orienté notre screening vers des protéines associées à l'inflammation. Parmi les PLA2, par exemple, la forme indépendante du Ca^{2+}, iPLA2 porte l'ACBD. Comme le montre la Figure 106, elle est effectivement acylée par le KPF. On sait qu'eNOS est palmitoylée, mais rien n'est décrit pour les autres isozymes ; or iNOS contient également notre domaine. Son acylation ne fait aucun doute, même si le témoin est légèrement marqué dans cette expérience.

On voit également sur la Figure 106 que les échantillons n'ont pas migré et sont restés bloqués à l'interface entre le gel de concentration et de migration. Une fois encore, c'est la labilité des adduits qui nous empêche d'utiliser des solutions de dépôt classiques, en évitant absolument le β-mercaptoéthanol. L'utilisation d'urée 8 M compatible avec les adduits ne permet pas de compenser l'absence de ce dénaturant. Il est donc fort probable que des ponts disulfures relient protéine, anticorps et protéine G, formant des agglomérats incapables de migrer. Nous n'avons donc pu vérifier l'efficacité de notre purification que sur des témoins traités au β-mercaptoéthanol. Dans ces conditions cependant, les protéines migrent correctement et une coloration de la membrane au rouge ponceau ne révèle pas d'autre protéine majeure, ce qui montre que la purification était efficace, et que nos adduits correspondaient bien aux protéines recherchées.

E. 5. Discussion

L'un des objectifs de ce travail était de chercher s'il pouvait exister un mode d'action des AINS supplémentaire à l'inhibition compétitive des COX, pouvant rendre compte de leur action anti-inflammatoire. La détection des adduits protéiques dus au métabolite KPF-CoA permet effectivement d'envisager la participation d'autres voies.

Par ce métabolite, dont l'apparition est favorisée au site inflammatoire par l'expression coordonnée de COX-2 et d'ACS-2 et –4, la cible prépondérante COX-2 est d'abord inactivée, et pas simplement inhibée comme elle l'est par la molécule parent (Figure 107).

Mais nous avons vu que d'autres protéines que COX-2 intervenant dans les processus inflammatoires sont acylées par le KPF-CoA. C'est le cas de Cav-1 qui régule les interactions protéines/protéines de la transduction du signal, en particulier entre récepteur, protéine G et Tyr kinases. Elle est également associée à iNOS et COX-2, pour laquelle on pourrait supposer qu'elle favorise les interactions avec d'autres enzymes de la cascade de l'AA (PGES, par exemple), ou cible la production enzymatique à un endroit précis (iNOS) [911],[912]. En acylant Cav-1, le KPF-CoA pourrait ainsi interférer avec ces voies et limiter ainsi la réponse inflammatoire (Figure 108).

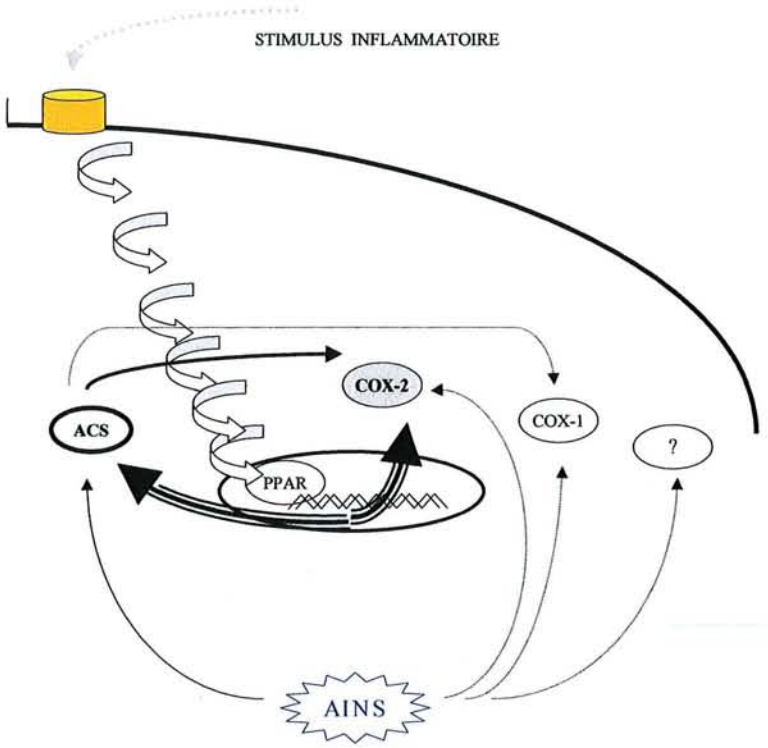


Figure 107 Effets des AINS et de leur métabolite acyl-CoA sur les COX

L'expression coordonnée de COX-2 et des ACS en réponse à un stimulus inflammatoire est ici signifiée par leur induction suivant la cascade des kinases. Les flèches pointillées symbolisent une inhibition réversible

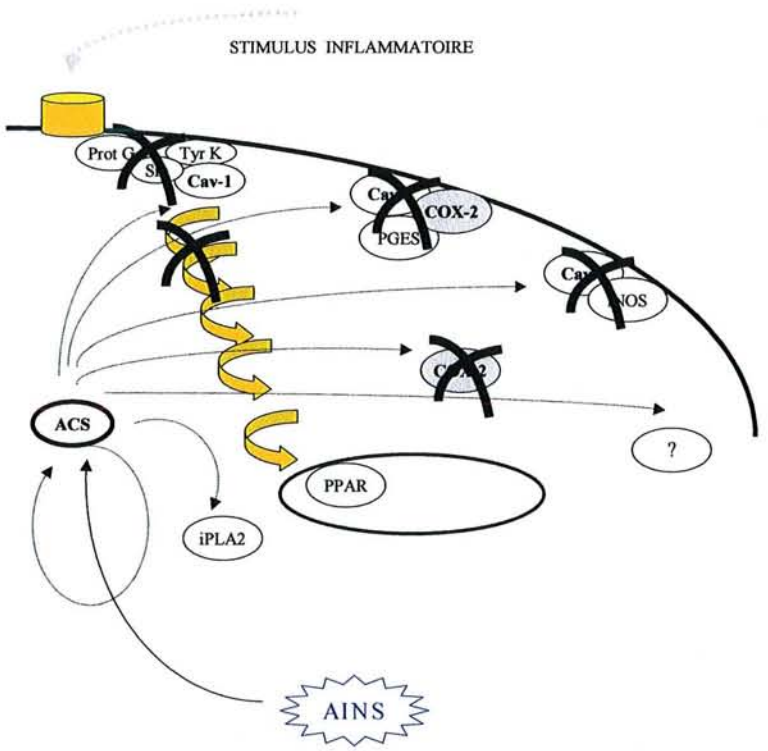


Figure 108 Effets des acyl-CoA d'AINS sur la réponse cellulaire inflammatoire

Les flèches pointillées symbolisent l'acylation. Les croix noires marquent les conséquences probables de l'acylation.

E. 6. Manuscrit γ

Adduct formation of ketoprofenoyl-CoA and identification of target proteins. Involvement and characterisation of a conserved palmitoylation domain.

soumis à *Protein Science*

Levoin N., Asensio C., Gand A., Giorgi M., Benoit E., Netter P., Lapicque F.

Adduct formation of ketoprofenyl-CoA and identification of target proteins. Involvement and characterisation of a conserved palmitoylation domain

Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used for the treatment of articular and inflammatory diseases. Their principal mode of action is through the inhibition of prostaglandin synthesis by cyclooxygenase (COX). COX exists as 2 isoforms, one constitutive, COX-1, and the second, COX-2, mainly inducible in response to inflammatory stimuli. Inhibition of the inducible enzyme is thought to be responsible for the beneficial properties of NSAIDs, while blocking the house-keeping functions of COX-1 would contribute to their gastro-intestinal side-effects. This explanation appears today too simplistic, since COX-1 is also involved in inflammation [1, 2], and COX-2 participates in the resolution of inflammation [3, 4]. Besides, several works suggest that NSAIDs have other targets than COX, that could also participate in beneficial and drawback effects of these drugs. Thus, an inhibition of sPLA2 by alminoprofen has been reported [5], as inhibition of the activation of αIIbβ3 integrin by KPF [6]. NSAIDs are also inhibitors of medium chain ACS [7], long chain ACS [8] and acetyl-CoA carboxylase [9]. Such a perturbation of fatty acid metabolism could be involved in topical damages observed for the drugs [10]. At the transcriptional level, R and S ibuprofen [11] as R and S flurbiprofen [12] inhibits activation of NFκB, as reported for aspirine and salicylate [13]. This should explain the inhibition of NO production associated with iNOS repression [14, 15]. NSAIDs seem to have also an effect on signal transduction, inhibiting phosphorylation of ERK 1/2 [16]. KPF inhibit migration and activation of PMN, via diminution of intracellular Ca^{2+} level and phosphorylation of the same kinases [17]. Enantiomers of other NSAIDs also diminish hydrolysis of anandamide in the brain [18].

Most NSAIDs are extensively metabolised as acylglucuronides by UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in liver. Glucuronidation is therefore the main metabolic pathway for their elimination into urine. Chiral inversion was shown for propionic NSAIDs, and occurs from the R enantiomer to its S antipode. This phenomenon points out another pathway involving the formation of a reactive thioester of coenzyme A (CoA), obligatory intermediate for this process. We speculate that these conjugated metabolites could participate in the pharmacological action of NSAIDs. In fact, these metabolites are highly reactive compounds and can form adducts with proteins : covalent attachment to plasma proteins of NSAIDs via their acyl glucuronides has been shown for many drugs, such as zomepirac [19, 20], carprofen [21], ketoprofen [22], fenoprofen [23], suprofen [24], ibuprofen and ibufenac [25]. Intracellular proteins also undergo acylation, as observed for rat microsomial proteins with acyl glucuronides of carprofen [26], and for human and rat liver UGT with acyl glucuronide of ketoprofen [27]. By contrast, the reactivity of CoA thioesters of drugs has been far less investigated: only Medica 16, nafenopin and bezafibrate were reported to bind covalently membrane and cytosolic hepatocyte proteins [28, 29]. Retinoate is also incorporated into proteins via acyl-CoA [30, 31].

We hypothesised that these various reactive metabolites should explain misunderstood safety discrepancies between NSAIDs and interspecies and interindividual differences in response, as well as define other mode of actions than competitive COX inhibition. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the potency of NSAIDs acyl-CoA to form adducts with proteins and to identify the targets, using ketoprofen (KPF) as a model drug. By trying to identify these targets, we discovered a conserved domain probably involved in palmitoylation of proteins.

Subcellular localisation of adducts

Incubation of intact 3T-L1 adipocytes resulted in an important adduct formation, as revealed by western blot using anti-KPF antibody. A particularly strong labelling was observed for proteins between 50, 55, 70, 85, 90 and 150 kDa, but a large number of proteins were also revealed in the range of 50-150 kDa (Fig. 1A). By contrast, few small proteins were detected near 20 and 40 kDa (Fig. 1B). Incubation of cytosolic and particulate fractions of cells with KPF-CoA clearly showed that a great majority of adducts are membrane proteins (Fig. 1C).

Acylation of proteins is often involved in rafts localisation, so we look forward if KPF acylation was associated with membrane rafts. After incubation of intact cells, DRM were prepared [32]. As seen in Fig. 2A, very few proteins were detected in fraction corresponding to rafts (fractions 2-3, as revealed by Cav-1 presence [33]), by comparaison with fractions corresponding to solubilised membrane proteins (fractions 7-8). Only 4 bands were detected between 15-20 kDa and none besides 30 kDa (Fig. 2C). None of the small proteins correspond to Cav-1 which is undoubtedly bigger than acylated proteins (Fig. 2D)

Thus, it appears that (i) either KPF acylation occurs almost only with proteins absent from rafts, (ii) or acylation exclude proteins from rafts. Indeed, one know that fatty acid composition dramatically affects rafts localization of proteins [34].

Identification of some proteins interacting with KPF-CoA

The first trail we followed to identify most noticeable bands was to test if proteins that interact obviously with KPF-CoA could be involved in adduct formation. First of these is of course the enzyme responsible for synthesis of the compound, in particular ACS-1, which is the most effective towards aryl-propionates (specific activity for R-ibuprofen of 18 % that for its best substrate palmitate [35], compared with 9 % for "R-ibuprofenoyl-CoA synthetase" [36]). In fact, several enzymes are thus inactivated by their own products, as COX [37, 38], P450 cytochromes [39, 40] or UGT2B1 [41]. We conducted immunoprecipitation experiments in order to preserve the membrane environment of our candidate proteins during the incubation of intact cells with KPF-CoA, and avoid the release of cryptic sites. Moreover, this allowed to respect the relative affinities of cellular proteins for KPF-CoA. As shown in Fig. 3, we effectively purified acylated ACS-1. We have recently demonstrate that the target of NSAIDs, COX-2, was inhibited selectively and irreversibly by KPF-CoA in J774.2 macrophages [42]. The inhibition was due to an acylation occurring in the active site. In adipocytes, we also detected adducts with COX-2 (Fig. 3). ACS-1 and COX-2, two proteins of about 75 kDa might be at the origin of the strong labelling observed at this level in Fig. 1. However, it is known that COX-2 colocalize with Cav-1 in rafts [43]. That we did not observe any protein between 70 Kda in DRM (Fig. 2C) suggests again either that raft COX-2 could not be a target of KPF-CoA or that acylation exclude COX-2 from rafts.

Endogenous as well as xenobiotic acyl-CoA are taken up by different acyl-CoA binding proteins, of whose ACBP strictly speaking. This small protein of 10 kDa sould constitute another target. KPF-CoA is actually ligand of the recombinant rat liver form, but this interaction did not result in adduct formation, as revealed by western blot (data not shown). This clearly shows that proteins interacting with KPF are likely to form intracellular adducts via KPF-CoA. However, all these proteins are not sensitive to the reactivity of the metabolite, arguing in favour of that observed acylations are not only due to the strong

chemical reactivity. Such a mechanism requires a binding site for acyl-CoA but also "catalytic" residues.

Characterisation of KPF-CoA binding

KPF-CoA is an amphipathic compound, so we tried to characterise its proteic binding site by searching which moiety of the molecule, parent drug or CoASH was recognized. We conducted competition experiments using KPF, CoASH and derivatives of CoASH. The electrophoretic profile of hepatic microsomes pre-incubated with KPF before KPF-CoA did not reveal clear competition, contrary to pre-incubation with CoASH which made near all the band to disappear (Fig. 4). Desulfocoenzyme A, AMP and panthetine also inhibited adduct formation, suggesting that the common portion pantheteine is the crucial component for binding. This is in agreement with most resolved complexes of acyl-CoA/protein: even if no common feature could be detected, one of the principal interactions are those involving phosphates [44, 45, 46]. The large majority of target proteins thus recognize (i) rather CoASH part than the acyl (ii) or chronologically first the CoASH then the acyl. The second hypothesis is all the more probable than all the proteins that bind acyl-CoA keep the CoA moiety at the periphery of the protein, the acyl being hide from the solvent. Pre-incubation with CoASH provokes certainly an obstruction of the acyl binding site, whereas occupation of the hydrophobic site by KPF would not interfere with later binding of KPF-CoA to the CoA binding site then adduct formation.

Incubation of microsomes with NEM before KPF-CoA, with hydroxylamine or mercaptoethanol after KPF-CoA, or treatment of transferred membrane with hydroxylamine resulted in a large loss of labelling (Fig. 4). Near all the proteins are thus acylated by thioester or oxyester bounds but very few amides. The very important number of revealed proteins made us think that they are probably palmitoylated proteins in vivo. Palm-CoA essentially, but other endogenous acyl-CoA too (linoleyl-CoA, oleyl-CoA, arachidonoyl-CoA) are thus responsible for the acylation of many proteins, especially membrane one. Pre-incubation of microsomes with Palm-CoA clearly showed a competition, confirming that most of acylated membrane proteins are likely to be palmitoylated in vivo. Moreover, incubation of microsomes with ibuprofenyl-CoA (and revelation with anti-ibuprofen antibody) resulted in the same labelling than KPF-CoA, as if the acyl chain binding site was not very compeling. It seems thus that NSAIDs-CoA could act as mimics of Palm-CoA or other endogenous acyl-CoA in acylation of proteins.

Finally, incubation of microsomes with KPF + ATP + CoASH resulted again in the same labelling, as a proof that acylation we underlined are not the only fact of an excess of acylating agent in the medium but rather reveals the pool of possible palmitoylated proteins.

Definition of KPF-CoA binding domains in HSA

By characterising acylation of proteins by KPF-CoA, we conclude that this metabolite could act as a mimic of endogenous acyl-CoA, in particular Palm-CoA. The identification of target of KPF-CoA thus correspond certainly to determine whose proteins are palmitoylated in vivo. Many membrane proteins are known to be modify by fatty acids, as G proteins [47], Src kinases [48], or GPCR. Neither structure nor sequence consensus has been reported for palmitoylated region of the proteins; it is thus impossible to predict if a protein is acylated or not. In the absence of conserved primary sequence, we nevertheless ask if it could be possible to find a domain or a common topology for these proteins. In that purpose, we turned towards

a transporter that binds hydrophobic ligands of varying structure, as diverse acyl-CoA: albumin. It presents actually 6 binding sites for Palm-CoA, of whose two of high affinity [49], one of them is bilirubin binding site [50]. That way, we characterised binding of KPF-CoA by HSA as a model protein.

Incubation of HSA with KPF-CoA resulted again in an important adduct formation since acylation rate (% adduct KPF / initial KPF-CoA) is near 100 %. Different concentration of HSA revealed that acylation rate is near maximal from 5 g/L, with 75 % adducts (Fig. 5). KPF-CoA concentration did not modify this rate with 1g/L HSA, constant at 40 %. Finally, kinetic of acylation is rapid (< 5 min) and adducts formed are stable at least 90 min in these conditions (data not shown). Pre-incubation of HSA with non acylating analogue of KPF-CoA [51] inhibited at 45 % the adduct formation. This confirm that acylation requires the previous specific binding of KPF-CoA and is not solely due to its chemical reactivity.

It seems reasonable to suppose that KPF part of the molecule is bond at least in the xenobiotic binding sites located in subdomain II A and III A [52]. Besides, KPF glucuronide has been reported to be bound on site II, interacting with K199 [53, 54]. In the complex HSA:myristate:TIB, Curry et al. defined site II A and III A as medium chain fatty acid binding sites [55], and it was shown that long chain fatty acid [56] and acyl-CoA binding sites was the same that fatty acids one [57]. We have thus studied interaction of these two sites with KPF-CoA by molecular modelling. Docking experiments allowed to conclude that these site (TIB1, Myr 3 and Myr 4 in PDB: 1bke) are effectively compatible with KPF-CoA binding and acylation reaction. H bonds networks might actually be responsible for activation of nucleophilic residues. TIB1 and Myr4 sites appeared as particularly good candidate, as far as steric constraints are concerned, for the fixation of the voluminous and polar CoA. Docking of KPF-CoA on these sites is illustrated Fig. 6. Interatomic distances measured clearly suggested that acylation might occure via K199 and Y411. The mechanism proposed for site III A agrees well with photolabelling experiment [58] and mutagenesis studies [59], showing involvement of R410 and Y411 on the binding of KPF. To test this theorical approach, we focused on the best candidates sites of TIB1 and Myr 4, and their nucleophilic residues K199 and Y411. Specific chemical modification of these amino acids confirmed docking results since we quantified a loss of adduct formation of 25 % with acetylated K199 and 16 % with nitrosylated Y411.

We have thus identified two covalent binding sites of KPF-CoA to HSA and their "catalytic" residues. In our optic of using these domains as archetypes of acyl-CoA binding domain (AcBD), we continued with two different but complementary ways: (i) we looked for sequence analogies between the two HSA domains and proteins known to interact with long chain acyl-CoA, (ii) we searched for structural homologies with folds of these domains, restricting them to their probable minimum structural requisite. We were then surprised to observe that minimal folds of TIB1 (209-291, K199) and Myr 4 (401-489, Y411) binding domains were identical (rmsd=1.53 Å for Cα of the 70 most structured residues), confirming that this could be the minimal fold for acyl binding (Fig. 6'). This domain is constituted of 3 small α helices overhanging a core of 2 anti parallel helices, the acyl binding site being situated in the hydrophobic pocket formed at the interfaces of the helices. The size of the overhall fold is 38 * 30 * 18 Å, with a PM of near 10 kDa.

Common 2D domain in proteins interacting with acyl-CoA

Automatic alignment methods (BLAST, Φ/Ψ BLAST) did not permit to detect significant analogies in protein data banks, neither multiple alignment between different proteins. So we turned towards bidimensional sequence analysis method HCA, especially used for weak homologies in the "twilight zone" of sequence similarity [60, 61].

First, we searched for the presence of the 2D AcBD of HSA in proteins known to be acylated or to bind long chain acyl-CoA. On knows that GSTα but neither π nor μ isozyme binds various acyl-CoA, from C8 to C18:2 [62]. Analysis of HCA plot of GST A1-1 (P08263) revealed the presence of the putative AcBD in the region (70-185) (Fig. 7). This 2D domain is conserved in GSTα, π and μ of many animal species, but the "catalytical" pair RY79 is lacking in GST π (TL) and all μ human isozymes (KH) (Fig. 8). As presumed by the presence of the "catalytic" pair, incubation of purified GST resulted in adduct formation, as revealed by western blot (Fig. 3). Weakness of the labelling clearly suggested that not all GST isoforms present in the fraction were target of KPF-CoA.

Some cobra venom PLA2 are acylated in certain circumstances, and adducts were only observed with *naja mossambica mossambica* (P00604) enzyme and not with *naja naja naja* (P15445) [63]. Both enzymes presents a very similar HCA plot, close to our albumin probe. The position of the "catalytical" pair is here occupied by CY27 in both enzymes. However, *mossambica* presents a K33 close to the pair instead of S33 of *naja* (Fig. 7). This position is include in the region of WW19 whom fluorescence quenching made suggest that it is the acyl binding domain. Snake venom PLA2 of other species (*austrelaps*, *bungarus*) as well as pancreatic PLA2 have all S33 of *naja*.

FadR is a nuclear receptor of E. coli, accepting acyl-CoA as ligand and regulating the transcription of many genes of fatty acid metabolism [64]. Ligand binding site is located in Ct [65]. HCA plot of the receptor (P09371) shows it also contain the AcBD in the Ct region (170-238), with the apparent pair HY171 (Fig. 7). Thus sequence alignment by their HCA profile confirms the relevance of our probe, since it allowed the localisation of the region of acyl-CoA binding (FadR, GST) and suggested probable residues involved in acylation of venom PLA2.

Common fold in proteins interacting with acyl-CoA

Then we search if similitude in HCA profiles could be correlated to the conservation of the fold observed in HSA. AcBD from HSA was thus submitted to the program DALI [66, 67]. In accordance with HCA, DALI found some structural homology with GST (score z = 3.7) and FadR (more precisely with its homologue tetracycline repressor (z = 3). The inverse operation, i.e. testing region of these proteins detected by HCA, confirmed 3D similarity with AcBD of HSA: FadR (z = 3.8), GST A1-1 (z = 3) and venom PLA2 (z = 2.7). This suggests that beyond the conservation of hydrophobic clusters, our proteins might share a precise domain in common. Analysis of crystal structures confirms this hypothesis: DALI described a good homology between AcBD of HSA and a fungi P450 cytochrome (P23295) with z = 4.2. Crystal structure (PDB: 1rom) clearly comprises the domain. SY151 pair being in the same environment that RY411 of HSA (Fig. 9). DALI reported another good homology with FK 506 binding protein (FRAP, P42345, PDB: 1nsg) with z = 3.4, which is glaring in Fig. 8. As far HCA tested proteins are concerned, the conservation of the global fold is confirmed too, even if some divergence appear: the region 68-190 of GSAT A1-1 (PDB: 1guh) with RY79 pair, region 1-105 of venom PLA2 (PDB: 1a3d) with CY27 pair, region (137-228) of FadR (PDB: 1h9g) with R105 Y179 pair (In 3D structure, R105 appeared as a better partner for Y179 than previously suggested H178, Fig. 9).

Many known palmitoylated proteins belong to the superfamilly of GPCR. Transmembrane proteins are resistant to crystallisation so it is difficult to look for the presence of our AcBD, with the exception of rhodopsine. This classical seven-pass protein is palmitoylated on C322 et 323 [68]. Recently, crystal structure of palmitoylated bovine rhodopsin was obtained (PDB: 1hzx) [69]. As shown in Fig. 9, palmitate surrounding region is not far from AcBD. This structure suggest clearly rather a convergent evolution for acyl binding than divergent since the fold is here constituted for a half by Nt of a mer and by Ct of the other mer for the second half. Besides, we did not see any clear correspondence between postiton and length of the exons of analysed proteins (with some exception, as for P450). This crystal structure being unique in GPCR, it is difficult to assert that AcBD is conserved among palmitoylated receptors, but its is certainly true for CCR-5 (acylated on C321, 323, 324 [70, 71]), endothelin B (C403, 405 [72]), α2 adrenergic receptor (C442 [73]) and histamine H2 receptor (C305 [74]), if we consider the strong topohydrophobic clusters conservation between them (Fig. 10). We could thus predict that PGI2 receptor, for instance, known to be isoprenylated in C414 [75] is probably palmitoylated on C308

As most of acylated proteins, GPCR are palmitoylated on Cys, and involvement of a pair basic residue/Tyr had never been shown. However, thioacylation did not account for all acylations: Wolff et al. [76] sowed that if 70 % of covalent bounded palmitate to tubulin are thioesters, 15 % are oxyesters and 10 % amides. Besides, it has been shown that residues basic/Tyr situated before Cys allows stronger acylation of this amino acid [77], presumably by activating its nucleophily. His and Tyr are also activators of adduct formation on Lys [78]. Mechanism of acyl transfer from RY to Cys should also be envisaged as it has been shown for acetylation of ubiquitine [79]. At last, HSA itself, where AcBD is sometimes acylated via Tyr (Y411), sometimes via Lys (K199) shows that "catalytical" pair RY that we used as an anchor for HCA alignments is only a particular case. Basic residues rich regions, as frequently observed in GPCR near acylated Cys should constitute another mechanism to activate the nucleophily of Cys, the only invariant factor being the AcBD fold itself.

Use of HCA profile as a tool to predict KPF-CoA acylation

It is now clear that HCA profile of HSA subdomain IIIa constitute a good probe to detect interactions with long chain acyl-CoA. So we will use it as a predictive tool to identify KPF-CoA target proteins.

As discussed above, GSTα are likely to be acylated by acyl-CoA. Incubation of purified GST resulted indeed in adduct formation, as revealed by western blot (Fig. 13). Weakness of the labelling implies that not all GST isoforms present in the fraction were target of KPF-CoA.

Analysis of cellular adducts (Fig.1) showed a strong labelling of small proteins between 20 kDa. Caveolins, in particular Cav-1 (Q03135) is a protein of 22 kDa, reported to be palmitoylated on C133, 143 and 156 [80]. As shown in Fig. 11, Cav-1 carries AcBD in the region (84-178) of Ct, with KY97 S168 triad. HCA plot illustrates clearly that known palmitoylated Cys are inclusive in predicted AcBD. As discussed for GPCR, involvement of Cys in acylation is not incompatible with RYS triad, either trough a base-assisted mechanism for Cys activation, either by an acyl transfer from KY to Cys. Immunoprecipitation of Cav-1 in KPF-CoA incubated adipocytes demonstrated KPF acylation (Fig. 3).

Thus, Cav-1 (α and/or β), and perhaps Cav-2 (which carries also the AcBD) was among our target proteins, certainly of those observed between 20 kDa. Cav-1 is predominantly present in rafts (***Refs***). However, Fig. 2D showed that though being present in our DRM preparation, Cav-1 was not acylated here. This clearly suggests that chemical modification by KPF has displaced proteins (at least Cav-1) from rafts. Palmitoylation of Cav-1 is involved in many biological events, as caveolae localisation [81], signal transduction with partner as Src [82], and allows interaction with effectors as oestrogen receptor α [83]. Competition with palmitoylation and exclusion from rafts by acylation might thus have dramatic consequences in stimulus response of cells in contact with NSAIDs, and could certainly participate in the modes of action of these drugs.

Cellular and microsomial adducts revealed a strong labelling around 80 kDa. Besides COX-2, 80-85 kDa PLA2 might correspond to this adduct. In fact, Fig. 12 shows that group VI iPLA2 has the AcBD HCA profile, with the triad RY132 S202. The domain overlaps 4th, 5th and 6th ankyrin repeats [84]. It is thus unlikely that this region share the precise fold of HSA AcBD, but helical ankyrin repeats could adopt a 3D topology well-suited to form the AcBD. As shown in Fig. 3, immunoprecipitation of iPLA2 confirmed it is another target of KPF-CoA. Chemical modification of iPLA2 on ankyrin repeats will certainly have consequences on its ability to interact with other proteins or to oligomerise into active tetramer [85] or on the contrary to dissociate from inactive cluster as IV cPLA2 [86]. Membrane insertion could also be concerned, as for ankyrin itself [87]. This possibility is all the more probable that iPLA2 seems to be both cytosolic and membrane associated [88, 89].

We had initially supposed and demonstrated that ACS-1 is also acylated. Without surprise, it carries also the AcBD in Nt, with RY9 pair (Fig. 10). Among the 4 other isozymes of ACS, only ACS-2 shares this Nt; it is thus very likely that only ACS-1 and 2 are KPF-CoA targets, and could be palmitoylated in vivo. A consequence of this adduct is perhaps membrane translocation since ACS-1 is essentially cytosolic whereas its activity is mostly in membranes. This should constitute a specific way of regulation of ACS-1 and ACS-2. Besides, ACS-4 and 5 are exclusively membrane associated [90]. Involvement in precise subcellular localisation could also be considered, as nuclear one [91, 92].

Cellular adducts showed at last an important labelling near 150 kDa. eNOS is a palmitoylated protein that should constitute this mark. However, its HCA plot is not compatible with AcBD. On the other hand, inducible isozyme iNOS seems a good candidate, since we can detect spaced out clusters 2, 4 and probably 3 of our probe in Nt (Fig. 12). The domain is laied out but shorter than AcBD: it begins with cluster 2, after RY pair. However, this first cluster carries neighbouring R10Y15 in 2D near C3 in iNOS. It is likely that it constitute a huddled variant of our fold. Fig. 3 shows actually acylated iNOS in adipocytes. Palmitoylation of the only endothelial form of NOS was known, but one can suppose the same implications for that of iNOS: membrane translocation and caveolae colocalisation [93, 94], protein / protein interaction leading to activity regulation, as with inhibitor NAP110 fixing Nt of iNOS [95], or colocalisation with COX-2 [96] to regulate it [97].

Detection of the AcBD allows on the one hand to predict the sensitivity of a protein to acyl-CoA (interaction or even acylation), on the other hand to precise residues interacting with the ligand. Thus we can predict that *mossambica* venom PLA2 is certainly acylated via the triad CY27 K33. In view of the position of these residues compared to the active site and membrane interacting region, we can suppose that acylation increase membrane affinity. For GST, analysis of crystal structure reveals that the AcBD region form actually an hydrophobic pocket. This site is different from active and ligandin sites [98, 99]. It is constituted by side chain of I99, I106, L107 and Y166. It is certainly the acyl-CoA binding site since it is not accessible in GST π, obstructed by I203 and N209 (Fig. 11).

Structural similitude detected between FRAP and AcBD suggest that it could share the same function. Such an interaction with acyl-CoA should explain regulation of RyR by acyl-CoA [100, 101]. This regulation act probably via partner protein, as FKBP12 [102]. FRAP should thus be added to the model proposed by Fulceri et al., the acyl-CoA being not directly bound to FKBP 12 but to FRAP, itself associated with FKBP 12 and RyR. It is worth noting that effect of acyl-CoA on RyR seems not to require acylation [103], in agreement with the absence of "catalytic" pair +Y in FRAP.

Interaction of FadR with long chain acyl-CoA is strong (Kd = 45-70 nM for oleyl-CoA [104] and myristoyl-CoA [105]) but we did not know if it is covalent or not. However, affinity for Palm-CoA is weaker than for other acyl-CoA (Kd = 370 nM), though this ligand is 50 times more efficient than myristoyl-CoA in inhibiting binding to DNA [106]. It is thus probable that non covalent binding observed for myristoyl-CoA should be different from interaction with Palm-CoA [107]. On the other hand, the most nucleophilic residue close to the thioester function of myristoyl-CoA, R105 form salt bridge with D145, that should lower its nucleophily and inhibit adduct formation [108].

Conclusion

Acyl-CoA of certain xenobiotics as fibrates are known for their reactivity leading to adduct formation with proteins. Unfortunately none of these protein had been identify. We have recently demonstrate that KPF-CoA was abble to inhibit COX-2 by acylating it. Then we extended this study by searching if this metabolite could have other targets. In the present work, we related that KPF-CoA is at the origin of covalent binding of KPF to many membrane proteins. In the aim of identifying these targets, we characterised 2 acylation sites on HSA, used as a model protein. These sites are fatty acid binding sites in subdomain IIA (K199) and IIIA (RY411), and share exactly the same fold. This domain appeared then as an archetype of acyl binding domain: AcBD.

AcBD had been discovered in many proteins known to be palmitoylated in vivo, by the use of HCA profile and analysis of their 3D structure. AcBD shown by HCA had been associated with the fold of imputed domain of HSA. Thus alignment of HCA lots were used as a predictive tool to detect AcBD in proteins, with the only need of primary sequence. Among membrane acylated proteins by KPF, we found Cav-1, ACS-1, iNOS and iPLA2. Some cytosolic proteins also carries the AcBD: GSTα, fungus P450 and FRAP.

This study suggests the conservation of AcBD among palmitoylated proteins. Works are in progress in our lab to demonstrate this by expressing recombinant isolated AcBD from HSA and other proteins. Mutagenesis experiments are also conducted to define the precise role of "catalytic" triad RYS. This could be usefull to clarify the origin and significance of palmitoylation, which is a subject of controversy: it is not clear, for instance, if it constitute an auto-catalytic process or if it is enzyme associated. Proteins are thus described as auto-acylated, as PLP [109], G proteins [110], Giα [111] and SNAP 25 [112], whereas palmitoyl-transferases were purified for Giα [113] and Po [114]. Works underlines that primary sequence of synthetic peptides should be sufficient for auto-acylation (P231/Ras [115], Src kinases [116], Po [117] and P63 [118]), whereas other works demonstrate that native protein structure is required (Giα [119], tubulin [120], PLP [121], phospholipase D1 [122], PKc [123], rhodopsin [124]). It appears in fact very tricky to analyse these studies since none had compared the efficacy of peptide acylation with that of

native protein. Moreover, ACBP can inhibit autoacylation of Lck [125] and G proteins [126], but it has no effect on Yes [127] and CPT-I [128].

The consequences of protein acylation is also very variable [129]. Membrane insertion is often pointed out (histamine H2 receptor [130], SNAP 25 [131], pro-TNF [132]), indeed membrane translocation (P21/Ras [133] and tubulin [134]), leading to an activation (PKc [135], venom PLA2 [136]) or an inhibition of the enzyme (Gsα [137], eNOS [138]). Precise subcellular localisation as localisation into rafts have also been reported for certain proteins (G0iα [139], neurofascin [140], tubulin [141]), probably associated with signal transduction (PGI2 R [142], endothelin B [143]). The influence of palmitoylation on protein/protein interactions was also shown for PKc [144], eNOS [145], caveolin [146] and ankyrin [147] as well as the coordinate regulation of acylation for G11α/GPCR [148] or β adrenergic receptor/GPCR [149]. Surface expression (CCR-5 [150], thyrotropin receptor [151]), mobility in membranes (CCR-5 [152]), endocythosis (transferrin receptor [153]) had also been associated with acylation. Studies with AcBD will undoubtably highlight this intricate biochemical process.

To conclude, we underline in this paper the conservation of a 3D domain in target proteins of KPF-CoA. It is very likely that this domain constitute a Palm-CoA binding domain, involved in palmitoylation of proteins. We have validated a predictive tool for the detection of this domain in proteins, solely from primary sequence. This tool appears of importance since no consensus sequence existed and it was until now impossible to predict if a protein could be palmitoylated.

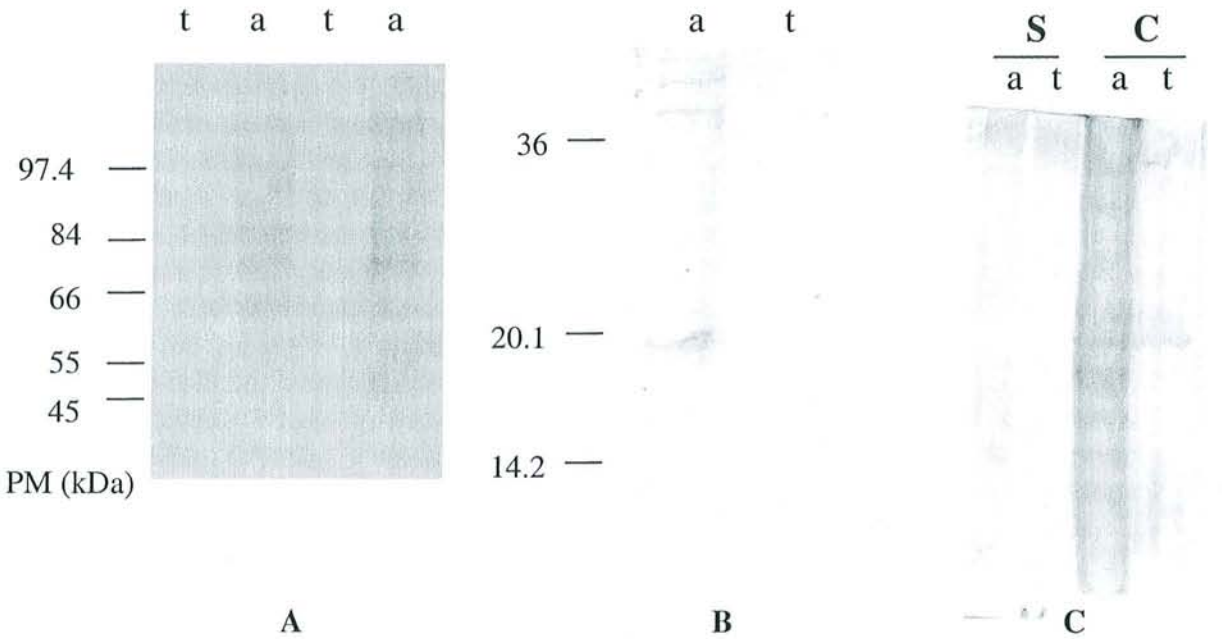


Fig. 1 Subcellular localization of KPF adducts. A: intact 3T3-L1 adipocytes were incubated with 0.1 mM KPF-CoA, then cellular extracts were analysed by SDS-PAGE using anti-KPF antibody. **A:** on a 9 % acrylamid gel, **B:** on a 13 % acrylamid gel.
C: 0.1 mM KPF-CoA were incubated with cytosolic fraction of 3T3-L1 adipocytes (**S**) or microsomial fraction (**C**). **t**: control, **a**: incubation with KPF-CoA.

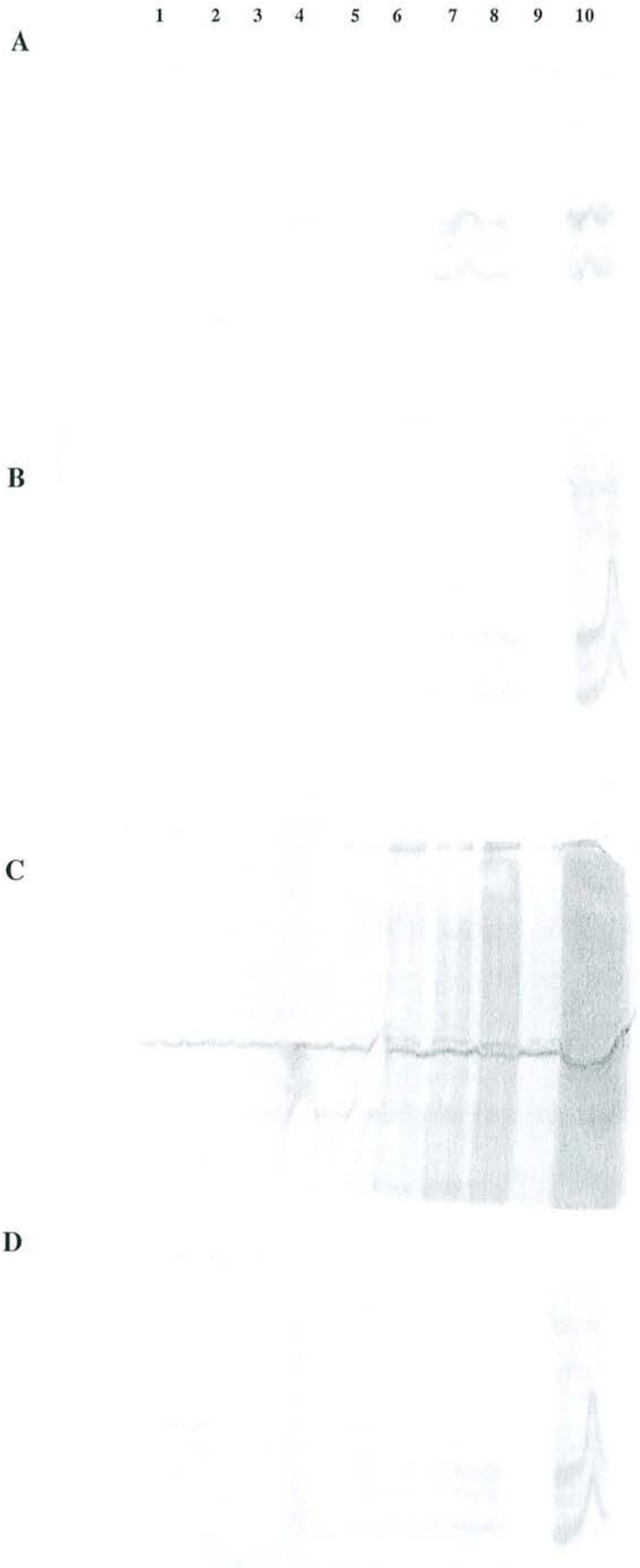

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
A
B
C
D

Fig. 2 Intact 3T3-L1 adipocytes were icubated with 0.1 mM KPF-CoA for 2h then microsomial fraction was analysed by triton 1% solubilisation as decribed in M&M. 10 fractions of saccharose gradient were then analysed by SDS-PAGE. **A**: on 15 % acrylamid gel (control in **B**). **C**: on 9 % acrylamid gel. **D:** After revelation with KPF antibody, membrane **B** was revealed with Cav-1 antibody.

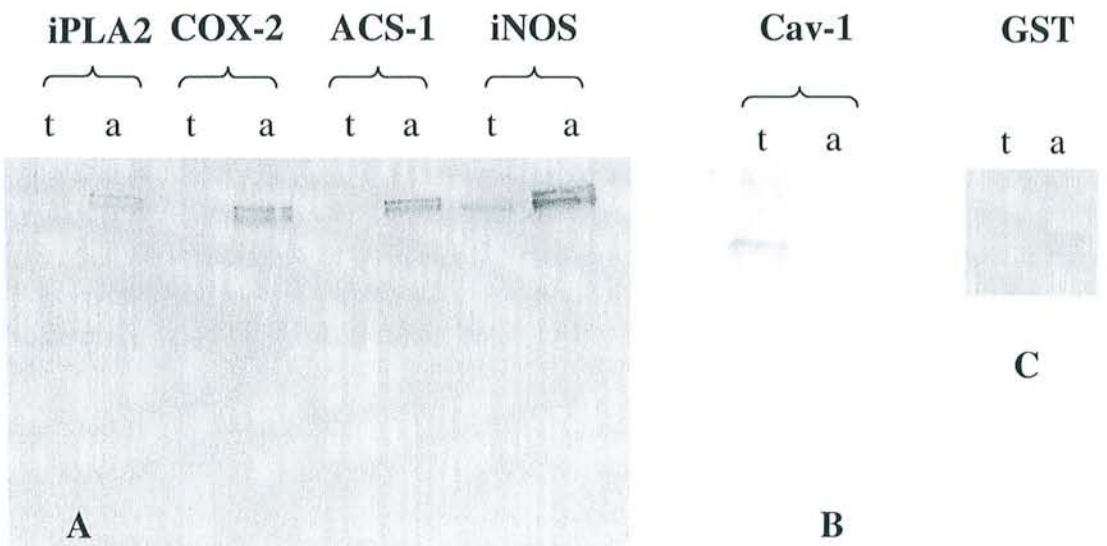


Fig. 3 Immunoprecipitation of proteins. 3T3-L1 adipocytes were incubated with 0.1 mM KPF-CoA then proteins were immunoprecipited. **A:** immunoprecipitation of iPLA2, COX-2, ACS-1 and iNOS was analysed on 9 % acrylamid gel, **B:** immunoprecipitation of Cav-1 was analysed on 13 % acrylamid gel, before revelation with anti-KPF antibody. C: KPF Adducts with purified GST. T: contrôle, a: incubation with KPF-CoA

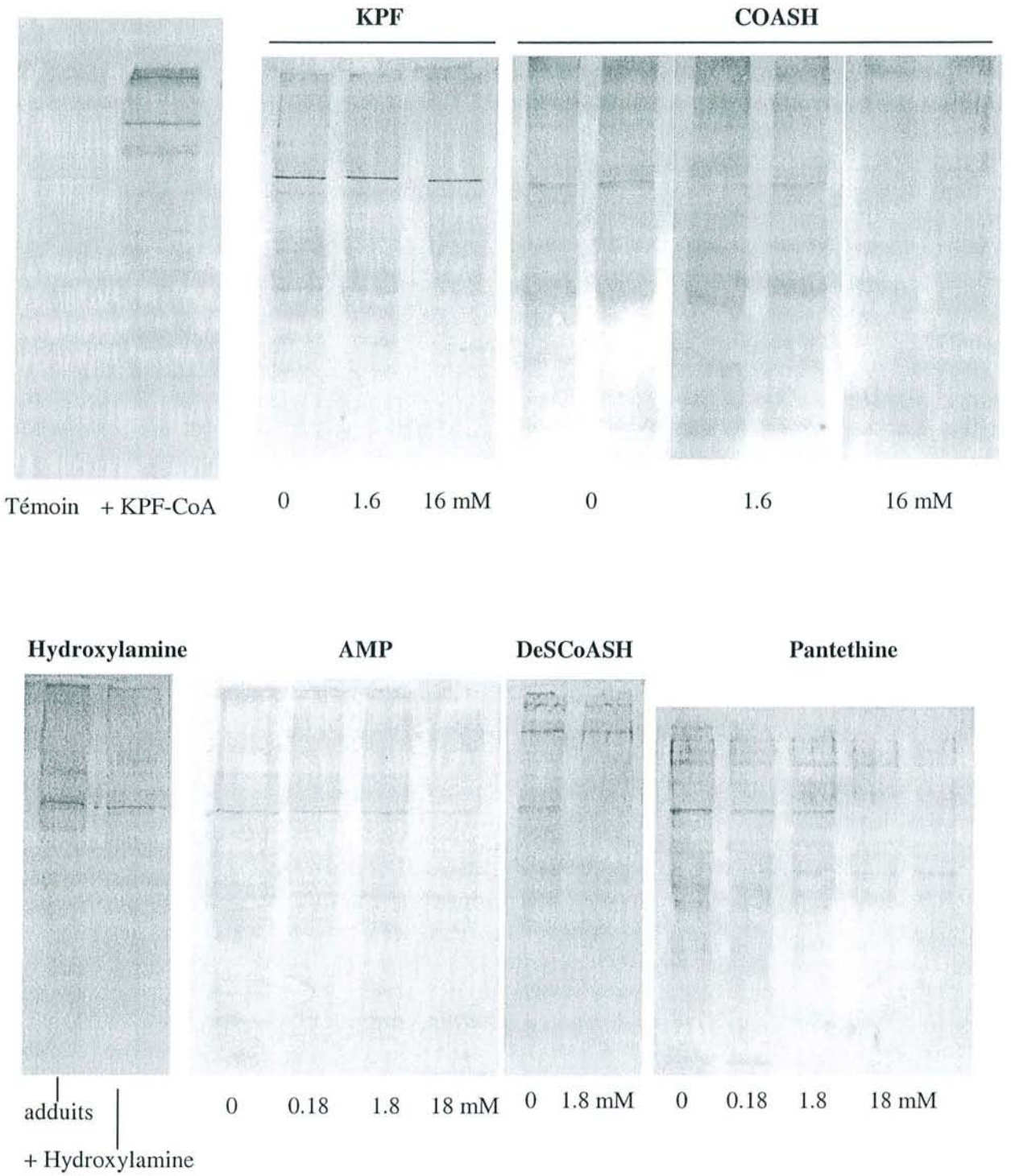
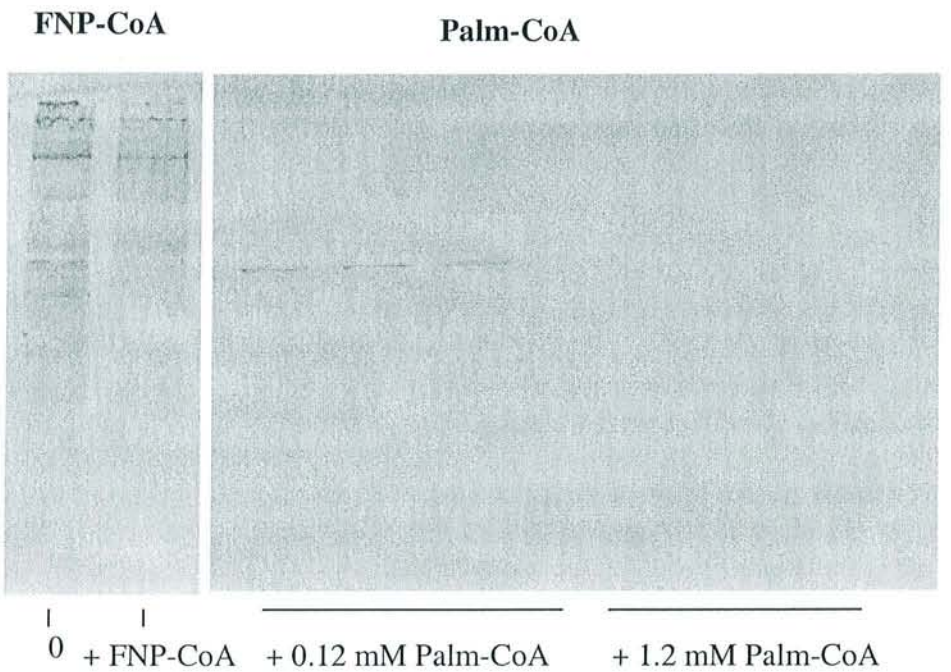

KPF
COASH
Témoin
+ KPF-CoA
0
1.6
16 mM
0
1.6
16 mM
Hydroxylamine
AMP
DeSCoASH
Pantethine
adduits
+ Hydroxylamine
0
0.18
1.8
18 mM
0
1.8 mM
0
0.18
1.8
18 mM

Fig 4


FNP-CoA
Palm-CoA
0
+ FNP-CoA
+ 0.12 mM Palm-CoA
+ 1.2 mM Palm-CoA

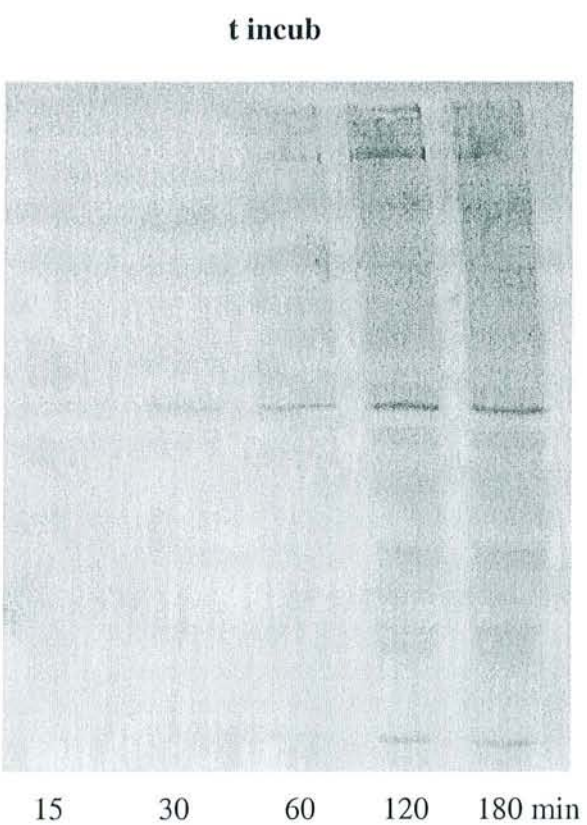

t incub
15
30
60
120
180 min

Fig. 4'

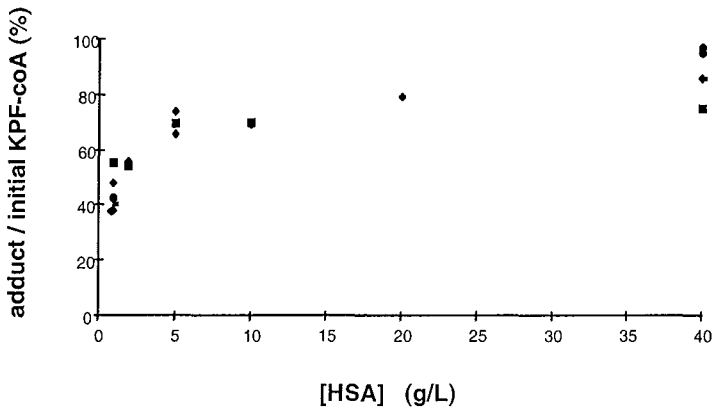


Fig. 5 Acylation of HSA by KPF-CoA. Various concentrations of HSA were incubated with 40 μM KPF-CoA. Adducts were quantified as described in M&M

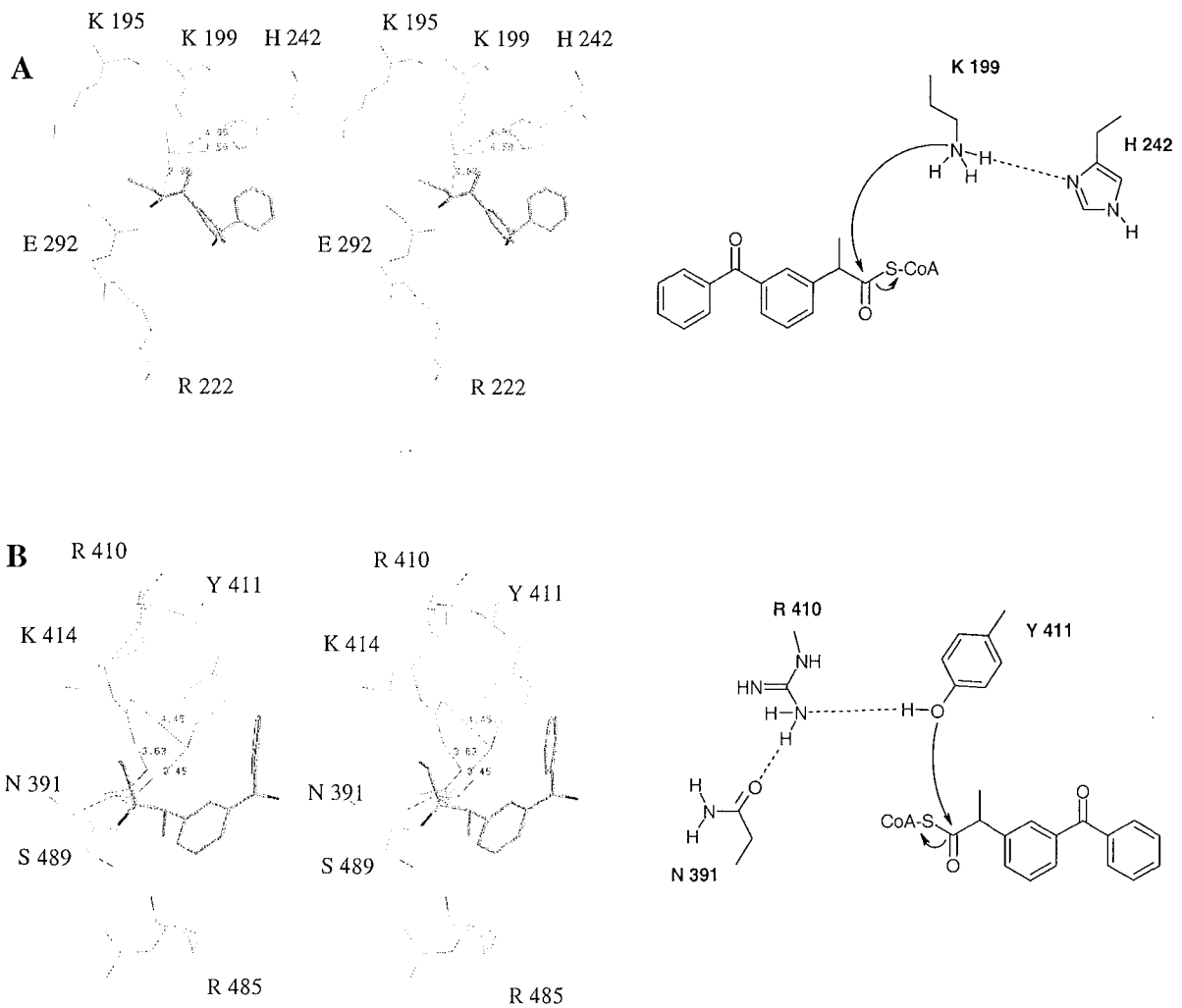


Fig. 6 Docking of KPF-COA on site I (**A**) and II (**B**) of HSA. Interatomic distance are given in Å. Possible mechanisms of acylation are proposed on the right

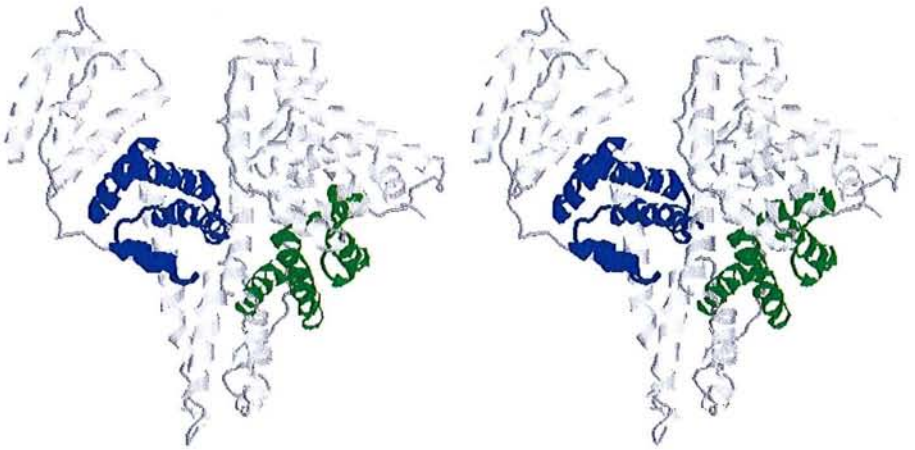


Fig. 6'. Putative KPF-CoA binding domains in site of TIB1 (209-291, in green) and Myr 4 (401-489, in blue) of HSA (PDB: 1bke)

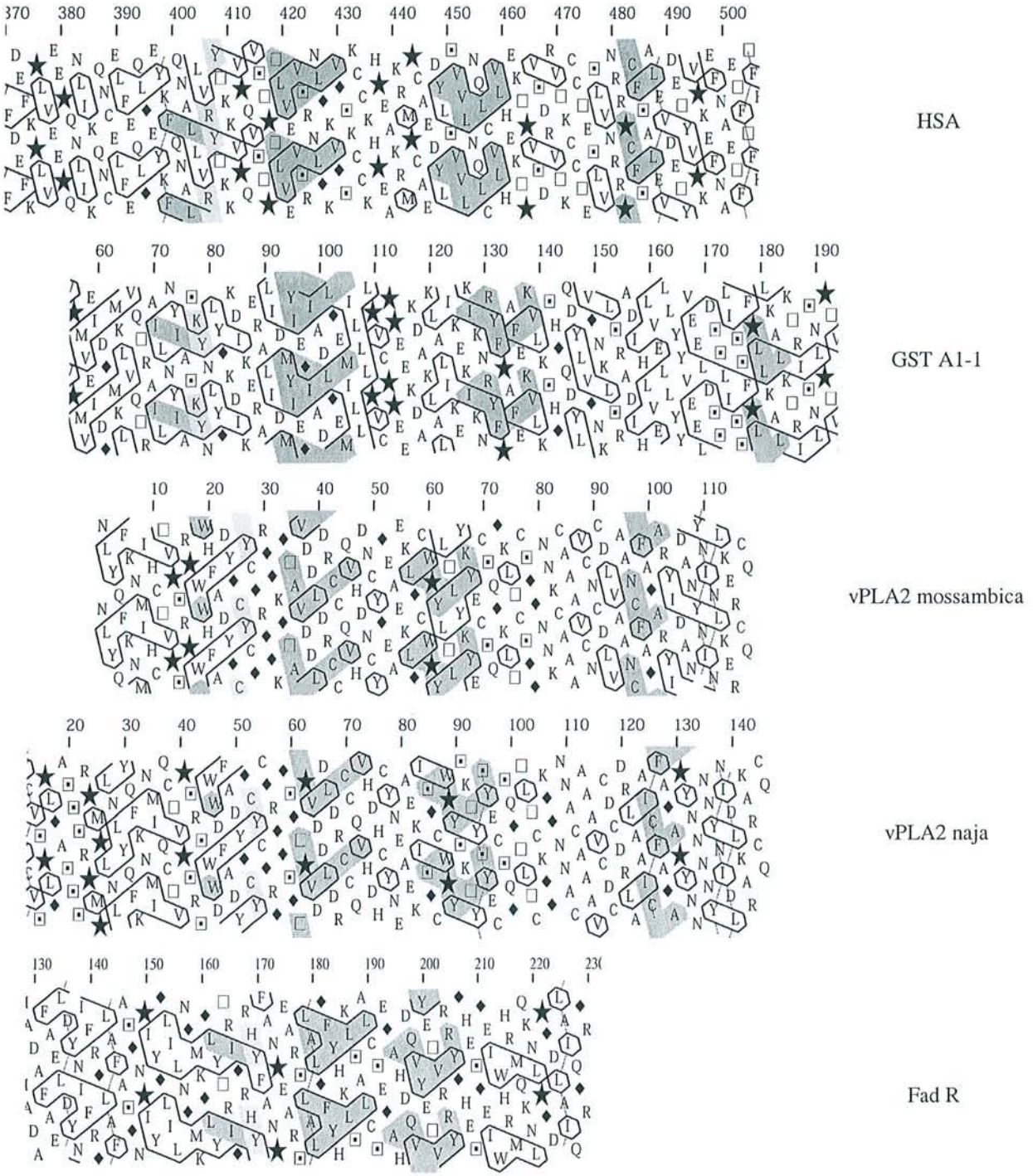


Fig. 7 Alignement of HCA profile of proteins that bind acyl-CoA. Human serum albumin (HSA), glutahione S transferase (GST A1-1), venom PLA2 from naja naja mossambica (vPLA2 mossambica) and naja naja naja (vPLA2 naja) and E. coli Fad R

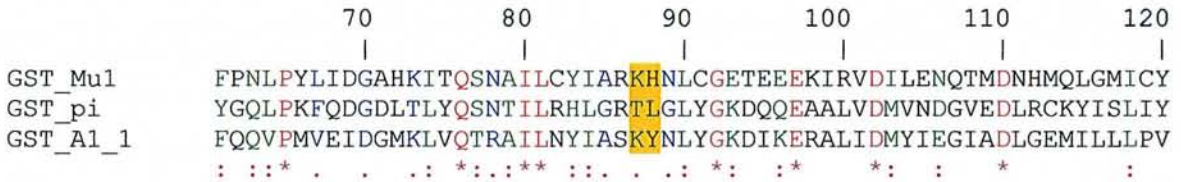


Fig. 8 Alignment of multiple human GST isozymes. "catalytic" pair KY79 is underlined in yellow

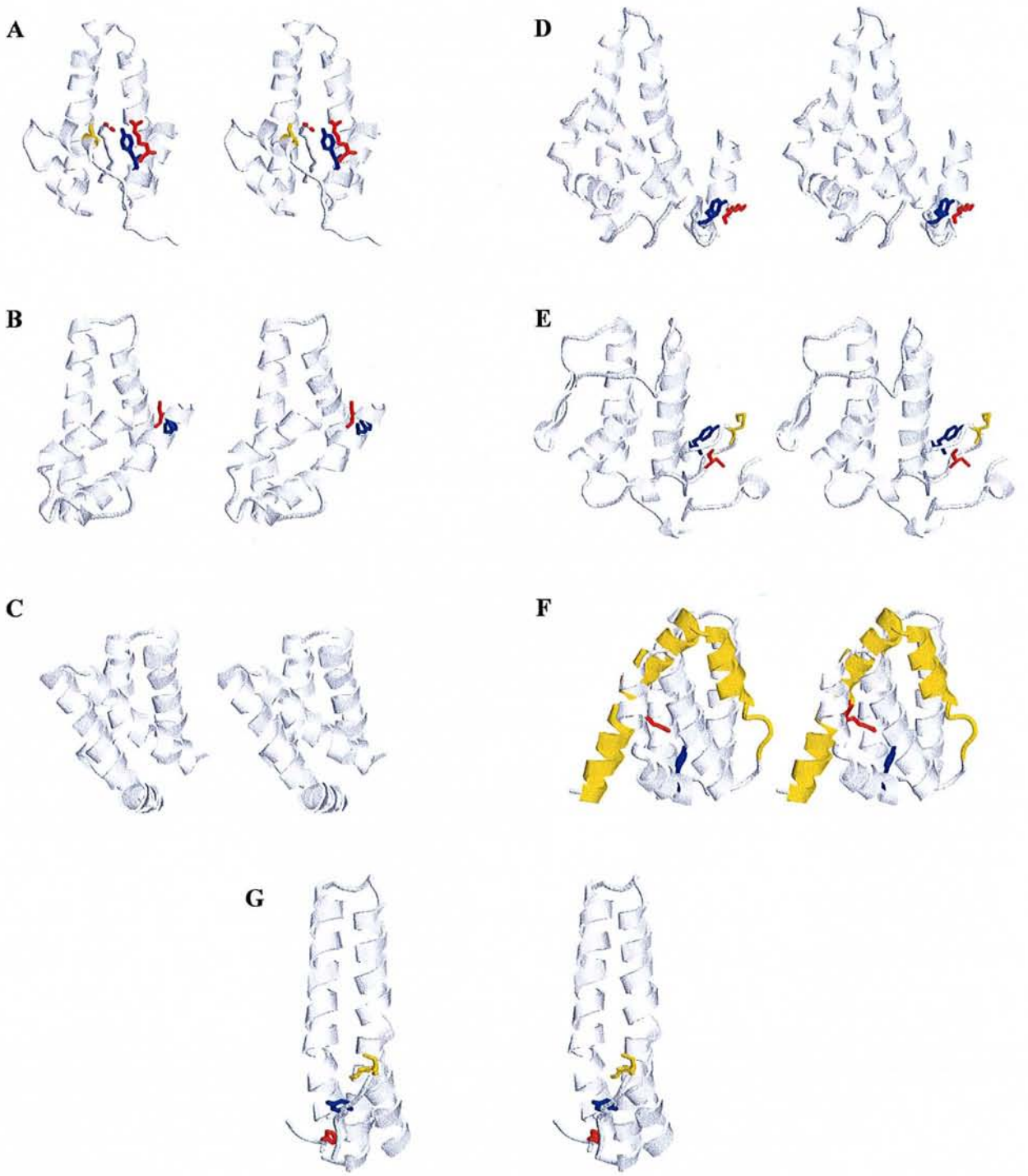


Fig. 9 Folds similar to AcBD of HSA. **A:** AcBD of HSA, i.e. region (405-501), R410 in red, Y411 in blue, S489 in yellow, Palmitate 1004 in CPK. **B:** Region (147-238) of fungus P450, Y151 in blue. **C:** Region (2019-2112) of FRAP. **D:** Region (68-190) of GST A1-1with R78 in red, Y79 in blue. **E:** S33K venom PLA2 from naja with C26 in red, Y27 in blue, K33 in yellow. **F:** Region (94-226) of Fad R with (94-133) in yellow, R105 in red, Y179 in blue. **G:** Region (32-103)B and (310-330)A of bovine rhodopsin with H100 in red, Y96 in blue, C322 and 323 in yellow

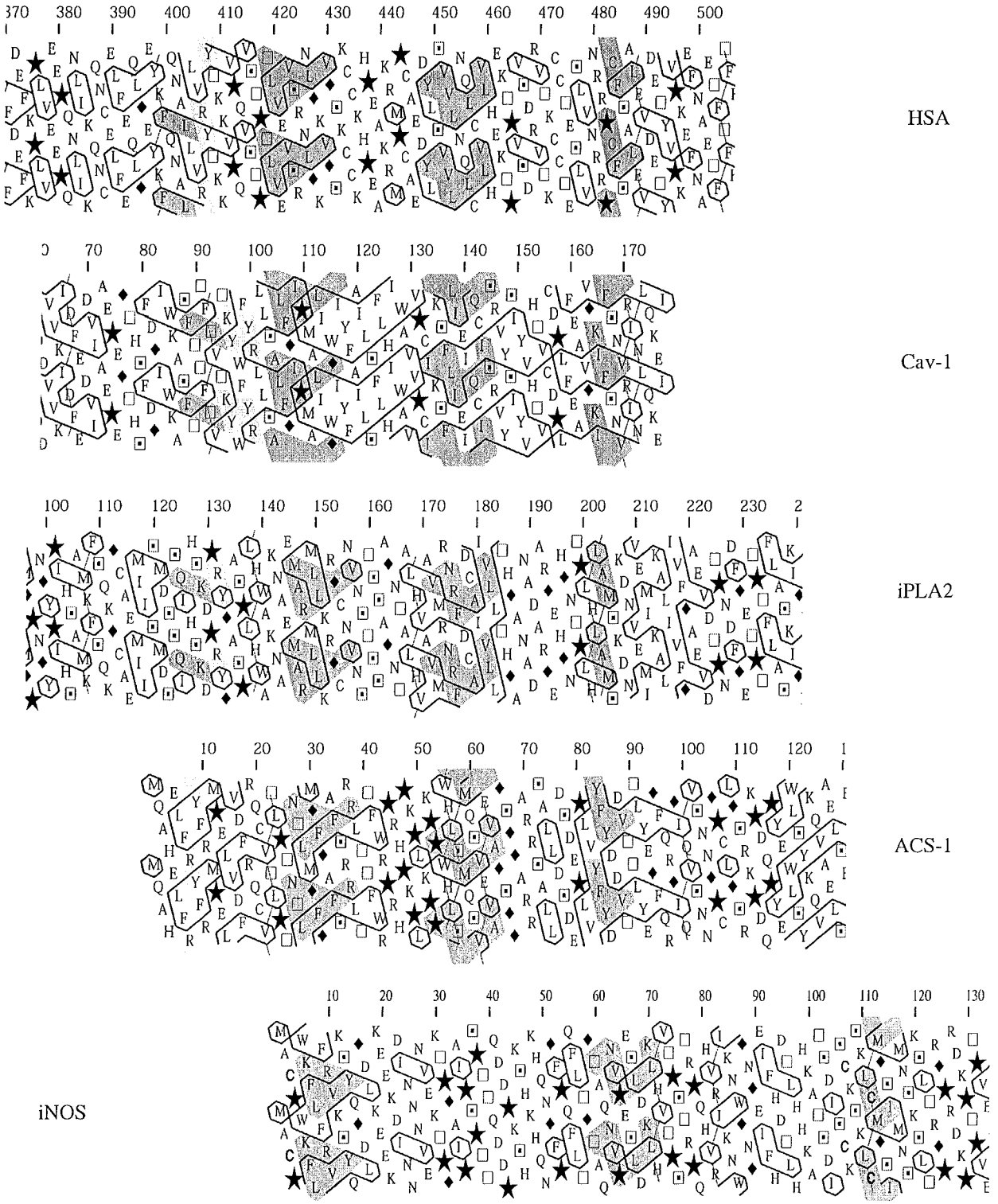


Fig. 10 Alignement of HCA profile of KPF-CoA target proteins

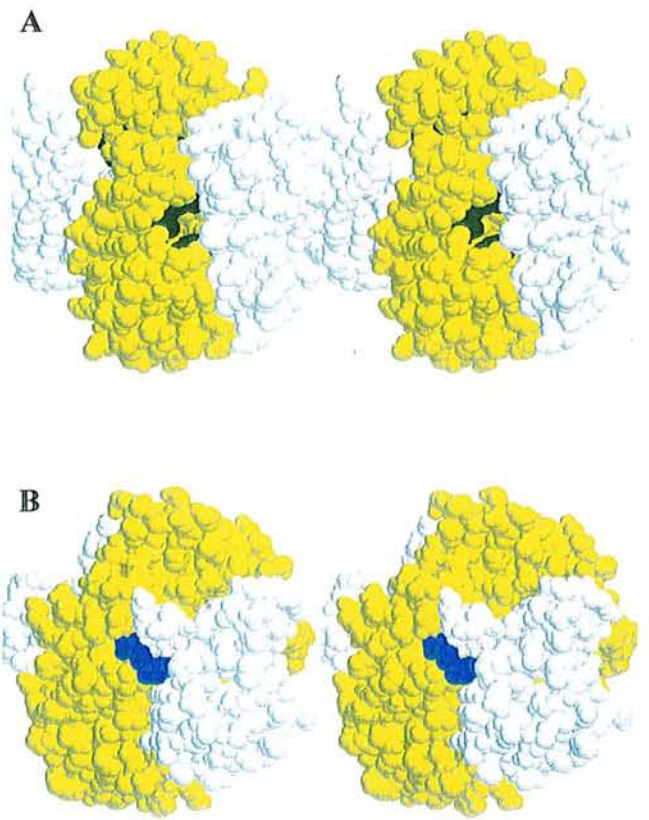


Fig. 11 Putative AcBD in GST A1-1. **A:** GST A1-1 (PDB: 1guh). Region (68-190) in yellow. Sidechains of I99, I106, L107 and Y166 in black. **B:** Same region in GSt pi (PDB: 1pgt). Sidechain of I203 and N209 in blue.

VI_CONCLUSION

Le mode d'action principal des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est l'inhibition des cyclo-oxygénases (COX), enzymes majeures de la synthèse des prostaglandines. La découverte de deux isoformes de COX n'a permis d'expliquer qu'en partie l'absence de corrélation entre les effets observés *in vitro* et l'effet pharmacologique *in vivo*. Une explication possible à ces divergences est l'implication de métabolites des AINS, tels les dérivés glucuroniques ou les thioesters de coenzyme A formés lors de l'inversion chirale. La réactivité de ces métabolites pour certaines protéines a en effet été mise en évidence récemment. Elle est supposée responsable d'effets indésirables, mais pourrait aussi conduire à des inhibitions enzymatiques impliquées dans l'activité thérapeutique des AINS.
La présente étude était fondée sur deux hypothèses : celle d'une participation des métabolites conjugués aux effets des AINS, et celle de l'existence d'autres cibles protéiques que COX pour ces médicaments et/ou leurs métabolites.

Afin de tester ces possibilités, il nous a fallu dans un premier temps mettre au point une synthèse d'un des produits, l'acyl-CoA, en utilisant le KPF comme modèle d'AINS. Nous avons ainsi obtenu et chimiquement décrit l'acyl-CoA des 2 énantiomères du KPF, ainsi qu'un analogue non hydrolysable et non acylant de ce métabolite.

L'étude de nos conjugués glucuronide et acyl-CoA nous a permis de confirmer la première supposition. Les métabolites circulants que sont les glucuronides sont capables de pénétrer dans les cellules, où ils sont inhibiteurs essentiellement réversibles des COX. Leur efficacité est inférieure à celle de la molécule mère (facteur 10), mais les IC50 que nous avons mesurées restent compatibles avec un effet pharmacologique.

Les acyl-CoA, métabolites *a priori* uniquement intracellulaires sont également inhibiteurs des COX, avec des IC50 comparables à celles du glucuronide de S-KPF. Leur efficacité est en revanche bien supérieure puisqu'ils se révèlent inhibiteurs irréversibles sélectifs de COX-2. L'incubation de cellules avec le KPF-CoA montre en effet que la production de PG par les cellules exprimant préférentiellement COX-2 n'est pas restaurée après élimination du métabolite, contrairement à ce qu'on observe avec des cellules exprimant essentiellement COX-1. L'utilisation d'enzymes purifiées a avéré une inhibition irréversible par le KPF-CoA, tandis que nous avons pu démontrer une formation d'adduits du KPF avec les COX isolées ou cellulaires.

En considérant les enzymes responsables de la production des acyl-CoA, nous avons constaté une expression coordonnée de certaines ACS avec COX-2 en réponse à un stimulus inflammatoire, tant *in vivo* que dans un modèle cellulaire. La cinétique d'expression suggère que les produits des ACS, les lc acyl-CoA puissent jouer un rôle de régulateurs négatifs de l'activité de COX-2. Il s'agit donc d'une perspective de travail très intéressante, qui pourrait aboutir au développement de nouveaux anti-inflammatoires mimant une voie de régulation physiologique. En concevant une molécule qui serait à la fois bon substrat des ACS inductibles et bon inhibiteur de COX-2, on pourrait disposer d'une pro-drogue qui ne deviendrait active qu'au site inflammatoire, là où il existe une forte expression de COX-2 et d'ACS.

En nous focalisant sur le KPF-CoA et sa capacité à former des adduits, nous avons ensuite envisagé notre seconde hypothèse. Nos efforts pour identifier les cibles du métabolite nous ont amené à proposer l'existence d'un domaine de fixation des acyl-CoA (endo- ou

xénobiotes) : l'ACBD (Acyl-CoA binding domain). Ce domaine apparaît conservé chez nombre de protéines palmitoylées *in vivo*, et chez l'albumine. En utilisant un sous-domaine de l'albumine comme archétype de l'ACBD, nous avons proposé un mécanisme d'acylation pour ces protéines. Il nous a ainsi été possible de caractériser et identifier d'autres cibles intracellulaires.

La participation de ces cibles au mécanisme d'action des AINS peut alors être envisagée selon les conséquences pharmacologiques de leur acylation :

1. Comme pour l'acylation de COX-2, on peut envisager une inhibition de la production de médiateurs inflammatoires, par ciblage direct d'une enzyme. Une des cibles est en effet une autre enzyme fondamentale dans les pathologies inflammatoires : iNOS. Nous n'avons pas étudié les conséquences de son acylation, mais il est peu probable qu'elle soit gratuite et ne s'accompagne pas de répercussions catalytiques, soit quant à la synthèse même de produits enzymatiques, soit par modification de la localisation subcellulaire ou de la capacité à interagir avec des partenaires protéiques.

2. Le KPF-CoA pourrait également agir au niveau de la transduction du signal, et de la régulation des partenariats protéiques associées à la réponse inflammatoire. Nous avons ainsi montré l'acylation de Cav-1, protéine majeure des associations protéines/protéines apparaissant dans la membrane plasmique. Cette protéine est ainsi associée à COX-2 et iNOS. Nous avons vu aussi que l'acylation des protéines par le KPF semble les exclure des rafts, structures membranaires cruciales au signaling. Il apparaît donc fort probable que de telles acylations puissent limiter la réponse cellulaire à un stimulus, pro-inflammatoire, par exemple. L'acylation d'autres protéines que COX-2 est une autre voie intéressante pour notre nouvel anti-inflammatoire idéal : il pourrait ainsi être très affine pour l'ACBD, afin d'interférer efficacement avec le signaling pro-inflammatoire. Des travaux complémentaires seront néanmoins indispensables pour démontrer la conservation et la fonction de ce domaine, de même que pour comprendre les conséquences de l'acylation des cibles du KPF-CoA, comme iNOS, iPLA2 ou Cav-1.

La fixation covalente des AINS permet de proposer une explication à plusieurs aspects encore mal compris de leur pharmacodynamie : relativement aux COX, elle peut ainsi compte des différences d'efficacité des AINS entre modèles expérimentaux, en particulier des disparités *in vivo* et *in vitro*. Par le métabolisme lui-même très variable, elle peut aussi expliquer les différences interindividuelles d'efficacité des médicaments. Elle peut également permettre de comprendre le comportement atypique de COX-2 en phase de résolution ou issue d'une longue incubation avec des AINS, qui avait donné naissance à l'hypothèse d'une COX-3. Mais nous avons vu que l'effet des AINS ne se limite pas à l'inhibition des COX. La formation d'adduits avec des protéines comme Cav-1, la compétition avec la palmitoylation et l'exclusion des protéines acylées des rafts suggèrent un mécanisme impliquant une interférence avec la transduction du signal.

Nous nous sommes surtout consacré aux propriétés anti-inflammatoires des AINS, mais leur métabolisme peut encore expliquer certains effets secondaires, comme la toxicité hépatique ou les réactions imuno-allergiques. Des inhibitions enzymatiques, en particulier dans les voies du métabolisme énergétique pourraient en effet provoquer des dysfonctionnements hépatiques. Les formations d'adduits constituant une modification des protéines, elles pourraient également être à l'origine de l'apparition d'haptènes.

Ces études ont donc montré *in vitro* l'importance des métabolites d'AINS dans leur activité pharmacologique, en particulier par fixation irréversible des acyl-CoA sur certaines cibles protéiques impliquées dans les processus inflammatoires, en particulier COX. Elles permettent ainsi une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires expliquant les effets anti-inflammatoires, et peuvent apporter des éléments pour la recherche de thérapeutiques articulaires plus efficaces et mieux tolérées. Il est aussi probable que ce type d'action ne se limite pas aux aryl-propionates ni même aux AINS. C'est en effet grâce aux processus d'inversion chirale et d'incorporation dans le tissu adipeux que ce métabolisme a été révélé, mais il pourrait aussi servir d'autres classes médicamenteuses, comme celle des hypolipémiants.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. O'neil J., *The IL-1 receptor / toll-like receptor superfamily: Signal transduction during inflammation and host defense.* Science's stke, 2000(1-11).
2. Wang Z.-M., C. Liu, and R. Dziarski, *Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by staphylococcus aureus, peptidoglycan, and endotoxin.* J. Biol. Chem., 2000. **275**(27): p. 20260-20267.
3. Heller R.A., M. Schena, A. Chai, D. Shalon, T. Bedilion, J. Gilmore, D.E. Woolley, and R.W. Davis, *Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(6): p. 2150-2155.
4. Griswold D.E. and J.L. Adams, *Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date.* Medicinal Research Reviews, 1996. **16**(2): p. 181-206.
5. Vane J., J. Mitchell, I. Appleton, A. Tomlinson, D. Bishop-Bailey, J. Croxtall, and D. Willoughby, *Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(6): p. 2046-3420.
6. Eberhard J., S. Jepsen, H.K. Albers, and Y. Acil, *Quantitation of arachidonic acid metabolites in small tissue biopsies by reversed-phase high-performance liquid chromatography.* Analytical Biochemistry, 2000. **280**(2): p. 258-263.
7. Devchand P.R., A.K. Hihi, M. Perroud, W.-D.D. Schleuning, B.M. Spiegelman, and W. Wahli, *Chemical probes that differentially modulate peroxisome proliferator- activated receptor and BLTR, nuclear and cell surface receptors for leukotriene B.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(33): p. 23341-23348.
8. Kanai N., R. Lu, J.A. Satriano, Y. Bao, A.W. Wolkoff, and V.L. Schuster, *Identification and characterization of a prostaglandin transporter.* Science, 1995. **268**(5212): p. 866-869.
9. Versteeg H.H., P.M.P. Van Bergen En Henegouwen, S.J.H. Van Deventer, and M.P. Peppelenbosch, *Cyclooxygenase-dependent signalling: Molecular events and consequences.* FEBS Letters, 1999. **445**(1): p. 1-5.
10. Bhattacharya M., K.G. Peri, G. Almazan, A. Ribeiro-Da-Silva, H. Shichi, Y. Durocher, M. Abramovitz, X. Hou, D.R. Varma, and S. Chemtob, *Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(26): p. 15792-15797.
11. Stock J.L., K. Shinjo, J. Burkhardt, M. Roach, K. Taniguchi, T. Ishikawa, H.-S. Kim, P.J. Flannery, T.M. Coffman, J.D. Mcneish, and L.P. Audoly, *The prostaglandin E EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure.* Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**(3): p. 325-331.
12. Austin S.C. and C.D. Funk, *Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions.* Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 1999. **58**(5-6): p. 231-52.
13. Ferrari D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau, and F. Di Virgilio, *Purinergic modulation of interleukin-1-beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin.* Journal of Experimental Medicine, 1997. **185**(3): p. 579-582.
14. Balboa M.A., J. Balsinde, C.A. Johnson, and E.A. Dennis, *Regulation of arachidonic acid mobilization in lipopolysaccharide-activated P388D1 macrophages by adenosine triphosphate.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36764-1.
15. Ferrari D., C. Stroh, and K. Schulze-Osthoff, *P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor nfat in microglial cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(19): p. 13205-10
16. Mann R.K. and P.A. Beachy, *Cholesterol modification of proteins.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1529**(1-3): p. 188-202.
17. Monsinjon T., P. Gasque, A. Ischenko, and M. Fontaine, *C3a binds to the seven transmembrane anaphylatoxin receptor expressed by epithelial cells and triggers the production of il-8.* FEBS Letters, 2001. **487**(3): p. 339-346.
18. Bandoh K., J. Aoki, H. Hosono, S. Kobayashi, T. Kobayashi, K. Murakami-Murofushi, M. Tsujimoto, H. Arai, and K. Inoue, *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(39): p. 27776-85

19. Yang R.-B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski, *Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.* Nature, 1998. **395**(6699): p. 284-288.
20. Faure E., O. Equils, P.A. Sieling, L. Thomas, F.X. Zhang, C.J. Kirschning, N. Polentarutti, M. Muzio, and M. Arditi, *Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappa B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(15): p. 11058-11063.
21. Gutkind J.S., *Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors.* Science's stke, 2000: p. 1-13.
22. Hu Y., P.L. Fisette, L.C. Denlinger, A.G. Guadarrama, J.A. Sommer, R.A. Proctor, and P.J. Bertics, *Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in raw 264.7 macrophages.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(42): p. 27170-27175.
23. Takahashi Y., Y. Taketani, T. Endo, S. Yamamoto, and M. Kumegawa, *Studies on the induction of cyclooxygenase isozymes by various prostaglandins in mouse osteoblastic cell line with reference to signal transduction pathways.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1994. **1212**(2): p. 217-224.
24. Rao G.N., N.R. Madamanchi, M. Lele, L. Gadiparthi, A.-C. Gingras, T.E. Eling, and N. Sonenberg, *A potential role for extracellular signal-regulated kinases in prostaglandin F2alpha-induced protein synthesis in smooth muscle cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(18): p. 12925-12932.
25. Metzler B., Y. Hu, G. Sturm, G. Wick, and Q. Xu, *Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(50): p. 33320-1.
26. Newton R., D.A. Stevens, L.A. Hart, M. Lindsay, I.M. Adcock, and P.J. Barnes, *Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1-beta involves increased transcription and correlates with increased NF-kappaB and jnk activation.* FEBS Letters, 1997. **418**(1-2): p. 135-138.
27. Chen Q.-R., C. Miyaura, S. Higashi, M. Murakami, I. Kudo, S. Saito, T. Hiraide, Y. Shibasaki, and T. Suda, *Activation of cytosolic phospholipase A2 by platelet-derived growth factor is essential for cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblasts cultured with interleukin-1.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(9): p. 5952-21460.
28. Jaffee B.D., E.J. Manos, R.J. Collins, P.M. Czerniak, M.F. Favata, R.L. Magolda, P.A. Scherle, and J.M. Trzaskos, *Inhibition of MAP kinase kinase (MEK) results in an anti-inflammatory response in vivo.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **268**(2): p. 647-651.
29. D'acquisto F., T. Iuvone, L. Rombola, L. Sautebin, M. Di Rosa, and R. Carnuccio, *Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages.* FEBS Letters, 1997. **418**(1-2): p. 175-178.
30. Wadgaonkar R., K.M. Phelps, Z. Haque, A.J. Williams, E.S. Silverman, and T. Collins, *Creb-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappa B and P53 signaling.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(4): p. 1879-1882.
31. Poynter M.E. and R.A. Daynes, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappa B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(49): p. 32833-20981.
32. Poligone B. and A.S. Baldwin, *Positive and negative regulation of NF-kappa B by COX-2. Roles of different prostaglandins.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38658-38664.
33. Michalik L. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: Three isotypes for a multitude of functions.* Current Opinion in Biotechnology, 1999. **10**(6): p. 564-570.
34. Pineda Torra I., P. Gervois, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging.* Current Opinion in Lipidology, 1999. **10**(2): p. 151-159
35. Kliewer S.A., B.M. Forman, B. Blumberg, E.S. Ong, U. Borgmeyer, D.J. Mangelsdorf, K. Umesono, and R.M. Evans, *Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(15): p. 7355-7359.
36. Martin G., K. Schoonjans, A.-M. Lefebvre, B. Staels, and J. Auwerx, *Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by pparalpha and ppargamma activators.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(45): p. 28210-20981.

37. Motojima K., P. Passilly, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, and N. Latruffe, *Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(27): p. 16710-16714.
38. Mascaro C., E. Acosta, J.A. Ortiz, P.F. Marrero, F.G. Hegardt, and D. Haro, *Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(15): p. 8560-8563.
39. Aoyama T., J.M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto, and F.J. Gonzalez, *Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα).* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5678-5684.
40. Peters J.M., N. Hennuyer, B. Staels, J.-C. Fruchart, C. Fievet, F.J. Gonzalez, and J. Auwerx, *Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator- activated receptor α-deficient mice.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(43): p. 27307-27312.
41. Basu-Modak S., O. Braissant, P. Escher, B. Desvergne, P. Honegger, and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(50): p. 35881-1.
42. Hi R., S. Osada, N. Yumoto, and T. Osumi, *Characterization of the amino-terminal activation domain of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Importance of alpha-helical structure in the transactivating function.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(49): p. 35152-35158.
43. Tontonoz P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARg2, a lipid-activated transcription factor.* Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-1156.
44. Rosen E.D., P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, and R.M. Mortensen, *PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.* Molecular Cell, 1999. **4**(4): p. 611-617.
45. Tontonoz P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor G.* Current Opinion in Genetics and Development, 1995. **5**(5): p. 571-576.
46. Schoonjans K., J. Peinado-Onsurbe, A.-M. Lefebvre, R.A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, and J. Auwerx, *PPARa and PPARg activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a ppre in the lipoprotein lipase gene.* EMBO Journal, 1996. **15**(19): p. 5336-5348.
47. Bordji K., J.-P. Grillasca, J.-N. Gouze, J. Magdalou, H. Schohn, J.-M. Keller, A. Bianchi, M. Dauca, P. Netter, and B. Terlain, *Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(16): p. 12243-12250.
48. Mangelsdorf D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors.* Cell, 1995. **83**(6): p. 841-850.
49. Lee M.S., S.A. Kliewer, J. Provencal, P.E. Wright, and R.M. Evans, *Structure of the retinoid X receptor a DNA binding domain: A helix required for homodimeric DNA binding.* Science, 1993. **260**(5111): p. 1117-1121.
50. Holmbeck S.M.A., M.P. Foster, D.R. Casimiro, D.S. Sem, H.J. Dyson, and P.E. Wright, *High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain.* Journal of Molecular Biology, 1998. **281**(2): p. 271-284.
51. Rastinejad F., T. Wagner, Q. Zhao, and S. Khorasanizadeh, *Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element dr1.* EMBO Journal, 2000. **19**(5): p. 1045-1054.
52. Elholm M., I. Dam, C. Jorgensen, A.-M. Krogsdam, D. Holst, I. Kratchmarova, M. Gottlicher, J.-A. Gustafsson, R. Berge, T. Flatmark, J. Knudsen, S. Mandrup, and K. Kristiansen, *Acyl-CoA esters antagonize the effects of ligands on peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformation, DNA binding, and interaction with co-factors.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(24): p. 21410-21416
53. Nolte R.T., G.B. Wisely, S. Westin, J.E. Cobb, M.H. Lambert, R. Kurokawa, M.G. Rosenfeld, T.M. Willson, C.K. Glass, and M.V. Milburn, *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma.* Nature, 1998. **395**(6698): p. 137-143.
54. Hsu M.-H., U. Savas, K.J. Griffin, and E.F. Johnson, *Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HEPG2 cells.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(30): p. 27950-27958.

55. Holmbeck S.M.A., H.J. Dyson, and P.E. Wright, *DNA-induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor.* Journal of Molecular Biology, 1998. **284**(3): p. 533-539.
56. Juge-Aubry C., A. Pernin, T. Favez, A.G. Burger, W. Wahli, C.A. Meier, and B. Desvergne, *DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements: Importance of the 5'-flanking region.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(40): p. 25252-25259.
57. Palmer C.N.A., M.-H. Hsu, K.J. Griffin, and E.F. Johnson, *Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(27): p. 16114-16121.
58. Rastinejad F., *Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family.* Current Opinion in Structural Biology, 2001. **11**(1): p. 33-38.
59. Dowell P., J.E. Ishmael, D. Avram, V.J. Peterson, D.J. Nevrivy, and M. Leid, *P300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator- activated receptor A.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(52): p. 33435-33443.
60. Schulman I.G., D. Chakravarti, H. Juguilon, A. Romo, and R.M. Evans, *Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the tata-binding protein mediate hormone-dependent transactivation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(18): p. 8288-8292.
61. Delerive P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, J.-C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(45): p. 32048-32054.
62. Mandrup S. and M.D. Lane, *Regulating adipogenesis.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(9): p. 5367-5370.
63. Clarke S.L., C.E. Robinson, and J.M. Gimble, *CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor G2 promoter.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **240**(1): p. 99-103.
64. Camp H.S., A.L. Whitton, and S.R. Tafuri, *PPAR-gamma activators down-regulate the expression of PPAR-gamma in 3T3-L1 adipocytes.* FEBS Letters, 1999. **447**(2-3): p. 186-190.
65. Bastie C., D. Hoist, D. Gaillard, C. Jehl-Pietri, and P.A. Grimaldi, *Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPAR-delta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3c2 fibroblasts.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(31): p. 21920-21925.
66. Juge-Aubry C.E., E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, A. Takeshita, W.W. Chin, A.G. Burger, and C.A. Meier, *Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(15): p. 10505-10510.
67. Adams M., M.J. Reginato, D. Shao, M.A. Lazar, and V.K. Chatterjee, *Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor G is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(8): p. 5128-5132.
68. Camp H.S. and S.R. Tafuri, *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor G activity by mitogen-activated protein kinase.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(16): p. 10811-10816.
69. Yan Z.H., W.G. Karam, J.L. Staudinger, A. Medvedev, B.I. Ghanayem, and A.M. Jetten, *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha -induced transactivation by the nuclear orphan receptor TAK1/TR4.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(18): p. 10948-20981.
70. Nicolas-Frances V., V.K. Dasari, E. Abruzzi, T. Osumi, and N. Latruffe, *The peroxisome proliferator response element (PPRE) present at positions -681/-669 in the rat liver 3-ketoacyl-CoA thiolase B gene functionally interacts differently with PPARalpha and HNF-4.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **269**(2): p. 347-351.
71. Chu R., Y. Lin, M.S. Rao, and J.K. Reddy, *Cloning and identification of rat deoxyuridine triphosphatase as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor A.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(44): p. 27670-27676.
72. Forman B.M., J. Chen, and R.M. Evans, *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(9): p. 4312-4317.

73. Krey G., O. Braissant, F. L'horset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M.G. Parker, and W. Wahli, *Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay.* Molecular Endocrinology, 1997. **11**(6): p. 779-791.
74. Devchand P.R., H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez, and W. Wahli, *The PPAR alpha-leukotriene B pathway to inflammation control.* Nature, 1996. **384**(6604): p. 39-43.
75. Forman B.M., P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, and R.M. Evans, *15-deoxy-d-prostaglandin J is a ligand for the adipocyte determination factor PPARg.* Cell, 1995. **83**(5): p. 803-812.
76. Tontonoz P., L. Nagy, J.G.A. Alvarez, V.A. Thomazy, and R.M. Evans, *PPARg promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.* Cell, 1998. **93**(2): p. 241-252.
77. Yu K., W. Bayona, C.B. Kallen, H.P. Harding, C.P. Ravera, G. Mcmahon, M. Brown, and M.A. Lazar, *Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(41): p. 23975-23983.
78. Issemann I. and S. Green, *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.* Nature, 1990. **347**(6294): p. 645-650.
79. Lehmann J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, and S.A. Kliewer, *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor g (PPARg).* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(22): p. 12953-12956.
80. Lehmann J.M., J.M. Lenhard, B.B. Oliver, G.M. Ringold, and S.A. Kliewer, *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(6): p. 3406-3410.
81. Spiegelman B.M., *PPAR-gamma in monocytes: Less pain, any gain?* Cell, 1998. **93**(2): p. 153-155.
82. Paik J.H., J.H. Ju, J.Y. Lee, M.D. Boudreau, and D.H. Hwang, *Two opposing effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the expression of the inducible cyclooxygenase. Mediation through different signaling pathways.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(36): p. 28173-1.
83. He T.-C., T.A. Chan, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, *PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Cell, 1999. **99**(3): p. 335-345.
84. Oberfield J.L., J.L. Collins, C.P. Holmes, D.M. Goreham, J.P. Cooper, J.E. Cobb, J.M. Lenhard, E.A. Hull-Ryde, C.P. Mohr, S.G. Blanchard, D.J. Parks, L.B. Moore, J.M. Lehmann, K. Plunket, A.B. Miller, M.V. Milburn, S.A. Kliewer, and T.M. Willson, *A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(11): p. 6102-6106.
85. Lavinsky R.M., K. Jepsen, T. Heinzel, J. Torchia, T.-M. Mullen, R. Schiff, A.L. Del-Rio, M. Ricote, S. Ngo, J. Gemsch, S.G. Hilsenbeck, C.K. Osborne, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, and D.W. Rose, *Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(6): p. 2920-2925.
86. Dowell P., J.E. Ishmael, D. Avram, V.J. Peterson, D.J. Nevrivy, and M. Leid, *Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor A interacting protein.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(22): p. 15901-15907.
87. Torchia J., C. Glass, and M.G. Rosenfeld, *Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses.* Current Opinion in Cell Biology, 1998. **10**(3): p. 373-383.
88. Zhu Y., C. Qi, S. Jain, M.S. Rao, and J.K. Reddy, *Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(41): p. 25500-25506.
89. Yuan C.-X., M. Ito, J.D. Fondell, Z.-Y. Fu, and R.G. Roeder, *The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(14): p. 7939-7944.
90. Yao T.-P., G. Ku, N. Zhou, R. Scully, and D.M. Livingston, *The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of P300.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(20): p. 10626-10631.
91. Lundblad J.R., R.P.S. Kwok, M.E. Laurance, M.L. Harter, and R.H. Goodman, *Adenoviral E1A-associated protein P300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP.* Nature, 1995. **374**(6517): p. 85-88.

92. Gelman L., G. Zhou, L. Fajas, E. Raspe, J.-C. Fruchart, and J. Auwerx, *P300 interacts with the N- and C-terminal part of PPAR gamma2 in a ligand- independent and -dependent manner, respectively.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(12): p. 7681-7688.
93. Puigserver P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, and B.M. Spiegelman, *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.* Cell, 1998. **92**(6): p. 829-839.
94. Puigserver P., G. Adelmant, Z. Wu, M. Fan, J. Xu, B. O'malley, and B.M. Spiegelman, *Activation of PPAR-gamma coactivator-1 through transcription factor docking.* Science, 1999. **286**(5443): p. 1368-71
95. Meertens L.M., K.S. Miyata, J.D. Cechetto, R.A. Rachubinski, and J.P. Capone, *A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPAR-alpha.* EMBO Journal, 1998. **17**(23): p. 6972-6978.
96. Heinlein C.A., H.-J. Ting, S. Yeh, and C. Chang, *Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(23): p. 16147-16152.
97. Miyata K.S., S.E. Mccaw, L.M. Meertens, H.V. Patel, R.A. Rachubinski, and J.P. Capone, *Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver- X-receptor alpha.* Molecular and Cellular Endocrinology, 1998. **146**(1-2): p. 69-76.
98. Castillo G., R.P. Brun, J.K. Rosenfield, S. Hauser, C.W. Park, A.E. Troy, M.E. Wright, and B.M. Spiegelman, *An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma.* EMBO Journal, 1999. **18**(13): p. 3676-3687.
99. Couturier C., A. Brouillet, C. Couriaud, K. Koumanov, G. Bereziat, and M. Andreani, *Interleukin 1beta induces type II-secreted phospholipase A2 gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor kappa B and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(33): p. 23085-1.
100. Callejas N.A., A. Castrillo, L. Bosca, and P. Martin-Sanz, *Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators.* Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics, 1999. **288**(3): p. 1235-1241.
101. Glass C.K., D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld, *Nuclear receptor coactivators.* Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**(2): p. 222-232.
102. Lee S.-K., S.L. Anzick, J.-E. Choi, L. Bubendorf, X.-Y. Guan, K. Jung Y.-, O.P. Kallioniemi, J. Kononen, J.M. Trent, D. Azorsa, B.-H. Jhun, C. Jae Hun, L. Young Chul, P.S. Meltzer, and L. Jae Woon, *A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(48): p. 34283-93
103. Chen L., *Combinatorial gene regulation by eukaryotic transcription factors.* Current Opinion in Structural Biology, 1999. **9**(1): p. 48-55.
104. Yan S.-F., Y.S. Zou, M. Mendelsohn, Y. Gap, Y. Naka, S.D. Yan, D. Pinsky, and D. Stern, *Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in hypoxia.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(7): p. 4287-4294.
105. Poli V., *The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(45): p. 29279-29282.
106. Rudders S., J. Gaspar, R. Madore, C. Voland, F. Grall, A. Patel, A. Pellacani, M.A. Perrella, T.A. Libermann, and P. Oettgen, *ESE-1 is a novel transcriptional mediator of inflammation that interacts with NF-kappa B to regulate the inducible nitric-oxide synthase gene.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(5): p. 3302-3309.
107. Vidwans A.S., T.F. Uliasz, J.A. Hewett, and S.J. Hewett, *Differential modulation of prostaglandin H synthase-2 by nitric oxide-related species in intact cells.* Biochemistry, 2001. **40**(38): p. 11533-11542.
108. Lee J.Y., K.H. Sohn, S.H. Rhee, and D. Hwang, *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through toll-like receptor 4.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(20): p. 16683-16689.
109. Klein T., V. Ullrich, J. Pfeilschifter, and R. Nusing, *On the induction of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and soluble phospholipase A2 in rat mesangial cells by a nonsteroidal anti-inflammatory drug: The role of cyclic AMP.* Molecular Pharmacology, 1998. **53**(3): p. 385-760.
110. Chen C.-C., K.-T. Chiu, Y.-T. Sun, and W.-C. Chen, *Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(44): p. 31559-1.

111. Xie Q., Y. Kashiwabara, and C. Nathan, *Role of transcription factor NF-kappa B/rel in induction of nitric oxide synthase.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(7): p. 4705-4708.
112. Ganster R.W., B.S. Taylor, L. Shao, and D.A. Geller, *Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by STAT1 and NF-kappa B.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(15): p. 8638-8643.
113. Perrella M., M. Yoshizumi, Z. Fen, J. Tsai, C. Hsieh, S. Kourembanas, and M. Lee, *Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down- regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(20): p. 14595-14600.
114. Kwon G., G. Xu, C.A. Marshall, and M.L. Mcdaniel, *Tumor necrosis factor -alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-delta- prostaglandin J and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator- activated receptor chi activation and iNOS expression.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(26): p. 18702-18708.
115. Petrova T.V., K.T. Akama, and L.J. Van Eldik, *Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: Down- regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-delta- prostaglandin J.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(8): p. 4668-4673.
116. Iwasaki T., H. Hori, Y. Hayashi, T. Nishino, K. Tamura, S. Oue, T. Iizuka, T. Ogura, and H. Esumi, *Characterization of mouse nNOS2, a natural variant of neuronal nitric-oxide synthase produced in the central nervous system by selective alternative splicing.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(25): p. 17559-17566.
117. Li H., C.S. Raman, C.B. Glaser, E. Blasko, T.A. Young, J.F. Parkinson, M. Whitlow, and T.L. Poulos, *Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(30): p. 21276-21284.
118. Babu B.R., C. Frey, and O.W. Griffith, *L-arginine binding to nitric-oxide synthase. The role of H-bonds to the nonreactive guanidinium nitrogens.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(36): p. 25218-26
119. Raman C.S., H. Li, P. Martasek, V. Kral, B.S.S. Masters, and T.L. Poulos, *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center.* Cell, 1998. **95**(7): p. 939-950.
120. Crane B.R., A.S. Arvai, D.K. Ghosh, C. Wu, E.D. Getzoff, D.J. Stuehr, and J.A. Tainer, *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.* Science, 1998. **279**(5359): p. 2121-2126.
121. Pou S., L. Keaton, W. Surichamorn, and G.M. Rosen, *Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase.* Journal of Biological Chemistry., 1999. **274**(14): p. 9573-9580.
122. Alderton W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition.* Biochemical Journal, 2001. **357**(3): p. 593-615.
123. Andrew P.J. and B. Mayer, *Enzymatic function of nitric oxide synthases.* Cardiovascular Research, 1999. **43**(3): p. 521-531.
124. Huuskonen J., G. Wohlfahrt, M. Jauhiainen, C. Ehnholm, O. Teleman, and V.M. Olkkonen, *Structure and phospholipid transfer activity of human PLTP: Analysis by molecular modeling and site-directed mutagenesis.* Journal of Lipid Research, 1999. **40**(6): p. 1123-1130.
125. Bender A.T., A.M. Silverstein, D.R. Demady, K.C. Kanelakis, S. Noguchi, W.B. Pratt, and Y. Osawa, *Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(3): p. 1472-1478.
126. Liu J., G. Garcia-Cardena, and W.C. Sessa, *Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: Mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme.* Biochemistry, 1995. **34**(38): p. 12333-12340.
127. Ribardo D.A., S.E. Crowe, K.R. Kuhl, J.W. Peterson, and A.K. Chopra, *Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A2-activating protein and by activation of phospholipase C and D.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(8): p. 5467-5475.
128. Bomalaski J.S. and M.A. Clark, *Review: Phospholipase A and arthritis.* Arthritis and Rheumatism, 1993. **36**(2): p. 190-198.
129. Wang A. and E.A. Dennis, *Mammalian lysophospholipases.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. **1439**(1): p. 1-16.

130. Dolan-O'keefe M., V. Chow, J. Monnier, G.A. Visner, and H.S. Nick, *Transcriptional regulation and structural organization of the human cytosolic phospholipase A gene.* American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000. **278**(4 22-4): p. L649-L657.
131. Van Putten V., Z. Refaat, C. Dessev, S. Blaine, M. Wick, L. Butterfield, S.-Y. Han, L.E. Heasley, and R.A. Nemenoff, *Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(2): p. 1226-1232.
132. Akiba S., R. Hatazawa, K. Ono, K. Kitatani, M. Hayama, and T. Sato, *Secretory phospholipase A2 mediates cooperative prostaglandin generation by growth factor and cytokine independently of preceding cytosolic phospholipase A2 expression in rat gastric epithelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(24): p. 21854-21862.
133. Naraba H., M. Murakami, H. Matsumoto, S. Shimbara, A. Ueno, I. Kudo, and S. Oh-Ishi, *Segregated coupling of phospholipases A, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages.* Journal of Immunology, 1998. **160**(6): p. 2974-82
134. Sanchez T. and J.J. Moreno, *The effect of high molecular phospholipase A inhibitors on 3T6 fibroblast proliferation.* Biochemical Pharmacology, 2001. **61**(7): p. 811-816.
135. Dennis E.A., *The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes.* Trends in Biochemical Sciences, 1997. **22**(1): p. 1-2.
136. Kramer R.M. and J.D. Sharp, *Structure, function and regulation of Ca-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2).* FEBS Letters, 1997. **410**(1): p. 49-53.
137. Ishizaki J., N. Suzuki, K.-I. Higashino, Y. Yokota, T. Ono, K. Kawamoto, N. Fujii, H. Arita, and K. Hanasaki, *Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A2s.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(35): p. 24973-24979.
138. Gelb M.H., M.K. Jain, and O.G. Berg, *Inhibition of phospholipase A.* FASEB Journal, 1994. **8**(12): p. 916-924.
139. Valentin E., F. Ghomashchi, M.H. Gelb, M. Lazdunski, and G. Lambeau, *On the diversity of secreted phospholipases A2. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(44): p. 31195-31202.
140. Forsell P.K.A.L., B.P. Kennedy, and H.-E. Claesson, *The human calcium-independent phospholipase A gene: Multiple enzymes with distinct properties from a single gene.* European Journal of Biochemistry, 1999. **262**(2): p. 575-585.
141. Hanasaki K., T. Ono, A. Saiga, Y. Morioka, M. Ikeda, K. Kawamoto, K.-I. Higashino, K. Nakano, K. Yamada, J. Ishizaki, and H. Arita, *Purified group X secretory phospholipase A2 induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(48): p. 34203-34211.
142. Gelb M.H., E. Valentin, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, and G. Lambeau, *Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(51): p. 39823-39826.
143. Prigent-Tessier A., J.-F. Pageaux, J.-M. Fayard, M. Lagarde, C. Laugier, and H. Cohen, *Arachidonic acid up-regulates and prostaglandin E down-regulates the expression of pancreatic-type phospholipase A and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 in uterine stromal cells.* European Journal of Biochemistry, 1996. **241**(3): p. 872-878.
144. Shinohara H., M.A. Balboa, C.A. Johnson, J. Balsinde, and E.A. Dennis, *Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(18): p. 12263-12268.
145. Murakami M., T. Kambe, S. Shimbara, K.-I. Higashino, K. Hanasaki, H. Arita, M. Horiguchi, M. Arita, H. Arai, K. Inoue, and I. Kudo, *Different functional aspects of the group II subfamily (types IIa and V) and type X secretory phospholipase A2s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(44): p. 31435-1.
146. Kambe T., M. Murakami, and I. Kudo, *Polyunsaturated fatty acids potentiate interleukin-1-stimulated arachidonic acid release by cells overexpressing type IIa secretory phospholipase A2.* FEBS Letters, 1999. **453**(1-2): p. 81-84.
147. Reynolds L.J., L.L. Hughes, A.I. Louis, R.M. Kramer, and E.A. Dennis, *Metal ion and salt effects on the phospholipase A, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1993. **1167**(3): p. 272-280.

148. Song C., X.J. Chang, K.M. Bean, M.S. Proia, J.L. Knopf, and R.W. Kriz, *Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(24): p. 17063-17067.
149. Mayer R.J. and L.A. Marshall, *New insights on mammalian phospholipase A(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes.* FASEB Journal, 1993. **7**(2): p. 339-348.
150. Wang P.-Y. and R.S. Munford, *CD14-dependent internalization and metabolism of extracellular phosphatidylinositol by monocytes.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(33): p. 23235-23241.
151. Scott D.L., S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Gelb, and P.B. Sigler, *Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A.* Science, 1990. **250**(4987): p. 1541-1546.
152. Scott D.L., S.P. White, J.L. Browning, J.J. Rosa, M.H. Gelb, and P.B. Sigler, *Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A from inflammatory exudate.* Science, 1991. **254**(5034): p. 1007-1010.
153. Dessen A., J. Tang, H. Schmidt, M. Stahl, J.D. Clark, J. Seehra, and W.S. Somers, *Crystal structure of human cytosolic phospholipase A reveals a novel topology and catalytic mechanism.* Cell, 1999. **97**(3): p. 349-360.
154. Warwicker J., *A molecular model for interfacial activation in phospholipase A.* FEBS Letters, 1997. **404**(2-3): p. 159-163.
155. Burke J.R., M.R. Witmer, F.C. Zusi, K.R. Gregor, L.B. Davern, R. Padmanabha, R.T. Swann, D. Smith, J.A. Tredup, R. Micanovic, S.P. Manly, J.J. Villafranca, and K.M. Tramposch, *Competitive, reversible inhibition of cytosolic phospholipase A2 at the lipid-water interface by choline derivatives that partially partition into the phospholipid bilayer.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(27): p. 18864-18871.
156. Zhou F. and K. Schulten, *Molecular dynamics study of phospholipase A on a membrane surface.* Proteins: Structure, Function and Genetics, 1996. **25**(1): p. 12-27.
157. Stahelin R., Cho, W, *Roles of calcium ions in the membrane binding of C2 domains.* Biochemical Journal, 2001. **359**(3): p. 679–685.
158. Perisic O., H.F. Paterson, G. Mosedale, S. Lara-Gonzalez, and R.L. Williams, *Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(21): p. 14979-14987.
159. Bittova L., M. Sumandea, and W. Cho, *A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(14): p. 9665-9672.
160. Ball A., R. Nielsen, M.H. Gelb, and B.H. Robinson, *Interfacial membrane docking of cytosolic phospholipase A2 C2 domain using electrostatic potential-modulated spin relaxation magnetic resonance.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(12): p. 6637-6642.
161. Grandbois M., H. Clausen-Schaumann, and H. Gaub, *Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A.* Biophysical Journal, 1998. **74**(5): p. 2398-2404.
162. Xing M., S. Post, R.S. Ostrom, M. Samardzija, and P.A. Insel, *Inhibition of phospholipase A2-mediated arachidonic acid release by cyclic AMP defines a negative feedback loop for P2Y receptor activation in madin-darby canine kidney d1 cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(15): p. 10035-10038.
163. Balboa M.A., J. Balsinde, and E.A. Dennis, *Phosphorylation of cytosolic group iv phospholipase A is necessary but not sufficient for arachidonic acid release in P388D macrophages.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **267**(1): p. 145-148.
164. Pickard R.T., B.A. Strifler, R.M. Kramer, and J.D. Sharp, *Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2.* J. Biol. Chem., 1999. **274**(13): p. 8823-8831.
165. Hirabayashi T., K. Kume, K. Hirose, T. Yokomizo, M. Iino, H. Itoh, and T. Shimizu, *Critical duration of intracellular Ca2+ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2.* Journal of Biological Chemistry., 1999. **274**(8): p. 5163-5169.
166. Klapisz E., J. Masliah, G. Bereziat, C. Wolf, and K.S. Koumanov, *Sphingolipids and cholesterol modulate membrane susceptibility to cytosolic phospholipase A.* Journal of Lipid Research, 2000. **41**(10): p. 1680-1688.
167. Martinez R., Moreno, Jj, *Role of Ca2+-independant pla2 on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species.* Archives of Biology and Biochemistry, 2001. **392**(2): p. 257-262.
168. Wilson H.A., J.B. Waldrip, K.H. Nielson, A.M. Judd, S.K. Han, W. Cho, P.J. Sims, and J.D. Bell, *Mechanisms by which elevated intracellular calcium induces S49 cell membranes to become susceptible*

to the action of secretory phospholipase A2. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 11494-11504.
169. Wu T., C.W. Angus, X.-L. Yao, C. Logun, and J.H. Shelhamer, *P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(27): p. 17145-17153.
170. Kim S.-W., J. Ko, K. Jae Hong, C. Eung Chil, and N. Doe Sun, *Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: Specific interaction model.* FEBS Letters, 2001. **489**(2-3): p. 243-248.
171. Jenkins C.M., M.J. Wolf, D.J. Mancuso, and R.W. Gross, *Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2beta . Implications for structure and function.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(10): p. 7129-7135.
172. Fujishima H., R.O. Sanchez Mejia, C.O. Bingham, Iii, B.K. Lam, A. Sapirstein, J.V. Bonventre, K.F. Austen, and J.P. Arm, *Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(9): p. 4803-4807.
173. Balsinde J., H. Shinohara, L.J. Lefkowitz, C.A. Johnson, M.A. Balboa, and E.A. Dennis, *Group V phospholipase A2-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(37): p. 25967-1.
174. Aarsman A.J., F.W. Neys, H.A. Van Der Helm, F.A. Kuypers, and H. Van Den Bosch, *Sera of patients suffering from inflammatory diseases contain group IIa but not group V phospholipase A.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 2000. **1502**(2): p. 257-263.
175. Bingham C.O., Iii, R.J.A. Fijneman, D.S. Friend, R.P. Goddeau, R.A. Rogers, K.F. Austen, and J.P. Arm, *Low molecular weight group IIa and group V phospholipase A2 enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(44): p. 31476-31484.
176. Murakami M., T. Kambe, S. Shimbara, and I. Kudo, *Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(5): p. 3103-1.
177. Cupillard L., R. Mulherkar, N. Gomez, S. Kadam, E. Valentin, M. Lazdunski, and G. Lambeau, *Both group Ib and group IIa secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa m-type receptor.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(11): p. 7043-7051.
178. Copic A., N. Vucemilo, F. Gubensek, and I. Krizaj, *Identification and purification of a novel receptor for secretory phospholipase A2 in porcine cerebral cortex.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(37): p. 26315-26320.
179. Zvaritch E., G. Lambeau, and M. Lazdunski, *Endocytic properties of the m-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A(2).* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(1): p. 250-257.
180. Murakami M., S. Shimbara, T. Kambe, H. Kuwata, M.V. Winstead, J.A. Tischfield, and I. Kudo, *The functions of five distinct mammalian phospholipase as in regulating arachidonic acid release: Type IIa and type V secretory phospholipase as are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(23): p. 14411-14423.
181. Reddy S.T. and H.R. Herschman, *Transcellular prostaglandin production following mast cell activation is mediated by proximal secretory phospholipase A(2) and distal prostaglandin synthase 1.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(1): p. 186-21460.
182. Kinoshita E., N. Handa, K. Hanada, G. Kajiyama, and M. Sugiyama, *Activation of map kinase cascade induced by human pancreatic phospholipase A in a human pancreatic cancer cell line.* FEBS Letters, 1997. **407**(3): p. 343-346.
183. Balsinde J., I.D. Bianco, E.J. Ackermann, K. Conde-Frieboes, and E.A. Dennis, *Inhibition of calcium-independent phospholipase A prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D macrophages.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(18): p. 8527-8531.
184. Balsinde J., M.A. Balboa, and E.A. Dennis, *Antisense inhibition of group VI Ca-independent phospholipase A blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D macrophages.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(46): p. 29317-29321.

185. Rikitake Y., K. Hirata, S. Kawashima, S. Takeuchi, Y. Shimokawa, Y. Kojima, N. Inoue, and M. Yokoyama, *Signaling mechanism underlying COX-2 induction by lysophosphatidylcholine.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **281**(5): p. 1291-1297.
186. Jang B.-C., T. Sanchez, H.-J. Schaefers, O.C. Trifan, C.H. Liu, C. Creminon, C.-K. Huang, and T. Hla, *Serum withdrawal-induced post-transcriptional stabilization of cyclooxygenase-2 mRNA in MDA-MB-231 mammary carcinoma cells requires the activity of the P38 stress-activated protein kinase.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(50): p. 39507-1.
187. Maldve R.E., Y. Kim, S.J. Muga, and S.M. Fischer, *Prostaglandin E2 regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors.* Journal of Lipid Research, 2000. **41**(6): p. 873-2184.
188. Nanji A.A., L. Miao, P. Thomas, A. Rahemtulla, S. Khwaja, S. Zhao, D. Peters, S.R. Tahan, and A.J. Dannenberg, *Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat.* Gastroenterology, 1997. **112**(3): p. 943-951.
189. Mcadam B.F., I.A. Mardini, A. Habib, A. Burke, J.A. Lawson, S. Kapoor, and G.A. Fitzgerald, *Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation.* Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(10): p. 1473-1482.
190. Nantel F., E. Meadows, D. Denis, B. Connolly, K.M. Metters, and A. Giaid, *Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly.* FEBS Letters, 1999. **457**(3): p. 475-477.
191. Samad T.A., K.A. Moore, A. Sapirstein, S. Billet, A. Allchorne, S. Poole, J.V. Bonventre, and C.J. Woolf, *Interleukin-1 beta-mediated induction of COX-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity.* Nature, 2001. **410**(6827): p. 471-475.
192. Hirai K., H. Takayama, K. Tomo, and M. Okuma, *Protein-tyrosine-kinase-dependent expression of cyclo-oxygenase-1 and -2 mRNAs in human endothelial cells.* Biochemical Journal, 1997. **322**(2): p. 373-377.
193. Karim S., A. Habib, S. Lévy-Toledano, and J. Maclouf, *Cyclooxygenases-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane.* Journal of Biological Chemistry., 1996. **271**(20): p. 12042-21460.
194. Akarasereenont P. and C. Thiemermann, *The induction of cyclo-oxygenase-2 in human pulmonary epithelial cell culture (A549) activated by IL-1 beta is inhibited by tyrosine kinase inhibitors.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996. **220**(1): p. 181-185.
195. Zimmermann K.C., M. Sarbia, K. Schror, and A.-A. Weber, *Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa.* Molecular Pharmacology, 1998. **54**(3): p. 536-540.
196. Smith T.J., T.A. Jennings, D. Sciaky, and H.J. Cao, *Prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 expression in human thyroid epithelium. Evidence for constitutive expression in vivo and in cultured KAT-50 cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(22): p. 15622-15632.
197. Goldyne M.E., *Cyclooxygenase isoforms in human skin.* Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2000. **63**(1-2): p. 15-23.
198. Dixon D.A., C.D. Kaplan, T.M. Mcintyre, G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott, *Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(16): p. 11750-1.
199. Cok S.J. and A.R. Morrison, *The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(25): p. 23179-23185.
200. Gorgoni B., M. Caivano, C. Arizmendi, and V. Poli, *The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the COX-2 gene in macrophages but not in fibroblasts.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(44): p. 40769-40777.
201. Mestre J.R., P.J. Mackrell, D.E. Rivadeneira, P.P. Stapleton, T. Tanabe, and J.M. Daly, *Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(6): p. 3977-1.
202. Hinz B., K. Brune, and A. Pahl, *Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **278**(3): p. 790-796.
203. Barry O.P., M.G. Kazanietz, D. Pratico, and G.A. Fitzgerald, *Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(11): p. 7545-1.

204. Maloney C.G., W.A. Kutchera, K.H. Albertine, T.M. Mcintyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman, *Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils.* Journal of Immunology, 1998. **160**(3): p. 1402-1410.
205. Huang Z.-F., J.B. Massey, and D.P. Via, *Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1[beta] (IL-1[beta]) and tumor necrosis factor-[alpha] (TNF-[alpha]) in human in vitro differentiated macrophages.* Biochemical Pharmacology, 2000. **59**(2): p. 187-194.
206. Wallner B.P., R.J. Mattaliano, C. Hession, and A. Et, *Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A inhibitor with potential anti-inflammatory activity.* Nature, 1986. **320**(6057): p. 77-81.
207. Hinz B., K. Brune, and A. Pahl, *Prostaglandin E upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **272**(3): p. 744-748.
208. Mestre J.R., D.E. Rivadeneira, P.J. Mackrell, M. Duff, P.P. Stapleton, V. Mack-Strong, S. Maddali, G.P. Smyth, T. Tanabe, and J.M. Daly, *Overlapping CRE and E-box promoter elements can independently regulate COX-2 gene transcription in macrophages.* FEBS Letters, 2001. **496**(2-3): p. 147-151.
209. Shimada K., T. Kita, Y. Yonetani, A. Suzumura, and T. Nakashima, *The effect of endothelin-1 on lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase 2 expression in association with prostaglandin E.* European Journal of Pharmacology, 2000. **388**(2): p. 187-194.
210. Wadleigh D.J., S.T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh, and H.R. Herschman, *Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(9): p. 6259-1.
211. Yamamoto K., T. Arakawa, N. Ueda, and S. Yamamoto, *Transcriptional roles of nuclear factor kappaB and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in mc3T3-e1 cells.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(52): p. 31315-31320.
212. Von Knethen A. and B. Brune, *Superinduction of cyclooxygenase-2 by NO and agonist challenge involves transcriptional regulation mediated by AP-1 activation.* Biochemistry, 2000. **39**(6): p. 1532-1540
213. Rosenstock M., A. Danon, and G. Rimon, *Prostaglandin H synthase: Protein synthesis-independent regulation in bovine aortic endothelial cells.* American Journal of Physiology, 1997. **273**(5): p. C1749-55
214. Yan Z., K. Subbaramaiah, T. Camilli, F. Zhang, T. Tanabe, T.A. Mccaffrey, A.J. Dannenberg, and B.B. Weksler, *Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappa B.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(7): p. 4949-1.
215. Xu K., A.M. Robida, and T.J. Murphy, *Immediate-early MEK-1-dependent stabilization of rat smooth muscle cell cyclooxygenase-2 mRNA by Galpha Q-coupled receptor signaling.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(30): p. 23012-1.
216. Meade E.A., T.M. Mcintyre, G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott, *Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(12): p. 8328
217. Haertel-Wiesmann M., Y. Liang, W.J. Fantl, and L.T. Williams, *Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by WNT-3 in mouse mammary epithelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(41): p. 32046-1.
218. Howe L.R., H.C. Crawford, K. Subbaramaiah, J.A. Hassell, A.J. Dannenberg, and A.M.C. Brown, *Pea3 is up-regulated in response to WNT1 and activates the expression of cyclooxygenase-2.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(23): p. 20108-20115.
219. Newton R., L.M. Kuitert, M. Bergmann, I.M. Adcock, and P.J. Barnes, *Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **237**(1): p. 28-32.
220. Ridley S.H., J.L.E. Dean, S.J. Sarsfield, M. Brook, A.R. Clark, and J. Saklatvala, *A P38 map kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA.* FEBS Letters, 1998. **439**(1-2): p. 75-80.
221. Bonazzi A., V. Mastyugin, P.A. Mieyal, M.W. Dunn, and M. Laniado-Schwartzman, *Regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia and peroxisome proliferators in the corneal epithelium.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(4): p. 2837-1.
222. Iniguez M.A., S. Martinez-Martinez, C. Punzon, J.M. Redondo, and M. Fresno, *An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(31): p. 23627-1.

223. De Gregorio R., M.A. Iniguez, M. Fresno, and S. Alemany, *COT kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(29): p. 27003-27009.
224. Matsuura H., M. Sakaue, K. Subbaramaiah, H. Kamitani, T.E. Eling, A.J. Dannenberg, T. Tanabe, H. Inoue, J. Arata, and A.M. Jetten, *Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon gamma and transforming growth factor alpha in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(41): p. 29138-1.
225. Slice L.W., L. Bui, C. Mak, and J.H. Walsh, *Differential regulation of COX-2 transcription by ras- and rho-family of GTPases.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **276**(2): p. 406-10
226. Wadleigh D.J. and H.R. Herschman, *Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene by diverse ligands in murine osteoblasts.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **264**(3): p. 865-870.
227. Ogasawara A., T. Arakawa, T. Kaneda, T. Takuma, T. Sato, H. Kaneko, M. Kumegawa, and Y. Hakeda, *Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta , cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic mc3T3-e1 cells.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(10): p. 7048-1.
228. Subbaramaiah K., J.C. Hart, L. Norton, and A.J. Dannenberg, *Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of ERK1/2 and P38 mitogen-activated protein kinase pathways.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(20): p. 14838-14845.
229. Faour W.H., Y. He, Q.W. He, M. De Ladurantaye, M. Quintero, A. Mancini, and J.A. Di Battista, *Prostaglandin E2 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of P38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1beta -treated human synovial fibroblasts.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(34): p. 31720-31731.
230. Liu J., M. Antaya, D. Boerboom, J.G. Lussier, D.W. Silversides, and J. Sirois, *The delayed activation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in bovine granulosa cells is associated with down-regulation of truncated upstream stimulatory factor-2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(49): p. 35037-45
231. Pistritto G., O. Franzese, G. Pozzoli, C. Mancuso, G. Tringali, P. Preziosi, and P. Navarra, *Bacterial lipopolysaccharide increases prostaglandin production by rat astrocytes via inducible cyclo-oxygenase: Evidence for the involvement of nuclear factor B.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **263**(2): p. 570-574.
232. Balsinde J., M.A. Balboa, and E.A. Dennis, *Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(14): p. 7951-3420.
233. Reddy S.T., D.J. Wadleigh, and H.R. Herschman, *Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(5): p. 3107-1.
234. Martin-Sanz P., N.A. Callejas, M. Casado, M.J.M. Diaz-Guerra, and L. Bosca, *Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines.* British Journal of Pharmacology, 1998. **125**(6): p. 1313-1319.
235. Johnson C.A., M.A. Balboa, J. Balsinde, and E.A. Dennis, *Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic wish cells.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(39): p. 27689-1.
236. Tran P.O.T., C.E. Gleason, V. Poitout, and R.P. Robertson, *Prostaglandin E2 mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1beta.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(44): p. 31245-31248.
237. Kraemer S.A., K.A. Arthur, M.S. Denison, W.L. Smith, and D.L. Dewitt, *Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **330**(2): p. 319-328.
238. Yang X., F. Hou, L. Taylor, and P. Polgar, *Characterization of human cyclooxygenase 2 gene promoter localization of a TGF-beta response element.* Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression, 1997. **1350**(3): p. 287-292.
239. Mcginty A., M. Foschi, Y.-W.E. Chang, J. Han, M.J. Dunn, and A. Sorokin, *Induction of prostaglandin endoperoxide synthase 2 by mitogen-activated protein kinase cascades.* Biochemical Journal, 2000. **352**(2): p. 419-424.
240. Nantel F., N. Denis, R. Gordon, G. Northey, M. Cirino, K.M. Metters, and C.C. Chan, *Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation.* British Journal of Pharmacology, 1999. **128**(4): p. 853-859.

241. Seibert K., Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, W. Perkins, L. Lee, and P. Isakson, *Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(25): p. 12013-3420.
242. Koljak R., I. Jarving, R. Kurg, W.E. Boeglin, K. Varvas, K. Valmsen, M. Ustav, A.R. Brash, and N. Samel, *The basis of prostaglandin synthesis in coral. Molecular cloning and expression of a cyclooxygenase from the arctic soft coral gersemia fruticosa.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(10): p. 7033-1.
243. Loll P.J., D. Picot, O. Ekabo, and R.M. Garavito, *Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H synthase cyclooxygenase active site.* Biochemistry, 1996. **35**(23): p. 7330-7340.
244. Picot D., P.J. Loll, and R.M. Garavito, *The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H synthase-1.* Nature, 1994. **367**(6460): p. 243-249.
245. Spencer A.G., E. Thuresson, J.C. Otto, I. Song, T. Smith, D.L. Dewitt, R.M. Garavito, and W.L. Smith, *The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(46): p. 32936-32942.
246. Spencer A.G., J.W. Woods, T. Arakawa, I.I. Singer, and W.L. Smith, *Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(16): p. 9886-9893.
247. Guo Q. and R.J. Kulmacz, *Distinct influences of carboxyl terminal segment structure on function in the two isoforms of prostaglandin H synthase.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **384**(2): p. 269-279.
248. Nemeth J.F., J. Hochensang G.P., L.J. Marnett, and R.M. Caprioli, *Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry.* Biochemistry, 2001. **40**(10): p. 3109-3116.
249. Percival M.D., L. Bastien, P.R. Griffin, S. Kargman, M. Ouellet, and G.P. O'neill, *Investigation of human cyclooxygenase-2 glycosylation heterogeneity and protein expression in insect and mammalian cell expression systems.* Protein Expression and Purification, 1997. **9**(3): p. 388-398.
250. Malkowski M.G., M.J. Theisen, A. Scharmen, and R.M. Garavito, *The formation of stable fatty acid substrate complexes in prostaglandin h synthase-1.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **380**(1): p. 39-45.
251. Malkowski M.G., S.L. Ginell, W.L. Smith, and R.M. Garavito, *The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase.* Science, 2000. **289**(5486): p. 1933-1937.
252. Kiefer J.R., J.L. Pawlitz, K.T. Moreland, R.A. Stegeman, W.F. Hood, J.K. Gierse, A.M. Stevens, D.C. Goodwin, S.W. Rowlinson, L.J. Marnett, W.C. Stallings, and R.G. Kurumbail, *Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction.* Nature, 2000. **405**(6782): p. 97-101.
253. Rieke C.J., A.M. Mulichak, R.M. Garavito, and W.L. Smith, *The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(24): p. 17109-1.
254. Kalgutkar A.S., B.C. Crews, and L.J. Marnett, *Design, synthesis, and biochemical evaluation of N-substituted maleimides as inhibitors of prostaglandin endoperoxide synthases.* Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(8): p. 1692-1703.
255. Kalgutkar A.S., B.C. Crews, and L.J. Marnett, *Kinetics of the interaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs with prostaglandin endoperoxide synthase-1 studied by limited proteolysis.* Biochemistry, 1996. **35**(28): p. 9076-9082.
256. Smith T., J. Mccracken, Y.-K. Shin, and D. Dewitt, *Arachidonic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce conformational changes in the human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 (cyclooxygenase-2).* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(51): p. 40407-40415.
257. Bhattacharyya D.K., M. Lecomte, C.J. Rieke, R.M. Garavito, and W.L. Smith, *Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(4): p. 2179-2184.
258. Greig G.M., D.A. Francis, J.-P. Falgueyret, M. Ouellet, M.D. Percival, P. Roy, C. Bayly, J.A. Mancini, and G.P. O'neill, *The interaction of arginine 106 of human prostaglandin G/H synthase-2 with inhibitors is not a universal component of inhibition mediated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Molecular Pharmacology, 1997. **52**(5): p. 829-908.

259. Luong C., A. Miller, J. Barnett, J. Chow, C. Ramesha, and M.F. Browner, *Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2.* Nature Structural Biology, 1996. **3**(11): p. 927-933.
260. Johnson J.L., J. Wimsatt, S.D. Buckel, R.D. Dyer, and K.R. Maddipati, *Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995. **324**(1): p. 26-34.
261. Kerkhoff C., M. Klempt, V. Kaever, and C. Sorg, *The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(46): p. 32672-32679.
262. Roulin K., G. Hagens, R. Hotz, J.-H. Saurat, J.H. Veerkamp, and G. Siegenthaler, *The fatty acid-binding heterocomplex FA-P34 formed by S100A8 and S100A9 is the major fatty acid carrier in neutrophils and translocates from the cytosol to the membrane upon stimulation.* Experimental Cell Research, 1999. **247**(2): p. 410-421.
263. Kerkhoff C., C. Sorg, N.N. Tandon, and W. Nacken, *Interaction of S100A8/S100A9 - arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells.* Biochemistry, 2001. **40**(1): p. 241-248.
264. Seibold S.A., J.F. Cerda, A.M. Mulichak, I. Song, R.M. Garavito, T. Arakawa, W.L. Smith, and G.T. Babcock, *Peroxidase activity in prostaglandin endoperoxide H synthase-1 occurs with a neutral histidine proximal heme ligand.* Biochemistry, 2000. **39**(22): p. 6616-6624.
265. Landino L.M., B.C. Crews, J.K. Gierse, S.D. Hauser, and L.J. Marnett, *Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(34): p. 21565-21574.
266. Dean A. and F. Dean, *Carbocations in the synthesis of prostaglandins by the cyclooxygenase of PGH synthase? A radical departure!* Protein Science, 1999. **8**(5): p. 1087-1098.
267. Tsai A.-L. and R.J. Kulmacz, *Tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase-1 and -2.* Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2000. **62**(3): p. 231-254.
268. Eling T.E., W.C. Glasgow, J.F. Curtis, W.C. Hubbard, and J.A. Handler, *Studies on the reduction of endogenously generated prostaglandin G by prostaglandin H synthase.* Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(19): p. 12348-12355.
269. Wei C., R.J. Kulmacz, and A.-L. Tsai, *Comparison of branched-chain and tightly coupled reaction mechanisms for prostaglandin H synthase.* Biochemistry, 1995. **34**(26): p. 8499-8512.
270. Bambai B. and R.J. Kulmacz, *Prostaglandin H synthase. Effects of peroxidase cosubstrates on cyclooxygenase velocity.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(36): p. 27608-1.
271. Goodwin D.C., S.W. Rowlinson, and L.J. Marnett, *Substitution of tyrosine for the proximal histidine ligand to the heme of prostaglandin endoperoxide synthase 2: Implications for the mechanism of cyclooxygenase activation and catalysis.* Biochemistry, 2000. **39**(18): p. 5422-5432.
272. Koshkin V. and H.B. Dunford, *Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase.* Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999. **1430**(2): p. 341-348.
273. Malkowski M.G., E.D. Thuresson, K.M. Lakkides, C.J. Rieke, R. Micielli, W.L. Smith, and R.M. Garavito, *Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 37547-37555.
274. Weaver J.A., J.F. Maddox, Y.Z. Cao, I.K. Mullarky, and L.M. Sordillo, *Increased 15-HPETE production decreases prostacyclin synthase activity during oxidant stress in aortic endothelial cells.* Free Radical Biology and Medicine, 2001. **30**(3): p. 299-308.
275. Kozak K.R., S.W. Rowlinson, and L.J. Marnett, *Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(43): p. 33744-1.
276. Kozak K.R., J.J. Prusakiewicz, S.W. Rowlinson, C. Schneider, and L.J. Marnett, *Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol.* Journal of Biological Chemistry., 2001. **276**(32): p. 30072-30077.
277. Yu M., D. Ives, and C.S. Ramesha, *Synthesis of prostaglandin E ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(34): p. 21181-21186.

278. So O.-Y., L.E. Scarafia, A.Y. Mak, O.H. Callan, and D.C. Swinney, *The dynamics of prostaglandin H synthases. Studies with prostaglandin H synthase 2 Y355F unmask mechanisms of time-dependent inhibition and allosteric activation.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5801-1.
279. Thuresson E.D., K.M. Lakkides, and W.L. Smith, *Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(12): p. 8501-1.
280. Schutz G.J., G. Kada, V.P. Pastushenko, and H. Schindler, *Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy.* EMBO Journak, 2000. **19**(5): p. 892-901.
281. Rowlinson S.W., B.C. Crews, C.A. Lanzo, and L.J. Marnett, *The binding of arachidonic acid in the cyclooxygenase active site of mouse prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). A putative L-shaped binding conformation utilizing the top channel region.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(33): p. 23305-1.
282. Rowlinson S.W., B.C. Crews, D.C. Goodwin, C. Schneider, J.K. Gierse, and L.J. Marnett, *Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5z,8z,11z,13e-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesize 15-(R)-HETE.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(9): p. 6586-1.
283. Thuresson E.D., M.G. Malkowski, K.M. Lakkides, C.J. Rieke, A.M. Mulichak, S.L. Ginell, R.M. Garavito, and W.L. Smith, *Mutational and X-ray crystallographic analysis of the interaction of dihomo-gamma -linolenic acid with prostaglandin endoperoxide H synthases.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(13): p. 10358-1.
284. Schneider C. and A.R. Brash, *Stereospecificity of hydrogen abstraction in the conversion of arachidonic acid to 15R-HETE by aspirin-treated cyclooxygenase-2. Implications for the alignment of substrate in the active site.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(7): p. 4743-4746.
285. Lopez S., L. Vila, F. Breviario, and C. De Castellarnau, *Interleukin-1 increases 15-hydroxyeicosatetraenoic acid formation in cultured human endothelial cells.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1993. **1170**(1): p. 17-24.
286. Amat M., C. Diaz, and L. Vila, *Leukotriene A hydrolase and leukotriene C synthase activities in human chondrocytes. Transcellular biosynthesis of leukotrienes during granulocyte-chondrocyte interaction.* Arthritis and Rheumatism, 1998. **41**(9): p. 1645-1651.
287. Brock T.G., R.W. Mcnish, and M. Peters-Golden, *Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 11660-1.
288. Capdevila J.H., J.D. Morrow, Y.Y. Belosludtsev, D.R. Beauchamp, R.N. Dubois, and J.R. Falck, *The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible isoforms of prostaglandin H synthase are markedly affected by glutathione and glutathione peroxidase(s).* Biochemistry, 1995. **34**(10): p. 3325-37
289. Walter M.F., J.B. Blumberg, G.G. Dolnikowski, and G.J. Handelman, *Streamlined F-isoprostane analysis in plasma and urine with high- performance liquid chromatography and gas chromatography/mass spectroscopy.* Analytical Biochemistry, 2000. **280**(1): p. 73-79.
290. Morrow J.D., W.E. Zackert, J.P. Yang, E.H. Kurhts, D. Callewaert, R. Dworski, K. Kanai, D. Taber, K. Moore, J.A. Oates, and L.J. Roberts, *Quantification of the major urinary metabolite of 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-PGF2-alpha) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay.* Analytical Biochemistry, 1999. **269**(2): p. 326-331.
291. Valmsen K., I. Jarving, W.E. Boeglin, K. Varvas, R. Koljak, T. Pehk, A.R. Brash, and N. Samel, *The origin of 15R-prostaglandins in the caribbean coral plexaura homomalla: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(14): p. 7700-7705.
292. Marshall P., R. Kulmacz, and W. Lands, *Constraints on prostaglandin biosynthesis in tissues.* Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(8): p. 3510-3517.
293. Wu G., C. Wei, R.J. Kulmacz, Y. Osawa, and A.-L. Tsai, *A mechanistic study of self-inactivation of the peroxidase activity in prostaglandin H synthase-1.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(14): p. 9231-1.
294. Wu G., J.L. Vuletich, R.J. Kulmacz, Y. Osawa, and A.-L. Tsai, *Peroxidase self-inactivation in prostaglandin H synthase-1 pretreated with cyclooxygenase inhibitors or substituted with mangano protoporphyrin IX.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(23): p. 19879-19888.

295. Serhan C.N., C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, K. Gronert, and N. Chiang, *Anti-microinflammatory lipid signals generated from dietary n-3 fatty acids via cyclooxygenase-2 and transcellular processing: A novel mechanism for NSAID and n-3 PUFA therapeutic actions.* Journal of Physiology and Pharmacology, 2000. **51**(4): p. 643-654.
296. Lecomte M., R. Lecocq, J.E. Dumont, and J.-M. Boeynaems, *Covalent binding of arachidonic acid metabolites to human platelet proteins. Identification of prostaglandin H synthase as one of the modified substrates.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(9): p. 5178-5187.
297. Shitashige M., I. Morita, and S. Murota, *Existence of endogenous inhibitor(s) of prostaglandin endoperoxide H synthase activities in murine NIH3T3 fibroblasts.* Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1999. **61**(2): p. 97-103.
298. Kulmacz R.J. and L.-H. Wang, *Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(41): p. 24019-24023.
299. Margalit A., S.D. Hauser, B.S. Zweifel, M.A. Anderson, and P.C. Isakson, *Regulation of prostaglandin biosynthesis in vivo by glutathione.* American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 1998. **274**(2 43-2): p. R294-R302.
300. Rodriguez De Turco E.B. and J.A. Spitzer, *Metabolic fate of arachidonic acid in hepatocytes of continuously endotoxemic rats.* Journal of Clinical Investigation, 1988. **81**(3): p. 700-709.
301. Sakuma S., Y. Fujimoto, T. Sawada, K. Saeki, M. Akimoto, and T. Fujita, *Existence of acyl-CoA hydrolase-mediated pathway supplying arachidonic acid for prostaglandin synthesis in microsomes from rabbit kidney medulla.* Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 1999. **57**(2-3): p. 63-72.
302. Sakuma S., Y. Fujimoto, Y. Katoh, A. Kitao, and T. Fujita, *The effects of fatty acyl CoA esters on the formation of prostaglandin and arachidonoyl-CoA formed from arachidonic acid in rabbit kidney medulla microsomes.* Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2001. **64**(1): p. 61-65.
303. Sakuma S., Y. Fujimoto, A. Kitao, H. Sakamoto, H. Nishida, and T. Fujita, *Simultaneous measurement of prostaglandin and arachidonoyl CoA formed from arachidonic acid in rabbit kidney medulla microsomes: The roles of Zn and Cu as modulators of formation of the two products.* Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1999. **61**(2): p. 105-112.
304. Kang M.-J., T. Fujino, H. Sasano, H. Minekura, N. Yabuki, H. Nagura, H. Iijima, and T.T. Yamamoto, *A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(7): p. 2880-6677.
305. Yamada R., H. Sano, T. Hla, A. Hashiramoto, Y. Kawahito, S. Mukai, M. Kohno, Y. Tsubouchi, M. Inoue, A. Komatsu, K.-I. Inoue, and M. Kondo, *Selective inhibition of cyclooxygenase-2 with antisense oligodeoxynucleotide restricts induction of rat adjuvant-induced arthritis.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **269**(2): p. 415-421.
306. Cao C., K. Matsumura, K. Yamagata, and Y. Watanabe, *Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response.* Brain Research, 1995. **697**(1-2): p. 187-196.
307. Quan N., M. Whiteside, and M. Herkenham, *Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide.* Brain Research, 1998. **802**(1-2): p. 189-197.
308. Li S., L.R. Ballou, S.G. Morham, and C.M. Blatteis, *Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1b.* Brain Research, 2001. **910**(1-2): p. 163-173.
309. Smith C.J., Y. Zhang, C.M. Koboldt, J. Muhammad, B.S. Zweifel, A. Shaffer, J.J. Talley, J.L. Masferrer, K. Seibert, and P.C. Isakson, *Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(22): p. 13313-13318.
310. Mcadam B.F., F. Catella-Lawson, I.A. Mardini, S. Kapoor, J.A. Lawson, and G.A. Fitzgerald, *Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(1): p. 272-277.
311. Langenbach R., C. Loftin, C. Lee, and H. Tiano, *Cyclooxygenase knockout mice models for elucidating isoform-specific functions.* Biochemical Pharmacology, 1999. **58**(8): p. 1237-1246.

312. Newberry R.D., W.F. Stenson, and R.G. Lorenz, *Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen.* Nature Medicine, 1999. **5**(8): p. 900-906.
313. Morham S.G., R. Langenbach, C.D. Loftin, H.F. Tiano, N. Vouloumanos, J.C. Jennette, J.F. Mahler, K.O. Kluckman, A. Ledford, C.A. Lee, and O. Smithies, *Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse.* Cell, 1995. **83**(3): p. 473-482.
314. Kawata R., S.T. Reddy, B. Wolner, and H.R. Herschman, *Prostaglandin synthase 1 and prostaglandin synthase 2 both participate in activation-induced prostaglandin D production in mast cells.* Journal of Immunology, 1995. **155**(2): p. 818-825.
315. Reddy S.T. and H.R. Herschman, *Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D in activated mast cells.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(6): p. 3231-3237.
316. Gilroy D.W., A. Tomlinson, and D.A. Willoughby, *Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation.* European Journal of Pharmacology, 1998. **355**(2-3): p. 211-217.
317. Gilroy D.W., A. Tomlinson, and D.A. Willoughby, *Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation.* Inflammation Research, 1998. **47**(2): p. 79-85.
318. Lichtenberger L.M., *Where is the evidence that cyclooxygenase inhibition is the primary cause of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastrointestinal injury? Topical injury revisited.* Biochemical Pharmacology, 2001. **61**(6): p. 631-637.
319. Liu C.H., S.-H. Chang, K. Narko, O.C. Trifan, M.-T. Wu, E. Smith, C. Haudenschild, T.F. Lane, and T. Hla, *Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(21): p. 18563-18569.
320. Tsujii M. and R.N. Dubois, *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2.* Cell, 1995. **83**(3): p. 493-501.
321. Vance J.E., *Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: The same but not the same.* Trends in Biochemical Sciences, 1998. **23**(11): p. 423-428.
322. Tsai A.-L., G. Wu, G. Palmer, B. Bambai, J.A. Koehn, P.J. Marshall, and R.J. Kulmacz, *Rapid kinetics of tyrosyl radical formation and heme redox state changes in prostaglandin H synthase-1 and -2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(31): p. 21695-1.
323. Lu G., A.-L. Tsai, H.E. Van Wart, and R.J. Kulmacz, *Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(23): p. 16162-1.
324. Swinney D.C., A.Y. Mak, J. Barnett, and C.S. Ramesha, *Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(19): p. 12393-21460.
325. Chen W., T.R. Pawelek, and R.J. Kulmacz, *Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(29): p. 20301
326. Chulada P.C., C.D. Loftin, V.D. Winn, D.A. Young, H.F. Tiano, T.E. Eling, and R. Langenbach, *Relative activities of retrovirally expressed murine prostaglandin synthase-1 and -2 depend on source of arachidonic acid.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **330**(2): p. 301-313.
327. Kargman S., E. Wong, G.M. Greig, J.-P. Falgueyret, W. Cromlish, D. Ethier, J.A. Yergey, D. Riendeau, J.F. Evans, B. Kennedy, P. Tagari, D.A. Francis, and G.P. O'neill, *Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells.* Biochemical Pharmacology, 1996. **52**(7): p. 1113-1125.
328. Kozak K.R., B.C. Crews, J.L. Ray, H.-H. Tai, J.D. Morrow, and L.J. Marnett, *Metabolism of prostaglandin glycerol esters and prostaglandin ethanolamides in vitro and in vivo.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 36993-36998.
329. Ek-Von Mentzer B.A., F. Zhang, and J.A. Hamilton, *Binding of 13-HODE and 15-HETE to phospholipid bilayers, albumin, and intracellular fatty acid binding proteins. Implications for transmembrane and intracellular transport and for protection from lipid peroxidation.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 15575-15580.
330. Forsberg L., L. Leeb, S. Thoren, R. Morgenstern, and P.-J. Jakobsson, *Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: Gene structure and regulation.* FEBS Letters, 2000. **471**(1): p. 78-82.

331. Mancini J.A., K. Blood, J. Guay, R. Gordon, D. Claveau, C.-C. Chan, and D. Riendeau, *Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(6): p. 4469-1.
332. Murakami M., H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh-Ishi, and I. Kudo, *Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(42): p. 32783-1.
333. Caughey G.E., L.G. Cleland, P.S. Penglis, J.R. Gamble, and M.J. James, *Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: Selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2.* Journal of Immunology, 2001. **167**(5): p. 2831-2838.
334. Jakobsson P.-J., S. Thoren, R. Morgenstern, and B. Samuelsson, *Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(13): p. 7220-3420.
335. Tanioka T., Y. Nakatani, N. Semmyo, M. Murakami, and I. Kudo, *Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(42): p. 32775-1.
336. Kuhn H. and B.J. Thiele, *The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance.* FEBS Letters, 1999. **449**(1): p. 7-11.
337. Gillmor S.A., A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, and M.F. Browner, *The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity.* Nature Structural Biology, 1997. **4**(12): p. 1003-1009.
338. Peters-Golden M. and T.G. Brock, *Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: Unexpected nuclear secrets.* FEBS Letters, 2001. **487**(3): p. 323-326.
339. Chen X.-S., and C.D. Funk, *The N-terminal "beta -barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **276**(1): p. 811-818.
340. Provost P., B. Samuelsson, and O. Radmark, *Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(5): p. 1881-5
341. Brash A.R., *Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(34): p. 23679-23682.
342. Boeglin W.E., R.B. Kim, and A.R. Brash, *A 12R-lipoxygenase in human skin: Mechanistic evidence, molecular cloning, and expression.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(12): p. 6744-6749.
343. Moody J.S., K.R. Kozak, C. Ji, and L.J. Marnett, *Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase.* Biochemistry, 2001. **40**(4): p. 861-866.
344. Hada T., N. Ueda, Y. Takahashi, and S. Yamamoto, *Catalytic properties of human platelet 12-lipoxygenase as compared with the enzymes of other origins.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1991. **1083**(1): p. 89-93.
345. Rahman M., J.T.J. Wright, and J.G. Douglas, *The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function. A review.* American Journal of Hypertension, 1997. **10**(3): p. 356-365.
346. Qu W., J.A. Bradbury, C.-C. Tsao, R. Maronpot, G.J. Harry, C.E. Parker, L.S. Davis, M.D. Breyer, M.P. Waalkes, J.R. Falck, J. Chen, R.L. Rosenberg, and D.C. Zeldin, *Cytochrome P450 CYP2J9, a new mouse arachidonic acid omega -1 hydroxylase predominantly expressed in brain.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(27): p. 25467-25479.
347. Huang J.T., J.S. Welch, M. Ricote, C.J. Binder, T.M. Willson, C. Kelly, J.L. Witztum, C.D. Funk, D. Conrad, and C.K. Glass, *Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase.* Nature, 1999. **400**(6742): p. 378-382.
348. Ghosh J. and C.E. Myers, *Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(22): p. 13182-13187.
349. Sutherland M., P. Shankaranarayanan, T. Schewe, and S. Nigam, *Evidence for the presence of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human platelets: Implications for its involvement in the regulatory network of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism.* Biochemical Journal, 2001. **353**(1): p. 91-100.

350. Pace-Asciak C.R., D. Reynaud, P. Demin, and S. Nigam, *The hepoxilins: A review.* Advances in Experimental Medicine and Biology, 1999. **447**: p. 123-132.
351. Sutherland M., T. Schewe, and S. Nigam, *Biological actions of the free acid of hepoxilin A on human neutrophils.* Biochemical Pharmacology, 2000. **59**(4): p. 435-440.
352. Calorini L., A. Mannini, F. Bianchini, G. Mugnai, and S. Ruggieri, *The change in leukotrienes and lipoxins in activated mouse peritoneal macrophages.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1484**(2-3): p. 87-92.
353. Kramer H.J., J. Stevens, and W. Seeger, *Analysis of 2- and 3-series prostanoids by post-HPLC elisa.* Analytical Biochemistry, 1993. **214**(2): p. 535-543.
354. Rys-Sikora K.E., R.L. Konger, J.W. Schoggins, R. Malaviya, and A.P. Pentland, *Coordinate expression of secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in activated human keratinocytes.* American Journal of Physiology, 2000. **278**(4): p. C822-833.
355. Ko Y.-G., H. Park, T. Kim, J.-W. Lee, S.G. Park, W. Seol, J.E. Kim, W.-H. Lee, S.-H. Kim, J.-E. Park, and S. Kim, *A cofactor of tRNA synthetase, P43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(25): p. 23028-23033.
356. Rupprecht G., K. Scholz, K.-F. Beck, H. Geiger, J. Pfeilschifter, and M. Kaszkin, *Cross-talk between group IIa-phospholipase A and inducible NO-synthase in rat renal mesangial cells.* British Journal of Pharmacology, 1999. **127**(1): p. 51-56.
357. Alcaraz M.J., A. Habib, C. Créminon, A.M. Vicente, M. Lebret, S. Lévy-Toledano, and J. Maclouf, *Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor.* Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 2001. **1526**(1): p. 13-16.
358. Tanaka Y., S. Igimi, and F. Amano, *Inhibition of prostaglandin synthesis by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. **391**(2): p. 207-217.
359. Honda S., K. Migita, Y. Hirai, Y. Ueki, S. Yamasaki, S. Urayama, Y. Kawabe, T. Fukuda, A. Kawakami, M. Kamachi, M. Kita, H. Ida, T. Aoyagi, and K. Eguchi, *Induction of COX-2 expression by nitric oxide in rheumatoid synovial cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **268**(3): p. 928-931.
360. Ma Z., S. Ramanadham, J.A. Corbett, A. Bohrer, R.W. Gross, M.L. Mcdaniel, and J. Turk, *Interleukin-1 enhances pancreatic islet arachidonic acid 12-lipoxygenase product generation by increasing substrate availability through a nitric oxide-dependent mechanism.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(2): p. 1029-1042.
361. Clancy R., B. Varenika, W. Huang, L. Ballou, M. Attur, A.R. Amin, and S.B. Abramson, *Nitric oxide synthase/COX cross-talk: Nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production.* Journal of Immunology, 2000. **165**(3): p. 1582-1587.
362. Goodwin D.C., L.M. Landino, and L.J. Marnett, *Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis.* FASEB Journal, 1999. **13**(10): p. 1121-1136.
363. Landino L.M., B.C. Crews, M.D. Timmons, J.D. Morrow, and L.J. Marnett, *Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(26): p. 15069-3420.
364. O'donnell V.B., B. Coles, M.J. Lewis, B.C. Crews, L.J. Marnett, and B.A. Freeman, *Catalytic consumption of nitric oxide by prostaglandin H synthase-1 regulates platelet function.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(49): p. 38239-38244.
365. Curtis J.F., N.G. Reddy, R.P. Mason, B. Kalyanaraman, and T.E. Eling, *Nitric oxide: A prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate cyclooxygenase activity or prostaglandin H synthase expression in murine macrophages.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **335**(2): p. 369-376.
366. Upmacis R.K., R.S. Deeb, and D.P. Hajjar, *Regulation of prostaglandin H synthase activity by nitrogen oxides.* Biochemistry, 1999. **38**(38): p. 12505-12513.
367. O'donnell V.B., K.B. Taylor, S. Parthasarathy, H. Kuhn, D. Koesling, A. Friebe, A. Bloodsworth, V.M. Darley-Usmar, and B.A. Freeman, *15-lipoxygenase catalytically consumes nitric oxide and impairs activation of guanylate cyclase.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(29): p. 20083-20091.
368. Foley T.D., *The cyclooxygenase hydroperoxide product PGG activates synaptic nitric oxide synthase: A possible antioxidant response to membrane lipid peroxidation.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **286**(2): p. 235-238.

369. Wijkander J., J.T. O'flaherty, A.B. Nixon, and R.L. Wykle, *5-lipoxygenase products modulate the activity of the 85-kDa phospholipase A in human neutrophils.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(44): p. 26543-26549.
370. Ueno N., M. Murakami, and I. Kudo, *Functional crosstalk between phospholipase D2 and signaling phospholipase A2/cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin biosynthetic pathways.* FEBS Letters, 2000. **475**(3): p. 242-246.
371. Matsumoto H., H. Naraba, M. Murakami, I. Kudo, K. Yamaki, A. Ueno, and S. Oh-Ishi, *Concordant induction of prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E over thromboxane and prostaglandin D in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **230**(1): p. 110-114.
372. Ueno N., M. Murakami, T. Tanioka, K. Fujimori, T. Tanabe, Y. Urade, and I. Kudo, *Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(37): p. 34918-34927.
373. Liou J.-Y., S.-K. Shyue, M.-J. Tsai, C.-L. Chung, K.-Y. Chu, and K.K. Wu, *Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin h synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(20): p. 15314-1.
374. Sala A., S. Zarini, G. Folco, R.C. Murphy, and P.M. Henson, *Differential metabolism of exogenous and endogenous arachidonic acid in human neutrophils.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(40): p. 28264-28269.
375. Chicheportiche Y., L. Fossati-Jimack, S. Moll, N. Ibnou-Zekri, and S. Izui, *Down-regulated expression of tweak mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **279**(1): p. 162-165.
376. Attur M.G., M. Dave, C. Cipolletta, P. Kang, M.B. Goldring, I.R. Patel, S.B. Abramson, and A.R. Amin, *Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(51): p. 40307-40315.
377. Radi R., G. Peluffo, M.N. Alvarez, M. Naviliat, and A. Cayota, *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems.* Free Radical Biology and Medicine, 2001. **30**(5): p. 463-488.
378. Ensor C.M. and H.-H. Tai, *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase.* Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling, 1995. **12**(2-3): p. 313-319.
379. Yamane M. and A. Abe, *Omega-hydroxylation activity toward leukotriene B and polyunsaturated fatty acids in the human hepatoblastoma cell line, HepG2, and human lung adenocarcinoma cell line, A549.* Journal of Biochemistry, 2000. **128**(5): p. 827-835.
380. Klatt P., E.P. Molina, and S. Lamas, *Nitric oxide inhibits c-jun DNA binding by specifically targeted S-glutathionylation.* J. Biol. Chem., 1999. **274**(22): p. 15857-15864.
381. Marshall H.E. and J.S. Stamler, *Inhibition of NF-kB by S-nitrosylation.* Biochemistry, 2001. **40**(6): p. 1688-1693.
382. Nedospasov A., R. Rafikov, N. Beda, and E. Nudler, *An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(25): p. 13543-13548.
383. Subbaramaiah K., N. Altorki, W.J. Chung, J.R. Mestre, A. Sampat, and A.J. Dannenberg, *Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by P53.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(16): p. 10911-1.
384. Pang L. and J.R.S. Hoult, *Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages.* Biochemical Pharmacology, 1997. **53**(4): p. 493-500.
385. Fitzpatrick F.A. and R. Soberman, *Regulated formation of eicosanoids.* Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**(11): p. 1347-1351.
386. Lecomte M., R. Lecocq, J. Dumont, and J. Boeynaems, *Covalent binding of arachidonic acid metabolites to human platelet proteins. Identification of prostaglandin H synthase as one of the modified substrates.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(9): p. 5178-5187.
387. Kulmacz R.J., *Attachment of substrate metabolite to prostaglandin H synthase upon reaction with arachidonic acid.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987. **148**(2): p. 539-545.
388. Boutaud O., C.J. Brame, P. Chaurand, J. Li, S.W. Rowlinson, B.C. Crews, C. Ji, L.J. Marnett, R.M. Caprioli, L.J. Roberts Ii, and J.A. Oates, *Characterization of the lysyl adducts of prostaglandin H-*

synthases that are derived from oxygenation of arachidonic acid. Biochemistry, 2001. **40**(23): p. 6948-6955.
389. Fonteh A.N., T. Laporte, D. Swan, and M.A. Mcalexander, *A decrease in remodeling accounts for the accumulation of arachidonic acid in murine mast cells undergoing apoptosis.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(2): p. 1439-1.
390. Chinetti G., S. Griglio, M. Antonucci, I.P. Torra, P. Delerive, Z. Majd, J.-C. Fruchart, J. Chapman, J. Najib, and B. Staels, *Activation of proliferator-activated receptors A and G induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(40): p. 25573-25580.
391. Fadok V.A., A. De Cathelineau, D.L. Daleke, P.M. Henson, and D.L. Bratton, *Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(2): p. 1071-1077.
392. Ianaro A., A. Ialenti, P. Maffia, B. Pisano, and M. Di Rosa, *Hsf1/Hsp72 pathway as an endogenous anti-inflammatory system.* FEBS Letters, 2001. **499**(3): p. 239-244.
393. Willoughby D.A., A.R. Moore, P.R. Colville-Nash, and D. Gilroy, *Resolution of inflammation.* International Journal of Immunopharmacology, 2000. **22**(12): p. 1131-1135.
394. Tamion F., V. Richard, S. Lyoumi, M. Hiron, G. Bonmarchand, J. Leroy, M. Daveau, C. Thuillez, and J.-P. Lebreton, *Induction of haem oxygenase contributes to the synthesis of pro-inflammatory cytokines in re-oxygenated rat macrophages: Role of cGMP.* Cytokine, 1999. **11**(5): p. 326-333.
395. Jackson S.M., F. Parhami, X.-P. Xi, J.A. Berliner, W.A. Hsueh, R.E. Law, and L.L. Demer, *Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999. **19**(9): p. 2094-2104.
396. Nawa T., M.T. Nawa, Y. Cai, C. Zhang, I. Uchimura, S. Narumi, F. Numano, and S. Kitajima, *Repression of TNF-alpha-induced E-selectin expression by PPAR activators: Involvement of transcriptional repressor LRF-1/ATF3.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **275**(2): p. 406-11
397. Ricote M., A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, and C.K. Glass, *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation.* Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
398. Jiang C., A.T. Ting, and B. Seed, *PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines.* Nature, 1998. **391**(6662): p. 82-86.
399. Maggi L.B. J., H. Sadeghi, C. Weigand, A.L. Scarim, M.R. Heitmeier, and J.A. Corbett, *Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta-prostaglandin J and troglitazone evidence for heat shock-dependent and-independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression.* Diabetes, 2000. **49**(3): p. 346-355.
400. Tsubouchi Y., Y. Kawahito, M. Kohno, K. Inoue, T. Hla, and H. Sano, *Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **283**(4): p. 750-755.
401. Inoue H., T. Tanabe, and K. Umesono, *Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(36): p. 28028-1.
402. Subbaramaiah K., D.T. Lin, J.C. Hart, and A.J. Dannenberg, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/P300.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(15): p. 12440-1.
403. Staels B., W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebret, I.P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J.-C. Fruchart, J. Najib, J. Maclouf, and A. Tedgui, *Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR-alpha but not by PPAR-gamma activators.* Nature, 1998. **393**(6687): p. 790-793.
404. Delerive P., P. Gervois, J.C. Fruchart, and B. Staels, *Induction of IkappaB-alpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(47): p. 36703-36707.
405. Zhou Y.-C. and D.J. Waxman, *Cross-talk between janus kinase-signal transducer and activator of transcription (jak-stat) and peroxisome proliferator-activated receptor-a (PPARa) signaling pathways: Growth hormone inhibition of PPARa transcriptional activity mediated by STAT5B.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(5): p. 2672-2681.
406. Zhou Y.-C. and D.J. Waxman, *Stat5b down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor A transcription by inhibition of ligand-independent activation function region- 1 trans-activation domain.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(42): p. 29874-29882.

407. Rossi A., P. Kapahi, G. Natoli, T. Takahashi, Y. Chen, M. Karin, and M.G. Santoro, *Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I-kappa-B kinase.* Nature, 2000. **403**(6765): p. 103-108.
408. Gilroy D.W., P.R. Colville-Nash, D. Willis, J. Chivers, M.J. Paul-Clark, and D.A. Willoughby, *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.* Nature Medicine, 1999. **5**(6): p. 698-701.
409. Lin S., D. Cheng, M.-S. Liu, J. Chen, and T.-Y. Chang, *Human acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase-1 in the endoplasmic reticulum contains seven transmembrane domains.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(33): p. 23276-1.
410. Simmons D.L., R.M. Botting, P.M. Robertson, M.L. Madsen, and J.R. Vane, *Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(6): p. 3275-3280.
411. Willoughby D.A., A.R. Moore, and P.R. Colville-Nash, *COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease.* Lancet, 2000. **355**(9204): p. 646-648.
412. Zeldin D.C., *Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(39): p. 36059-36062.
413. Node K., Y. Huo, X. Ruan, B. Yang, M. Spiecker, K. Ley, D.C. Zeldin, and J.K. Liao, *Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids.* Science, 1999. **285**(5431): p. 1276-79
414. Widstrom R.L., A.W. Norris, and A.A. Spector, *Binding of cytochrome P450 monooxygenase and lipoxygenase pathway products by heart fatty acid-binding protein.* Biochemistry, 2001. **40**(4): p. 1070-6
415. Smith R.J., J.M. Justen, E.G. Nidy, L.M. Sam, and J.E. Bleasdale, *Transmembrane signaling in human polymorphonuclear neutrophils: 15(S)- hydroxy-(5z,8z,11z,13e)-eicosatetraenoic acid modulates receptor agonist- triggered cell activation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(15): p. 7270-7274.
416. Vachier I.P.C., C. Bonnans, P. Godard, J. Bousquet, C. Chavis, *Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **290**(1): p. 219-224.
417. O'flaherty J.T., J.S. Taylor, and M.J. Thomas, *Receptors for the 5-oxo class of eicosanoids in neutrophils.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(49): p. 32535-32541.
418. Pratico D., J.A. Lawson, and G.A. Fitzgerald, *Cylooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F(2a).* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(17): p. 9800-9808.
419. Mcmahon B., S. Mitchell, H.R. Brady, and C. Godson, *Lipoxins: Revelations on resolution.* Trends in Pharmacological Sciences, 2001. **22**(8): p. 391-395.
420. Claria J. and C.N. Serhan, *Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(21): p. 9475-9479.
421. Takano T., S. Fiore, J.F. Maddox, H.R. Brady, N.A. Petasis, and C.N. Serhan, *Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin a (LXa) and LXxa stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: Evidence for anti-inflammatory receptors.* Journal of Experimental Medicine, 1997. **185**(9): p. 1693-1704.
422. Clish C.B., J.A. O'brien, K. Gronert, G.L. Stahl, N.A. Petasis, and C.N. Serhan, *Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(14): p. 8247-8252.
423. Gronert K., T. Martinsson-Niskanen, S. Ravasi, N. Chiang, and C.N. Serhan, *Selectivity of recombinant human leukotriene D, leukotriene B, and lipoxin A receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXa and regulation of vascular and inflammatory responses.* American Journal of Pathology, 2001. **158**(1): p. 3-9.
424. Hachicha M., M. Pouliot, N.A. Petasis, and C.N. Serhan, *Lipoxin (LX)a and aspirin-triggered 15-epi-LXa inhibit tumor necrosis factor 1a-initiated neutrophil responses and trafficking: Regulators of a cytokine-chemokine axis.* Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(12): p. 1923-1929.
425. Reynaud D., A. Sun, P. Demin, and C.R. Pace-Asciak, *Novel platelet antiaggregating substances.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **284**(3): p. 580-582.
426. Nigam S., Pace-Asciak, Cr, *Lipoxygenases and their metabolites biological functions.* Advance in Experimental and Medical Biology, 1999. **447**: p. 123.
427. Dannhardt G. and W. Kiefer, *Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects.* European Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **36**(2): p. 109-126.

428. Pilbeam C.C., H. Kawaguchi, Y. Hakeda, O. Voznesensky, C.B. Alander, and L.G. Raisz, *Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic mc3T3-e1 cells.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(34): p. 25643-25649.
429. Suh N., T. Honda, H.J. Finlay, A. Barchowsky, C. Williams, N.E. Benoit, Q.-W. Xie, C. Nathan, G.W. Gribble, and M.B. Sporn, *Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages.* Cancer Research, 1998. **58**(4): p. 717-723.
430. Zhang M.-Z., R.C. Harris, and J.A. Mckanna, *Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(26): p. 15280-15285.
431. Farooqui A.A., M.L. Litsky, T. Farooqui, and L.A. Horrocks, *Inhibitors of intracellular phospholipase A activity: Their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders.* Brain Research Bulletin, 1999. **49**(3): p. 139-153.
432. Yao X.-L., M.J. Cowan, M.T. Gladwin, M.M. Lawrence, C.W. Angus, and J.H. Shelhamer, *Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of P11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(24): p. 17202-17208.
433. Henricks P.A.J. and F.P. Nijkamp, *Pharmacological modulation of cell adhesion molecules.* European Journal of Pharmacology, 1998. **344**(1): p. 1-13.
434. Lyss G., A. Knorre, T.J. Schmidt, H.L. Pahl, and I. Merfort, *The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappa B by directly targeting P65.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(50): p. 33508-33516.
435. Feldman M., K. Shewmake, and B. Cryer, *Time course inhibition of gastric and platelet COX activity by acetylsalicylic acid in humans.* American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2000. **279**(5 42-5): p. G1113-G1120.
436. Bhattacharyya D.K., M. Lecomte, J. Dunn, D.J. Morgans, and W.L. Smith, *Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995. **317**(1): p. 19-24.
437. Kalgutkar A.S., B.C. Crews, S.W. Rowlinson, C. Garner, K. Seibert, and L.J. Marnett, *Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2.* Science, 1998. **280**(5367): p. 1268-1270.
438. Hochgesang G.P. J., S.W. Rowlinson, and L.J. Marnett, *Tyrosine-385 is critical for acetylation of cyclooxygenase-2 by aspirin [14].* Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(27): p. 6514-5
439. Mancini J.A., P.J. Vickers, G.P. O'neill, C. Boily, J.-P. Falgueyret, and D. Riendeau, *Altered sensitivity of aspirin-acetylated prostaglandin G/H synthase-2 to inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Molecular Pharmacology, 1997. **51**(1): p. 52-60.
440. Kopp E. and S. Ghosh, *Inhibition of NF-kappaB by sodium salicylate and aspirin.* Science, 1994. **265**(5174): p. 956-959.
441. Frantz B., E.A. O'neill, S. Ghosh, and E. Kopp, *The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B.* Science, 1995. **270**(5244): p. 2017-2019.
442. Pillinger M.H., C. Capodici, P. Rosenthal, N. Kheterpal, S. Hanft, M.R. Philips, and G. Weissmann, *Modes of action of aspirin-like drugs: Salicylates inhibit ERK activation and integrin-dependent neutrophil adhesion.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(24): p. 14540-3420.
443. Shackelford R.E., P.B. Alford, Y. Xue, S.-F. Thai, D.O. Adams, and S. Pizzo, *Aspirin inhibits tumor necrosis factor-alpha gene expression in murine tissue macrophages.* Molecular Pharmacology, 1997. **52**(3): p. 421-429.
444. Xu X.-M., L. Sansores-Garcia, X.-M. Chen, N. Matijevic-Aleksic, M. Du, and K.K. Wu, *Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(9): p. 5292-3420.
445. Cronstein B.N., M.C. Montesinos, and G. Weissmann, *Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and P105 of NFkappa B.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(11): p. 6377-6381.
446. Amin A., P. Vyas, M. Attur, J. Leszczynska-Piziak, I. Patel, G. Weissman, and S. Abramson, *The mode of action of aspirin-like drugs: Effect on inducible nitric oxide synthase.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(17): p. 7926-3420.

447. Mitchell J.A., M. Saunders, P.J. Barnes, R. Newton, and M.G. Belvisi, *Sodium salicylate inhibits cyclo-oxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor kappa B) activation: Role of arachidonic acid.* Molecular Pharmacology, 1997. **51**(6): p. 907-912.
448. Bomalaski J.S., J. Alvarez, J. Touchstone, and R.B. Zurier, *Alteration of uptake and distribution of eicosanoid precursor fatty acids by aspirin.* Biochemical Pharmacology, 1987. **36**(19): p. 3249-3253.
449. Jurivich D.A., C. Pachetti, L. Qiu, and J.F. Welk, *Salicylate triggers heat shock factor differently than heat.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(41): p. 24489-24495.
450. Guo Q., L.-H. Wang, K.-H. Ruan, and R.J. Kulmacz, *Role of Val509 in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(32): p. 19134-21460.
451. Van Ryn J. and M. Pairet, *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Pharmacology, clinical effects and therapeutic potential.* Expert Opinion on Investigational Drugs, 1997. **6**(5): p. 609-614.
452. Wong E., C. Bayly, H.L. Waterman, D. Riendeau, and J.A. Mancini, *Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 right-arrow Arg and Ile523 right-arrow val mutation.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(14): p. 9280-9286.
453. Gierse J.K., J.J. Mcdonald, S.D. Hauser, S.H. Rangwala, C.M. Koboldt, and K. Seibert, *A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2(COX-2) reverses the selectivity of cox-2 specific inhibitors.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(26): p. 15810-21460.
454. Kalgutkar A.S., B.C. Crews, S.W. Rowlinson, A.B. Marnett, K.R. Kozak, R.P. Remmel, and L.J. Marnett, *Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(2): p. 925-930.
455. Gierse J.K., C.M. Koboldt, M.C. Walker, K. Seibert, and P.C. Isakson, *Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases.* Biochemical Journal, 1999. **339**(3): p. 607-614.
456. Lanzo C.A., J. Sutin, S. Rowlinson, J. Talley, and L.J. Marnett, *Fluorescence quenching analysis of the association and dissociation of a diarylheterocycle to cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2: Dynamic basis of cyclooxygenase-2 selectivity.* Biochemistry, 2000. **39**(20): p. 6228-6234.
457. Selinsky B.S., K. Gupta, C.T. Sharkey, and P.J. Loll, *Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H synthase: Time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations.* Biochemistry, 2001. **40**(17): p. 5172-5180.
458. Rosenstock M., A. Danon, M. Rubin, and G. Rimon, *Prostaglandin H synthase-2 inhibitors interfere with prostaglandin H synthase-1 inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* European Journal of Pharmacology, 2001. **412**(1): p. 101-108.
459. Jiang Q., I. Elson-Schwab, C. Courtemanche, and B.N. Ames, *Gamma -tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(21): p. 11494-3420.
460. Subbaramaiah K., C. Wen Jing, P. Michaluart, N. Telang, T. Tanabe, H. Inoue, M. Jang, J.M. Pezzuto, and A.J. Dannenberg, *Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(34): p. 21875-82
461. Kurumbail R.G., A.M. Stevens, J.K. Gierse, J.J. Mcdonald, R.A. Stegeman, J.Y. Pak, D. Gildehaus, J.M. Miyashiro, T.D. Penning, K. Seibert, P.C. Isakson, and W.C. Stallings, *Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti- inflammatory agents.* Nature, 1996. **384**(6610): p. 644-648.
462. Pade V. and S. Stavchansky, *Link between drug absorption solubility and permeability measurements in caco-2 cells.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(12): p. 1604-1607.
463. Sugawara M., Y. Takekuma, H. Yamada, M. Kobayashi, K. Iseki, and K. Miyazaki, *A general approach for the prediction of the intestinal absorption of drugs: Regression analysis using the physicochemical properties and drug- membrane electrostatic interaction.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(8): p. 960-965.
464. Stump D.D., X. Fan, and P.D. Berk, *Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake.* Journal of Lipid Research, 2001. **42**(4): p. 509-520.
465. Ogihara T., I. Tamai, H. Takanaga, Y. Sai, and A. Tsuji, *Stereoselective and carrier-mediated transport of monocarboxylic acids across caco-2 cells.* Pharmaceutical Research, 1996. **13**(12): p. 1828-1832.
466. Stremmel W., *Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process.* Journal of Clinical Investigation, 1988. **81**(3): p. 844-852.

467. Abumrad N., C. Harmon, and A. Ibrahimi, *Membrane transport of long-chain fatty acids: Evidence for a facilitated process.* Journal of Lipid Research, 1998. **39**(12): p. 2309-2318.
468. Stahl A., D.J. Hirsch, R.E. Gimeno, S. Punreddy, P. Ge, N. Watson, S. Patel, M. Kotler, A. Raimondi, L.A. Tartaglia, and H.F. Lodish, *Identification of the major intestinal fatty acid transport protein.* Molecular Cell, 1999. **4**(3): p. 299-308.
469. Fargeman N.J., C.C. Dirusso, A. Elberger, J. Knudsen, and P.N. Black, *Disruption of the saccharomyces cerevisiae homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(13): p. 8531-8538.
470. Bojesen I.N. and E. Bojesen, *Arachidonic acid transfer across the human red cell membrane by a specific transport system.* Acta Physiologica Scandinavica, 1995. **154**(2): p. 253-267.
471. Luiken J.J.F.P., F.A. Van Nieuwenhoven, G. America, G.J. Van Der Vusse, and J.F.C. Glatz, *Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: Involvement of sarcolemmal proteins.* Journal of Lipid Research, 1997. **38**(4): p. 745-758.
472. Gargiulo C.E., S.M. Stuhlsatz-Krouper, and J.E. Schaffer, *Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane.* Journal of Lipid Research, 1999. **40**(5): p. 881-892.
473. Memon R.A., K.R. Feingold, A.H. Moser, J. Fuller, and C. Grunfeld, *Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines.* American Journal of Physiology, 1998. **274**(2): p. E210-217.
474. Trigatti B.L. and G.E. Gerber, *A direct role far serum, albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids.* Biochemical Journal, 1995. **308**(1): p. 155-159.
475. Mcarthur M.J., B.P. Atshaves, A. Frolov, W.D. Foxworth, A.B. Kier, and F. Schroeder, *Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids.* Journal of Lipid Research, 1999. **40**(8): p. 1371-83
476. Kudo S., R. Morigaki, J. Saito, M. Ikeda, K. Oka, and K. Tanishita, *Shear-stress effect on mitochondrial membrane potential and albumin uptake in cultured endothelial cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **270**(2): p. 616-621.
477. Populaire P., B. Terlain, S. Pascal, and A. Et, *Biological behavior: Serum levels, excretion and biotransformation of 2 (3 benzoylphenyl) propionic acid or ketoprofen in animals and man.* Annales Pharmaceutiques Francaises, 1973. **31**(12): p. 735-749.
478. Cooper S.A., D.C. Reynolds, B. Reynolds, and E.V. Hersh, *Analgesic efficacy and safety of (R)- keto-profen in postoperative dental pain.* Journal of Clinical Pharmacology, 1998. **38**(2 SUPPL.): p. 11S-18S.
479. Upton R.A., J.N. Buskin, R.L. Williams, and E. Al., *Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen, and probenecid in urine.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1980. **69**(11): p. 1254-1257.
480. Lee E.J.D., K. Williams, R. Day, and A. Et, *Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man.* British Journal of Clinical Pharmacology, 1985. **19**(5): p. 669-674.
481. Meunier C.J. and R.K. Verbeeck, *Glucuronidation of R- and S-ketoprofen, acetaminophen, and diflunisal by liver microsomes of adjuvant-induced arthritic rats.* Drug Metabolism and Disposition, 1999. **27**(1): p. 26-31.
482. Tukey R.H. and C.P. Strassburg, *Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract.* Molecular Pharmacology, 2001. **59**(3): p. 405-414.
483. Giroud Y.C.P.P.A., *Intrinsic and intramolecular lipophilicity effects in o-glucuronides.* Helvetica Chimica Acta, 1998. **81**: p. 330-341.
484. Saxena M. and G.B. Henderson, *MOAT4, a novel multispecific organic-anion transporter for glucuronides and mercapturates in mouse L1210 cells and human erythrocytes.* Biochemical Journal, 1996. **320**(1): p. 273-281.
485. Dubois-Presle N., F. Lapicque, M. Maurice, S. Fournel-Gigleux, J. Magdalou, M. Abiteboul, G. Siest, and P. Netter, *Stereoselective esterase activity of human serum albumin toward ketoprofen glucuronide.* Molecular Pharmacology, 1995. **47**(3): p. 647-653.
486. Wang M. and R.G. Dickinson, *Disposition and covalent binding of diflunisal and diflunisal acyl glucuronide in the isolated perfused rat liver.* Drug Metabolism and Disposition, 1998. **26**(2): p. 98-104.
487. Nicholls A.W., K. Akira, J.C. Lindon, R.D. Farrant, I.D. Wilson, J. Harding, D.A. Killick, and J.K. Nicholson, *NMR spectroscopic and theoretical chemistry studies on the internal acyl migration reactions of the 1-O-acyl-beta-D-glucopyranuronate conjugates of 2-, 3-, and 4-(trifluoromethyl)benzoic acids.* Chemical Research in Toxicology, 1996. **9**(8): p. 1414-1424.

488. Sidelmann U.G., E. Christiansen, L. Krogh, C. Cornett, and J.T. Hansen, and Steen Honore, *Purification and 1H NMR spectroscopic characterization of phase II metabolites of tolfenamic acid.* Drug Metabolism and Disposition, 1997. **25**(6): p. 725-731.
489. Hasegawa J., P. Smith, and L. Benet, *Apparent intramolecular acyl migration of zomepirac glucuronide.* Drug Metabolism and Disposition, 1982. **10**(5): p. 469-473.
490. Hansen-Moller J., C. Cornett, L. Dalgaard, and S.L.H. Hansen, *Isolation and identification of the rearrangement products of diflunisal 1-O-acyl glucuronide.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1988. **6**(3): p. 229-240.
491. Akira K., T. Taira, H. Hasegawa, C. Sakuma, and Y. Shinohara, *Studies on the stereoselective internal acyl migration of ketoprofen glucuronides using 13C labeling and nuclear magnetic resonance spectroscopy.* Drug Metabolism and Disposition, 1998. **26**(5): p. 457-464.
492. Dahms M. and H. Spahn-Langguth, *Covalent binding of acidic drugs via reactive intermediates: Detection of benoxaprofen and flunoxaprofen protein adducts in biological material.* Pharmazie, 1996. **51**(11): p. 874-881.
493. Knights K.M., R. Gasser, and W. Klemisch, *In vitro metabolism of acitretin by human liver microsomes: Evidence of an acitretinoyl-Coenzyme A thioester conjugate in the transesterification to etretinate.* Biochemical Pharmacology, 2000. **60**(4): p. 507-516.
494. Carabaza A., N. Suesa, D. Tost, J. Pascual, M. Gomez, M. Gutierrez, E. Ortega, X. Montserrat, A.M. Garcia, R. Mis, F. Cabre, D. Mauleon, and G. Carganico, *Stereoselective metabolic pathways of ketoprofen in the rat: Incorporation into triacylglycerols and enantiomeric inversion.* Chirality, 1996. **8**(2): p. 163-172.
495. Knights K.M., U.M. Talbot, and T.A. Baillie, *Evidence of multiple forms of rat liver microsomal coenzyme A ligase catalysing the formation of 2-arylpropionyl-Coenzyme A thioesters.* Biochemical Pharmacology, 1992. **44**(12): p. 2415-2417.
496. Knadler M.P. and S.D. Hall, *Stereoselective arylpropionyl-CoA thioester formation in vitro.* Chirality, 1990. **2**(2): p. 67-73.
497. Sevoz C., C. Rousselle, E. Benoit, and T. Buronfosse, *In vitro study of fenoprofen chiral inversion in rat: Comparison of brain versus liver.* Xenobiotica, 1999. **29**(10): p. 1007-1016.
498. Soraci A. and E. Benoit, *In vitro fenoprofenyl-Coenzyme A thioester formation: Interspecies variations.* Chirality, 1995. **7**(7): p. 534-540.
499. Agius L., E.J. Meredith, and H.S.A. Sherratt, *Stereospecificity of the inhibition by etomoxir of fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes.* Biochemical Pharmacology, 1991. **42**(9): p. 1717-20
500. Brugger R., B. Garcia Alfa, C. Reichel, R. Waibel, S. Menzel, K. Brune, and G. Geisslinger, *Isolation and characterization of rat liver microsomal R-ibuprofenoyl-CoA synthetase.* Biochemical Pharmacology, 1996. **52**(7): p. 1007-1013.
501. Bruggera R., C. Reichel, B.G. Alia, K. Brune, T. Yamamoto, I. Tegeder, and G. Geissinger, *Expression of rat liver long-chain acyl-CoA synthetase and characterization of its role in the metabolism of R-ibuprofen and other fatty acid-like xenobiotics.* Biochemical Pharmacology, 2001. **61**(6): p. 651-656.
502. Sevoz C., E. Benoit, and T. Buronfosse, *Thioesterification of 2-arylpropionic acids by recombinant acyl-Coenzyme A synthetases (ACS1 and ACS2).* Drug Metabolism and Disposition, 2000. **28**(4): p. 398-165.
503. Benoit E., *Communication personnelle.*
504. Um P.-J. and D.G. Drueckhammer, *Dynamic enzymatic resolution of thioesters.* Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(23): p. 5605-5610.
505. Berry B. and F. Jamali, *Presystemic and systemic chiral inversion of R-(-)-fenoprofen in the rat.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1991. **258**(2): p. 695-701.
506. Tracy T. and S. Hall, *Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Epimerization and hydrolysis of ibuprofenyl-Coenzyme A.* Drug Metabolism and Disposition, 1992. **20**(2): p. 322-327.
507. Caldwell J., A.J. Hutt, and S. Fournel-Gigleux, *The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences.* Biochemical Pharmacology, 1988. **37**(1): p. 105-114.
508. Muller N., E. Payan, F. Lapicque, B. Bannwarth, and P. Netter, *Pharmacological aspects of chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Fundamental and Clinical Pharmacology, 1990. **4**(6): p. 617-634.
509. Chen C.-S., W.-R. Shieh, P.-H. Lu, S. Harriman, and C.-Y. Chen, *Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals.* Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1991. **1078**(3): p. 411-417.

510. Jamali F., R. Lovlin, and G. Aberg, *Bi-directional chiral inversion of ketoprofen in CD-1 mice.* Chirality, 1997. **9**(1): p. 29-31.
511. Knihinicki R.D., R.O. Day, and K.M. Williams, *Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs - II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters.* Biochemical Pharmacology, 1991. **42**(10): p. 1905-1911.
512. Shieh W.R., D.M. Gou, Y.C. Liu, C.S. Chen, and C.Y. Chen, *A 13C NMR study on ibuprofen metabolism in isolated rat liver mitochondria.* Analytical Biochemistry, 1993. **212**(1): p. 143-149.
513. Shieh W. and C. Chen, *Purification and characterization of novel "2-arylpropionyl-CoA epimerases" from rat liver cytosol and mitochondria.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(5): p. 3487-3493.
514. Reichel C., H. Bang, K. Brune, G. Geisslinger, and S. Menzel, *2-arylpropionyl-CoA epimerase: Partial peptide sequences and tissue localization.* Biochemical Pharmacology, 1995. **50**(11): p. 1803-1806.
515. Baillie T., W. Adams, D. Kaiser, L. Olanoff, G. Halstead, H. Harpootlian, and G. Van Giessen, *Mechanistic studies of the metabolic chiral inversion of (R)-ibuprofen in humans.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1989. **249**(2): p. 517-523.
516. Rhys-Williams W., F. Mccarthy, J. Baker, Y.-F. Hung, M.J. Thomason, A.W. Lloyd, and G.W. Hanlon, *A mechanistic investigation into the microbial chiral inversion of 2-arylpropionic acids using deuterated derivatives of 2-phenylpropionic acid.* Enzyme and Microbial Technology, 1998. **22**(4): p. 281-287.
517. Sanins S.M., W.J. Adams, D.G. Kaiser, G.W. Halstead, J. Hosley, H. Barnes, and T.A. Baillie, *Mechanistic studies on the metabolic chiral inversion of R-ibuprofen in the rat.* Drug Metabolism and Disposition, 1991. **19**(2): p. 405-410.
518. Engst S., P. Vock, M. Wang, J.-J.P. Kim, and S. Ghisla, *Mechanism of activation of acyl-CoA substrates by medium chain acyl-CoA dehydrogenase: Interaction of the thioester carbonyl with the flavin adenine dinucleotide ribityl side chain.* Biochemistry, 1999. **38**(1): p. 257-267.
519. Tracy T.S. and S.D. Hall, *Determination of the epimeric composition of ibuprofenyl-CoA.* Analytical Biochemistry, 1991. **195**(1): p. 24-29.
520. Sanchez R.M., M. Alegret, T. Adzet, M. Merlos, and J.C. Laguna, *Differential inhibition of long-chain acyl-CoA hydrolase by hypolipidemic drugs in vitro.* Biochemical Pharmacology, 1992. **43**(3): p. 639-644
521. Walker J.S., *NSAID: An update on their analgesic effects.* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 1995. **22**(11): p. 855-860.
522. Smith C.J., Y. Zhang, C.M. Koboldt, J. Muhammad, B.S. Zweifel, A. Shaffer, J.J. Talley, J.L. Masferrer, K. Seibert, and P.C. Isakson, *Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(22): p. 13313-13318.
523. Forghani F., M. Ouellet, S. Keen, M.D. Percival, and P. Tagari, *Analysis of prostaglandin G/H synthase-2 inhibition using peroxidase- induced luminol luminescence.* Analytical Biochemistry, 1998. **264**(2): p. 216-221.
524. Carabaza A., F. Cabre, E. Rotllan, M. Gomez, M. Gutierrez, M.L. Garcia, and D. Mauleon, *Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs.* Journal of Clinical Pharmacology, 1996. **36**(6): p. 505-512.
525. Kawai S., S. Nishida, M. Kato, Y. Furumaya, R. Okamoto, T. Koshino, and Y. Mizushima, *Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells.* European Journal of Pharmacology, 1998. **347**(1): p. 87-94.
526. Riendeau D., S. Charleson, W. Cromlish, J.A. Mancini, E. Wong, and J. Guay, *Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays.* Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1997. **75**(9): p. 1088-1095.
527. Jouzeau J.-Y., B. Terlain, A. Abid, E. Nedelec, and P. Netter, *Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Drugs, 1997. **53**(4): p. 563-582.
528. Gierse J.K., S.D. Hauser, D.P. Creely, C. Koboldt, S.H. Rangwala, P.C. Isakson, and K. Seibert, *Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase.* Biochemical Journal, 1995. **305**(2): p. 479-484.
529. Tobetto K., Y. Yamamoto, M. Kataoka, T. Ando, K. Sugimoto, and M. Himeno, *The effects of a newly developed nonsteroidal anti-inflammatory drug (M-5011) on arachidonic acid metabolism in rheumatoid synovial fibroblasts.* Japanese Journal of Pharmacology, 1997. **75**(4): p. 371-379.

530. Raguenes-Nicol C., F. Russo-Marie, G. Domage, N. Diab, E. Solito, F. Dray, J.L. Garcia Mace, and G. Streichenberger, *Anti-inflammatory mechanism of alminoprofen: Action on the phospholipid metabolism pathway.* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(4): p. 433-443.
531. Sergeeva M.G., M.V. Gonchar, Z.V. Grishina, A.T. Mevkh, and S.D. Varfolomeyev, *Low concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect cell functions.* Life Sciences, 1995. **56**(16): p. PL313-9
532. Cashman J.N., *The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia.* Drugs, 1996. **52**(SUPPL. 5): p. 13-23.
533. Fowler C.J., G. Tiger, and A. Stenstrom, *Ibuprofen inhibits rat brain deamidation of anandamide at pharmacologically relevant concentrations. Mode of inhibition and structure- activity relationship.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1997. **283**(2): p. 729-734.
534. Berdyshev E., E. Boichot, M. Corbel, N. Germain, and V. Lagente, *Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice.* Life Sciences, 1998. **63**(8): p. 125-129.
535. Ghezzi P., G. Melillo, C. Meazza, S. Sacco, L. Pellegrini, C. Asti, S. Porzio, A. Marullo, V. Sabbatini, G. Caselli, and R. Bertini, *Differential contribution of R and S isomers in ketoprofen anti-inflammatory activity: Role of cytokine modulation.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1998. **287**(3): p. 969-974.
536. Brune K., W.S. Beck, G. Geisslinger, S. Menzel-Soglowek, B.M. Peskar, and B.A. Peskar, *Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition.* Experientia, 1991. **47**(3): p. 257-261.
537. De Beaurepaire R., C. Suaudeau, A. Chait, and C. Cimetiere, *Anatomical mapping of brain sites involved in the antinociceptive effects of ketoprofen.* Brain Research, 1990. **536**(1-2): p. 201-206.
538. Rampin O., J.M. Harrewyn, and D. Albe-Fessard, *Antialgic effect of central administration of ketoprofen in rats.* Revue du Rhumatisme et des Maladies Osteo-Articulaires, 1988. **55**(10): p. 779-780.
539. Fowler C.J., U. Janson, R.M. Johnson, G. Wahlstrom, A. Stenstrom, A. Norstrom, and G. Tiger, *Inhibition of anandamide hydrolysis by the enantiomers of ibuprofen, ketorolac, and flurbiprofen.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. **362**(2): p. 191-196.
540. Papworth J., P. Colville-Nash, C. Alam, M. Seed, and D. Willoughby, *The depletion of substance P by diclofenac in the mouse.* European Journal of Pharmacology, 1997. **325**(2-3): p. R1-R2.
541. Schaible H.-G., V. Neugebauer, G. Geisslinger, and U. Beck, *The effects of S- and R-flurbiprofen on the inflammation-evoked intraspinal release of immunoreactive substance P - a study with antibody microprobes.* Brain Research, 1998. **798**(1-2): p. 287-293.
542. Bizzarri C., S. Pagliei, L. Brandolini, P. Mascagni, G. Caselli, P. Transidico, S. Sozzani, and R. Bertini, *Selective inhibition of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by ketoprofen isomers.* Biochemical Pharmacology, 2001. **61**(11): p. 1429-1437.
543. Dominguez-Jimenez C., F. Diaz-Gonzalez, I. Gonzalez-Alvaro, J.M. Cesar, and F. Sanchez-Madrid, *Prevention of alpha-IIb-beta3 activation by non-steroidal antiinflammatory drugs.* FEBS Letters, 1999. **446**(2-3): p. 318-322.
544. Sadowski T. and J. Steinmeyer, *Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes.* Osteoarthritis and Cartilage, 2001. **9**(5): p. 407-415.
545. Wang L.M., A. Toyoshima, S. Mineshita, X.X. Wang, T. Yamomoto, Y. Nomura, Y. Koikei, K. Shiba, and Y. Honda, *The anti-inflammatory effects of ketoprofen in animal experiments.* Drugs under Experimental and Clinical Research, 1997. **23**(1): p. 1-6.
546. Kataoka M., K. Tonooka, T. Ando, K. Imai, and T. Aimoto, *Hydroxyl radical scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Free Radical Research, 1997. **27**(4): p. 419-427.
547. Vandivier R.W., A. Eidsath, S.M. Banks, H.L. Preas, Ii, S.B. Leighton, P.J. Godin, A.F. Suffredini, and R.L. Danner, *Down-regulation of nitric oxide production by ibuprofen in human volunteers.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999. **289**(3): p. 1398-1403.
548. Baek S.J., J.M. Horowitz, and T.E. Eling, *Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by SP1 and SP3.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(36): p. 33384-33392.
549. Han Z., P. Pantazis, J.H. Wyche, N. Kouttab, V.J. Kidd, and E.A. Hendrickson, *A fas-associated death domain protein-dependent mechanism mediates the apoptotic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human leukemic jurkat cell line.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38748-38754.

550. Dekkers D.W.C., P. Comfurius, R.G.J. Van Gool, E.M. Bevers, and R.F.A. Zwaal, *Multidrug resistance protein 1 regulates lipid asymmetry in erythrocyte membranes.* Biochemical Journal, 2000. **350**(2): p. 531-535.
551. Scheuren N., H. Bang, T. Munster, K. Brune, and A. Pahl, *Modulation of transcription factor NF-kappaB by enantiomers of the nonsteroidal drug ibuprofen.* British Journal of Pharmacology, 1998. **123**(4): p. 645-652.
552. Jones M.K., H. Wang, B.M. Peskar, E. Levin, R.M. Itani, I.J. Sarfeh, and A.S. Tarnawski, *Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing.* Nature Medicine, 1999. **5**(12): p. 1418-1423.
553. Mccarthy D.M., *Comparative toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* American Journal of Medicine, 1999. **107**(6 A): p. 37S-46S; discussion 46S-47S.
554. Warner T.D., F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J.A. Mitchell, and J.R. Vane, *Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo- oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(13): p. 7563-7568.
555. Caliendo G., V. Santagada, E. Perissutti, B. Severino, F. Fiorino, T.D. Warner, J.L. Wallace, D.R. Ifa, E. Antunes, G. Cirino, and G. De Nucci, *Synthesis of substituted benzamides as anti-inflammatory agents that inhibit preferentially cyclooxygenase 1 but do not cause gastric damage.* European Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **36**(6): p. 517-530.
556. Wechter W.J., A.E. Bigornia, E.D. Murray Jr., B.H. Levine, and J.W. Young, *Rac-flurbiprofen is more ulcerogenic than its (S)-enantiomer.* Chirality, 1993. **5**(7): p. 492-494.
557. Somasundaram S., S. Rafi, J. Hayllar, G. Sigthorsson, M. Jacob, A.B. Price, A. Macpherson, T. Mahmod, D. Scott, J.M. Wrigglesworth, and I. Bjarnason, *Mitochondrial damage: A possible mechanism of the 'topical' phase of NSAID induced injury to the rat intestine.* Gut, 1997. **41**(3): p. 344-353.
558. Masubuchi Y., S. Yamada, and T. Horie, *Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation.* Biochemical Pharmacology, 1999. **58**(5): p. 861-865.
559. Moreno-Sanchez R., C. Bravo, C. Vasquez, G. Ayala, L.H. Silveira, and M. Martinez-Lavin, *Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart.* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(7): p. 743-752.
560. Browne G.S., C. Nelson, T. Nguyen, B.A. Ellis, R.O. Day, and K.M. Williams, *Stereoselective and substrate-dependent inhibition of hepatic mitochondrial beta-oxidation and oxidative phosphorylation by the non-steroidal anti inflammatory drugs ibuprofen, flurbiprofen, and ketorolac.* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(7): p. 837-844.
561. Freneaux E., B. Fromenty, A. Berson, G. Labbe, C. Degott, P. Letteron, D. Larrey, and D. Pessayre, *Stereoselective and nonstereoselective effects of ibuprofen enantiomers on mitochondrial beta-oxidation of fatty acids.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1990. **255**(2): p. 529-535.
562. Gossett R.E., A.A. Frolov, J.B. Roths, W.D. Behnke, A.B. Kier, and F. Schroeder, *Acyl-CoA binding proteins: Multiplicity and function.* Lipids, 1996. **31**(9): p. 895-918.
563. Giraud M.N., C. Motta, J.J. Romero, G. Bommelaer, and L.M. Lichtenberger, *Interaction of indomethacin and naproxen with gastric surface-active phospholipids: A possible mechanism for the gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(3): p. 247-254.
564. Szczeklik A., *Mechanism of aspirin-induced asthma.* Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1997. **52**(6): p. 613-619.
565. Arnaud A., *Allergy and intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory agents.* Clinical Reviews in Allergy and Immunology, 1995. **13**(3): p. 245-251.
566. Pessayre D., *Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis.* Journal of Hepatology, Supplement, 1995. **23**(1): p. 16-24.
567. Boelsterli U.A., H.J. Zimmerman, and A. Kretz-Rommel, *Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: Molecular mechanisms and pathology.* Critical Reviews in Toxicology, 1995. **25**(3): p. 207-235.
568. Pohl L.R., J.G. Kenna, H. Satoh, D. Christ, and J.L. Martin, *Neoantigens associated with halothane hepatitis.* Drug Metabolism Reviews, 1989. **20**(2-4): p. 203-217.

569. Beaune P., P.M. Dansette, D. Mansuy, and E. Al., *Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochromeP-450 that hydroxylates the drug.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(2): p. 551-555.
570. Bourdi M., D. Larrey, J. Nataf, J. Bernuau, D. Pessayre, M. Iwasaki, F.P. Guengerich, and P.H. Beaune, *Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450Ia2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis.* Journal of Clinical Investigation, 1990. **85**(6): p. 1967-1973.
571. Bachrich T., T. Thalhammer, W. J Ger, P. Haslmayer, B. Alihodzic, S. Bakos, E. Hitchman, A.M. Senderowich, and E. Penner, *Characterization of autoantibodies against uridine-diphosphate glucurono-syltransferase in patients with inflammatory liver diseases.* Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1053-1059.
572. Choy L.N., B.S. Rosen, and B.M. Spiegelman, *Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose cells.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(18): p. 12736-12741.
573. Cianflone K., *The acylation stimulating protein pathway: Clinical implications.* Clinical Biochemistry, 1997. **30**(4): p. 301-312.
574. Pangburn M.K., *Spontaneous reformation of the intramolecular thioester in complement protein c3 and low temperature capture of a conformational intermediate capable of reformation.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(12): p. 8584-8590.
575. Sahu A. and M.K. Pangburn, *Covalent attachment of human complement c3 to IGG. Identification of the amino acid residue involved in ester linkage formation.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(46): p. 28997-29002.
576. Sahu A. and M.K. Pangburn, *Tyrosine is a potential site for covalent attachment of activated complement component c3.* Molecular Immunology, 1995. **32**(10): p. 711-716.
577. Villiers M.-B., C.L. Villiers, A.-M. Laharie, and P.N. Marche, *Amplification of the antibody response by c3b complexed to antigen through an ester link.* Journal of Immunology, 1999. **162**(6): p. 3647-3652.
578. Sahu A. and M.K. Pangburn, *Investigation of mechanism-based inhibitors of complement targeting the activated thioester of human c3.* Biochemical Pharmacology, 1996. **51**(6): p. 797-804.
579. Sahu A., N. Rawal, and M.K. Pangburn, *Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated c3b.* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(12): p. 1439-1446.
580. Horkko S., E. Miller, D.W. Branch, W. Palinski, and J.L. Witztum, *The epitopes for some antiphospholipid antibodies are adducts of oxidized phospholipid and beta2 glycoprotein 1 (and other proteins).* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(19): p. 10356-10361.
581. Horkko S., E. Miller, E. Dudl, P. Reaven, L.K. Curtiss, N.J. Zvaifler, R. Terkeitaub, S.S. Pierangeli, D.W. Branch, W. Palinski, and J.L. Witztum, *Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids: Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein.* Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(3): p. 815-825.
582. Dodds P.F., *Xenobiotic lipids: The inclusion of xenobiotic compounds in pathways of lipid biosynthesis.* Progress in Lipid Research, 1995. **34**(3): p. 219-247.
583. Foxworthy P.S., D.N. Perry, and P.I. Eacho, *Induction of peroxisomal b-oxidation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Toxicology and Applied Pharmacology, 1993. **118**(2): p. 271-274.
584. Gansevoort R.T., J.E. Heeg, F.D. Dikkeschei, D. De Zeeuw, P.E. De Jong, and R.P.F. Dullaart, *Symptomatic antiproteinuric treatment decreases serum lipoprotein (a) concentration in patients with glomerular proteinuria.* Nephrology Dialysis Transplantation, 1994. **9**(3): p. 244-250.
585. Al Rayyes O., B. Ahren, and C.H. Floren, *Enhancement of low density lipoprotein catabolism by non-steroidal anti-inflammatory drugs in cultured HEPG2 cells.* European Journal of Pharmacology, 1999. **372**(3): p. 311-318.
586. Kasuya F., M. Hiasa, Y. Kawai, K. Igarashi, and M. Fukui, *Inhibitory effect of quinolone antimicrobial and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on a medium chain acyl-COA synthetase.* Biochemical Pharmacology, 2001. **62**(3): p. 363-367.
587. Knights K.M. and M.E. Jones, *Inhibition kinetics of hepatic microsomal long chain fatty acid-CoA ligase by 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs.* Biochemical Pharmacology, 1992. **43**(7): p. 1465-1471.

588. Pan Z., B. Camara, H.W. Gardner, and R.A. Backhaus, *Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(29): p. 18139-1.
589. Bosca F., G. Carganico, J.V. Castell, M.J. Gomez-Lechon, D. Hernandez, D. Mauleon, L.A. Martinez, and M.A. Miranda, *Evaluation of ketoprofen (R, S and R/S) phototoxicity by a battery of in vitro assays.* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1995. **31**(3): p. 133-138.
590. Hermening A., A.-K. Grafe, G. Baktir, E. Mutschler, and H. Spahn-Langguth, *Gemfibrozil and its oxidative metabolites: Quantification of aglycones, acyl glucuronides, and covalent adducts in samples from preclinical and clinical kinetic studies.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000. **741**(2): p. 129-144.
591. Dubois N., F. Lapicque, M.-H. Maurice, M. Pritchard, S. Fournel-Gigleux, J. Magdalou, M. Abiteboul, G. Siest, and P. Netter, *In vitro irreversible binding of ketoprofen glucuronide to plasma proteins.* Drug Metabolism and Disposition, 1993. **21**(4): p. 617-623.
592. Terrier N., E. Benoit, C. Senay, F. Lapicque, A. Radominska-Pandya, J. Magdalou, and S. Fournel-Gigleux, *Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide.* Molecular Pharmacology, 1999. **56**(1): p. 226-234.
593. Georges H., I. Jarecki, P. Netter, J. Magdalou, and F. Lapicque, *Glycation of human serum albumin by acylglucuronides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of the series of phenylpropionates.* Life Sciences, 1999. **65**(12): p. PL151-PL156.
594. Amore A., P. Cirina, S. Mitola, L. Peruzzi, B. Gianoglio, I. Rabbone, C. Sacchetti, F. Cerutti, C. Grillo, and R. Coppo, *Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells.* Kidney International, 1997. **51**(1): p. 27-35.
595. Wu V.-Y., C.W. Shearman, and M.P. Cohen, *Identification of calnexin as a binding protein for Amadori-modified glycated albumin.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **284**(3): p. 602-606.
596. Shaklai N., R. Garlick, and H. Bunn, *Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function.* Journal of Biological Chemistry., 1984. **259**(6): p. 3812-3817.
597. Worrall S. and R.G. Dickinson, *Rat serum albumin modified by diflunisal acyl glucuronide is immunogenic in rats.* Life Sciences, 1995. **56**(22): p. 1921-1930.
598. Swartzentruber M.S. and R.A. Harris, *Inhibition of metabolic processes by Coenzyme-A-sequestering aromatic acids. Prevention by para-chloro- and para-nitrobenzoic acids.* Biochemical Pharmacology, 1987. **36**(19): p. 3147-3153.
599. Tanaka Y., Y. Shimomura, T. Hirota, A. Nozaki, M. Ebata, W. Takasaki, E. Shigehara, R. Hayashi, and J. Caldwell, *Formation of glycine conjugate and (-)-(R)-enantiomer from (+)-(S)-2- phenylpropionic acid suggesting the formation of the CoA thioester intermediate of (+)-(S)-enantiomer in dogs.* Chirality, 1992. **4**(6): p. 342-348.
600. Bronfman M., A. Orellana, M.N. Morales, F. Bieri, F. Waechter, W. Staubli, and P. Bentley, *Potentiation of diacylglycerol-activated protein kinase C by acyl-Coenzyme A thioesters of hypolipidaemic drugs.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989. **159**(3): p. 1026-1031.
601. Kemal C. and J.E. Casida, *Coenzyme A esters of 2-aryloxyphenoxypropionate herbicides and 2-arylpropionate antiinflammatory drugs are potent and stereoselective inhibitors of rat liver acetyl-Coa carboxylase.* Life Sciences, 1992. **50**(7): p. 533-540.
602. Neupert W., R. Brugger, C. Euchenhofer, K. Brune, and G. Geisslinger, *Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases.* British Journal of Pharmacology, 1997. **122**(3): p. 487-492.
603. Hertz R. and J. Bar-Tana, *The acylation of proteins by xenobiotic amphipatic carboxylic acids in cultured rat hepatocytes.* Biochemical Journal, 1988. **254**(1): p. 39-44.
604. Sallustio B.C., S. Nunthasomboon, C.J. Drogemuller, and K.M. Knights, *In vitro covalent binding of nafenopin-CoA to human liver proteins.* Toxicology and Applied Pharmacology, 2000. **163**(2): p. 176-82
605. Ramsay R.R., R.D. Gandour, and F.R. Van Der Leij, *Molecular enzymology of carnitine transfer and transport.* Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1546**(1): p. 21-43.
606. Williams K., R. Day, R. Knihinicki, and A. Duffield, *The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue.* Biochemical Pharmacology, 1986. **35**(19): p. 3403-3405.

607. Sallustio B.C., P.J. Meffin, and K.M. Knights, *The stereospecific incorporation of fenoprofen into rat hepatocyte and adipocyte triacylglycerols.* Biochemical Pharmacology, 1988. **37**(10): p. 1919-1923.
608. Igal R.A., S. Wang, M. Gonzalez-Baro, and R.A. Coleman, *Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(45): p. 42205-42212.
609. Scheuerer S., K.M. Williams, R. Brugger, A.J. Mclachlan, K. Brune, R.O. Day, and G. Geisslinger, *Effect of clofibrate on the chiral disposition of ibuprofen in rats.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1998. **284**(3): p. 1132-1138.
610. Waku K., *Origins and fates of fatty acyl-CoA esters.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1992. **1124**(2): p. 101-111.
611. Vessey D.A., M. Kelley, and R.S. Warren, *Characterization of the CoA ligases of human liver mitochondria catalyzing the activation of short- and medium-chain fatty acids and xenobiotic carboxylic acids.* Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1999. **1428**(2-3): p. 455-462.
612. Vessey D.A. and J. Hu, *Isolation from bovine liver mitochondria and characterization of three distinct carboxylic acid: CoA ligases with activity toward xenobiotics.* Journal of Biochemical Toxicology, 1995. **10**(6): p. 329-337.
613. Luong A., V.C. Hannah, M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(34): p. 26458-1.
614. Kasuya F., K. Igarashi, M. Fukui, and K. Nokihara, *Purification and characterization of a medium chain acyl-Coenzyme A synthetase.* Drug Metabolism and Dispoition, 1996. **24**(8): p. 879-883.
615. Kasuya F., Y. Yamaoka, K. Igarashi, and M. Fukui, *Molecular specificity of a medium chain acyl-COA synthetase for substrates and inhibitors: Conformational analysis.* Biochemical Pharmacology, 1998. **55**(11): p. 1769-1775.
616. Fujino T., Y.A. Takei, H. Sone, R.X. Ioka, A. Kamataki, K. Magoori, S. Takahashi, J. Sakai, and T.T. Yamamoto, *Molecular identification and characterization of two medium-chain acyl-CoA synthetases, macs1 and the sa gene product.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(38): p. 35961-35966.
617. Vessey D.A. and M. Kelley, *Characterization of the reaction mechanism for the XL-I form of bovine liver xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase.* Biochemical Journal, 2001. **357**(1): p. 283-288.
618. Vessey D.A. and M. Kelley, *Characterization of the monovalent and divalent cation requirements for the xenobiotic carboxylic acid: CoA ligases of bovine liver mitochondria.* Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. **1382**(2): p. 243-248.
619. Vessey D.A. and M. Kelley, *Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid:CoA ligase from bovine liver mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1997. **1346**(3): p. 231-236.
620. Kwakye J.B., S. Barnes, and R.B. Diasio, *Identification of bile acid coenzyme A synthetase in rat kidney.* Journal of Lipid Research, 1993. **34**(1): p. 95-99.
621. Muller S., J.M. Mayer, J.-C. Etter, and B. Testa, *Influence of palmitate and benzoate on the unidirectional chiral inversion of ibuprofen in isolated rat hepatocytes.* Biochemical Pharmacology, 1992. **44**(7): p. 1468-1470.
622. Tracy T., D. Wirthwein, and S. Hall, *Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Formation of ibuprofenyl-Coenzyme A.* Drug Metab Dispos, 1993. **21**(1): p. 114-120.
623. Black P.N., Q. Zhang, J.D. Weimar, and C.C. Dirusso, *Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity.* Journal of Biological Chemistry., 1997. **272**(8): p. 4896-4903.
624. Iijima H., T. Fujino, H. Minekura, H. Suzuki, M.-J. Kang, and T. Yamamoto, *Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2.* European Journal of Biochemistry, 1996. **242**(2): p. 186-190.
625. Black P.N., C.C. Dirusso, D. Sherin, R. Maccoll, J. Knudsen, and J.D. Weimar, *Affinity labeling fatty acyl-CoA synthetase with 9-p-azidophenoxy nonanoic acid and the identification of the fatty acid-binding site.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(49): p. 38547-38553.
626. Ghosh B., E. Barbosa, and I. Singh, *Molecular cloning and sequencing of human palmitoyl-CoA ligase and its tissue specific expression.* Molecular and Cellular Biochemistry, 1995. **151**(1): p. 77-81.

627. Suzuki H., Y. Kawarabayasi, J. Kondo, T. Abe, K. Nishikawa, S. Kimura, T. Hashimoto, and T. Yamamoto, *Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(15): p. 8681-8685.
628. Suzuki H., M. Watanabe, T. Fujino, and T. Yamamoto, *Multiple promoters in rat acyl-CoA synthetase gene mediate differential expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(16): p. 9676-9682.
629. Schoonjans K., M. Watanabe, H. Suzuki, A. Mahfoudi, G. Krey, W. Wahli, P. Grimaldi, B. Staels, T. Yamamoto, and J. Auwerx, *Induction of the acyl-Coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the c promoter.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(33): p. 19269-19276.
630. Memon R.A., J. Fuller, A.H. Moser, P.J. Smith, K.R. Feingold, and C. Grunfeld, *In vivo regulation of acyl-CoA synthetase mRNA and activity by endotoxin and cytokines.* American Journal of Physiology, 1998. **275**(1): p. E64-72.
631. Beigneux A.P., A.H. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K.R. Feingold, *The acute phase response is associated with retinoid X receptor repression in rodent liver.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p. 16390-16399.
632. Fujino T., M.-J. Kang, H. Suzuki, H. Iijima, and T. Yamamoto, *Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(28): p. 16748-29858
633. Fujino T. and T. Yamamoto, *Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain.* Journal of Biochemistry, 1992. **111**(2): p. 197-203.
634. Cho Y.-Y., M.-J. Kang, S. Ogawa, Y. Yamashita, T. Fujino, and T.T. Yamamoto, *Regulation by adrenocorticotropic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **274**(3): p. 741-745.
635. Malhotra K.T., K. Malhotra, B.H. Lubin, and F.A. Kuypers, *Identification and molecular characterization of acyl-CoA synthetase in human erythrocytes and erythroid precursors.* Biochemical Journal, 1999. **344**(1): p. 135-143.
636. Oikawa E., H. Iijima, T. Suzuki, H. Sasano, H. Sato, A. Kamataki, H. Nagura, M.-J. Kang, T. Fujino, H. Suzuki, and T.T. Yamamoto, *A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes.* Journal of Biochemistry, 1998. **124**(3): p. 679-685.
637. George P., D. Ardail, C. Rey, P. Louisot, and C. Levrat, *Phospholipids reacylation and palmitoylCoA control tumour necrosis factor-alpha sensitivity.* Cytokine, 2001. **13**(5): p. 257-263.
638. Sleeman M.W., N.P. Donegan, R. Heller-Harrison, W.S. Lane, and M.P. Czech, *Association of acyl-CoA synthetase-1 with Glut4-containing vesicles.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(6): p. 3132-20981.
639. Lewin T.M., J.-H. Kim, D.A. Granger, J.E. Vance, and R.A. Coleman, *Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(27): p. 24674-24679.
640. Haddock B.A., D.W. Yates, and P.B. Garland, *The localization of some coenzyme A-dependent enzymes in rat liver mitochondria.* Biochemical Journal, 1970. **119**(3): p. 565-573.
641. Ves-Losada A. and R.R. Brenner, *Long-chain fatty acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei.* Molecular and Cellular Biochemistry, 1996. **159**(1): p. 1-6.
642. Tang P.-Z., C.-H. Tsai-Morris, and M.L. Dufau, *Cloning and characterization of a hormonally regulated rat long chain acyl-CoA synthetase.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(12): p. 6581-6586.
643. Igal R.A., P. Wang, and R.A. Coleman, *Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: Evidence for functionally separate pools of acyl-CoA.* Biochemical Journal, 1997. **324**(2): p. 529-534.
644. Dirusso C.C., P.N. Black, and J.D. Weimar, *Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria.* Progress in Lipid Research, 1999. **38**(2): p. 129-197.
645. Lewis S.E., L.L. Listenberger, D.S. Ory, and J.E. Schaffer, *Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 37042-37050.
646. Martin G., H. Poirier, N. Hennuyer, D. Crombie, J.C. Fruchart, R.A. Heyman, P. Besnard, and J. Auwerx, *Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids*

suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(17): p. 12612-12618.
647. Tomoda H., K. Igarashi, and S. Omura, *Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1987. **921**(3): p. 595-598.
648. Muoio D.M., T.M. Lewin, P. Wiedmer, and R.A. Coleman, *Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: Potential role of acyl-CoA synthetase.* American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2000. **279**(6 42-6): p. E1366-E1373.
649. Shimomura I., K. Tokunaga, S. Jiao, T. Funahashi, Y. Keno, T. Kobatake, K. Kotani, H. Suzuki, T. Yamamoto, S. Tarui, and Y. Matsuzawa, *Marked enhancement of acyl-CoA synthetase activity and mrna, paralleled to lipoprotein lipase mRNA, in adipose tissues of zucker obese rats (FA/FA).* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1992. **1124**(2): p. 112-118.
650. Uchiyama A., T. Aoyama, K. Kamijo, Y. Uchida, N. Kondo, T. Orii, and T. Hashimoto, *Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(48): p. 30360-30365.
651. Coe N.R., A.J. Smith, B.I. Frohnert, P.A. Watkins, and D.A. Bernlohr, *The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36300-1.
652. Berger J., C. Truppe, H. Neumann, and S. Forss-Petter, *CDNA cloning and mRNA distribution of a mouse very long-chain acyl-CoA synthetase.* FEBS Letters, 1998. **425**(2): p. 305-309.
653. Steinberg S.J., S.J. Mihalik, D.G. Kim, D.A. Cuebas, and P.A. Watkins, *The human liver-specific homolog of very long-chain acyl-CoA synthetase is cholate:CoA ligase.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p. 15605-1.
654. Berger J., C. Truppe, H. Neumann, and S. Forss-Petter, *A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **247**(2): p. 255-260.
655. Moriya-Sato A., A. Hida, M. Inagawa-Ogashiwa, M.R. Wada, K. Sugiyama, J. Shimizu, T. Yabuki, Y. Seyama, and N. Hashimoto, *Novel acyl-CoA synthetase in adrenoleukodystrophy target tissues.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **279**(1): p. 62-68.
656. Steinberg S.J., J. Morgenthaler, A.K. Heinzer, K.D. Smith, and P.A. Watkins, *Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(45): p. 35162-1.
657. Rasmussen J.T., J. Rosendal, and J. Knudsen, *Interaction of acyl-coa binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor.* Biochemical Journal, 1993. **292**(3): p. 907-913.
658. Jolly C.A., T. Hubbell, W.D. Behnke, and F. Schroeder, *Fatty acid binding protein: Stimulation of microsomal phosphatidic acid formation.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997. **341**(1): p. 112-121.
659. Hunt M.C., S.E.B. Nousiainen, M.K. Huttunen, K.E. Orii, L.T. Svensson, and S.E.H. Alexson, *Peroxisome proliferator-induced long chain acyl-CoA thioesterases comprise a highly conserved novel multi-gene family involved in lipid metabolism.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(48): p. 34317-26
660. Garras A., M. Elholm, J. Sleboda, L. Froyland, H. Osmundsen, and R.K. Berge, *On the effects of thia fatty acid analogues on hydrolases involved in the degradation of metabolisable and non-metabolisable acyl-CoA esters.* Xenobiotica, 1997. **27**(8): p. 781-799.
661. Poupon V., B. Begue, J. Gagnon, A. Dautry-Varsat, N. Cerf-Bensussan, and A. Benmerah, *Molecular cloning and characterization of mt-ACT48, a novel mitochondrial acyl-CoA thioesterase.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(27): p. 19188-19194.
662. Yamada J., A. Kurata, M. Hirata, T. Taniguchi, H. Takama, T. Furihata, K. Shiratori, N. Iida, M. Takagi-Sakuma, T. Watanabe, K. Kurosaki, T. Endo, and T. Suga, *Purification, molecular cloning, and genomic organization of human brain long-chain acyl-CoA hydrolase.* Journal of Biochemistry, 1999. **126**(6): p. 1013-1019.
663. Gasmi L. and A.G. Mclennan, *The mouse nudt7 gene encodes a peroxisomal nudix hydrolase specific for coenzyme A and its derivatives.* Biochemical Journal, 2001. **357**(1): p. 33-38.
664. Deeney J., K. Tornheim, H. Korchak, M. Prentki, and B. Corkey, *Acyl-CoA esters modulate intracellular Ca2+ handling by permeabilized clonal pancreatic beta-cells.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(28): p. 19840-4008.

665. Rasmussen J.T., T. Borchers, and J. Knudsen, *Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters.* Biochemical Journal, 1990. **265**(3): p. 849-855.
666. Rosendal J., P. Ertbjerg, and J. Knudsen, *Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein.* Biochemical Journal, 1993. **290**(2): p. 321-326.
667. Andersen K.V. and F.M. Poulsen, *Three-dimensional structure in solution of acyl-Coenzyme A binding protein from bovine liver.* Journal of Molecular Biology, 1992. **226**(4): p. 1131-1141.
668. Frolov A. and F. Schroeder, *Acyl coenzyme A binding protein. Conformational sensitivity to long chain fatty acyl-CoA.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(18): p. 11049-20981.
669. Kragelund B.B., K.V. Andersen, J.C. Madsen, J. Knudsen, and F.M. Poulsen, *Three-dimensional structure of the complex between acyl-Coenzyme A binding protein and palmitoyl-Coenzyme A.* Journal of Molecular Biology, 1993. **230**(4): p. 1260-1277.
670. Robinson C.V., E.W. Chung, B.B. Kragelund, J. Knudsen, R.T. Aplin, F.M. Poulsen, and C.M. Dobson, *Probing the nature of noncovalent interactions by mass spectrometry. A study of protein-CoA ligand binding and assembly.* Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(36): p. 8646-8653.
671. Mandrup S., R. Jepsen, H. Skott, J. Rosendal, P. Hojrup, K. Kristiansen, and J. Knudsen, *Effect of heterologous expression of acyl-CoA-binding protein on acyl-CoA level and composition in yeast.* Biochemical Journal, 1993. **290**(2): p. 369-374.
672. Swinnen J.V., P. Alen, W. Heyns, and G. Verhoeven, *Identification of diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein as a sterol regulatory element-binding protein-responsive gene.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(32): p. 19938-20981.
673. Fyrst H., J. Knudsen, M.A. Schott, B.H. Lubin, and F.A. Kuypers, *Detection of acyl-CoA-binding protein in human red blood cells and investigation of its role in membrane phospholipid renewal.* Biochemical Journal, 1995. **306**(3): p. 793-799.
674. Elholm M., A. Garras, S. Neve, D. Tornehave, T.B. Lund, J. Skorve, T. Flatmark, K. Kristiansen, and R.K. Berge, *Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells.* Journal of Lipid Research, 2000. **41**(4): p. 538-545.
675. Van Nieuwenhoven F.A., G.J. Van Der Vusse, and J.F.C. Glatz, *Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins.* Lipids, 1996. **31**(3 SUPPL.): p. S223-S227.
676. Storch J. and A.E.A. Thumser, *The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1486**(1): p. 28-44.
677. Sacchettini J.C., J.I. Gordon, and L.J. Banaszak, *Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the escherichia Coli-derived protein with bound palmitate.* Journal of Molecular Biology, 1989. **208**(2): p. 327-339.
678. Thompson J., A. Reese-Wagoner, and L. Banaszak, *Liver fatty acid binding protein: Species variation and the accommodation of different ligands.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. **1441**(2-3): p. 117-130.
679. Zhu L., E. Kurian, F.G. Prendergast, and M.D. Kemple, *Dynamics of palmitic acid complexed with rat intestinal fatty acid binding protein.* Biochemistry, 1999. **38**(5): p. 1554-1561.
680. Arighi C.N., J.P.F.C. Rossi, and J.M. Delfino, *Temperature-induced conformational transition of intestinal fatty acid binding protein enhancing ligand binding: A functional, spectroscopic, and molecular modeling study.* Biochemistry, 1998. **37**(47): p. 16802-16814.
681. Ohba T., J.A. Holt, J.T. Billheimer, and J.F. Strauss Iii, *Human sterol carrier protein x/sterol carrier protein 2 gene has two promoters.* Biochemistry, 1995. **34**(33): p. 10660-10668.
682. Seedorf U., P. Ellinghaus, and J.R. Nofer, *Sterol carrier protein-2.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1486**(1): p. 45-54.
683. Wouters F.S., P.I.H. Bastiaens, K.W.A. Wirtz, and T.M. Jovin, *Fret microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (NSL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes.* EMBO Journal, 1998. **17**(24): p. 7179-7189.
684. Dansen T.B., J. Westerman, F.S. Wouters, R.J.A. Wanders, A. Van Hoek, J. Gadella T.W.J., and K.W.A. Wirtz, *Nigh-affinity binding of very-long-chain fatty acyl-CoA esters to the peroxisomal non-specific lipid-transfer protein (sterol carrier protein-2).* Biochemical Journal, 1999. **339**(1): p. 193-199.
685. Stolowich N., A. Frolov, A.D. Petrescu, A.I. Scott, J.T. Billheimer, and F. Schroeder, *Holo-sterol carrier protein-2. 13C NMR investigation of cholesterol and fatty acid binding sites.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(50): p. 35425-1.

686. Starodub O., C.A. Jolly, B.P. Atshaves, J.B. Roths, E.J. Murphy, A.B. Kier, and F. Schroeder, *Sterol carrier protein-2 localization in endoplasmic reticulum and role in phospholipid formation.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2000. **279**(4 48-4): p. C1259-C1269.
687. Sharon R., M.S. Goldberg, I. Bar-Josef, R.A. Betensky, J. Shen, and D.J. Selkoe, *Alpha -synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(16): p. 9110-9115.
688. Pusch W., D. Jahner, A.-N. Spiess, and R. Ivell, *Rat endozepine-like peptide (ELP): cDNA cloning, genomic organization and tissue-specific expression.* Gene, 1999. **235**(1-2): p. 51-57.
689. Gossett R.E., R.D. Edmondson, C.A. Jolly, T.-H. Cho, D.H. Russell, J. Knudsen, A.B. Kier, and F. Schroeder, *Structure and function of normal and transformed murine acyl-CoA binding proteins.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998. **350**(2): p. 201-213.
690. Sprecher H., D.L. Luthria, B.S. Mohammed, and S.P. Baykousheva, *Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids.* Journal of Lipid Research, 1995. **36**(12): p. 2471-2477.
691. Titorenko V.I. and R.A. Rachubinski, *The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis.* Trends in Biochemical Sciences, 1998. **23**(7): p. 231-233.
692. Abo-Hashema K.A.H., M.H. Cake, M.A. Lukas, and J. Knudsen, *Evaluation of the affinity and turnover number of both hepatic mitochondrial and microsomal carnitine acyltransferases: Relevance to intracellular partitioning of acyl-CoAs.* Biochemistry, 1999. **38**(48): p. 15840-15847.
693. Abo-Hashema K.A.H., M.H. Cake, M.A. Lukas, and J. Knudsen, *The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I.* International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2001. **33**(8): p. 807-815.
694. Burrier R.E., C.R. Manson, and P. Brecher, *Binding of acyl-CoA to liver fatty acid binding protein: Effect on acyl-CoA synthesis.* Biochimica et Biophysica Acta, 1987. **919**(3): p. 221-230.
695. Dunphy J.T., H. Schroeder, R. Leventis, W.K. Greentree, J.K. Knudsen, J.R. Silvius, and M.E. Linder, *Differential effects of acyl-CoA binding protein on enzymatic and non-enzymatic thioacylation of protein and peptide substrates.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1485**(2-3): p. 185-198.
696. Bhuiyan A.K.M.J. and S.V. Pande, *Carnitine palmitoyltransferase activities: Effects of serum albumin, acyl-CoA binding protein and fatty acid binding protein.* Molecular and Cellular Biochemistry, 1994. **139**(2): p. 109-116.
697. Myung C.-S., H. Yasuda, W.W. Liu, T.K. Harden, and J.C. Garrison, *Role of isoprenoid lipids on the heterotrimeric G protein subunit in determining effector activation.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(23): p. 16595-16603.
698. Melloni E., M. Averna, F. Salamino, B. Sparatore, R. Minafra, and S. Pontremoli, *Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(1): p. 82-1.
699. Foucaud L., J. Grillasca, I. Niot, N. Domingo, H. Lafont, R. Planells, and P. Besnard, *Output of liver fatty acid-binding protein (l-FABP) in bile.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. **1436**(3): p. 593-599.
700. Herzig K.-H., I. Schon, K. Tatemoto, Y. Ohe, Y. Li, U.R. Folsch, and C. Owyang, *Diazepam binding inhibitor is a potent cholecystokinin-releasing peptide in the intestine.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(15): p. 7927-7932.
701. Costa C., E. Struys, A. Bootsma, H. Ten Brink, L. Dorland, I. Tavares De Almeida, M. Duran, and C. Jakobs, *Quantitative analysis of plasma acylcarnitines using gas chromatography chemical ionization mass fragmentography.* Journal of Lipid Research, 1997. **38**(1): p. 173-182.
702. Chini E.N. and T.P. Dousa, *Palmitoyl-CoA potentiates the Ca release elicited by cyclic ADP-ribose.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, 1996. **270**(2 39-2): p. C530-C537.
703. Fitzsimmons T.J., J.A. Mcroberts, K.H. Tachiki, and S.J. Pandol, *Acyl-Coenzyme A causes Ca2+ release in pancreatic acinar cells.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(50): p. 31435-20981.
704. Fulceri R., A. Nori, A. Gamberucci, P. Volpe, R. Giunti, and A. Benedetti, *Fatty acyl-CoA esters induce calcium release from terminal cisternae of skeletal muscle.* Cell Calcium, 1994. **15**(2): p. 109-116.
705. Faergeman N.J. and J. Knudsen, *Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling.* Biochemical Journal, 1997. **323**(1): p. 1-12.

706. Branstrom R., I.B. Leibiger, B. Leibiger, B.E. Corkey, P.-O. Berggren, and O. Larsson, *Long chain Coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(47): p. 31395-20981.
707. Shrago E., *Long-chain acyl-CoA as a multi-effector ligand in cellular metabolism.* Journal of Nutrition, 2000. **130**(2 SUPPL.): p. 290S-293S.
708. Paucek P., V. Yarov-Yarovoy, X. Sun, and K.D. Garlid, *Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(50): p. 32084-20981.
709. Fox S.R., L.M. Hill, S. Rawsthorne, and M.J. Hills, *Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (brassica napus l.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis.* Biochemical Journal, 2000. **352**(2): p. 525-532.
710. Fox S.R., S. Rawsthorne, and M.J. Hills, *Role of acyl-CoAs and acyl-CoA-binding protein in regulation of carbon supply for fatty acid biosynthesis.* Biochemical Society Transactions, 2000. **28**(6): p. 672-674.
711. Taketa K. and B.M. Pogell, *The effect of palmityl coenzyme A on glucose 6-phosphate dehydrogenase and other enzymes.* Journal of Biological Chemistry, 1966. **241**(3): p. 720-726.
712. Kawaguchi A. and K. Bloch, *Inhibition of glucose 6 phosphate dehydrogenase by palmitoyl Coenzyme A.* Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**(18): p. 5793-5800.
713. Fulceri R., A. Gamberucci, H.M. Scott, R. Giunti, A. Burghell, and A. Benedetti, *Fatty acyl-CoA esters inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver microsomes.* Biochemical Journal, 1995. **307**(2): p. 391-397.
714. Tippett P.S. and K.E. Neet, *Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration.* Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(21): p. 12839-12845.
715. Tippett P.S. and K.E. Neet, *An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A.* Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(21): p. 12846-12852.
716. Rock C.O., R.B. Calder, M.A. Karim, and S. Jackowski, *Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of Coenzyme A.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(2): p. 1377-1383.
717. Kerkhoff C., M. Beuck, J. Threige-Rasmussen, F. Spener, J. Knudsen, and G. Schmitz, *Acyl-CoA binding protein (ACBP) regulates acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase (ACAT) in human mononuclear phagocytes.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1997. **1346**(2): p. 163-172.
718. Krcmery M. and D. Zakim, *Effects of oleoyl-CoA on the activity and functional state of UDP-glucuronosyltransferase.* Biochemical Pharmacology, 1993. **46**(5): p. 897-904.
719. Csala M., G. Banhegyi, T. Kardon, R. Fulceri, A. Gamberucci, R. Giunti, A. Benedetti, and J. Mandl, *Inhibition of glucuronidation by an acyl-CoA-mediated indirect mechanism.* Biochemical Pharmacology, 1996. **52**(7): p. 1127-1131.
720. Yaney G.C., H.M. Korchak, and B.E. Corkey, *Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells.* Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 1989-1998.
721. Bronfman M., M.N. Morales, and A. Orellana, *Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long-chain acyl-CoA.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988. **152**(3): p. 987-992.
722. Orellana A., P.C. Hidalgo, M.N. Morales, D. Mezzano, and M. Bronfman, *Palmitoyl-CoA and the acyl-CoA thioester of the carcinogenic peroxisme-proliferator ciprofibrate potentiate diacylglycerol-activated protein kinase C by decreasing the phosphatidylserine requirement of the enzyme.* European Journal of Biochemistry, 1990. **190**(1): p. 57-61.
723. Nakamura J., N. Okamura, S. Usuki, and S. Bannai, *Inhibition of adenylyl cyclase activity in brain membrane fractions by arachidonic acid and related unsaturated fatty acids.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. **389**(1): p. 68-76.
724. Raman N. and C.C. Dirusso, *Analysis of acyl coenzyme A binding to the transcription factor FADR and identification of amino acid residues in the carboxyl terminus required for ligand binding.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(3): p. 1092-1097.
725. Raman N., P.N. Black, and C.C. Dirusso, *Characterization of the fatty acid-responsive transcription factor FADR. Biochemical and genetic analyses of the native conformation and functional domains.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(49): p. 30645-20981.
726. Brun T., F. Assimacopoulos-Jeannet, B.E. Corkey, and M. Prentki, *Long-chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line INS-1.* Diabetes, 1997. **46**(3): p. 393-400.

727. Herbert D., L.J. Price, C. Alban, L. Dehaye, D. Job, D.J. Cole, K.E. Pallett, and L. Harwood, *Kinetic studies on two isoforms of acetyl-CoA carboxylase from maize leaves.* Biochemical Journal, 1996. **318**(3): p. 997-1006.
728. Hertz R., I. Berman, and J. Bar-Tana, *Transcriptional activation by amphipathic carboxylic peroxisomal proliferators is induced by the free acid rather than the acyl-CoA derivative.* European Journal of Biochemistry, 1994. **221**(1): p. 611-615.
729. Murakami K., T. Ide, T. Nakazawa, T. Okazaki, T. Mochizuki, and T. Kadowaki, *Fatty-acyl-CoA thioesters inhibit recruitment of steroid receptor co-activator 1 to alpha- and gamma isoforms of peroxisome-proliferator-activated receptors by competing with agonists.* Biochemical Journal, 2001. **353**(2): p. 231-238.
730. Hertz R., J. Magenheim, I. Berman, and J. Bar-Tana, *Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha.* Nature, 1998. **392**(6675): p. 512-516.
731. Bogan A.A., Q. Dallas-Yang, J. Ruse M.D., Y. Maeda, G. Jiang, L. Nepomuceno, T.S. Scanlan, F.E. Cohen, and F.M. Sladek, *Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4-alpha.* Journal of Molecular Biology, 2000. **302**(4): p. 831-851.
732. Hertz R., V. Sheena, B. Kalderon, I. Berman, and J. Bar-Tana, *Suppression of hepatocyte nuclear factor-4alpha by acyl-CoA thioesters of hypolipidemic peroxisome proliferators.* Biochemical Pharmacology, 2001. **61**(9): p. 1057-1062.
733. Yokokawa M., A. Fujiwara, H. Shimada, and I. Yasumasu, *Inhibitory effect of long chain fatty acyl CoAs on RNA polymerase from escherichia Coli.* Journal of Biochemistry, 1983. **94**(2): p. 415-420.
734. Rich G.T., J.G. Comerford, S. Graham, and A.P. Dawson, *Effects of CoA and acyl-CoA on Ca-permeability of endoplasmic-reticulum membranes from rat liver.* Biochemical Journal, 1995. **306**(3): p. 703-708.
735. Requero M.A., F.M. Goni, and A. Alonso, *The membrane-perturbing properties of palmitoyl-Coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study.* Biochemistry, 1995. **34**(33): p. 10400-10405.
736. Banhegy G., M. Csala, J. Mandl, A. Burchell, B. Burchell, P. Marcolongo, R. Fulceri, and A. Benedetti, *Fatty acyl-CoA esters and the permeability of rat liver microsomal vesicles [1].* Biochemical Journal, 1996. **320**(1): p. 343-344.
737. Requero M.A., M. Gonzalez, F.M. Goni, A. Alonso, and G. Fidelio, *Differential penetration of fatty acyl-Coenzyme A and fatty acylcarnitines into phospholipid monolayers.* FEBS Letters, 1995. **357**(1): p. 75-78
738. Glick B.S. and J.E. Rothman, *Possible role for fatty acyl-Coenzyme A in intracellular protein transport.* Nature, 1987. **326**(6110): p. 309-312.
739. Ostermann J., L. Orci, K. Tani, M. Amherdt, M. Ravazzola, Z. Elazar, and J.E. Rothman, *Stepwise assembly of functionally active transport vesicles.* Cell, 1993. **75**(5): p. 1015-1025.
740. Casey P.J. and M.C. Seabra, *Protein prenyltransferases.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(10): p. 5289-5292.
741. Grunler J. and I. Parmryd, *Subcellular distribution of farnesyl protein transferase in rat liver.* FEBS Letters, 1999. **455**(3): p. 233-237.
742. Clausen V.A., R.L. Edelstein, and M.D. Distefano, *Stereochemical analysis of the reaction catalyzed by human protein geranylgeranyl transferase.* Biochemistry, 2001. **40**(13): p. 3920-3930.
743. Hayes J.S., O.A. Lawler, M.-T. Walsh, and B.T. Kinsella, *The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(34): p. 23707-23718.
744. Resh M.D., *Fatty acylation of proteins: New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 1999. **1451**(1): p. 1-16
745. Farazi T.A., G. Waksman, and J.I. Gordon, *The biology and enzymology of protein N-myristoylation.* Journal of Biological Chemistry., 2001. **276**(43): p. 39501-39504.
746. Demar J.C. J., D.R. Rundle, T.G. Wensel, and R.E. Anderson, *Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins.* Progress in Lipid Research, 1999. **38**(1): p. 49-90.
747. Giang D.K. and B.F. Cravatt, *A second mammalian N-myristoyltransferase.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(12): p. 6595-6598.
748. Qi Q., R.V.S. Rajala, W. Anderson, C. Jiang, K. Rozwadowski, G. Selvaraj, R. Sharma, and R. Datla, *Molecular cloning, genomic organization, and biochemical characterization of myristoyl-CoA:Protein N-myristoyltransferase from arabidopsis thaliana.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(13): p. 9673

749. Takasaki A., N. Hayashi, M. Matsubara, E. Yamauchi, and H. Taniguchi, *Identification of the calmodulin-binding domain of neuron-specific protein kinase C substrate protein CAP-22/NAP-22. Direct involvement of protein myristoylation in calmodulin-target protein interaction.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 11848-11853.
750. Genchi G. and J.A. Olson, *Retinoylation of proteins in cell-free fractions of rat tissues in vitro.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2001. **1530**(2-3): p. 146-154.
751. Takahashi N. and T.R. Breitman, *Retinoic acid acylation (retinoylation) of a nuclear protein in the human acute myeloid leukemia cell line HL60.* Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(9): p. 5159-63
752. Myhre A.M., E. Hagen, R. Blomhoff, and K.R. Norum, *Retinoylation of proteins in a macrophage tumor cell line J774, following uptake of chylomicron remnant retinyl ester.* Journal of Nutritional Biochemistry, 1998. **9**(12): p. 705-711.
753. Wada M., T. Fukui, Y. Kubo, and N. Takahashi, *Formation of retinoyl-CoA in rat tissues.* Journal of Biochemistry, 2001. **130**(3): p. 457-463.
754. Buhman K.F., M. Accad, and R.V. Farese, *Mammalian acyl-CoA:Cholesterol acyltransferases.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2001. **1529**(1-3): p. 142-154.
755. Porter J.A., K.E. Young, and P.A. Beachy, *Cholesterol modification of Hedgehog signaling proteins in animal development.* Science, 1996. **274**(5285): p. 255-259.
756. Muszbek L. and M. Laposata, *Covalent modification of proteins by arachidonate and eicosapentaenoate in platelets.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(24): p. 18243-18248.
757. Bano M.C., C.S. Jackson, and A.I. Magee, *Pseudo-enzymatic S-acylation of a myristoylated YES protein tyrosine kinase peptide in vitro may reflect non-enzymatic S-acylation in vivo.* Biochemical Journal, 1998. **330**(2): p. 723-731.
758. Ford D.A., C.C. Horner, and R.W. Gross, *Protein kinase C acylation by palmitoyl coenzyme A facilitates its translocation to membranes.* Biochemistry, 1998. **37**(34): p. 11953-11961.
759. Yamashita A., M. Watanabe, T. Tonegawa, T. Sugiura, and K. Waku, *Acyl-CoA binding and acylation of UDP-glucuronosyltransferase isoforms of rat liver: Their effect on enzyme activity.* Biochemical Journal, 1995. **312**(1): p. 301-308.
760. Woldegiorgis G., J. Lawrence, A. Ruoho, T. Duff, and E. Shrago, *Photoaffinity labeling of mitochondrial proteins with 2-azido [32p]palmitoyl CoA.* FEBS Letters, 1995. **364**(2): p. 143-146.
761. Berthiaume L. and M.D. Resh, *Biochemical characterization of A palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(38): p. 22399-29858.
762. Dunphy J.T., W.K. Greentree, C.L. Manahan, and M.E. Linder, *G-protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(12): p. 7154-29858.
763. Liu L., T. Dudler, and M.H. Gelb, *Purification of a protein palmitoyltransferase that acts on H-Ras protein and on a C-terminal N-Ras peptide.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(38): p. 23269-76
764. Veit M., *Palmitoylation of the 25-kDa synaptosomal protein (SNAP-25) in vitro occurs in the absence of an enzyme, but is stimulated by binding to syntaxin.* Biochemical Journal, 2000. **345**(1): p. 145-151.
765. Bharadwaj M. and O.A. Bizzozero, *Myelin P glycoprotein and a synthetic peptide containing the palmitoylation site are both autoacylated.* Journal of Neurochemistry, 1995. **65**(4): p. 1805-1815.
766. Bizzozero O.A., J.F. Mcgarry, and M.B. Lees, *Autoacylation of myelin proteolipid protein with acyl coenzyme A.* Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(28): p. 13550-13557.
767. Kragelund B.B., J. Knudsen, and F.M. Poulsen, *Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP).* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. **1441**(2-3): p. 150-161.
768. Duncan J.A. and A.G. Gilman, *Autoacylation of G protein -alpha subunits.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(38): p. 23594-23600.
769. Xie Z., W.-T. Ho, and J.H. Exton, *Requirements and effects of palmitoylation of rat PLD1.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(12): p. 9383-9391.
770. O'brien P.J., R.S. St. Jules, T.S. Reddy, N.G. Bazan, and M. Zatz, *Acylation of disc membrane rhodopsin may be nonenzymatic.* Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(11): p. 5210-5215.
771. Okamoto Y., H. Ninomiya, M. Tanioka, A. Sakamoto, S. Miwa, and T. Masaki, *Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(34): p. 21589-21596.
772. Alvarez E., N. Girones, and R.J. Davis, *Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(27): p. 16644-16655.

773. Lee H., S.E. Woodman, J.A. Engelman, D. Volonte', F. Galbiati, H.L. Kaufman, D.M. Lublin, and M.P. Lisanti, *Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-src tyrosine kinase. Targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples C-SRC and caveolin-1 (Tyr-14).* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(37): p. 35150-35158.
774. Blanpain C., V. Wittamer, J.-M. Vanderwinden, A. Boom, B. Renneboog, B. Lee, E. Le Poul, L. El Asmar, C. Govaerts, G. Vassart, R.W. Doms, and M. Parmentier, *Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(26): p. 23795-23804.
775. Schroeder H., R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nagele, H. Waldmann, and J.R. Silvius, *S-acylation and plasma membrane targeting of the farnesylated carboxyl- terminal peptide of N-Ras in mammalian fibroblasts.* Biochemistry, 1997. **36**(42): p. 13102-13109.
776. Leventis R., G. Juel, J.K. Knudsen, and J.R. Silvius, *Acyl-CoA binding proteins inhibit the nonenzymic S-acylation of cysteinyl-containing peptide sequences by long-chain acyl-CoAs.* Biochemistry, 1997. **36**(18): p. 5546-5553.
777. Corvi M.M., C.-L.M. Soltys, and L.G. Berthiaume, *Regulation of mitochondrial carbamoyl-phosphate synthetase 1 activity by active site fatty acylation.* Journal of Biological Chemistry., 2001. **276**(49): p. 45704-45712.
778. Wolff J., A.M. Zambito, P.J. Britto, and L. Knipling, *Autopalmitoylation of tubulin.* Protein Science, 2000. **9**(7): p. 1357-1364.
779. Magee A.I., L. Gutierrez, I.A. Mckay, C.J. Marshall, and A. Hall, *Dynamic fatty acylation of P21N-Ras.* EMBO Journal, 1987. **6**(11): p. 3353-3357.
780. Staufenbiel M. and E. Lazarides, *Ankyrin is fatty acid acylated in erythrocytes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(2): p. 318-322.
781. Wedegaertner P.B. and H.R. Bourne, *Activation and depalmitoylation of G(salpha).* Cell, 1994. **77**(7): p. 1063-1070.
782. Fukushima Y., T. Saitoh, M. Anai, T. Ogihara, K. Inukai, M. Funaki, H. Sakoda, Y. Onishi, H. Ono, M. Fujishiro, T. Ishikawa, K. Takata, R. Nagai, M. Omata, and T. Asano, *Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys and is important for cell surface targeting.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2001. **1539**(3): p. 181-191.
783. Lane S.R. and Y. Liu, *Characterization of the palmitoylation domain of SNAP-25.* Journal of Neurochemistry, 1997. **69**(5): p. 1864-1869.
784. Utsumi T., T. Takeshige, K. Tanaka, K. Takami, Y. Kira, J. Klostergaard, and R. Ishisaka, *Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated.* FEBS Letters, 2001. **500**(1-2): p. 1-6.
785. Robinson L.J., L. Busconi, and T. Michel, *Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(3): p. 995-998.
786. De B.K. and M.E. Kirtley, *Interaction of phosphoglycerate kinase with human erythrocyte membranes.* Journal of Biological Chemistry, 1977. **252**(19): p. 6715-6720.
787. Zambito A.M. and J. Wolff, *Palmitoylation of tubulin.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **239**(3): p. 650-654.
788. Zambito A.M. and J. Wolff, *Plasma membrane localization of palmitoylated tubulin.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **283**(1): p. 42-47.
789. Palestini P., M. Pitto, G. Tedeschi, A. Ferraretto, M. Parenti, J. Brunner, and M. Masserini, *Tubulin anchoring to glycolipid-enriched, detergent-resistant domains of the neuronal plasma membrane.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(14): p. 9978-9985.
790. Ren Q. and V. Bennett, *Palmitoylation of neurofascin at a site in the membranespanning domain highly conserved among the L1 family of cell adhesion molecules.* Journal of Neurochemistry, 1998. **70**(5): p. 1839-1849.
791. Guzzi F., D. Zanchetta, B. Chini, and M. Parenti, *Thioacylation is required for targeting G-protein subunit Galpha to detergent-insoluble caveolin-containing membrane domains.* Biochemical Journal, 2001. **355**(2): p. 323-331.
792. Koegl M., P. Zlatkine, S.C. Ley, S.A. Courtneidge, and A.I. Magee, *Palmitoylation of multiple SRC-family kinases at a homologous N-terminal motif.* Biochemical Journal, 1994. **303**(3): p. 749-753.
793. Wolven A., H. Okamura, Y. Rosenblatt, and M.D. Resh, *Palmitoylation of P59(FYN) is reversible and sufficient for plasma membrane association.* Molecular Biology of the Cell, 1997. **8**(6): p. 1159-1173.

794. Godsel L.M. and D.M. Engman, *Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism.* EMBO Journal, 1999. **18**(8): p. 2057-2065.
795. Schlegel A., C. Wang, R.G. Pestell, and M.P. Lisanti, *Ligand-independent activation of oestrogen receptor A by caveolin-1.* Biochemical Journal, 2001. **359**(1): p. 203-210.
796. Mochly-Rosen D., H. Khaner, J. Lopez, and B.L. Smith, *Intracellular receptors for activated protein kinase C: Identification of a binding site for the enzyme.* Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(23): p. 14866-14868.
797. Feron O., J.B. Michel, K. Sase, and T. Michel, *Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: Complementary roles of dual acylation and caveolin interactions.* Biochemistry, 1998. **37**(1): p. 193-200.
798. Stevens P.A., J. Pediani, J.J. Carrillo, and G. Milligan, *Coordinated agonist regulation of receptor and G protein palmitoylation and functional rescue of palmitoylation-deficient mutants of the G protein G11alpha following fusion to the alpha 1b-adrenoreceptor. Palmitoylation of G11alpha is not required for interaction with beta-gamma complex.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(38): p. 35883-90
799. Tanaka K., Y. Nagayama, E. Nishihara, H. Namba, S. Yamashita, and M. Niwa, *Palmitoylation of human thyrotropin receptor: Slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant.* Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 803-806.
800. Percherancier Y., T. Planchenault, A. Valenzuela-Fernandez, J.-L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelerie, *Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(34): p. 31936-31944.
801. Gustafsson M., W.J. Griffiths, E. Furusjo, and J. Johansson, *The palmitoyl groups of lung surfactant protein C reduce unfolding into a fibrillogenic intermediate.* Journal of Molecular Biology, 2001. **310**(4): p. 937-950.
802. Yang S., L. Zhang, and Y. Huang, *Membrane association and conformational change of palmitoylated G-alpha.* FEBS Letters, 2001. **498**(1): p. 76-81.
803. Yamashita A., T. Nagatsuka, M. Watanabe, H. Kondo, T. Sugiura, and K. Waku, *Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase activity by fatty acyl-CoA. Kinetic studies and structure-activity relationship.* Biochemical Pharmacology, 1997. **53**(4): p. 561-570.
804. Duncan J.A. and A.G. Gilman, *A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein A subunits and P21(ras).* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(25): p. 15830-15837.
805. Devedjiev Y., Z. Dauter, S.R. Kuznetsov, T.L.Z. Jones, and Z.S. Derewenda, *Crystal structure of the human acyl protein thioesterase i from a single X-ray data set to 1.5 A.* Structure, 2000. **8**(11): p. 1137-46
806. Shahinian S. and J.R. Silvius, *Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes.* Biochemistry, 1995. **34**(11): p. 3813-3822.
807. Dunphy J.T. and M.E. Linder, *Signalling functions of protein palmitoylation.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1998. **1436**(1-2): p. 245-261.
808. Sowa G., J. Liu, A. Papapetropoulos, M. Rex-Haffner, T.E. Hughes, and W.C. Sessa, *Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(32): p. 22524-22531.
809. Demar Jr. J.C. and R.E. Anderson, *Identification and quantitation of the fatty acids composing the CoA ester pool of bovine retina, heart, and liver.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(50): p. 31362-81
810. Muszbek L., G. Haramura, J.E. Cluette-Brown, E.M. Van Cott, and M. Laposata, *The pool of fatty acids covalently bound to platelet proteins by thioester linkages can be altered by exogenously supplied fatty acids.* Lipids, 1999. **34**(6 suppl.): p. S331-S337.
811. Liang X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, and M.D. Resh, *Heterogeneous fatty acylation of SRC family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(33): p. 30987-30994.
812. Degtyarev M.Y., A.M. Spiegel, and T.L.Z. Jones, *The G protein alpha (s) subunit incorporates [H]palmitic acid and mutation of cysteine-3 prevents this modification.* Biochemistry, 1993. **32**(32): p. 8057-8061.
813. Scholich K., Y. Yigzaw, and T.B. Patel, *Cysteine 3 is not the site of in vitro palmitoylation on G(sa).* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **270**(1): p. 131-136.
814. Galbiati F., D. Volonte, D. Meani, G. Milligan, D.M. Lublin, M.P. Lisanti, and M. Parenti, *The dually acylated NH2-terminal domain of GI1alpha is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the*

recognition of dually acylated G-protein alpha subunits in vivo. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(9): p. 5843-5850.
815. Galbiati F., F. Guzzi, A.I. Magee, G. Milligan, and M. Parenti, *N-terminal fatty acylation of the alpha-subunit of the G-protein G(I)1: Only the myristoylated protein is a substrate for palmitoylation.* Biochemical Journal, 1994. **303**(3): p. 697-700.
816. Mumby S.M., C. Kleuss, and A.G. Gilman, *Receptor regulation of G-protein palmitoylation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(7): p. 2800-2804.
817. Bizzozero O.A., H.A. Bixler, and A. Pastuszyn, *Structural determinants influencing the reaction of cysteine-containing peptides with palmitoyl-Coenzyme A and other thioesters.* Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1545**(1-2): p. 278-288.
818. Milligan G., M. Parenti, and A.I. Magee, *The dynamic role of palmitoylation in signal transduction.* Trends in Biochemical Sciences, 1995. **20**(5): p. 181-186.
819. Veit M., T.H. Sollner, and J.E. Rothman, *Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the T-SNARE SNAP-25.* FEBS Letters, 1996. **385**(1-2): p. 119-123.
820. Chapman E.R., J. Blasi, S. An, N. Brose, P.A. Johnston, T.C. Sudhof, and R. Jahn, *Fatty acylation of synaptotagmin in PC12 cells and synaptosomes.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996. **225**(1): p. 326-332.
821. St Jules R.S. and P.J. O'brien, *The acylation of rat rhodopsin in vitro and in vivo.* Experimental Eye Research, 1986. **43**(6): p. 929-940.
822. Ovchinnikov Y.A., N.G. Abdulaev, and A.S. Bogachuk, *Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated.* FEBS Letters, 1988. **230**(1-2): p. 1-5.
823. Papac D.I., K.R. Thornburg, E.E. Bullesbach, R.K. Crouch, and D.R. Knapp, *Palmitylation of a G-protein coupled receptor. Direct analysis by tandem mass spectrometry.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(24): p. 16889-16894.
824. Kennedy M.E. and L.E. Limbird, *Palmitoylation of the alpha (2a)-adrenergic receptor. Analysis of the sequence requirements for and the dynamic properties of alpha (2a)-adrenergic receptor palmitoylation.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(50): p. 31915-31922.
825. Hess D.T., T.M. Slater, M.C. Wilson, and J.H.P. Skene, *The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS.* Journal of Neuroscience, 1992. **12**(12): p. 4634-4641.
826. Schweizer A., J. Rohrer, and S. Kornfeld, *Determination of the structural requirements for palmitoylation of P63.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(16): p. 9638-9644.
827. Quest A.F.G., J. Bloomenthal, E.S.G. Bardes, and R.M. Bell, *The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(14): p. 10193-10197.
828. Parat M.-O. and P.L. Fox, *Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 15776-15782.
829. Bergelson L.D. and L.I. Barsukov, *Topological asymmetry of phospholipids in membranes.* Science, 1977. **197**(4300): p. 224-230.
830. Florin-Christensen J., C.E. Suarez, M. Florin-Christensen, M. Wainszelbaum, W.C. Brown, T.F. Mcelwain, and G.H. Palmer, *A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(14): p. 7736-7741.
831. Nixon A.B., J.T. O'flaherty, J.K. Salyer, and R.L. Wykle, *Acetyl-CoA:1-o-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by P38 kinase.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(9): p. 5469-20981.
832. Baburina I. and S. Jackowski, *Cellular responses to excess phospholipid.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(14): p. 9400-9408.
833. Wilson H., W. Neumuller, H. Eibl, W. Welch, Jr, and R. Reitz, *Structural basis of the phospholipid acyltransferase enzyme substrate specificity: A computer modeling study of the phospholipid acceptor molecule.* Journal of Lipid Research, 1995. **36**(3): p. 429-439.
834. Sugiura T., N. Kudo, T. Ojima, S. Kondo, A. Yamashita, and K. Waku, *Coenzyme A-dependent modification of fatty acyl chains of rat liver membrane phospholipids: Possible involvement of ATP-independent acyl-CoA synthesis.* Journal of Lipid Research, 1995. **36**(3): p. 440-450.

835. Tieleman D.P., S.J. Marrink, and H.J.C. Berendsen, *A computer perspective of membranes: Molecular dynamics studies of lipid bilayer systems.* Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes, 1997. **1331**(3): p. 235-270.
836. Gliss C., H. Clausen-Schaumann, R. Gunther, S. Odenbach, O. Randl, and T.M. Bayerl, *Direct detection of domains in phospholipid bilayers by grazing incidence diffraction of neutrons and atomic force microscopy.* Biophysical. Journal, 1998. **74**(5): p. 2443-2450.
837. Tu K., M.L. Klein, and D.J. Tobias, *Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer.* Biophysical Journal, 1998. **75**(5): p. 2147-2156.
838. Gabdoulline R.R., Garret Vanderkooi, and Chong Zheng, *Comparison of the structures of dimyristoylphosphatidylcholine in the presence and absence of cholesterol by molecular dynamics simulations.* Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(39): p. 15942.
839. Ramstedt B. and J.P. Slotte, *Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: A comparative study of the effect of the chain length.* Biophysical Journal, 1999. **76**(2): p. 908-915.
840. Yamashita A., N. Kawagishi, T. Miyashita, T. Nagatsuka, T. Sugiura, K. Kume, T. Shimizu, and K. Waku, *ATP-independent fatty acyl-Coenzyme A synthesis from phospholipid. Coenzyme A-dependent transacylation activity toward lysophosphatidic acid catalyzed by acyl-Coenzyme A:Lysophosphatidic acid acyltransferase.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(29): p. 26745-26752.
841. Ahmed S.N., D.A. Brown, and E. London, *On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes.* Biochemistry, 1997. **36**(36): p. 10944-10953.
842. D'antuono C., M.D.C. Fernandez-Tome, N. Sterin-Speziale, and D.L. Bernik, *Lipid-protein interactions in rat renal subcellular membranes: A biophysical and biochemical study.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **382**(1): p. 39-47.
843. Xu X. and E. London, *The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation.* Biochemistry, 2000. **39**(5): p. 843-849.
844. Marsh D., *Polarity and permeation profiles in lipid membranes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(14): p. 7777-7782.
845. Brown D.A. and J.K. Rose, *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.* Cell, 1992. **68**(3): p. 533-544.
846. Hwang J., L.A. Gheber, L. Margolis, and M. Edidin, *Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy.* Biophysical Journal, 1998. **74**(5): p. 2184-2190.
847. Epand R.M., S. Maekawa, C.M. Yip, and R.F. Epand, *Protein-induced formation of cholesterol-rich domains.* Biochemistry, 2001. **40**(35): p. 10514-10521.
848. Moffett S., D.A. Brown, and M.E. Linder, *Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(3): p. 2191-2198.
849. Melkonian K.A., A.G. Ostermeyer, J.Z. Chen, M.G. Roth, and D.A. Brown, *Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(6): p. 3910-3917.
850. Brown D.A. and E. London, *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(23): p. 17221-17224.
851. Jacobson K. and C. Dietrich, *Looking at lipid rafts?* Trends in Cell Biology, 1999. **9**(3): p. 87-91.
852. Viola A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia, *T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains.* Science, 1999. **283**(5402): p. 680-682.
853. Ikonen E., *Roles of lipid rafts in membrane transport.* Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**(4): p. 470-477.
854. Chamberlain L.H., R.D. Burgoyne, and G.W. Gould, *Snare proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(10): p. 5619-5624.
855. Pande G., *The role of membrane lipids in regulation of integrin functions.* Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**(5): p. 569-574.
856. Stulnig T.M., J. Huber, N. Leitinger, E.-M. Imre, P. Angelisova, P. Nowotny, and W. Waldhausl, *Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 37335-37340.

857. Stulnig T.M., M. Berger, T. Sigmund, D. Raederstorff, H. Stockinger, and W. Waldhausl, *Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains.* Journal of Cell Biology, 1998. **143**(3): p. 637-644.
858. Brown D.A. and E. London, *Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes?* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **240**(1): p. 1-7.
859. Rothberg K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.-S. Ying, J.R. Glenney, and R.G.W. Anderson, *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.* Cell, 1992. **68**(4): p. 673-682.
860. Dietzen D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin, *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(12): p. 6838-6842.
861. Uittenbogaard A. and E.J. Smart, *Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(33): p. 25595-25599.
862. Couet J., S. Li, T. Okamoto, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti, *Molecular and cellular biology of caveolae: Paradoxes and plasticities.* Trends in Cardiovascular Medicine, 1997. **7**(4): p. 103-110.
863. Okamoto T., A. Schlegel, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti, *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5419-5422.
864. Oh P. and J.E. Schnitzer, *Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default.* Molecular Biology of the Cell, 2001. **12**(3): p. 685-698.
865. Kurzchalia T.V. and R.G. Parton, *Membrane microdomains and caveolae.* Current Opinion in Cell Biology, 1999. **11**(4): p. 424-431.
866. Rousso I., M.B. Mixon, B.K. Chen, and P.S. Kim, *Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(25): p. 13523-13525.
867. Harder T. and K. Simons, *Caveolae, digs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains.* Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**(4): p. 534-542.
868. Vidalain P.-O., O. Azocar, C. Servet-Delprat, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, and S. Manie, *CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts.* EMBO Journal, 2000. **19**(13): p. 3304-3313.
869. Fivaz M., L. Abrami, and F.G. Van Der Goot, *Landing on lipid rafts [2].* Trends in Cell Biology, 1999. **9**(6): p. 212-213.
870. Ostrom R.S., C. Gregorian, R.M. Drenan, Y. Xiang, J.W. Regan, and P.A. Insel, *Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(45): p. 42063-42069.
871. Murakami M., T. Kambe, S. Shimbara, S. Yamamoto, H. Kuwata, and I. Kudo, *Functional association of type IIa secretory phospholipase A2 with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(42): p. 29927-1.
872. Liou J.-Y., W.-G. Deng, D.W. Gilroy, S.-K. Shyue, and K.K. Wu, *Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(37): p. 34975-34982.
873. Cronstein B.N. and G. Weissmann, *Targets for antiinflammatory drugs.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1995. **35**: p. 449-462.
874. Lapicque F., N. Dubois, and P. Netter, *[optical isomerism of non-steroidal anti-inflammatory agents: Consequences on the risk/benefit ratio (editorial)].* Revue du Rhumatisme. Edition Francaise, 1993. **60**(11): p. 780-784.
875. Pairet M., J. Van Ryn, and J. Vane, *Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs.* Inflammation Research, 1998. **47**(2): p. S93-S101.
876. Haumont M., J. Magdalou, J.-C. Ziegler, R. Bidault, J.-P. Siest, and G. Siest, *Immobilization of microsomes into alginate beads is a convenient method for producing glucuronides from drugs.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1991. **35**(4): p. 440-446.

877. Walker J.E., *Lysine residue 199 of human serum albumin is modified by acetylsalicylic acid.* FEBS Letters, 1976. **66**(2): p. 173-175.
878. Fehske K.J., W.E. Mueller, and U. Wollert, *A highly reactive tyrosine residue as part of the indole and benzodiazepine binding site of human serum albumin.* Biochimica et Biophysica Acta, 1979. **577**(2): p. 346-359.
879. Benson D.A., M.S. Boguski, D.J. Lipman, J. Ostell, B.F.F. Ouellette, B.A. Rapp, and D.L. Wheeler, *Genbank.* Nucleic Acids Research, 1999. **27**(1): p. 12-17.
880. Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman, *Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs.* Nucleic Acids Research, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
881. Minekura H., M. Kang, Y. Inagaki, Y. Cho, T. Fujino, H. Suzuki, and T.T. Yamamoto, *Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **286**(1): p. 80-86.
882. Surles M.C., J.S. Richardson, D.C. Richardson, and F.P. Brooks Jr., *Sculpting proteins interactively: Continual energy minimization embedded in a graphical modeling system.* Protein Science, 1994. **3**(2): p. 198-210.
883. Callebaut I., G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat, and J.P. Mornon, *Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives.* Cellular and Molecular Life Sciences, 1997. **53**(8): p. 621-645.
884. Poupon A. and J.-P. Mornon, *Populations of hydrophobic amino acids within protein globular domains: Identification of conserved 'topohydrophobic' positions.* Proteins: Structure, Function and Genetics, 1998. **33**(3): p. 329-342.
885. Chakir S., M. Maurice, J. Magdalou, P. Leroy, N. Dubois, F. Lapicque, Z. Abdelhamid, and A. Nicolas, *High-performance liquid chromatographic enantioselective assay for the measurement of ketoprofen glucuronidation by liver microsomes.* Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 1994. **654**(1): p. 61-68.
886. Goldman P.V., Pr, *The specificity of triglyceride synthesis from diglycerides in chicken adipose tissue.* Journal of Biological Chemistry, 1961. **236**: p. 2620-2625.
887. Horton J.K., A.S. Williams, Z. Smith-Phillips, R.C. Martin, and G. O'beirne, *Intracellular measurement of prostaglandin e: Effect of anti- inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression.* Analytical Biochemistry, 1999. **271**(1): p. 18-28.
888. Laneuville O., D.K. Breuer, D.L. Dewitt, T. Hla, C.D. Funk, and W.L. Smith, *Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1994. **271**(2): p. 927-934.
889. Janusz J.M., P.A. Young, J.M. Ridgeway, M.W. Scherz, K. Enzweiler, L.I. Wu, L. Gan, R. Darolia, R.S. Matthews, D. Hennes, D.E. Kellstein, S.A. Green, J.L. Tulich, T. Rosario-Jansen, I.J. Magrisso, K.R. Wehmeyer, D.L. Kuhlenbeck, T.H. Eichhold, R.L.M. Dobson, S.P. Sirko, and R.W. Farmer, *New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 1. 7-tert-butyl-2,3- dihydro-3,3-dimethylbenzonfuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: Discovery and variation of the 5-keto substituent.* Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(7): p. 1112-1123.
890. Tang M.S., L.J. Askonas, and T.M. Penning, *Bromoacetamido analogs of indomethacin and mefenamic acid as affinity- labeling agents and mechanistic probes for prostaglandin H synthase.* Biochemistry, 1995. **34**(3): p. 808-815.
891. Llorens O., J.J. Perez, A. Palomer, and D. Mauleon, *Structural basis of the dynamic mechanism of ligand binding to cyclooxygenase.* Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1999. **9**(19): p. 2779-2784.
892. Chulada P.C. and R. Langenbach, *Differential inhibition of murine prostaglandin synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs using exogenous and endogenous sources of arachidonic acid.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1997. **280**(2): p. 606-613.
893. Gonchar M., M. Sergeeva, A. Mevkh, and S. Varfolomeyev, *Kinetics of prostanoid synthesis by macrophages is regulated by arachidonic acid sources.* European Journal of Biochemistry, 1999. **265**(2): p. 779-787.
894. Shimokawa T., R. Kulmacz, D. Dewitt, and W. Smith, *Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(33): p. 20073-20076.

895. Boutaud O., C.J. Brame, R.G. Salomon, L.J. Roberts Ii, and J.A. Oates, *Characterization of the lysyl adducts formed from prostaglandin H via the levuglandin pathway.* Biochemistry, 1999. **38**(29): p. 9389-9396.
896. Cao Y., A.T. Pearman, G.A. Zimmerman, T.M. Mcintyre, and S.M. Prescott, *Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(21): p. 11280-11285.
897. Cho Y.-Y., M.-J. Kang, H. Sone, T. Suzuki, M. Abe, M. Igarashi, T. Tokunaga, S. Ogawa, Y.A. Takei, T. Miyazawa, H. Sasano, T. Fujino, and T.T. Yamamoto, *Abnormal uterus with polycysts, accumulation of uterine prostaglandins, and reduced fertility in mice heterozygous for acyl-CoA synthetase 4 deficiency.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **284**(4): p. 993-997.
898. Fujimoto Y., T. Nakajima, Y. Murakami, K. Takami, H. Nishida, S. Sakuma, and T. Fujita, *Effects of fatty acyl-coenzyme A esters on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla microsomes.* Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1992. **47**(4): p. 265-268.
899. Demant E.J.F. and B.T. Nystrøm, *Continuous recording of long-chain acyl-Coenzyme A synthetase activity using fluorescently labeled bovine serum albumin.* Analytical Biochemistry, 2001. **295**(1): p. 38-44
900. Richards E.W., M.W. Hamm, J.E. Fletcher, and D.A. Otto, *The binding of palmitoyl-CoA to bovine serum albumin.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism, 1990. **1044**(3): p. 361-367.
901. Wilton D.C., *The fatty acid analogue 11-(dansylamino)undecanoic acid is a fluorescent probe for the bilirubin-binding sites of albumin and not for the high-affinity fatty acid-binding sites.* Biochemical Journal, 1990. **270**(1): p. 163-166.
902. Carter D.C., X.M. He, S.H. Munson, P.D. Twigg, K.M. Gernert, M.B. Broom, and T.Y. Miller, *Three-dimensional structure of human serum albumin.* Science, 1989. **244**(4909): p. 1195-1198.
903. Carter D.C. and X.-M. He, *Structure of human serum albumin.* Science, 1990. **249**(4966): p. 302-303.
904. He X.M. and D.C. Carter, *Atomic structure and chemistry of human serum albumin.* Nature, 1992. **358**(6383): p. 209-215.
905. Curry S., H. Mandelkow, P. Brick, and N. Franks, *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites.* Nature Structural Biology, 1998. **5**(9): p. 827-835.
906. Bhattacharya A.A., T. Grune, and S. Curry, *Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin.* Journal of Molecular Biology, 2000. **303**(5): p. 721-732.
907. Presle N., F. Lapicque, S. Fournel-Gigleux, J. Magdalou, and P. Netter, *Stereoselective irreversible binding of ketoprofen glucuronides to albumin: Characterization of the site and the mechanism.* Drug Metabolism and Disposition, 1996. **24**(10): p. 1050-1057.
908. Lisanti M.P., M. Sargiacomo, and P.E. Scherer, *Purification of caveolae-derived membrane microdomains containing lipid-anchored signaling molecules, such as GPI-anchored proteins, h-ras, src-family tyrosine kinases, eNOS, and G-protein alpha-, beta-, and gamma-subunits.* Methods in Molecular Biology, 1999. **116**: p. 51-60.
909. Scherer P.E., T. Okamoto, M. Chun, I. Nishimoto, H.F. Lodish, and M.P. Lisanti, *Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(1): p. 131-135.
910. Engel C. and R. Wierenga, *The diverse world of coenzyme A binding proteins.* Current Opinion in Structural Biology, 1996. **6**(6): p. 790-797.
911. Garcia-Cardena G., P. Oh, J. Liu, J.E. Schnitzer, and W.C. Sessa, *Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: Implications for nitric oxide signaling.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(13): p. 6448-6453.
912. Gath I., J. Ebert, U. Godtel-Armbrust, R. Ross, A.B. Reske-Kunz, and U. Forstermann, *NO synthase II in mouse skeletal muscle is associated with caveolin 3.* Biochemical Journal, 1999. **340**(3): p. 723-728.

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Prénom, Nom : **Nicolas LEVOIN**

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 10 avril 2002 n° 650

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Claude BURLET

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1

24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex · Tél. 03 83 85 48 00 · Fax 03 83 85 48 48

Adresse électronique : ..... @uhp-nancy.fr

RESUME

Le mode d'action principal des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est l'inhibition des cyclooxygénases (COX), enzymes majeures de la synthèse des prostaglandines. La découverte de deux isoformes de COX n'a permis d'expliquer qu'en partie l'absence de corrélation entre les effets observés *in vitro* et l'effet pharmacologique *in vivo*. Une explication possible à ces divergences est l'implication de métabolites des AINS, tels les dérivés glucuroniques ou les thioesters de coenzyme A formés lors de l'inversion chirale. La réactivité de ces métabolites pour certaines protéines a en effet été mise en évidence récemment. Elle est supposée responsable d'effets indésirables, mais pourrait aussi conduire à des inhibitions enzymatiques impliquées dans l'activité thérapeutique des AINS. Cette étude est donc fondée sur deux hypothèses : celle d'une participation des métabolites conjugués au mode d'action des AINS, et celle de l'existence d'autres cibles protéiques que COX pour ces médicaments ou leurs métabolites.

Nous avons dans un premier temps mis au point une synthèse chimique de l'acyl-CoA des 2 énantiomères du kétoprofène (KPF), ainsi que celle d'un analogue non hydrolysable et non acylant de ce métabolite

A l'aide de modèles cellulaires, nous avons montré que nos métabolites conjugués sont inhibiteurs de la production de prostaglandines. Les IC50 mesurées sont environ 10 fois supérieures à celle de la molécule parent, mais restent compatibles avec une participation des métabolites à l'effet du médicament. En revanche, la nature de l'inhibition les distingue du KPF, puisque le glucuronide est inhibiteur partiellement irréversible, et l'acyl-CoA totalement irréversible de COX-2 et essentiellement réversible de COX-1. L'utilisation d'enzymes purifiées a permis de confirmer une inhibition directe des COX, ainsi que l'irréversibilité de l'inhibition due à l'acyl-CoA. Elle révèle également que cette inhibition s'accompagne d'une formation d'adduits du KPF. Une acylation sélective de COX-2 par rapport à COX-1 a pu être montrée au niveau cellulaire, ce qui suggère que l'irréversibilité de l'inhibition est due à l'acylation. L'action particulièrement intéressante de l'acyl-CoA du médicament suggère qu'elle puisse constituer, pour des dérivés endogènes, une voie de régulation physiologique de l'activité de COX-2. Nous avons donc défini le profil d'expression des enzymes produisant les acyl-CoA endogènes, en réponse à un stimulus inflammatoire et parallèlement à COX-2. L'expression coordonnée de ces enzymes tend à confirmer cette possibilité.

Plusieurs protéines autres que COX-2 constituent des cibles du métabolite, comme nous l'avons constaté par la formation d'adduits. Nous avons cherché à les caractériser en examinant s'il existait un domaine commun, et en utilisant l'albumine comme protéine modèle. Un domaine de fixation des acyl-CoA, conservé chez de nombreuses protéines palmitoylées *in vivo,* a ainsi été mis en évidence. La détection théorique de ce domaine a alors été utilisée comme outil de prédiction de la sensibilité d'une protéine aux acyl-CoA. Parmi les protéines impliquées dans les processus inflammatoires, nous avons ainsi identifié ACS-1, Cav-1, iPLA2 et iNOS comme cibles ; nous avons confirmé leur acylation *in situ*.

Ces études ont donc montré *in vitro* l'importance des métabolites d'AINS dans leur activité pharmacologique, en particulier par fixation irréversible des acyl-coA sur des cibles protéiques. Elles permettent ainsi une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires expliquant les effets anti-inflammatoires, et peuvent apporter des éléments pour la recherche de thérapeutiques articulaires plus efficaces et mieux tolérées.