

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

ANNEE 2000 – THESE N° 97

**IMPLICATION DE L'ACYL-COENZYME A SYNTHETASE 5
DE RAT DANS LA THIOESTERIFICATION INTESTINALE
DES PROFENES**

THESE

**Présentée à l'Université Claude Bernard – Lyon 1
(Médecine- Pharmacie)
et soutenue publiquement le 18 décembre 2000
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire**

par

**Jérôme FRETTON
né le 12 décembre 1975
à TOULON (Var)**



DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur : Professeur J.-F. CHARY

Le 1^{er} sept 2000

DEPARTEMENT	PREX	PRI	PR2	MC	MA ancien statut	Contractuel, associé & IPAC	AERC	Chargés de conseil et d'enseignement
DEPART. SANTÉ PUBLIQUE VETERINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Ch.		Y. RICHARD M. PRAVE C. CHAUVY G. CHANTEGRELET	G. BOURDOISEAU P. DEMONT A. LACHERETZ	A. KODJO D. GREZEL V. GUERIN J. VIALARD L. ZENNER C. VERNOZDY A. GONTRIER		M. ARTOIS PR associé	M P CALLAIT	
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE		E. CHATELAIN J.P. GENEVONS J.P. MAGNOL	T. ROGIER D. FAU C. POURNEL	M.A. BERTHELET S. SAWAYA E. TRONCY T. MARCIAL L. CHABAYNE P. BARTHEZ	D. REMY	WATRELOT-VIRIBUX MC 0,5 PIERON-LEPAGE MC 0,5	C. CAROZZO F. PONCE C. ESCRIOU	M. WITZ I
DEPART DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootechnie, Biologie & Economie rurale Nutrition et Alimentation		M. FRANCK J.P. DESCHANEL J.P. BADRAND P. BEZILLE	M. BACHAIL T. ALOGNINOUIWA	D. GRANCHIER L. ALVES de OLIVEIRA G. EGMON P. GUBBIN R. FRUKHA M.A. ARCAINGIOLI D. LB GRAND		A. DERNBURG MC contractuel N. GIRAUD MC contractuel D. LAURENT MC associé 0,2 P. DEBARNOT MC contract 0,2 G. LESENECAL MC contract 0,2		T. OSSET I
DEPART SCIENCES BIOLOGIQUES Physiologie / Biochimie Biophysique / Biochimie Génétique et Biologie moléculaire Pharmacie / Toxicologie / Législation des Médicaments Bio-Mathématiques	P. DELATOUR G. LORGUE	R. BOVIN F. GARNIER	E. BENOIT F. OBAIN P. JAUSSAUD G. EBCK	J.J. THEBAULT T. BURONFOSSE V. LAMBERT P. BERNY P. SABATIER M.L. DELIGNETTE 80 % K. CHALVET-MONTRAY	J.M. BONNET-GARIN		M. BOCQUET A. FAVIER	
DEPART VÉTÉRINAIRE Pathologie équine Clinique équine Expertise névropathique		O. LEFACE	J.L. CADONÉ C. FLEURY	S. MARTINOT	A. LEBLOND	A. BENAMOU		

A Monsieur le Professeur BAVEREL,

Professeur à l'Université Claude BERNARD de Lyon (Médecine-Pharmacie),

*qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse.
Hommages respectueux.*

A Monsieur le Professeur BENOIT,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

*qui nous a guidé et conseillé dans la réalisation de ce travail,
qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur JAUSSAUD,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

*qui nous fait l'honneur de participer à notre Jury de Thèse.
Sincères remerciements.*

REMERCIEMENTS

à Thierry BURONFOSSE,

pour son indéfectible disponibilité, ses judicieux conseils, sa communicative bonne humeur, son sens des valeurs humaines et sa précieuse aide dans la réalisation de ce travail.

à Laurence OLIVIER-LOISEAU,

pour avoir guidé mes premiers pas en biochimie et mes attermolements, pour tout le précieux temps qu'elle a pu m'accorder.

à Christiane LONGIN-SAUVAGEON,

pour m'avoir fait découvrir les techniques de purification et d'électrophorèse, pour tous ses conseils, et sa grande disponibilité.

à Cendrine SEVOZ,

pour sa gentillesse de chaque instant, sa bonne humeur, son indéfectible aide, pour m'avoir accordé son soutien dans les instants délicats et m'avoir fait bénéficier de son expérience.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel du laboratoire pour sa gentillesse et pour sa bonne humeur communicative.

à mes parents, Jeanne et Robert,

à ma sœur aînée, Sandra,

à toute ma famille,

à Anna

à ses parents, Pierres et Marie-Reine

à mes amis, Virgile et Françoise, Arnald,

aux professeurs dont les figures ont modelé mon histoire en y laissant

des traces comme les pas dans la neige

aux félins dont la douce compagnie m'a été source de réconfort :

Gaïson, Minon, Mickey et Gaïa

*« ... Je suis en marche vers les gens de mon silence
Lentement vers ceux près de qui je peux me taire ;
Je vais venir de loin, entrer et puis m'asseoir,
Je viens chercher ce qu'il faut pour repartir... »*

Louis Braquier

*« ... Quand l'oreille se déconnecte du cerveau, tu entends encore le bruit, mais qui peut se
rappeler ce que ça signifie... »*

Allen Ginsberg

*« ... I have walked you, ancient trails,
Along the narrow rocky ridges
High above the mountains that
Make up your world:
Looking down on giant trees, silent
In the purple shadows of ravines
Above the spire-like alpine fir
Above the high, steep-standing meadows
Where sun-softened snowfields share the earth
With flowers... »*

Gary Snyder

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	3
A. STRUCTURE ET PROPRIETES GENERALES DES PROFENES	3
<i>A.1. Structure et asymétrie moléculaire</i>	3
<i>A.2. Mécanisme et stéréosélectivité de l'action</i>	3
<i>A.3. Propriétés thérapeutiques</i>	7
<i>A.4. Effets secondaires, indésirables et toxiques</i>	9
<i>A.4.α. Effets COX-dépendants majoritaires</i>	10
<i>Effets indésirables sur le tractus digestif</i>	10
<i>Effets rénaux</i>	11
<i>A.4.β. Effets COX-indépendants</i>	12
<i>Toxicité hépatique</i>	12
<i>Toxicité cutanée</i>	13
<i>Effets sur le système nerveux central</i>	13
<i>Effets anaphylactoïdes</i>	13
<i>Effet découplant</i>	13
B. METABOLISME DES PROFENES	14
<i>B.1. Oxydations</i>	14
<i>B.2. Glucuronconjugaison et conséquences toxicologiques</i>	15
<i>B.3. Thioestérification et inversion chirale des profène</i>	17
<i>B.3.α. Palmitoyl-CoA ligase</i>	17

B.3.β. Devenir et effets du thioester	17
<i>Inversion chirale</i>	17
<i>Conjugaison aux acides aminés</i>	18
<i>Conjugaison à la carnitine</i>	19
<i>Inhibition de l'acétyl-coenzyme A carboxylase</i>	19
<i>Formation de triglycérides hybrides</i>	21
<i>Acylation de protéines</i>	21
<i>Inhibition de la COX-2</i>	23
<i>Protéines de liaison aux acyl-coenzyme A</i>	23
B.3.γ. Inversion chirale	23
<i>Données générales et variations. Localisation</i>	23
<i>Mécanisme</i>	25
C. STRUCTURE ET PROPRIETES DES ACS	29
PARTIE EXPERIMENTALE	29
A. MATERIELS	29
<i>A.1. Animaux</i>	29
<i>A.2. Réactifs</i>	30
<i>A.3. Matériels utilisés</i>	30
B. METHODES	32
<i>B.1. Obtention d'un ADNc de l'ACS5 contenant le cadre de lecture</i>	32
<i>B.2. Construction des différents vecteurs d'expression</i>	34
<i>B.3. Production des protéines recombinantes et purification</i>	36
<i>B.4. Activités enzymatiques</i>	38
<i>B.5. Activités des microsomes hépatiques et intestinaux</i>	40
<i>B.6. Synthèse d'anticorps polyclonaux anti-ACS5 C-His</i>	40

C. RESULTATS	40
D. DISCUSSION	44
CONCLUSION	49
BIBLIOGRAPHIE	51
LISTE DES ABREVIATIONS	59
TABLE DES ILLUSTRATIONS	61
Liste des figures	61
Liste des tableaux	61
Liste des photos	62

Les profènes ou acides 2-aryl propioniques appartiennent à la classe thérapeutique la plus utilisée à travers le monde, sous et hors contrôle médical, celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Sur le plan structural, ce sont des composés chiraux. Ils existent sous la forme de deux énantiomères, le R(-) et le S(+). Le R(-)-profène est quasiment inactif au plan thérapeutique, contrairement au S(+).

Les profènes subissent une inversion chirale, phénomène unidirectionnel qui voit la transformation métabolique du profène de configuration R(-) en son antipode optique le S(+). L'inversion chirale souffre de nombreuses variations, qualitatives et quantitatives selon le profène étudié, l'espèce animale et l'état physiopathologique de l'individu considéré.

Le principal organe impliqué dans cette inversion chirale est le foie, cependant l'existence d'une inversion présystémique, extra-hépatique, a été montrée pour le fénoprophène (FPF) et l'ibuprofène (IPF) chez le rat en ce qui concerne l'intestin.

L'inversion chirale se décompose en trois étapes dont la première, limitante et catalysée par la palmitoyl-CoA ligase (E.C.6.2.1.3), correspond à la thioestérification du R(-)-profène par le groupe thiol du coenzyme A (CoA ou CoASH) et aboutit à la formation d'un thioester, le R(-)-profénoyl-CoA.

Des travaux de biologie moléculaire ont permis de décrire cinq isoformes d'acyl-CoA synthétase (ACS), notées ACS1 à ACS5, correspondant à l'activité catalytique palmitoyl-CoA ligase. L'ACS1 est clairement impliquée dans la thioestérification des profènes. L'ACS2, présente dans le cerveau, métabolise faiblement les profènes. L'ACS5 est mise en évidence dans la muqueuse intestinale et le poumon, tissus pour lesquels une inversion chirale extra-hépatique a été décrite.

L'objet de ce travail est de déterminer l'activité de thioestérification et la spécificité de substrat de l'ACS5 afin d'envisager l'implication de cette isoforme dans le phénomène de l'inversion chirale.

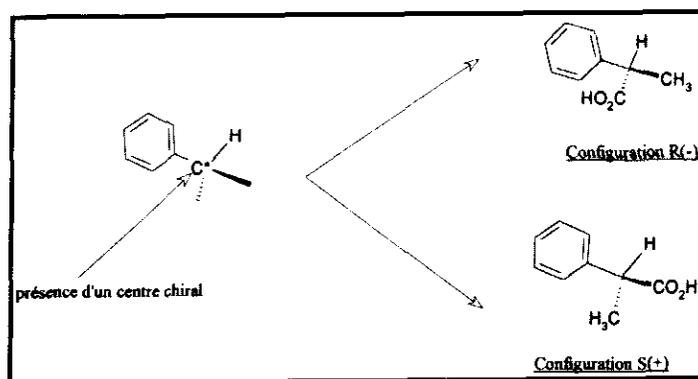


Figure 1. Structure générale des profènes, dérivés de l'acide 2-aryl propionique.

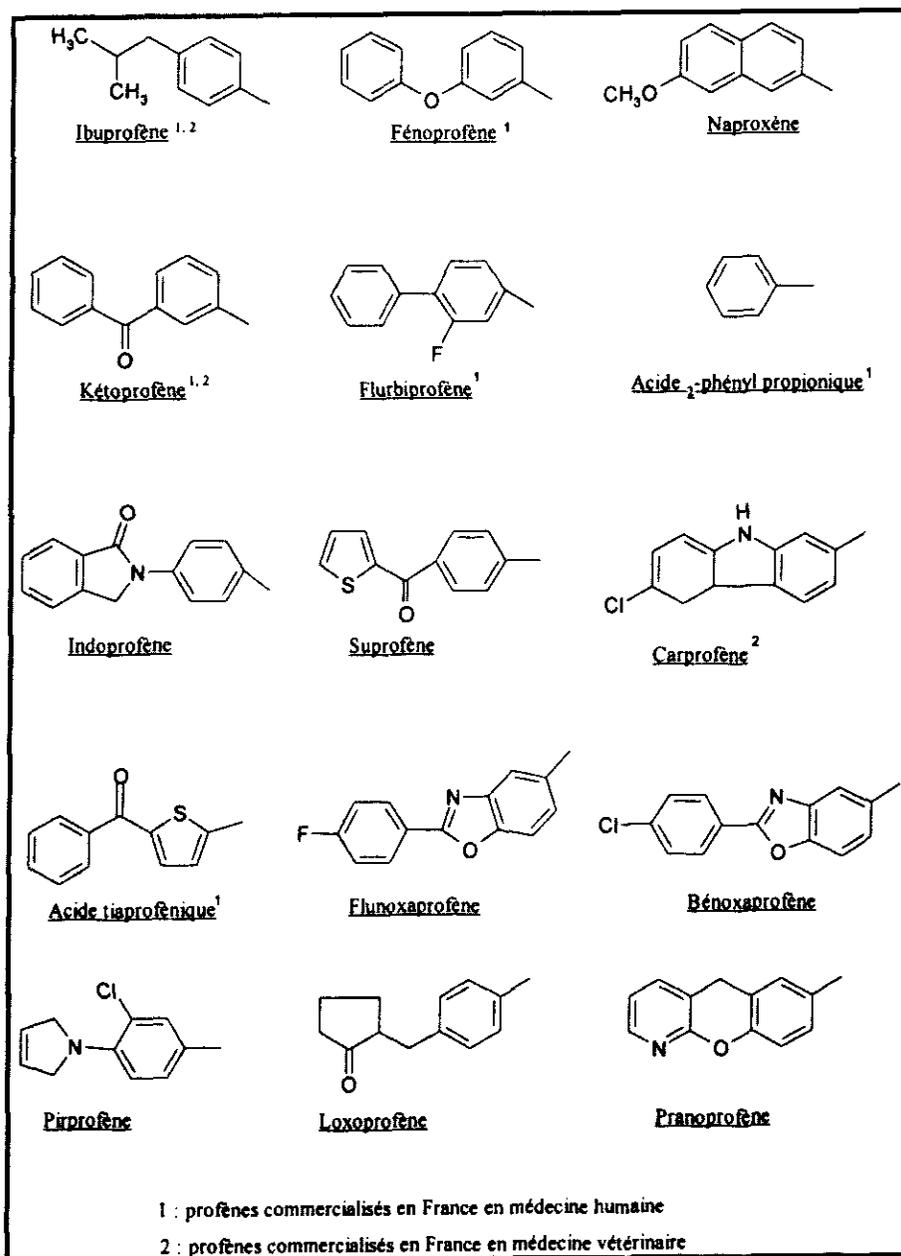


Figure 2. Structure développée de quelques profènes. Ne sont figurés ici que les groupements aryl substituant le carbone asymétrique

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

A. STRUCTURE ET PROPRIETES GENERALES DES PROFENES

A.1. Structure et asymétrie moléculaire

Les acides 2-aryl-propioniques ou profènes appartiennent à la famille thérapeutique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). La propriété remarquable de leur structure réside dans l'existence d'un carbone asymétrique en C2 (figure 1). Il existe donc deux configurations possibles: R(-) et S(+). En raison de leurs propriétés anti-inflammatoire, antiphlogistique, antipyrétique et analgésique, ces composés sont très largement utilisés à travers le monde, sous et hors contrôle médical, ce qui est susceptible d'avoir des conséquences toxicologiques. Malgré la faible incidence des accidents rencontrés avec ces molécules, leur toxicité ne peut être négligée en raison du nombre d'utilisateurs et de la fréquence d'utilisation.

Les profènes commercialisés sont nombreux et selon le groupement aryl substituant le carbone asymétrique, on distingue une douzaine de profènes (figure 2). A l'exception du naproxène, ils sont commercialisés sous forme racémique dans l'Union Européenne.

A.2. Mécanisme et stéréosélectivité de l'action

Les profènes diminuent la synthèse des prostaglandines (PG) par inhibition des cyclooxygénases (COX) (figure 3) [Vane *et al*, 1996; 1997] empêchant la formation des PG, à partir de l'acide arachidonique. Cette inhibition a été montrée dans de nombreux systèmes: préparations microsomales, cellules, tissus, animaux entiers et même l'homme.

Les cyclooxygénases, hémoprotéines membranaires, d'environ 71 kDa, de K_m et de V_{max} similaires en ce qui concerne l'acide arachidonique, existent sous deux isoformes la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est souvent considérée comme une enzyme «domestique», bénéfique car permettant le bon fonctionnement de certains organes, au contraire de la COX-2, induite lors de lésion tissulaire. Cette dernière n'est pratiquement pas

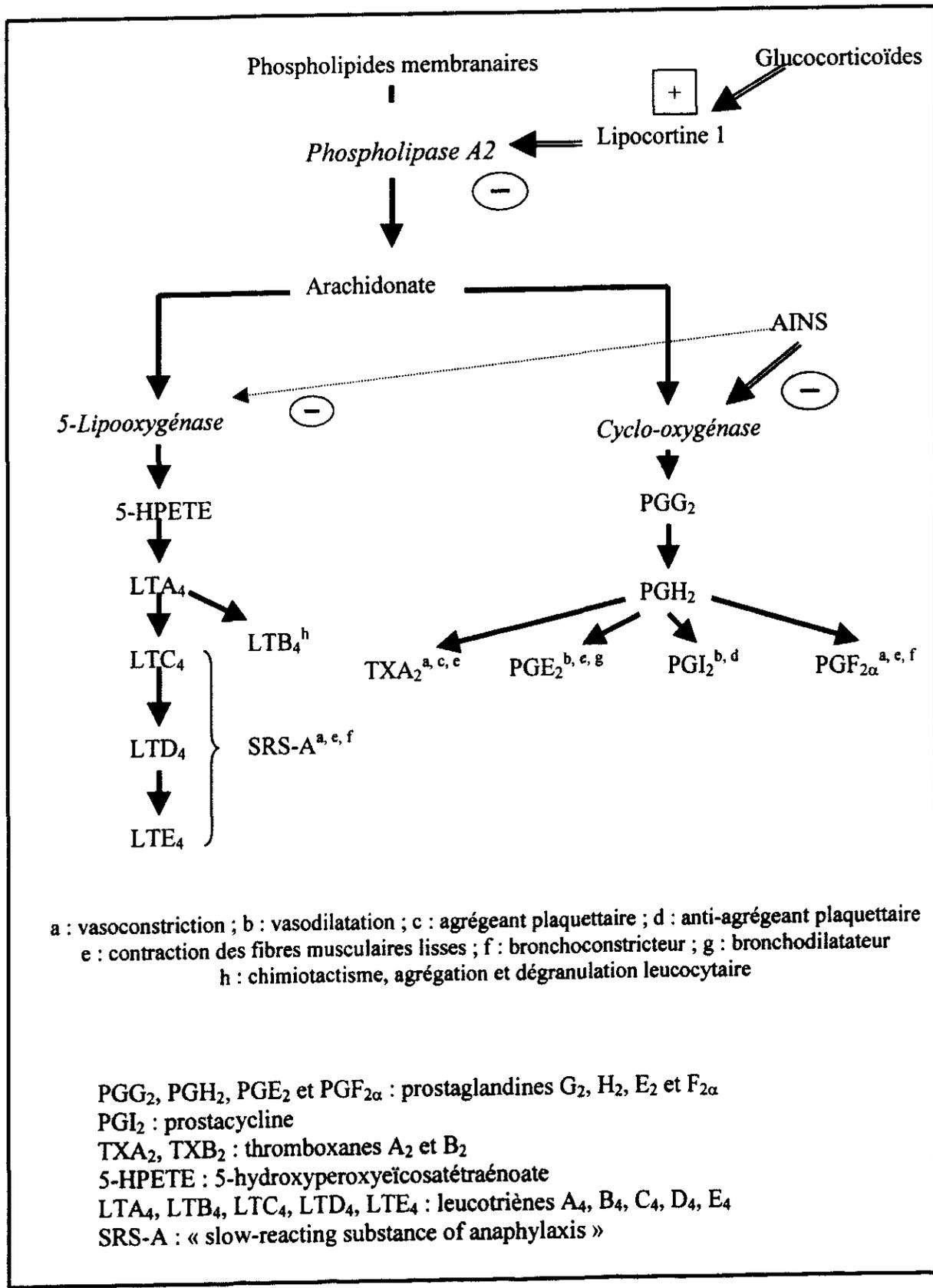


Figure 3. Cascade des eicosanoïdes
(d'après [Vane et al., 1996 ; Vane et al., 1997])

exprimée dans la plupart des cellules saines, mais son niveau d'expression augmente lors de l'inflammation (figure 4) [Vane *et al.*, 1996; Vane *et al.*, 1997].

Les COX, pourvues de deux sites catalytiques, sont des enzymes à double fonction. Le premier site actif prend en charge l'acide arachidonique et le transforme en son endoperoxyde, la PGG₂. Le deuxième site actif, à activité peroxydasique, convertit alors la PGG₂ en un autre endoperoxyde, la PGH₂. La PGH₂ est transformée par des isomérases spécifiques pour donner les PGs, prostacyclines et thromboxanes.

Picot, D. *et al.* [Picot *et al.*, 1994] ont déterminé la structure tridimensionnelle de la COX-1, permettant ainsi une meilleure compréhension du mécanisme d'action des AINS. Chaque dimère de COX-1 comprend trois domaines différents: un domaine EGF-*like*, un motif d'ancrage dans la membrane plasmique, et un domaine enzymatique. Les deux sites actifs, celui à l'activité cyclooxygénasique et celui à l'activité peroxydasique, sont adjacents mais distincts dans l'espace. Trois des hélices de la structure forment un canal d'accès au site actif, et l'insertion de la COX-1 à la membrane permettrait à l'acide arachidonique d'y accéder par l'intérieur de la bicouche. Le site actif COX est enfoui au fond d'un long canal hydrophobe, et Picot, D. *et al.* ont argumenté en faveur du fait que le flurbiprofène (FluPF) inhibe la COX-1 en excluant l'arachidonate de la partie supérieure du canal. L'énantiomère S(+) du FluPF interagit, via son groupement carboxylate, avec l'arginine 120, plaçant ainsi le deuxième cycle phényl à l'intérieur d'une liaison de Van der Waals avec la tyrosine 355. L'aspirine inhibe irréversiblement la COX-1 en acétylant la serine 530, ce qui exclut l'acide arachidonique de l'accès au canal, et à de fortes doses, elle acétyle la serine 516 de la COX-2. La COX-2, une fois acétylée, peut encore dégrader l'acide arachidonique en 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoate (5-HPETE), produit intermédiaire de la synthèse des leucotriènes (LT), faisant montre alors d'une activité lipooxygénase. D'autres sous-types de liaison des xénobiotiques à des acides aminés de l'étroit canal d'accès au site actif COX pourraient expliquer l'interaction d'AINS comme l'ibuprofène.

Le mécanisme d'action des profènes suggère qu'ils n'ont pas d'action inhibitrice sur les métabolites déjà formés de l'acide arachidonique, ce qui est vérifié dans la pratique.

Des études ont montré que les deux inverses optiques n'ont pas les mêmes propriétés inhibitrices de l'activité COX *in vitro*. Le profène de configuration S(+) s'est révélé être

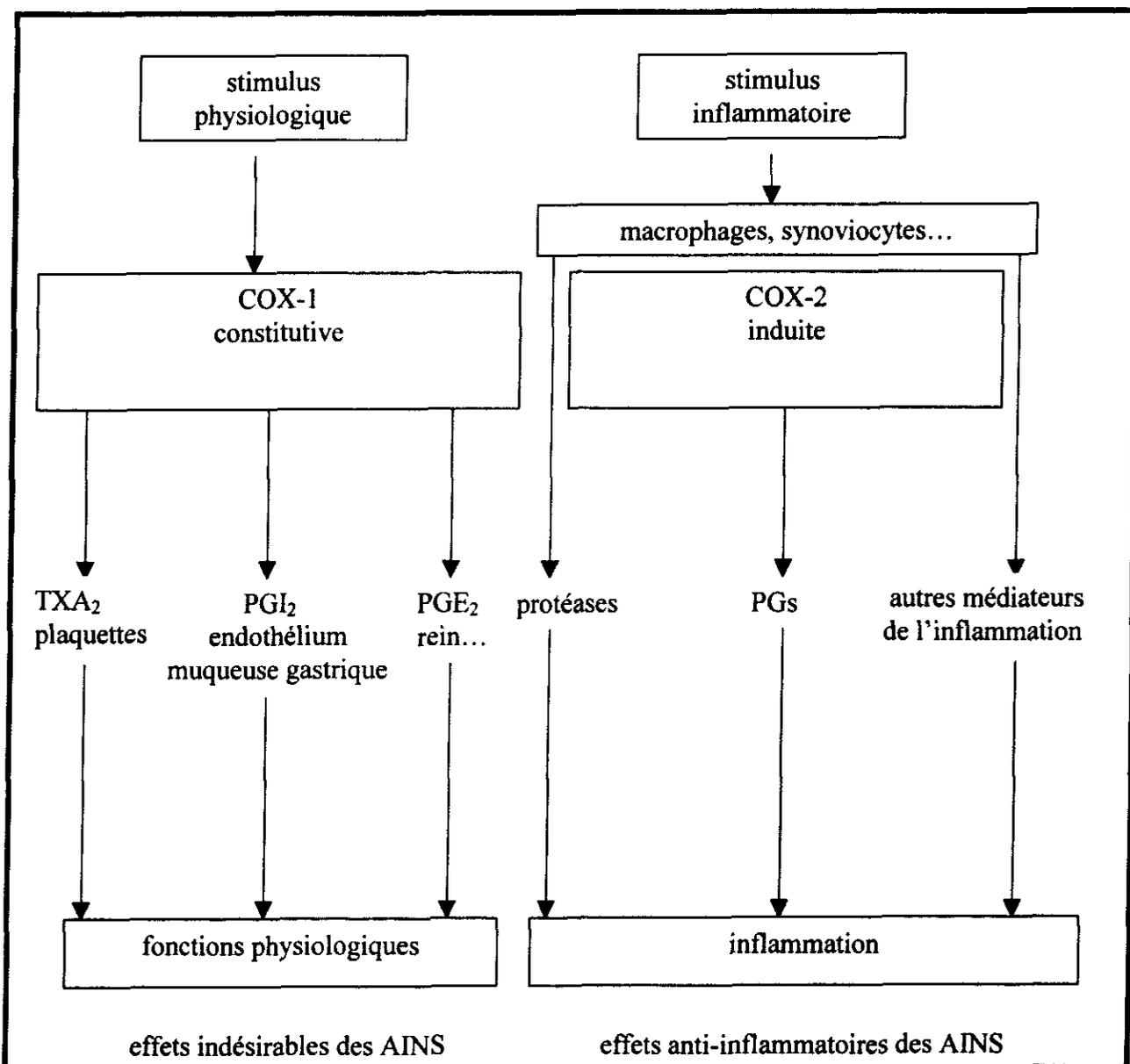


Figure 4. Rôles biologiques respectifs des deux isoformes de la cyclo-oxygénase (d'après [Vane *et al.*, 1997])

		rapports eudismiques	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
carprofène	mouton	>23	15
fénoprofène	homme	35	1
flurbiprofène	cobaye	878	8
ibuprofène	bovin	160	1.3
indoprofène		100	25
naproxène	bovin	70	21

Tableau 1 : Stéréosélectivité d'action des profènes (D'après [Caldwell *et al.*, 1988])

beaucoup plus inhibiteur que le même profène de configuration R(-). La différence d'activité entre les deux énantiomères est montrée par l'étude du rapport eudismique (tableau 1) [Caldwell *et al*, 1988], qui est le rapport de l'activité inhibitrice de l'énantiomère S(+) de l'activité COX sur celle de l'énantiomère R(-). Ce phénomène n'est pas toujours mis en évidence *in vivo*. La différence entre les résultats *in vivo* et ceux obtenus *in vitro* peut être expliquée par l'inversion chirale, très importante pour le FPF et l'IPF et quasi inexistante pour le carprofène (cf. *infra*).

Des études sur les propriétés antalgiques des profènes ont mis en évidence un mécanisme énantiosélectif. Ainsi, Brune *et al* [Brune *et al*, 1991] ont montré, à propos du FluPF, des différences quantitatives et qualitatives dans le mécanisme d'action des deux énantiomères: le rapport eudismique est de 500 en faveur du S(+) en ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire; pour ce qui est de l'activité antalgique, le R(-) reste efficace même à faible concentration (mais il n'a aucun effet anti-inflammatoire). L'incorporation énantiosélective du R(-) dans les phospholipides membranaires modifierait, chez le rat, la production du second messenger, le diacylglycérol. Celui-ci, libéré par l'action d'une phospholipase C, est activateur d'une protéine kinase indépendante de l'AMPc [Brune *et al*, 1991]. Cette kinase, en provoquant l'ouverture des canaux à calcium, déclencherait la transmission nociceptive. L'énantiomère R(-), le seul thioestérifié, serait incorporé sous forme de lipides hybrides dans les membranes cellulaires.

A.3. Propriétés thérapeutiques

L'inflammation est la réponse physiologique des tissus vivants à une agression. Suite à une atteinte tissulaire, la membrane cellulaire est altérée et les phospholipides qui la composent sont dégradés par la phospholipase A2 pour libérer de l'acide arachidonique. Sa dégradation par deux systèmes enzymatiques distincts donne la cascade des eïcosanoïdes (figure 3) [Vane *et al*, 1996; Vane *et al*, 1997], aboutissant à la formation des PG et des LT. L'un de ces systèmes utilise des cyclooxygénases pour mener à la synthèse des PG (PGD₂, PGE₂, PGF₂), des prostacyclines (PGI₂) et des thromboxanes (TXA₂ et TXB₂); l'autre système utilise une lipooxygénase pour la synthèse des LT (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄).

Les prostanoïdes, PGE₂ et PGI₂, puissants relaxants du muscle lisse vasculaire et agents hyperalgésiques, sont partiellement responsables de la vasodilatation artériolaire (rougeur) du stade précoce de l'inflammation aiguë. La vasodilatation augmente le flux sanguin vers le tissu enflammé, ce qui accroît l'œdème causé par les agents responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire que sont l'histamine et les bradykinines. C'est pourquoi l'effet majeur des AINS est la réduction de l'œdème inflammatoire [Gogny *et al*, 1992]. C'est ainsi, qu'à la différence des AIS (anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes), ils n'ont aucun effet sur l'infiltration par les cellules sanguines mononucléées et la libération ultérieure massive de médiateurs. Le chimiotactisme est la conséquence d'un gradient de LT. La synthèse de ces derniers n'est inhibée que par les AIS ou par certains inhibiteurs spécifiques. Il est facile de concevoir que les AINS exercent une action anti-inflammatoire notable et précoce, dose-dépendante et qu'ils permettent une restauration fonctionnelle immédiate. Lors d'inflammation chronique, leur effet modéré nécessiterait une administration longue à des doses élevées, potentiellement toxique.

Les AINS sont aussi capables de combattre et de soulager certaines douleurs faibles à modérées. Leur mécanisme d'action périphérique est le même que précédemment. Les douleurs d'origine inflammatoire sont les mieux contrôlées, les médiateurs étant alors libérés en masse, même si les PG semblent intervenir dans d'autres types de foyers douloureux non-inflammatoires [Gogny *et al*, 1992]. La PGE₂ agit en synergie avec d'autres médiateurs pour provoquer la douleur d'origine inflammatoire. Les prostanoïdes ont la capacité d'abaisser le seuil d'excitation des nocicepteurs des fibres C, les rendant plus sensibles aux stimuli mécaniques et chimiques soit directement, soit via d'autres médiateurs (bradykinines) [Gogny *et al*, 1992].

Différents agents pyrogènes exogènes (agents pathogènes, corps étrangers, cellules cancéreuses) sont susceptibles de provoquer la libération de substances pyrogènes endogènes, libération de cytokines: interleukines (IL1- α , IL1- β et IL-6, les plus actives); le TNF- α (*tumor necrosis factor*) et l'IFN- γ (interféron) potentialisent l'action des IL. Ces substances pyrogènes endogènes peuvent induire au niveau de la région préoptique de l'hypothalamus, siège de la thermorégulation, la synthèse des PGE₁ et PGE₂, et parallèlement, de corticolibérine (CRH). Ces PG seraient impliquées dans le dérèglement de l'activité de base des neurones «thermo-indépendants» dont la fréquence de dépolarisation stable et indépendante de la température centrale, est à l'origine de la température de référence de

l'espèce. Le «thermostat» central, dérégulé, stimule les voies végétatives de thermogénèse et diminue la thermolyse. L'action des profènes sur la synthèse des PGE₁ et PGE₂ pourrait être partiellement complétée par un accroissement de la thermolyse cutanée due à une vasodilatation périphérique [Gogny *et al*, 1992].

A.4. Effets secondaires, indésirables et toxiques

L'ensemble des phénomènes toxiques majeurs dus à l'usage des AINS tient dans l'acronyme «SAAB rule» [Jeske, 1999]: «stomach problem», «aspirin allergy» et «bleeding problems», auxquels s'ajoutent des problèmes lors de la grossesse, de maladies rénales ou hépatiques.

Les effets pharmacologiques et toxicologiques des AINS sont à mettre en relation, principalement, avec leur propriété d'inhiber les cyclooxygénases. Le déséquilibre physiologique causé par l'absence de certaines prostaglandines conduit à des effets indésirables importants [Vane *et al*, 1996; 1997]. Ils portent essentiellement sur le tractus digestif: l'estomac et le duodénum [Bannwarth, 2000; Davies *et al*, 2000; Jeske, 1999; Keck, 1992; Mc Carthy, 1999; Soll *et al*, 1999] (ulcères, perforations et hémorragies), le gros intestin et l'intestin grêle [Puspok *et al*, 2000] (colite ischémique). Mais ils concernent aussi les reins [Murray *et al*, 1997], cependant, chez un individu en bon état de santé, les AINS n'ont que peu d'effets. Cette toxicité, dose-dépendante et majoritairement COX-dépendante, pourrait être qualifiée de directe.

En marge de cette toxicité, il existe une toxicité indirecte, conséquence de phénomènes immunoallergiques. Ces derniers auraient comme origine une sensibilité individuelle, à l'heure actuelle plus ou moins imprévisible des patients, plutôt qu'une action toxique directe du médicament. Cette toxicité, COX-indépendante, touche essentiellement le tissu cutané (phénomènes phototoxiques et photoallergiques) [Bagheri *et al*, 2000] et le foie (lésions hépatocellulaires, cholestatiques ou mixtes, nécrose hépatique massive) [Zimmerman *et al*, 1990].

A.4.α. Effets COX-dépendants majoritaires

Effets indésirables sur le tractus digestif

Le surcoût de la prévention et du traitement des lésions de la partie haute du tube digestif induite par une thérapie à base d'AINS est estimé à, au moins, 40% du coût global de celle-ci. Les effets des AINS concernent l'œsophage, l'estomac et le duodénum. Ils vont de la simple dyspepsie aux complications sérieuses des ulcères: hémorragies et perforations, qui mettent en jeu le pronostic vital de l'individu [Soll *et al*, 1999].

Les lésions du tractus digestif associées à une telle thérapie, principalement observées dans l'estomac, sont regroupées sous le vocable «gastropathie due aux AINS». Cependant, ce groupe est très hétérogène tant dans l'étiologie que dans le traitement: complications d'ulcères peptiques préexistants, érosions et ulcères induits par la thérapie elle-même, et autres lésions provoquant des hémorragies dues à un dysfonctionnement plaquettaire induit par les AINS.

Récemment un ensemble de lésions intéressant le colon a été décrit par Puspok *et al*. [Puspok *et al*, 2000]. Au cours de leur étude sur les lésions induites par un traitement AINS sur le gros intestin et l'intestin grêle, ils ont diagnostiqué une colite ischémique due aux AINS, caractérisée sur le plan clinique par de la diarrhée, de l'anémie et des douleurs abdominales diffuses.

La pathogénie de ce phénomène toxique des AINS sur la muqueuse gastroduodénale semble impliquer des mécanismes topiques et systémiques [Bannwart, 2000]. Le premier est en relation avec la nature acide de la plupart des AINS, qui favorise l'accumulation de molécules ionisées («piègeage» ionique) au sein même des cellules de la muqueuse. Les lésions muqueuses topiques peuvent aussi résulter de l'excrétion de métabolites actifs. L'effet systémique et prédominant est du à l'inhibition des COX et par voie de conséquence, à la diminution des PG responsables de la protection de la muqueuse gastrique. En effet, les prostanoides synthétisés par celle-ci ont des propriétés cytoprotectrices [Vane *et al*, 1997]: ils diminuent la sécrétion acide gastrique et en stimulant la production de mucus et de bicarbonates, agissent comme agents protecteurs gastrique contre les agressions mécaniques et chimiques. Le mucus constitue un film alcalin qui tapisse la muqueuse et neutralise l'excès acide. Les prostanoides favorisent aussi l'irrigation de la muqueuse *via* leur action

vasodilatatrice puissante. L'inhibition de la synthèse des prostanoïdes par les AINS est susceptible d'induire une ischémie au sein de la muqueuse et une augmentation de la sécrétion acide, ce qui favorise la venue de lésions nécrotiques et d'ulcères. Ces effets indésirables sont doses-dépendants, et admettent comme facteur prédisposant l'âge du sujet.

Le nombre d'effets indésirables affectant le tractus digestif enregistrés au Royaume-Uni et rapportés en million de prescriptions durant les cinq premières années de commercialisation de différents AINS montre une toxicité modérée des acides 2-aryl propioniques en comparaison des autres AINS [Singh *et al.*, 1994]. Le moins toxique à cet égard serait l'ibuprofène; le FPF, le naproxène et le KPF seraient, parmi les profènes, les composés les plus toxiques à l'égard du tube digestif (environ 5 à 6 fois plus de cas, soit une trentaine par million de prescriptions).

Effets rénaux

Les prostanoïdes sont de puissants vasodilatateurs locaux, qui régulent, au niveau rénal, le débit sanguin artériolaire glomérulaire, la réabsorption active de sodium, la réabsorption d'eau et la libération de rénine. Leur synthèse semble relever plutôt de l'activité COX-1, sauf pour le contrôle de la sécrétion de rénine. Ils sont synthétisés dans la zone corticale au niveau des artéioles afférentes et dans la zone médullaire, au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé et les tubes collecteurs [Bennett *et al.*, 1996].

Chez un individu en bon état de santé, les AINS n'ont que peu d'effets sur le rein du fait de la production faible de prostaglandines rénales. Par contre, en situation d'hypovolémie réelle ou fictive (rencontrée lors d'insuffisance cardiaque, de cirrhose, d'insuffisance rénale ou d'hémorragie...), il y a libération massive de vasoconstricteurs (ATII, noradrénaline, ADH) dans le but de maintenir la pression artérielle dans des valeurs compatibles avec la vie. Une augmentation de la synthèse des prostanoïdes rénaux, va essayer de s'opposer aux vasoconstricteurs, dans le but de préserver l'hémodynamique glomérulaire. Il est dès lors facile de concevoir que l'inhibition d'un contrôle va accroître l'action de l'autre, dans le cadre de deux contrôles opposés. Murray *et al.* [Murray *et al.*, 1997] proposent que la prise d'AINS, suffisamment prolongée et importante, lors de telles situations pathologiques, intensifie la

vasoconstriction rénale, jusqu'à induire une insuffisance rénale aiguë, voire une nécrose tubulaire. D'autres auteurs proposent des effets nocifs par perturbations de l'équilibre hydro-électrolytique (hyponatrémie et hyperkaliémie).

A.4.β. Effets COX-indépendants

Toxicité hépatique

Selon une étude menée par Manoukian [Manoukian *et al.*, 1996] dans le Michigan et la Floride, entre 1980 et 1987, sur l'incidence des atteintes hépatiques par million de prescription, le FPF, le KPF et le FluPF semblent n'induire que peu ou pas d'effets toxiques hépatiques. L'incidence de ces atteintes est pour l'IPF de 1/40^{ème} et pour le naproxène de 1/20^{ème} de celle du sulindac (l'un des AINS le plus hépatotoxique). Il est à noter que l'hépatotoxicité importante du bénomaxprofène, du piroprofène, de l'ibufénac et du suprofène leur a valu d'être retirés du marché.

Ces atteintes hépatiques sont probablement dues à une idiosyncrasie plutôt qu'à une toxicité directe. Elles sont plus ou moins sévères et se traduisent cliniquement, du cas le plus bénin au cas plus grave, par une simple élévation transitoire des transaminases jusqu'à une nécrose massive du foie entraînant le décès du sujet [Zimmerman *et al.*, 1990].

Les lésions, le plus souvent hépatocellulaires (carprofène, FPF, IPF et piroprofène), peuvent être cholestatiques (bénomaxprofène, naproxène) ou mixtes (sulindac). L'atteinte hépatique est plus fréquente chez les personnes âgées que chez les autres classes d'âge.

La fixation covalente des profènes, sous forme de dérivés (conjugués ou thioesters), à des protéines plasmatiques et/ou tissulaires pourrait expliquer ces manifestations. La formation d'adduits peut avoir deux types de conséquences : l'une, directe, «métabolique», est la perte fonctionnelle de cette macromolécule et l'altération de la fonction cellulaire dont elle est responsable; l'autre, indirecte parce que nécessitant l'entremise du système immunitaire, serait à l'origine de l'induction d'une réponse immunitaire «aberrante» à l'encontre des éléments «étrangers» au soi que constituent les adduits [Rieder, 1993].

Toxicité cutanée

L'administration topique des AINS, largement répandue dans le cadre des douleurs aiguës modérées et chroniques, est l'une des quelques stratégies utilisée pour améliorer la tolérance rénale et gastrique, principalement. Cependant certains AINS en administration topique sont susceptibles d'induire des phénomènes de photosensibilité. Celle-ci comprend à la fois des phénomènes phototoxiques et des phénomènes photoallergiques. La toxicité cutanée, observée pour le KPF [Bagheri *et al.*, 2000], l'IPF [Halpern *et al.*, 1993] et le carprofène [Merot *et al.*, 1983] repose, le plus souvent, sur un mécanisme moléculaire qui reste à démontrer. Le KPF est impliqué dans des phénomènes phototoxiques et photoallergiques. Les mécanismes moléculaires sous-jacents font l'objet d'une revue récente [Bagheri *et al.*, 2000].

Effets sur le système nerveux central

Ceux-ci vont des bourdonnement d'oreilles, pertes d'audition ou céphalées, réactions transitoires relativement bénignes, jusqu'à des manifestations toxiques graves, méningite aseptique ou dysfonctionnement cognitifs [Halpern *et al.*, 1993].

Effets anaphylactoïdes

Les acides 2-aryl propioniques ont la possibilité d'induire des réactions anaphylactoïdes: en inhibant la synthèse des PG, ils augmentent la quantité d'acide arachidonique disponible pour la voie de la lipooxygénase et peuvent, par là-même, favoriser indirectement la synthèse des «slow-reacting substances of anaphylaxis» (SRS-A) responsables de réactions pseudo-allergiques.

Effet découplant

Dans les mitochondries, les profènes peuvent agir comme agents découplant des phosphorylations oxydatives. La respiration cellulaire n'est alors plus contrôlée, car la concentration d'ADP ou de phosphate inorganique ne limite plus la phosphorylation. Cette observation a été faite chez le rat *in vitro* pour l'IPF et le FluPF [Browne *et al.*, 1999] et le FPF [Masubuchi *et al.*, 1998].

B. METABOLISME DES PROFENES

Les profènes sont des acides faibles relativement liposolubles dont la constante d'ionisation (pKa) est comprise entre 3,5 et 5. Leur absorption est rapide et complète, quelque soit la voie d'administration choisie et leur métabolisme intense. Moins de 5% de l'IBP, du FPF, du FluPF et moins de 10% du KPF sont retrouvés dans les urines sous forme inchangée. Leur élimination fécale est très faible chez l'homme (inférieure à 5%). Des études pharmacocinétiques ont permis de distinguer trois grandes voies d'élimination et une particularité commune: l'énantiosélectivité.

B.1. Oxydations

L'oxydation est la voie métabolique majoritaire pour l'IPF chez l'homme. Elle conduit à la formation de deux métabolites majeurs, l'hydroxy- et le carboxy-IPF [Nicoll-Griffith *et al.*, 1988], qui peuvent être secondairement glucuroconjugués. Chez l'homme l'hydroxy-IPF est majoritairement de configuration S(+), quel que soit l'énantiomère initialement administré. L'étude de l'énantiosélectivité du carboxy-IPF est compliquée par l'apparition d'un deuxième centre chiral. Cependant, il semblerait que 85% du carboxy-IPF formé provienne du S(+)-IPF [Rudy *et al.*, 1991; Evans, 1992].

Le FPF peut également être oxydé en 4'-hydroxy-FPF, ultérieurement conjugué [Rubin *et al.*, 1972a; 1972b].

L'oxydation du FluPF aboutit à la formation de trois métabolites, le 4'-hydroxy-, le 3',4'-dihydroxy- et le 3'-hydroxy-4'-méthoxy-FluPF. Dans ce cas, la réaction d'oxydation concerne surtout la configuration R(+)[Knadler *et al.*, 1992].

Les réactions d'oxydation des profènes sont catalysées par les monooxygénases à cytochrome P 450 (CYP) [Sanins *et al.*, 1990; Boelsterli *et al.*, 1995]. Hamman *et al.* [Hamman *et al.*, 1997] ont identifiés deux CYP responsables de l'oxydation de l'IPF: le CYP 2C9, seul responsable de la 3'-hydroxylation, et le CYP 2C8, responsables tous deux de la 2-hydroxylation.

B.2. Glucuroconjugaison et conséquences toxicologiques

Bien que d'autres conjugaisons aient été décrites pour les profènes (une sulfoconjugaison des hydroxyl-PPF et -FluPF chez l'homme), la glucuroconjugaison est la voie majeure du métabolisme des profènes (sauf pour l'IPF). Ainsi 60% du naproxène, du FPF, du KPF et du FluPF contre seulement 14% de l'IPF sont trouvés sous forme de glucuroconjugués dans les urines [Verbeek *et al.*, 1983]. Les métabolites ainsi formés sont éliminés par voie biliaire et urinaire, en proportion variable selon le composé administré.

De façon générale, la glucuroconjugaison correspond à l'ajout d'une molécule d'acide α -D-glucuronique de l'acide urine 5'-diphosphoglucuronique (UDPGA) à une molécule réceptrice par un mécanisme de type substitution nucléophile concertée (SN2) [Mulder *et al.*, 1990]. En ce qui concerne les profènes, le centre nucléophile est représenté par le groupement carboxyle. Le produit de cette réaction est un ester-glucuronide (*O*-glucuronide). La réaction voit la transformation du C1 de l'acide α -D-glucuronique, en un glucuronide configuration β . La glucuroconjugaison des profènes aboutit donc à la formation de 1-*O*-acyl- β -D-glucuronides, plus simplement appelés acyl-glucuronides. Cette réaction est catalysée par des UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT, E.C.2.4.1.17), de la super-famille multigénique des UDP-glycosyltransférases (UGT).

Il est difficile d'apprécier l'énantiosélectivité de la glucuroconjugaison des profènes *in vivo*, du fait de l'existence d'autres processus énantiosélectifs: fixation aux protéines, hydrolyse des glucuronides, cycle entéro-hépatique, inversion chirale. Les études conduites *in vitro* permettent d'éviter, dans une certaine mesure, ces interférences et ont montré que le caractère énantiosélectif de la glucuroconjugaison des profènes dépend du composé et de l'espèce animale. Ainsi, chez le lapin, le singe et l'homme la glucuroconjugaison concerne préférentiellement l'IPF de configuration S(+), alors que chez le rat elle concerne les énantiomères R(-) des profènes, à l'exception du naproxène.

Les profènes et leurs métabolites peuvent être éliminés dans l'urine (chez l'homme) ou dans la bile (chez le rat). Les glucuroconjugués éliminés par voie biliaire sont susceptibles de subir un cycle entérohépatique particulièrement important avec hydrolyse du conjugué par les β -glucuronidases bactériennes de la flore intestinale et réabsorption *in situ* du composé initial.

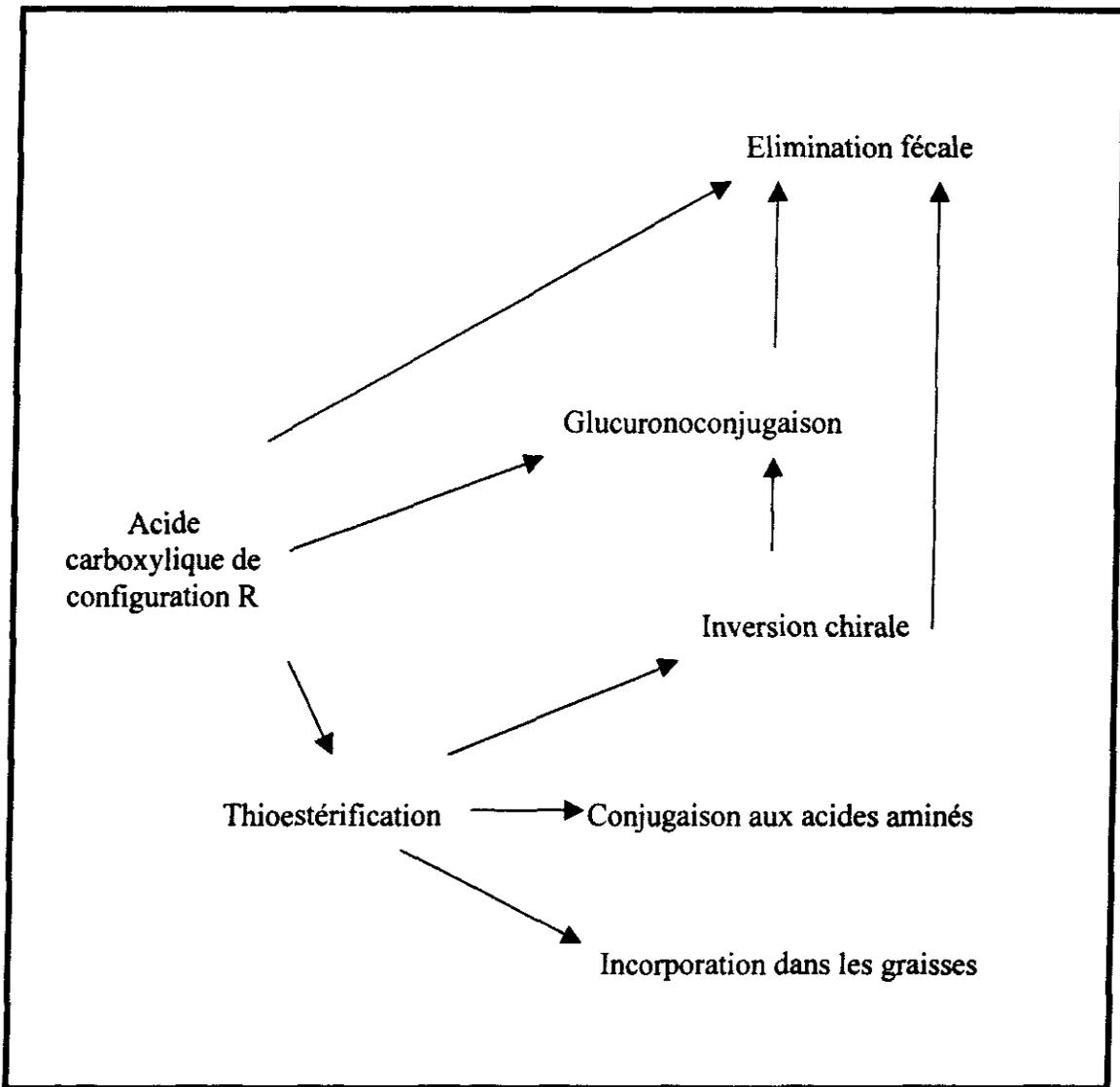


Figure 5. Voies métaboliques des molécules à fonction aryl-carboxylique

Par ailleurs, le bénomaxprofène est susceptible de subir une hydrolyse plasmatique après conjugaison. Ce «cycle futile» libère le composé actif de départ

Les acyl-glucuronides, esters instables et réactifs peuvent également subir des réarrangements intramoléculaires par transacylation interne (acyl-migration) et/ou permettre la formation d'adduits aux protéines. En effet, leur caractère électrophile les rend sensible aux réactions de substitution par des sites nucléophiles des macromolécules.

Deux mécanismes ont été envisagés pour expliquer la formation des adduits aux protéines: par substitution (déplacement nucléophile) [Van Breemen *et al.*, 1985], ou par l'intermédiaire d'une imine [Smith *et al.*, 1986].

Les glucuronoconjugués du KPF sont capables de former des adduits avec l'albumine plasmatique [Presle *et al.*, 1996] et aussi les UDP-GT [Terrier *et al.*, 1999]. Ces adduits permettraient de rendre compte d'un certain nombre de réactions toxiques anaphylactiques observées après administration de certains profènes. Des cibles protéiques cellulaires ont également été observées pour différents profènes [Smith *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1996].

B.3. Thioestérification et inversion chirale des profènes

C'est la voie métabolique caractéristique des profènes, en raison de l'existence d'un centre chiral au sein de leur structure. Elle correspond à la transformation unidirectionnelle de l'énantiomère R(-) en son inverse optique S(+).

B.3.α. Palmitoyl-CoA ligase

Des fractions hépatiques microsomales isolées sont capables de réaliser la thioestérification de l'acide palmitique et de certains profènes [Berry *et al.*, 1991; Brugger *et al.*, 1996; Knadler *et al.*, 1990; Knights *et al.*, 1988].

B.3.β. Devenir et effets du thioester (figure 5)

Inversion chirale

Ce phénomène particulier fera l'objet du paragraphe γ.

Conjugaison aux acides aminés

La conjugaison des xénobiotiques possédant une fonction acide carboxylique permet l'élimination de ces derniers. Dans le cas des profènes, cette conjugaison, limitée, est une voie mineure d'élimination. Mais les profènes activés sous forme de thioesters sont susceptibles de subir une conjugaison avec les acides aminés, grâce à la catalyse des *N*-amino acyltransférases mitochondriales. Sans que l'on puisse exclure le rôle de l'ACS dans cette conjugaison, d'autres protéines semblent être indispensables, au premier rang desquelles la carnitine-palmitoyl transférase et la carnitine-acylcarnitine translocase, toutes deux nécessaires au translocation du thioester du compartiment cytosolique à la matrice mitochondriale.

La réaction de conjugaison correspond à formation d'une liaison amide entre le groupement carboxylique du xénobiotique et la fonction amine de l'acide α aminés ou de son dérivé, représenté principalement par la glycine, la taurine ou la glutamine [Tanaka *et al.*, 1992]. Elle peut être formulée de la façon suivante :



Les *N*-amino-acyltransférases sont des enzymes solubles dont l'activité est essentiellement localisée dans le rein et le foie. L'activité rénale semble plus importante que l'activité hépatique [Caldwell, 1982]. Ainsi Shirley *et al.* [Shirley *et al.*, 1994], ont caractérisé chez l'homme, après administration orale d'IPF racémique, un nouveau métabolite urinaire conjugué à la taurine. Cette voie semble très minoritaire, puisque à peine 2% de la dose administrée est retrouvée sous cette forme 24 heures après administration. Le conjugué est majoritairement de configuration S(+). Les auteurs proposent une stéréosélectivité soit de formation, soit d'excrétion. La conjugaison de l'ibuprofénoyl-CoA à la taurine est également observée *in vitro* avec des fractions mitochondriales hépatiques, ainsi qu'avec des hépatocytes de rat. Shirley *et al.* [1994] supposent aussi l'existence d'une conjugaison avec la glycine bien qu'aucun métabolite de cette forme ne soit détecté dans les urines.

L'acide 2-phénylpropionique peut aussi se conjuguer à la glycine [Tanaka *et al.* 1992]. Chez le chien, 24 heures après administration orale de l'acide 2-phénylpropionique racémique, de l'énantiomère R(-) et de l'énantiomère S(+), 20.6%, 21.4% et 23.1% respectivement de la dose administrée sont retrouvées dans les urines conjuguées à la glycine. Le conjugué est exclusivement de configuration S(+). Cette stéréosélectivité de conjugaison s'observe également avec les hépatocytes. Seul le S(+)-2-phénylpropionyl-CoA est substrat de la *N*-glycine-acyltransférase. Si la conjugaison observée après administration de l'énantiomère R(-) peut s'expliquer par l'inversion chirale, celle observée après administration de l'énantiomère S(+) ne peut s'expliquer que par l'existence d'une thioestérification de cet énantiomère. Les auteurs concluent à l'existence d'une inversion chirale et à la thioestérification de l'acide S(+)-2-phénylpropionique chez le chien [Tanaka *et al.* 1992]

Conjugaison à la carnitine

Certains profènes (pirprofène, IPF, FluPF) sont connus pour inhiber la β -oxydation mitochondriale des acides gras, provoquant de ce fait, l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, et permettant la mise en évidence d'une stéatose microvésiculaire chez la souris [Browne *et al.* 1999; Freneaux *et al.* 1990; Zhao *et al.* 1992].

Deux mécanismes d'inhibition semblent possibles : l'un, CoA-dépendant, est stéréosélectif de l'énantiomère R(-); l'autre, CoA indépendant et non stéréosélectif, serait la conséquence d'un découplage des phosphorylation oxydatives [Zhao *et al.* 1992]. Le premier mécanisme retiendra notre attention ici. Il peut être désigné comme une compétition pour le pool de CoA libre entre les acyl-carnitine d'acides gras et les profényl-carnitine.

Les thioesters de CoA des profènes exercent d'autres actions au sein du compartiment mitochondrial, en perturbant notamment le métabolisme des acides gras.

Inhibition de l'acétyl-coenzyme A carboxylase

La biosynthèse des acides gras est assurée par une voie métabolique spécifique, cytosolique, qui permet la synthèse totale du palmitate à partir de l'acétyl-CoA. La

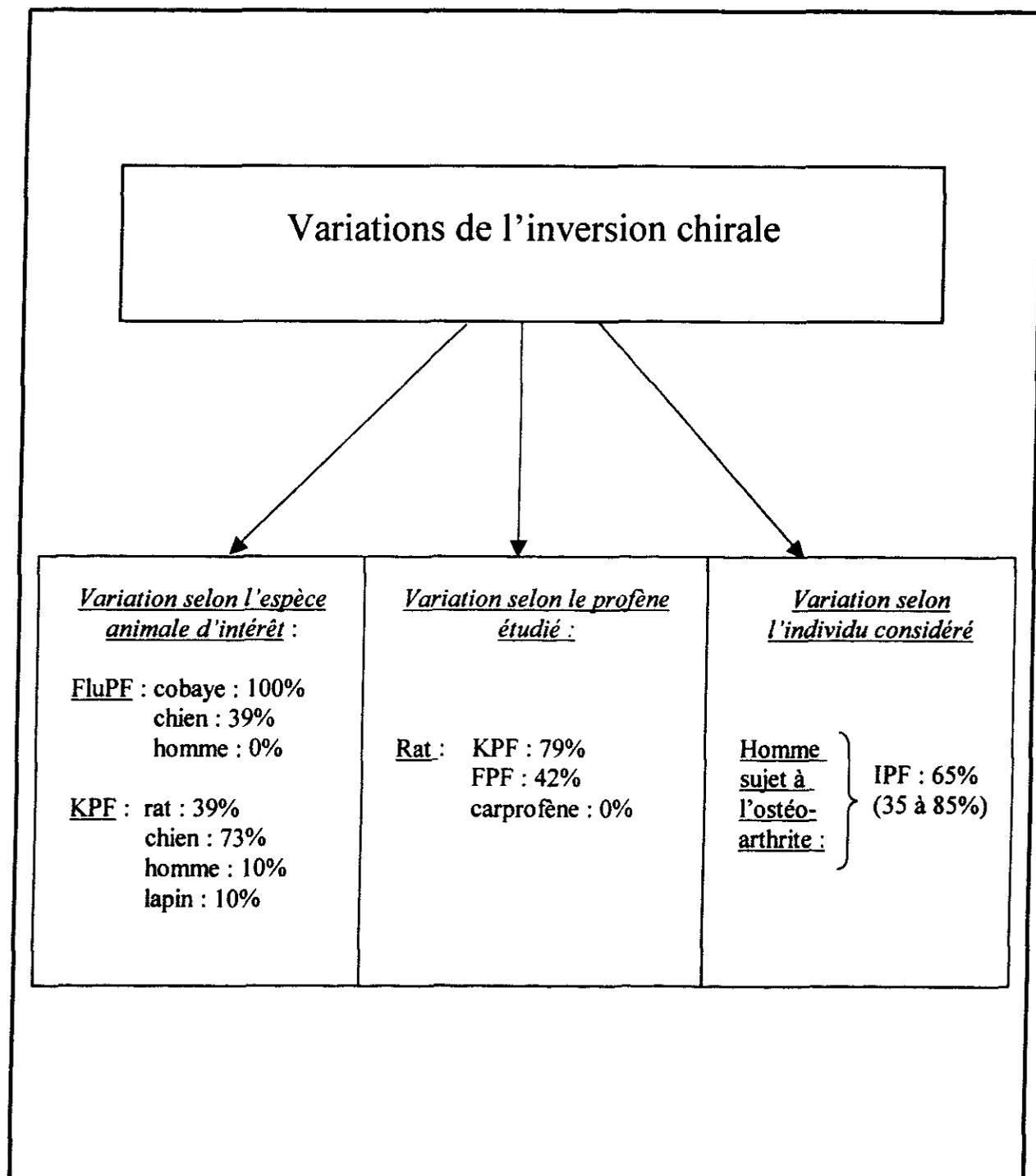


Figure 6. Variations de l'inversion chirale

transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA est catalysée par une enzyme biotine-dépendante, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC).

L'effet hypolipémiant, décrit pour le FPF, le KPF et l'IPF chez le rat, traduit une inhibition de la synthèse des acides gras et une diminution des lipides plasmatiques. Kemal *et al* [Kemal *et al*, 1991] ont montré une inhibition énantiosélective, en faveur du S(+)-IPF-CoA, de l'ACC.

Les thioesters de CoA des profènes sont aussi «confondus» avec les acyl-CoA par les systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse des lipides structuraux.

Formation de triglycérides hybrides

Des incubations de coupes fines de foie de rat avec l'IPF, le FPF ou le KPF ont conduit à la formation de lipides hybrides dans lesquels l'un des trois acides gras est remplacé par un profène [Fears *et al*, 1978]. Ce qui est confirmé par d'autres approches [Sallustio *et al*, 1988; Williams *et al*, 1986].

Le FluPF, mauvais substrat de l'acyl-CoA ligase n'est pas susceptible de subir cette hybridation. L'incorporation des profènes dans les triglycérides est stéréosélective en faveur de l'énantiomère R(-), si chaque énantiomère est administré seul [Zhao *et al*, 1992]. Ainsi certaines manifestations toxiques nerveuses pourraient être dues à la formation de triglycérides hybrides. De même, si les triglycérides hybrides peuvent être considérés comme des réservoirs de médicaments à longue rémanence, les conséquences toxicologiques de ce phénomène ne sont pas connues mais semblent limitées.

Acylation de protéines

Les acyl-CoA sont des élément régulateurs de nombreuses enzymes impliquées dans les signaux cellulaires ou dans le métabolisme énergétique. La palmitoylation de la protéine, altérant la structure et la fonction de celle-ci, phénomène unique dans le domaine de la modification de structure par les acides gras, est réversible, régulée, et à la base des interactions protéines-environnement membranaire et protéine-autre protéine. Souvent, une mutation affectant cette acylation entraîne la perte de la fonction. La palmitoylation, catalysée

Composé profène	Espèces	Inversion	Références
acide 2-phénylpropionique	rat	+	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 1987)
	chien, lapin	+	(Fournel-Gigleux <i>et al.</i> , 1986)
	souris	-	(Fournel-Gigleux <i>et al.</i> , 1986)
carprofène	rat	-	(Kemmerer <i>et al.</i> , 1979)
	chien	-	(Lee <i>et al.</i> , 1986 ; Iwakawa <i>et al.</i> , 1989)
	homme	-	(Graser <i>et al.</i> , 1991 ; Lees <i>et al.</i> , 1991)
	cheval	-	(McKellar <i>et al.</i> , 1994)
fénoprofène (FPF)	homme	+	(Rubin <i>et al.</i> , 1985 ; Jamali, 1988)
	lapin	+	(Hayball <i>et al.</i> , 1987)
	rat	+	(Berry <i>et al.</i> , 1991)
	mouton	+	Soraci <i>et al.</i> , 1995)
	chien, cheval	+	Soraci <i>et al.</i> , 1996)
ibuprofène (IPF)	homme	+	(Knihinicki <i>et al.</i> , 1990)
	lapin	+	(Lee <i>et al.</i> , 1985)
	rat	+	(Ahn <i>et al.</i> , 1991 a ; Beck <i>et al.</i> , 1991)
	cobaye	+	(Chen <i>et al.</i> , 1991)
	chien	+	(Williams <i>et al.</i> , 1991)
flurbiprofène (FluPF)	homme	-	(Jamali <i>et al.</i> , 1988)
	rat	+/-	(Menzel-Soglowek <i>et al.</i> , 1992)
	cobaye, chien	+	(Menzel-Soglowek <i>et al.</i> , 1992)
kétoprofène (KPF)	lapin	+	(Abas <i>et al.</i> , 1987)
	rat	+	(Rossetti <i>et al.</i> , 1986 ; Foster <i>et al.</i> , 1988)
	chien	+	(Aberg <i>et al.</i> , 1995)
	homme	+	(Jamali <i>et al.</i> , 1990)
Naproxène	rat	+	(Hutt <i>et al.</i> , 1983)
	lapin	+	(Iwakawa <i>et al.</i> , 1991) (Goto <i>et al.</i> , 1982)

Tableau 2. Données générales de l'inversion chirale de profènes chez différentes espèces (d'après [Sevoz, C. *et al.*, 2000])

Composé	Organes/Tissus
FPF	foie, poumon, jéjunum et duodénum
IPF	foie, poumon, iléon et colon
KPF	foie et intestin

Tableau 3. Localisation de l'inversion chirale du KPF, du FPF et de l'IPF

par une palmitoyl-acyltransférase, peut être considérée comme une régulation réversible post-traductionnelle nécessitant la fixation covalente d'un palmitate, via une liaison thioester, à certains résidus cystéine. Parmi les protéines cibles, beaucoup participent à la communication intracellulaire [Liu *et al*, 1996]. L'implication d'aryl-2-propionyl-CoA dans de tels phénomènes n'a jamais été envisagée, malgré l'existence de protéines cibles microsomaux avec le KPF-CoA (Benoît E. données du laboratoire).

Inhibition de la COX-2

Les thioesters de profènes pourraient inhiber les COX. Neupert *et al*. [Neupert *et al*, 1997] ont montré que si le R(-)-IPF, aux concentrations thérapeutiques usuelles, n'inhibe ni la COX-1, ni la COX-2, le thioester correspondant peut inhiber la COX-2. L'inhibition de la COX-2 a aussi été observée avec le S(+)-IPF-CoA, mais dans des conditions dans lesquelles plus de 35% du thioester était hydrolysé, sous forme de profène natif.

Protéines de liaison aux acyls-coenzyme A

Trois familles de protéines cytosoliques sont susceptibles de lier les acyl-CoA à longue chaîne : les « *sterol carrier protein* » (SCP-2), les « *fatty acid binding protein* » (FABP) et les « *acyl-coenzyme A binding protein* » (ACBP), ces dernières sont 3 à 4 fois plus affines pour les thioesters de CoA à longue chaîne [Faergeman *et al*, 1997].

B.3.γ. Inversion chirale

Données générales et variations. Localisation

Chez l'homme, après administration d'IPF de configuration R(-), 70% du profène de la configuration de départ est retrouvé dans le plasma sous forme S(+).

Les principales données générales par espèce et par composé, sont rassemblées dans le tableau 2. Elles souffrent de nombreuses variations (figure 6).

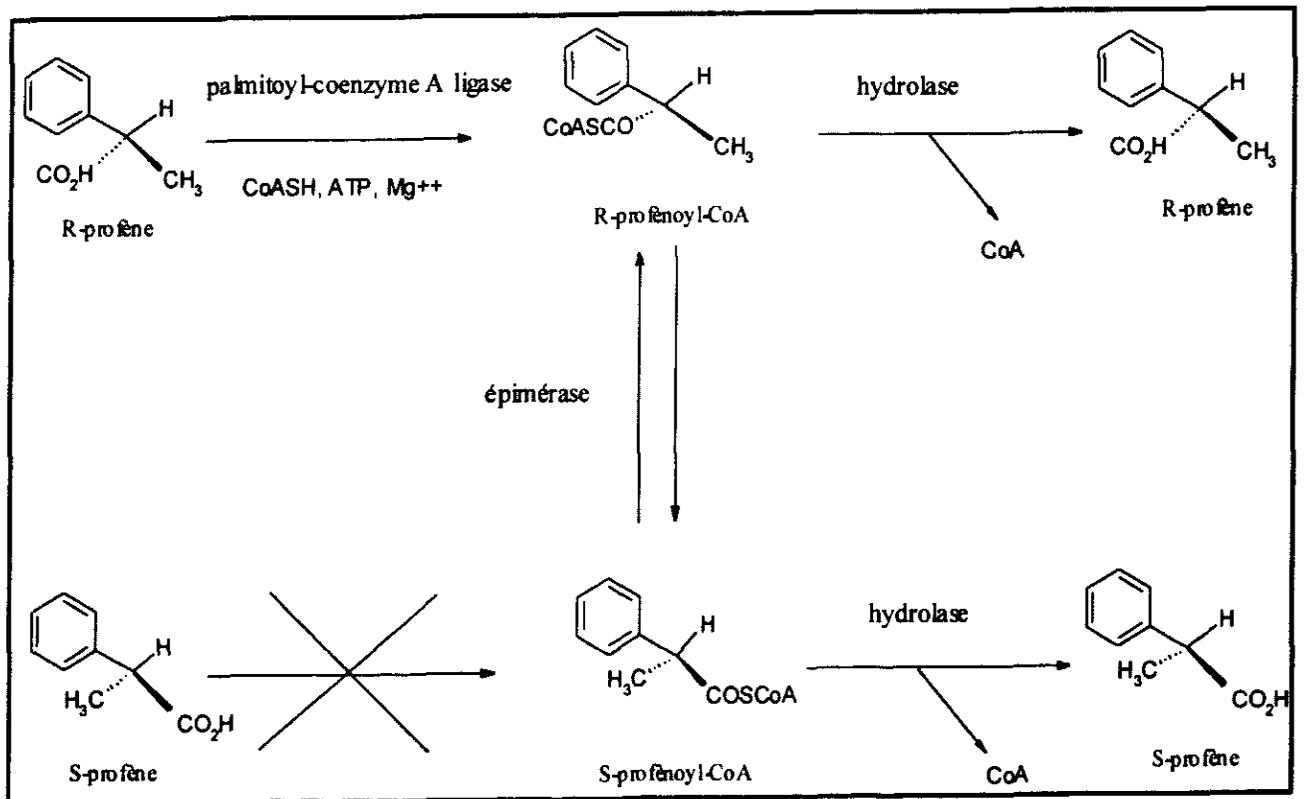


Figure 7. Mécanisme de l'inversion chirale

L'inversion chirale se produit majoritairement au niveau hépatique, et plus faiblement dans d'autres organes (poumons, tube digestif). Il existe une inversion chirale présystémique au niveau intestinal (tableau 3).

Mécanisme

Le mécanisme de l'inversion chirale fait intervenir trois activités enzymatiques distinctes (figure 7): premièrement, le profène de configuration R(-) est thioestérifié par le coenzyme A (CoA), en présence de magnésium et d'ATP (adénosine tri-phosphate), grâce à l'acyl-CoA ligase; le produit R(-) profénoyl-CoA est épimérisé grâce à une épimérase en son inverse optique, le profénoyl-CoA de configuration S(+) correspondant; ce dernier est enfin hydrolysé par une hydrolase pour libérer le profène initial mais de configuration S(+). Les épimérases et les hydrolases ne feront pas l'objet d'une étude approfondie ici.

C. STRUCTURE ET PROPRIETES DES ACS

L'acyl-CoA ligase est l'enzyme qui catalyse la première étape de l'inversion chirale, l'étape de la thioestérification, étape limitante qui confère la stéréosélectivité globale du système et son caractère unidirectionnel.

C'est une enzyme membranaire à activité microsomale et un peu mitochondriale et peroxysomale.

Plusieurs équipes ont accumulé un faisceau de preuves convergeant vers l'identification de l'acyl-CoA ligase à la palmitoyl-CoA ligase [Benoît *et al*, 1995; Brugger *et al*, 1996; Knights *et al*, 1988]. Ainsi l'acyl-CoA ligase est inhibée par du palmitate et des activités ibuprofénoyl- et fénoprénoyl-CoA sont co-purifiées avec l'activité palmitoyl-CoA ligase.

La palmitoyl-CoA ligase estérifie les acides gras ayant des chaînes carbonées comprises entre C10 et C18. Elle appartient aux acyl-CoA synthétases à longue chaîne (ACS). Son activité est mise en évidence dans le foie, et la plupart des tissus (cerveau, rein, plaquettes et adipocytes).

	N-term	LR1	Linker	LR2	C-term
ACS5					
<i>versus</i>	% d'identité en acides aminés				
ACS1	42	61	46	73	64
ACS2	39	63	52	65	58
ACS3	20	31	17	35	33
ACS4	16	32	17	35	31

Figure 8 Comparaison des acides aminés de l'ACS5 de rat à ceux des quatre autres ACS connues chez le rat. Les cinq régions communes aux ACS de rat sont précisées dans la partie supérieure : la région N-terminale (N-term), la région luciférase-like 1 (LR1), la région de liaison (linker), la région luciférase-like 2 (LR2) et la région C-terminale (C-term). Les chiffres indiquent le pourcentage d'identité en acide aminés au sein de chaque région entre les ACS1 à 4 de rat, comparativement à l'ACS5 de cette même espèce. (D'après [Oikawa, E *et al.*, 1998])

Des ADNc (ADN complémentaires) d'ACS ont récemment été obtenus et séquencés chez le rat. Les cinq isoformes d'ACS se répartissent en deux sous-familles : l'une contient l'ACS1, l'ACS2 et l'ACS5, avec plus de 55% d'homologie entre les séquences, l'autre contient l'ACS3 et l'ACS4 avec 68% d'homologie.

L'ACS1 [Suzuki *et al*, 1990; Tanaka *et al*, 1979] est l'isoforme très majoritairement hépatique mais elle est présente en faible quantité dans nombre d'autres organes : cerveau, cœur, intestin grêle. Son expression est sous le contrôle de trois promoteurs dont le «*peroxysome proliferator responsive element*» (PPRE), et le promoteur sensible au di-(2-éthylhexyl)-phtalate [Suzuki *et al*, 1990]. Elle est capable de catalyser la formation de FPF-CoA, d'IPF-CoA et de KPF-CoA [Sevoz *et al*, 2000].

L'ACS2 est surtout exprimée dans le cerveau du rat adulte [Fujino *et al*, 1992], tandis que l'ACS3 [Fujino *et al*, 1996], autre isoforme plutôt cérébrale a une expression maximale chez le jeune rat de 15 jours d'âge qui diminue fortement pour atteindre 10 % de son maximum chez le rat adulte.

L'ACS4 est une isoforme relativement ubiquitaire, mais surtout présente dans les organes impliqués dans la stéroïdogenèse [Kang *et al*, 1997].

L'ACS5 est la forme exprimée majoritairement dans le poumon et l'intestin grêle [Oikawa *et al*, 1998].

La structure schématique des ACS est représentée à la figure 8, ainsi que les pourcentages d'homologie des différentes séquences entre les isoformes chez le rat.

Les cinq domaines fonctionnels de l'ACS1 ont été étudiés par Iijima *et al*. [Iijima *et al*, 1996]. Ils semblent indispensables à l'activité de l'ACS1 de rat. Parmi ces domaines, deux (LR1 et LR2) présentent de fortes homologies de séquences en acides aminés avec les enzymes de la famille de la luciférase [Suzuki *et al*, 1990]: les pourcentages d'identité s'élèvent à 26 et 27% pour l'ACS1 [Iijima *et al*, 1996], à 21 et 26% pour l'ACS2 [Fujino *et al*, 1992] et à 21 et 25% pour l'ACS3 [Fujino *et al*, 1996].

Au sein du LR1, un site AMP binding est présent, indispensable à la fixation de l'adénylate intermédiaire [Black *et al*, 1997]. Une séquence consensus est intégrée au sein du LR2, qui constitue la signature des ACS : DGWLHTGDIGKWLPNGTLKIIDRKK. Celle-ci constituerait une partie du site de liaison aux acides gras et serait responsable de la spécificité de la longueur de chaîne des acides gras substrats [Black *et al*, 1997].

Chez l'homme, à ce jour, quatre et cinq ACS ont été séquencées . En ce qui concerne l'ACS1, un doute subsiste car deux séquences publiées indépendamment possèdent plus de 90% d'homologies [Abe *et al*, 1992; Ghosh *et al*, 1995]. Pour expliquer cette différence, trois raisons sont avancées par les auteurs: des erreurs de séquençage, un polymorphisme génétique, ou l'existence de deux gènes distincts, raisons qui ne s'excluent pas les unes les autres.

.....

Il existe une inversion chirale présystémique au niveau de l'intestin. Or dans ce tissu, deux isoformes d'ACS sont présentes: l'une, l'ACS1, est exprimée en faible quantité par rapport au foie, l'autre, l'ACS5, est surtout présente dans ce tissu.

L'ACS1 est susceptible de réaliser la thioestérification des profènes, mais aucune information n'est disponible quant à la capacité de l'ACS5 de réaliser celle-ci. Nous avons donc décidé de produire une ACS5 recombinante et d'observer l'éventuelle capacité de cette enzyme à catalyser la thioestérification des profènes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Le but de ce travail est l'étude des propriétés catalytiques de l'ACS5 obtenue par expression hétérologue chez *E. coli*. Différentes étapes intermédiaires ont ainsi été définies :

Obtenir un ADNc de l'ACS5 contenant le cadre de lecture par RT-PCR

- Préparer les différents vecteurs d'expression :
 - Le vecteur d'expression de la protéine native (pKK223-3-ACS5r)
 - Les deux vecteurs d'expression correspondant aux protéines contenant chacune une extrémité Tag histidine (pKK223-3-ACS5 C-His et pKK223-3-ACS5 N-His).
- Produire les protéines hétérologues et les purifier
- Mesurer les activités enzymatiques vis-à-vis d'un substrat endogène (l'acide palmitique) et de substrats xénobiotiques, en particulier, l'IPF, le FPF, le KPF (kétoprofène) et le FluPF.

A. MATERIELS

A.1. Animaux

Les rats adultes Sprague Dewley proviennent de IFFA-CREDO (L'Arbresle, France). Ils sont nourris par un régime industriel standard adapté, sans caractéristique particulière, et abreuvés à volonté. De sexe masculin, ils pèsent environ 200 g.

A.2. Réactifs

Tous les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma (La Verpillière, France).

Le R(-) et le S(+)-FluPF sont un don du Pr. G. Geisslinger (Département de Pharmacologie et de Toxicologie Expérimentales et Cliniques, Université Erlangen, Nuremberg, Allemagne). Leur pureté optique est de 99.1 % et de 98.5%, respectivement. Les R(-) et S(+)-IPF proviennent de chez Research Biochemicals Inc. (Natick, MA ; pureté >98%). Les énantiomères du FPF ont été obtenus par cristallisation stéréosélective, la méthylbenzylamine servant d'inducteur chiral. La pureté optique finale a été estimée par méthode HPLC, après dérivation à la L-leucinamide, à 96.4 pour le R(-)-FPF et à 98.8% pour le S(+)-FPF. Les différents R(-)-profénoyl-CoA, synthétisés selon la méthode des anhydrides mixtes, ont servi d'étalons analytiques lors des dosages par HPLC.

Les enzymes de biologie moléculaire et leurs tampons respectifs ont été obtenus chez Roche Diagnostics (Meylan, France) et Promega (Charbonnières, France) , le vecteur plasmidique pKK223-3 chez Amersham (Orsay, France). Les cellules NovaBlue Singles™ proviennent de chez Novagen (commercialisées par TEBU, Le Perray-en-Yvelines, France).

A.3. Matériels utilisés

Le thermocycleur est un appareil Eppendorff. La hotte à flux laminaire est un modèle Flufrance. L'incubateur est un appareil Jouan, préréglé sur +37°C.

L'HPLC utilisée est un modèle Merck comprenant une pompe L-6200 A et un détecteur UV-VIS L-4250. L'intégrateur est le modèle 3394 de chez Hewlett-Packard. La colonne servant au dosage des thioesters est une colonne LiChrospher® 100 RP-18 E (250 mm x 5µm, taille des particules : 10 µm) précédée d'une précolonne LiChroCART® 4-4, toutes deux proviennent de chez Merck KgaA (Darmstadt, Germany). L'ultra-centrifugeuse utilisée est une Beckman Avanti™ J30-I.

Un Econo Système Automatique Bio-Rad est utilisé pour la purification de la forme native de l'ACS5recombinante ainsi qu'une colonne échangeuse d'anion DEAE-Sephacel de chez

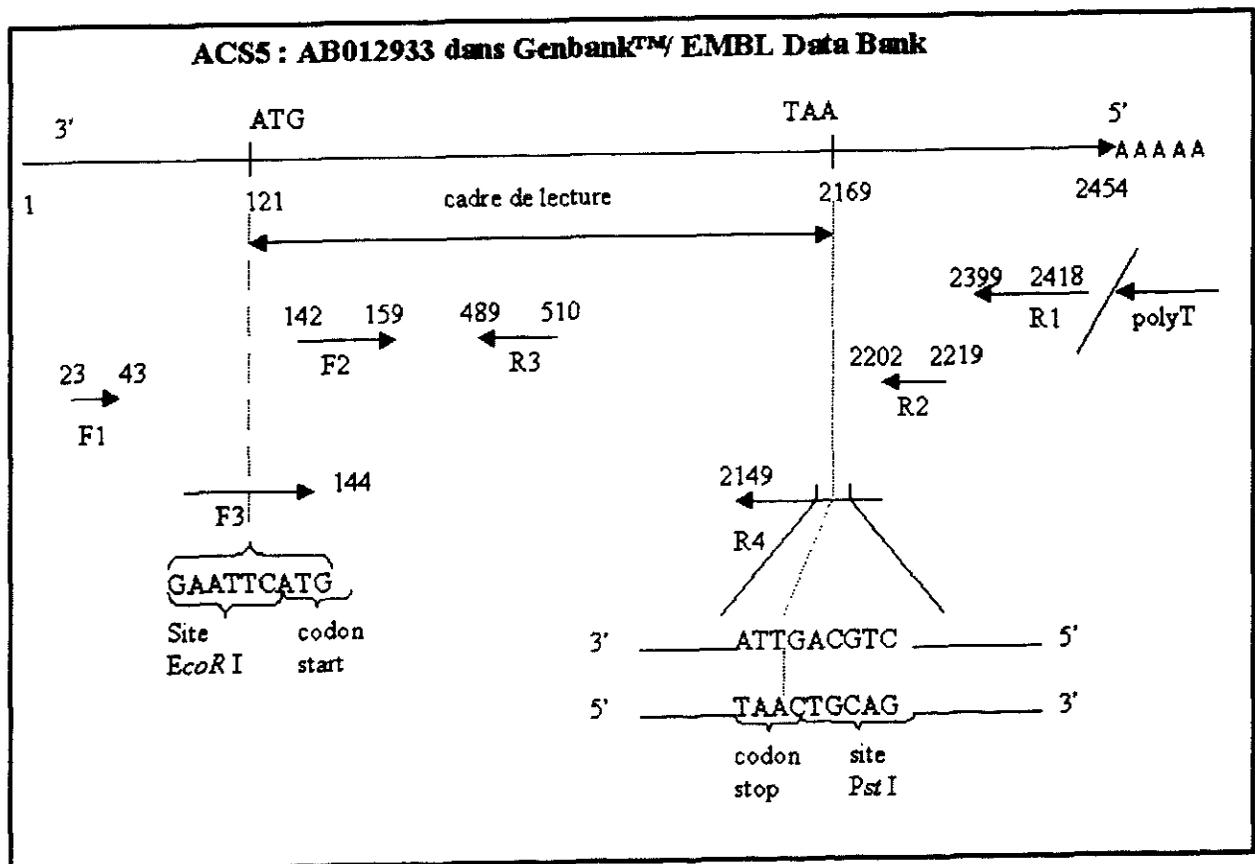


Figure 9. Schéma indiquant les positions relatives des différentes amorces utilisées

Sigma. La colonne utilisée pour la chromatographie d'affinité est une Blue Sepharose CL-6B (Amersham).

La colonne nickel servant à la purification de l'ACS5 tag-histidine, ainsi que tous les réactifs en rapport avec cette purification, proviennent du kit His Trap™ (Amersham).

Le matériel d'électrophorèse est le Mini Protean II de chez Bio-Rad. La quantification de la protéine recombinante native a été réalisée grâce à une révélation à l'argent, selon la méthode de Merrill. *et al*, [Merril *et al*, 1981].

B. METHODES

Les techniques de biologie moléculaire utilisées sont décrites dans l'ouvrage de Sambrook *et al*. [Sambrook *et al*, 1989]. Les produits de PCR ont été directement ou après extraction du gel, purifiés selon les instructions du fabricant Qiagen (Courtaboeuf, France).

B.1. Obtention d'ADNc de l'ACS5 contenant le cadre de lecture

Extraction des ARN. Un morceau d'environ 60 mg de poumon de rat est broyé dans un mortier, en présence d'azote liquide. L'extraction des ARN totaux est réalisée conformément aux instructions du SV Total RNA Isolation System® de chez Promega. La pureté des ARN obtenus est vérifiée par la mesure des densités optiques à 260 et à 280 nm. Le rapport de DO_{260}/DO_{280} des ARN obtenus est de l'ordre de 1,8. La concentration des ARN est ajustée à $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les ARN sont stockés à -80°C .

Rétrotranscription des ARN. $1\mu\text{g}$ d'ARN est rétrotranscrit en présence de 200 U de M-MuMLV Reverse Transcriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus*) dans un volume total de $20\mu\text{L}$ à 37°C pendant une heure, suivi de 10 minutes à 70°C en présence d'une amorce poly-T (18 T de séquence). Un essai identique est effectué en utilisant une amorce spécifique antisens R1-ACS5 (de séquence 5'-CATTACAGGTAGAGGCACC-3') (figure 9). Deux ADNc sont ainsi obtenus, le 18T et le R1.

ACS5 : AB012933 dans Genbank™ EMBL Data Bank

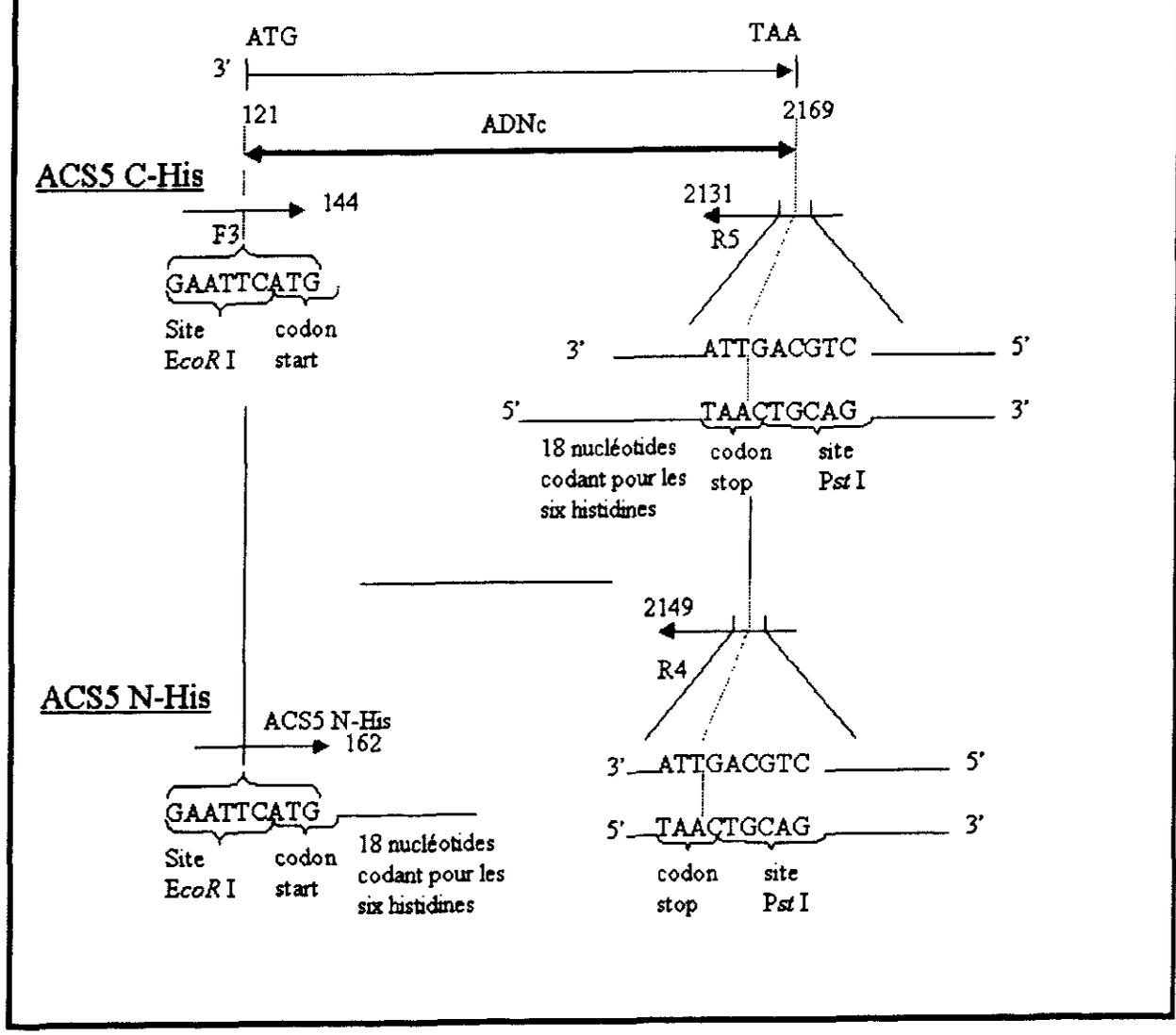


Figure 10. Schéma illustrant les positions relatives des deux amorces C- et N-His

Amplification des ADNc obtenus. Ils sont amplifiés par PCR (*polymerase chain reaction*) avec la *Pfu* ADN Polymérase dans son tampon approprié, entre l'amorce F1-ACS5 (de séquence 5'-GCTGAACCAACAACATCTAGC-3') et l'amorce R2-ACS5 (de séquence 5'-ATAGTTTCCGCTTCGTCC-3'). Après migration en gel d'agarose à 1% additionné de bromure d'éthydiu (BET), l'ampliat du tube correspondant à l'ADNc 18T présente une bande pure, très nette et intense à l'endroit attendu. C'est ce produit de PCR d'une taille apparente de 2400 paires de bases (pb) qui est purifié, à partir du gel, selon les instructions du QIAQuick™ gel purification protocol. Cet ADNc amplifié, appelé ORF-ACS5, est stocké à -80°C.

B.2. Construction des différents vecteurs d'expression

Construction du vecteur d'expression ACS5r. ORF-ACS5 est amplifié par PCR nichée, avec la *Pfu* ADN Polymérase, en 15 cycles en tout, dont 5 cycles à 52°C puis 10 cycles à 60°C entre les amorces R4-ACS5 (de séquence 5'-TATACTGCAGTTACTCTTCGATGCTCTCA TAG-3'), amorce pourvue d'un bout flottant contenant un site de restriction pour l'enzyme *Pst* I, et l'amorce F3-ACS5 (de séquence 5'-TTAAGAATTCATGCTTTTTATTTTAACTTCTTG-3'), amorce pourvue d'un bout flottant contenant le site de restriction de l'enzyme *EcoR* I. La migration en gel d'agarose à 1% additionné de BET met en évidence une bande unique, nette, à la taille attendue. L'ampliat est purifié selon la méthode QIAQuick™ gel purification protocol.

L'ADNc amplifié est coupé selon *Pst* I et *EcoR* I, en une heure, dans un bain-marie à +37°C. Le vecteur d'expression pKK223-3 est coupé par les mêmes enzymes de restriction. Les deux produits sont purifiés ensemble par passage sur une colonne QIAGEN, puis mis à ligaturer, à température ambiante, pendant 20 minutes, en présence de *T4 DNA Ligase* dans le tampon approprié. Des cellules Novablue Singles™ sont transformées par le plasmide recombinant (pKK223-3-ACS5r), étalées sur un milieu gélosé additionné d'ampicilline, et mises à cultiver une nuit entière selon les instructions du fabricant. Les différentes colonies sont criblées par PCR avec la *Taq* polymérase entre les amorces F2-ACS5 (de séquence 5'-TTGTTTTTCCCC ACTTCCG-3') et R3-ACS5 (de séquence 5'-CGATGGCTTGATCCTTTATGC-3'). Un des clones positifs (au vu de leur migration en gel d'agarose à 1% additionné de BET) est extrait du gel et purifié. Il est coupé selon les sites de restriction

des enzymes *EcoR* I et *Pst* I et la taille de l'insert est vérifiée. Le plasmide purifié, obtenu à partir de ce clone, est appelé JF3 et stocké à -80°C .

Construction du vecteur d'expression pKK223-3-ACS5 C-His. L'ADNc ORF-ACS5, est utilisé comme matrice pour une PCR, en présence de *Pfu* ADN Polymérase, effectuée entre l'amorce F3-ACS5 et une amorce chimère R5-ACS5 (de séquence 5'-ATACTGCAGTTA ATGATGATGATGATGATGCTCTTCGATGCTCTCATAGAG-3'), contenant en plus 18 nucléotides codant pour les six histidines C-terminales nécessaires à une purification sur une colonne nickel. Après extraction sur gel de la bande d'amplifiat correspondant au poids moléculaire attendu celui-ci est purifié sur colonne QIAGEN. Il est coupé, ainsi que le vecteur pKK223-3, selon les sites de restrictions correspondant aux enzymes *EcoR* I et *Pst* I. Purifiés sur une colonne QIAGEN, ils sont mis à ligaturer en présence de *T4 DNA ligase*, une heure à température ambiante.

Des cellules Novablue Singles™, transformées par le plasmide recombinant, sont étalées sur de la gélose additionnée d'ampicilline (112.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et mises à cultiver une nuit à $+37^{\circ}\text{C}$. Les colonies sont reprises dans un bouillon adapté (LB) et mises à croître. Une PCR nichée, suivie d'une migration en gel d'agarose à 1% avec BET, permet alors de s'assurer de la présence de colonies transformées recombinantes. Le plasmide transformé, purifié sur une colonne QIAGEN, est coupé selon les sites *EcoR* I et *Pst* I, afin de vérifier la taille de l'insert. Le plasmide purifié, appelé JFC4 est stocké à -80°C .

Construction du vecteur d'expression pKK223-3-ACS5 N-His. Les étapes sont identiques à celles envisagées pour l'ACS5 C-His, mais la PCR initiale est effectuée en présence de la *Pfu* ADN Polymérase entre une amorce ACS5-N His (de séquence 5'-GAGGAATTCATGCATCATCATCATCATCTTTTTATTTTAACTTCTTG-3'), qui contient les 18 nucléotides codant pour les six histidines terminales plus un site de restriction *EcoR* I et l'amorce ACS5-R4 (de séquence 5-TATACTGCAGTTACTCTTCGATGCTCTCATAG-3'), contenant un site de restriction pour *Pst* I. Le plasmide purifié est appelé JFN7 et stocké à -80°C .

B.3. Production des protéines recombinantes et purification

Production de l' ACS5r recombinante hétérologue (ACS5r) et purification.

Des cellules compétentes JM109 sont transformées par le vecteur d'expression pKK223-3-ACS5r. Les cellules JM109 transformées sont mises à cultiver pendant 12 heures, à +37°C, dans un bouillon de 8mL de *Terrific Broth* modifié (1.2% de tryptone bactérienne, 2.4 % d'extrait de levure, 0.4% de glycérol et 90 mM de phosphate de potassium, pH 7, 8) additionné d'ampicilline (100 µg/mL). Celui-ci, transvasé dans 1 L de *Terrific Broth* modifié, contenant de l'ampicilline (50 µg/mL) est mis à cultiver 5 à 6 heures à +37°C sous agitation. Quand la densité optique à la longueur d'onde à 600 nm du bouillon est comprise entre 0.6 et 1, l'expression est induite par ajout d'isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG) pour une concentration finale de 1mM. Après 6 heures de culture, les bactéries sont centrifugées à 10 000 rpm pendant 15 minutes et le culot bactérien est repris dans 7mL de tampon A (50mM de tampon phosphate, pH 7,4 à 37°C et 10% de glycérol), puis l'ensemble est mis à agiter 1 heure avec du lysozyme (1,25 mg/ml), et un comprimé de Miniprotease avec EDTA (Roche). Il est soumis à l'action d'un désintégrateur à ultrasons, 4 fois 45 secondes, 5 microns d'amplitude de pic à pic. Puis les membranes bactériennes sont solubilisées pendant une heure, par ajout de triton X-100 (1%) directement dans la solution précédente. Le solubilisé est alors mis à centrifuger (30 000 rpm, 1 heure). Le surnageant représente alors notre extrait brut qui est mis à dialyser pendant 12 heures contre un tampon A additionné de 1% de triton X-100 (tampon B).

Toutes les opérations sont conduites à +4°C. Au cours de la purification, les enzymes sont suivies selon leur activité de ACS sur le substrat de référence, l'acide palmitique (cf. infra) et leur profil en SDS-PAGE. Le dialysat est déposé sur une colonne DEAE-Sephacel, préalablement équilibrée par le tampon C (tampon A + 0,1% de triton X-100). La colonne est rincée par trois fois son volume de tampon C, puis le dépôt est élué par un gradient entre le tampon C et le tampon D (tampon C + 0,5M de NaCl). Les tubes présentant la plus forte activité ACS vis-à-vis du substrat de référence, l'acide palmitique (cf. infra) et le profil en SDS-PAGE le moins contaminé par d'autres protéines sont rassemblés et mis à dialyser une nuit à + 4°C contre le tampon C. Ce deuxième dialysat est alors déposé sur une colonne d'affinité Blue CL6B, précédemment équilibrée par du tampon C. La colonne est rincée par trois fois son volume de tampon C, puis le dépôt est élué par un gradient entre le tampon D et le tampon E (tampon C + 1,5 M de NaCl + 0,5 M d'ATP + 1% de triton X-100).

Les tubes présentant la plus forte activité ACS vis-à-vis du substrat de référence, l'acide palmitique (cf. infra) et le profil en SDS-PAGE le moins contaminé par d'autres protéines sont rassemblés et mis à concentrer en présence de PEG (polyéthylène glycol), une nuit à +4°C.

Production de l' ACS5 C-His et purification. Le plasmide pKK223-3-ACS5 C-His sert à transformer des cellules JM109 qui sont mises à cultiver une nuit à +37°C dans un bouillon de 8mL de *Terrific Broth* modifié additionné d'ampicilline (100 µg/mL). Quand la D.O. à 600nm des cellules transvasées dans un grand bouillon de ce même produit, toujours en présence d'ampicilline (50 µg/mL). est comprise entre 0,6 et 1, de l'IPTG (1 mM) est ajouté. La culture est arrêtée au bout de 5 à 6 heures, le bouillon est centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm. Le culot bactérien est repris dans 7 mL de *Start Buffer* (tampon phosphate 200 mM ; 0,5M de NaCl ; 20 mM d'imidazole), mis à agiter pendant une heure en présence de lysozyme (500 µM) (Roche), et de PMSF (500 µM), soumis à une sonication 4 fois 45 secondes. L'ensemble est solubilisé par du triton X-100 (1%), pendant une heure, puis mis à centrifuger une heure à 30 000 rpm. Le surnageant représente alors notre extrait brut. L'extrait brut est tout d'abord testé sur son activité ACS. Celle-ci est tout à fait comparable à l'extrait brut de l'ACS5 native.

L'ensemble des opérations est conduit à +4°C. Au cours de la purification, les enzymes sont suivies selon leur activité ACS vis-à-vis du substrat de référence, l'acide palmitique (cf. infra) et leur profil en SDS-PAGE. L'extrait brut est passé sur la colonne nickel, préalablement équilibrée par du *Start Buffer*. La colonne est rincée par cinq fois son volume de *Start Buffer*, puis par cinq fois son volume de tampon de rinçage (*Start Buffer* avec une concentration d'imidazole de 25 mM). Le dépôt est élué par un gradient entre le *Start Buffer* et l'*Elution Buffer* (*Start Buffer* avec une concentration d'imidazole de 100 mM). Le débit est de 1.5 mL/minute. Les tubes de collection contiennent 1 mL d'éluat.

Production de l' ACS5 N-His et purification. Les étapes sont identiques à celles envisagées pour l'ACS5 C-His, mais la transformation initiale est effectuée en utilisant le vecteur pKK223-3-ACS5 N-His.

B.4. Activités enzymatiques

Thioestérification de l'acide palmitique. Le milieu standard d'incubation (0.25 mL) se compose de tampon Tris-HCl (150mM, pH 8 à 37°C), de MgCl₂ (4,43 mM), de DTT (3,11 mM), de CoASH (0,6 mM), d'ATP (2,5 mM), de triton X-100 (0.02% v/v), et de protéines (80 ng de protéines). A ce milieu standard d'incubation est ajouté de l'acide palmitique (200 µM). Après un préchauffage d'une minute à 37°C, la réaction est initiée par l'addition du CoASH. Elle est arrêtée au bout d'un laps de temps variable (de 5 à 40 minutes d'incubation) par ajout d'acétonitrile (100 µL). Les tubes non dosés immédiatement sont congelés à -30°C.

La quantité de thioester formée est dosée par une méthode HPLC directe modifiée (technique développée dans le laboratoire). Le volume injecté est de 100 µL. La phase mobile est constituée d'un mélange d'un solvant A : acétonitrile et d'un solvant B : sulfate d'hydrogène tétrabutylammonium 10 mM, citrate d'ammonium 50mM. Le palmitoyl-CoA est élué par un gradient de 55 à 71% de A en 5,5 minutes. Le débit est de 1.5 mL/minute. Le détecteur est réglé sur la longueur d'onde de 255 nm. Le temps de rétention observé pour le palmitoyl-CoA est de 7,5 minutes sous ces conditions.

Thioestérification du FPF. Des concentrations de 0.25 à 2.5 mM finales de FPF sont incubées dans le milieu d'incubation standard. Le FPF-CoA est élué par un gradient de 35 à 80% de solvant A en 16 minutes. Le débit est de 1,5 mL/minute, le détecteur réglé sur 255 nm. Le temps de rétention du FPF-CoA est alors de 7,6 minutes.

Thioestérification de l'IPF. Des concentrations d'IPF de 0.2 à 4 mM finales d'IPF sont incubés dans le milieu standard. L'IPF est élué par un gradient de 38 à 48% de A en 11.5 minutes. Le débit est de 1.5 mL/minute, le détecteur réglé sur 255 nm. Le temps de rétention de l'IPF-CoA est de 8,1 minutes.

Thioestérification du FluPF. Du FluPF (0.2 à 2.5 mM final) est incubé dans le milieu standard. Le FluPF est élué par un gradient de 37 à 50% de solvant A en 18 minutes. Le débit est de 1.5 mL/min. Le détecteur est réglé sur la longueur d'onde de 255 nm. Le temps de rétention du FluPF est de 10,2 minutes.

	Protéines (μg)	Activité totale (nmol/min)	Activité spécifique (nmol/min/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Dialysat	37500	160	4.25	1	100
DEAE	11700	100	8.50	2	62.5
Bleue	5	70	13500	3200	43.8

Tableau 4. Synthèse de la purification de l'ACS5. Un litre d'une culture d'*E. coli* exprimant le plasmide pKK223-3-ACS5 r a été employée pour préparer le dialysat. L'activité enzymatique a été mesurée par la méthode HPLC développée par le laboratoire, l'acide palmitique servant de substrat.

	ACS5 r		ACS5 C- His	ACS5-N His
	Km ($\mu\text{mol/L}$)	Vm ($\mu\text{mol/min/mg}$)	Vm (nmol/min/mg)	Non fixé sur la colonne nickel
Acide palmitique	153 \pm 25	26.45 \pm 1.49	2.97 \pm 0.11	
R(-)-FPF	864 \pm 206	1.15 \pm 0.18	0	
S(+)-FPF	0	0	0	
R(-)-KPF	0	0	0	
S(-)-KPF	0	0	0	
R(-)-IPF	traces	traces	0	
S(-)-IPF	0	0	0	
FluPF	0	0	0	

Tableau 5. Les différentes constantes cinétiques des trois formes enzymatiques produites pour chacun des substrats testés. Les valeurs indiquées sont la moyenne \pm l'écart-type sur quatre mesures effectuées.

Thioestérification du KPF. Du KPF (0.2 à 2.5 mM final) est incubé dans le milieu standard. Le KPF est élué par un gradient de A de 39 à 44 % en 6 minutes. Le débit est de 1.5 mL/min. Le détecteur est réglé sur la longueur d'onde de 255 nm. Le temps de rétention du KPF est d'environ 7,3 minutes.

B.5. Activités des microsomes hépatiques et intestinaux

Des microsomes hépatiques ont été préparés selon la méthode de Benoît. *et al.* [Benoît *et al.*, 1995] et les microsomes intestinaux selon celle de Villaverde *et al.* [Villaverde *et al.*, 1995]. Ils sont incubés dans le milieu standard en présence d'acide palmitique et de FPF.

B.6. Synthèse d'anticorps polyclonaux anti-ACS5 C-His

La protéine recombinante C-His purifiée est quantifiée (**photo I**). Environ 200 µg de la protéine émulsifiée dans l'adjuvant complet de Freund est injectée à un lapin. Trois semaines après, un rappel est effectué avec 150 µg de cette même protéine émulsifiée dans de l'adjuvant de Freund incomplet. Trois semaines après cette dernière injection, un peu de sang est prélevé, qui est testé en Western Blot.

C. RESULTATS

Nous avons construit trois vecteurs d'expression, purifiés et stockés à -80°C, qui permettaient la synthèse des trois protéines «actives» désirées.

Pour surproduire l'ACS5 dans des colonies d'*Escherichia coli*, un vecteur plasmidique d'expression contenant la totalité de la région codante de l'ADNc correspondant a été inséré dans un vecteur placé sous la dépendance d'un puissant promoteur. L'expression du plasmide a été induite par de l'IPTG et l'enzyme active produite a été purifiée jusqu'à la quasi homogénéité (**photo II**). L'induction d'une activité palmitoyl-CoA synthétase dans le lysat des cellules solubilisées est entièrement dépendante de la présence de l'insert dans le plasmide (résultats non montrés). L'enzyme a été purifiée 3200 fois avec un rendement d'environ 45% (tableau 4) et l'enzyme purifiée montre une activité spécifique de 13.5 µmol/min/mg de protéine, quand le substrat est l'acide palmitique. La protéine semble homogène en SDS-PAGE, une coloration à l'argent se révélant nécessaire pour la mettre en évidence après

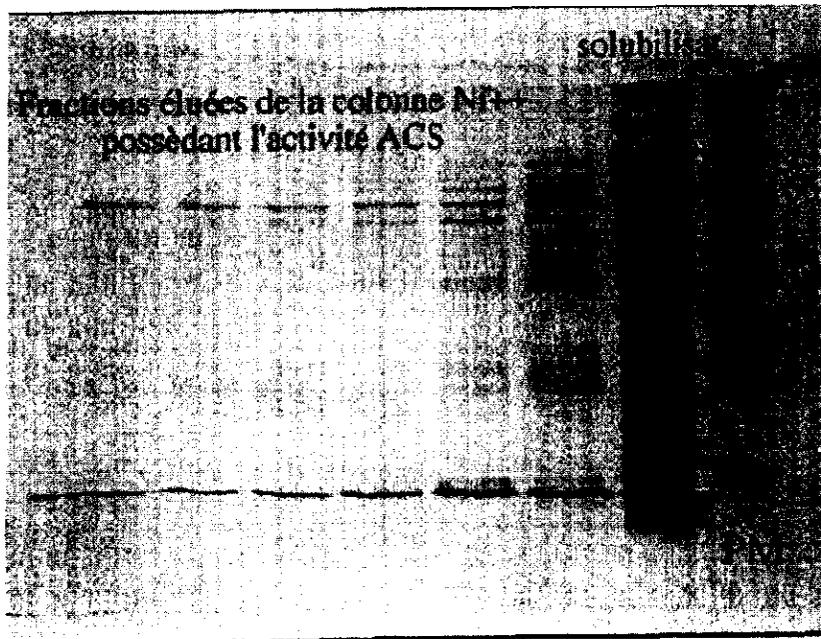


Photo I. Purification ACS5 C-IIis par colonne nickel, différentes fractions



Photo II. Quantification de l'ACS5r purifiée sur colonne Blue Cibacron , par comparaison à une gamme BSA

passage sur la colonne d'affinité Bleue CL6B. Elle migre à un poids moléculaire apparent d'environ 76 kDa, valeur en accord avec la masse moléculaire prédictible calculée à partir de la séquence déduite en acides α -aminés, mais aussi avec la migration de la palmitoyl-CoA synthétase native, purifiée à partir de foies de rat. Le tableau 5 montre les valeurs apparentes du K_m et de la V_m pour tous les substrats testés. L'ACS5 de rat, purifiée, catalyse la thioestérification du R(-)-FPFet du R(-)-IPF (même si dans ce dernier la méthode HPLC ne permet pas de quantification rigoureuse) avec une cinétique de type Michaelis-Menten, en regard de la concentration du substrat quand les incubations sont réalisées en présence de détergent. Sous les mêmes conditions, les incubations réalisées avec les énantiomères S(+) de chacun des deux acides 2-aryl propioniques précédents n'ont pas permis la mise en évidence d'une quantité détectable de thioester, quelles que soient les concentrations testées du substrat. Par ailleurs, aucune quantité de thioester n'a pu être détectée avec le FluPF et le KPF comme substrat, quelque soit l'énantiomère testé.

Pour surproduire l'ACS5 C-His dans des colonies d'*E. coli*, un vecteur plasmidique d'expression contenant la totalité de la région codante de l'ADNc de l'ACS5 plus six histidines C-terminales a été inséré dans un vecteur placé sous la dépendance d'un puissant promoteur. L'expression du plasmide a été induite par de l'IPTG et l'enzyme active produite a été purifiée jusqu'à la quasi homogénéité (photo I). Sa purification est rapide et quasi-complète. La protéine semble homogène en SDS-PAGE, révélée par le Bleu de Coomassie R-250. Elle migre à un poids moléculaire apparent d'environ 76 kDa. Elle catalyse bien la thioestérification de l'acide palmitique (V_m de 3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine, soit environ $1/9^{\text{ème}}$ de la valeur de la V_m de l'ACS5r pour le même substrat). Par contre, elle ne réalise cette catalyse pour aucun des substrats profènes testés.

Pour surproduire l'ACS5 N-His dans des colonies d'*E. coli*, un vecteur plasmidique d'expression contenant la totalité de la région codante de l'ADNc de l'ACS5 plus six histidines à l'extrémité N-terminale a été inséré dans un vecteur placé sous la dépendance d'un puissant promoteur. L'expression du plasmide a été induite par de l'IPTG, mais l'enzyme active produite ne se fixe pas sur la colonne nickel servant à sa purification. La protéine migre à un poids moléculaire apparent d'environ 76 kDa en SDS-PAGE (révélation au Bleu de Coomassie R-250. Elle catalyse la thioestérification de l'acide palmitique (résultats non présentés). Les activités des solubilisats ACS5 C-His et N-His sont comparables.

Les activités des microsomes de foie et d'intestin par rapport aux substrats acide palmitique et FPF sont rassemblés dans le tableau 7. La photo III illustre deux Western Blot identiques révélés soit par des anticorps polyclonaux anti-palmitoyl-CoA ligase hépatique, soit par des anticorps polyclonaux anti-ACS5 C-His. Dans ces Western Blot, ont été déposés des microsomes hépatiques (25 μ g), de l'ACS1r purifiée (1 μ g, don de Sevoz Cendrine et de Buronfosse Thierry), des microsomes intestinaux (35 μ g) et de l'ACS5r purifiée (1 μ g). Les deux types d'anticorps sont spécifiques des deux isoformes, ils ne croisent quasiment pas entre eux. Nous pouvons donc affirmer que de l'ACS5 est présente en faible quantité au niveau hépatique et que de l'ACS1 est présente en faible quantité au niveau intestinal.

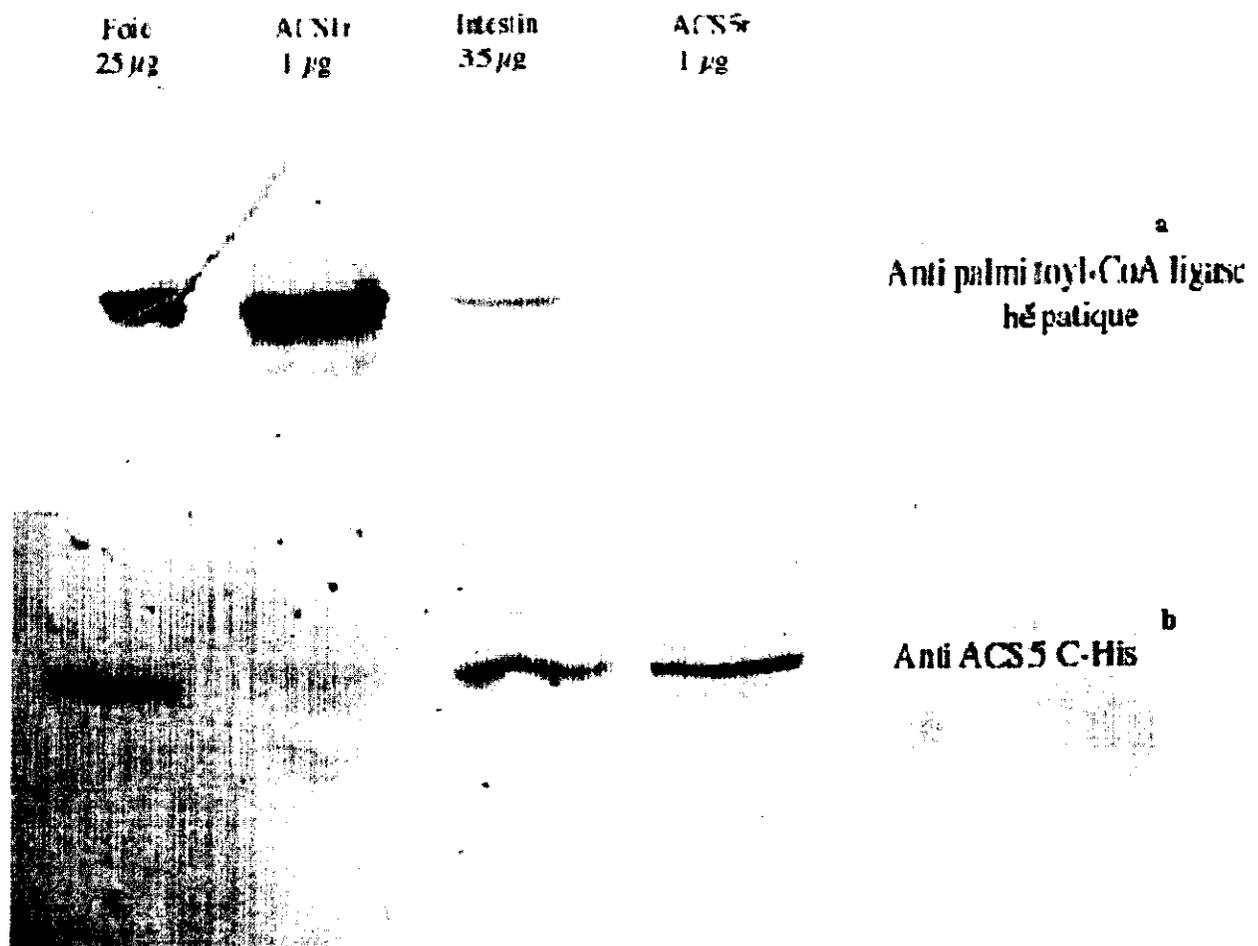


Photo III. Western Blot de microsomes hépatiques, d'ACS1r purifiée [Sevoz et al., 2000], de microsomes intestinaux, d'ACS5r purifiée, révélés par:

- a: des anticorps polyclonaux antipalmitoyl-coenzyme A ligase hépatique
- b: des anticorps polyclonaux anti-ACS5 C-His

D. DISCUSSION

L'ACS5 est une protéine faiblement liée aux membranes cellulaires et non glycosylée. Sa forte homologie avec l'ACS1 rend impossible une purification directe complète à partir de microsomes intestinaux. C'est pourquoi le choix de l'expression hétérologue s'est imposé. La protéine non glycosylée et la culture simple et rapide des bactéries *E. coli* nous ont conduit vers un système d'expression procaryote. Le caractère faiblement membranaire de l'enzyme (celle-ci ne contient pas de domaine trans-membranaire et peut être solubilisée sans détergent à forte force ionique) conduirait à préférer une expression dans des cellules eucaryotes en raison du risque majeur de produire une protéine sous la forme de corps d'inclusion. Néanmoins, les résultats concluants obtenus par une autre équipe du laboratoire sur l'ACS1 et l'ACS2 [Sevoz *et al*, 2000], en utilisant cette même approche nous ont conduit à développer l'expression hétérologue dans des cellules procaryotes.

Dans cette étude, nous avons caractérisé l'ACS5 au vu de son éventuelle activité de thioestérification d'un certain nombre de profènes subissant une inversion chirale présystémique, chez le rat. Pour ce faire, nous avons développé une approche expression hétérologue dans un vecteur procaryote. Nous avons fait surproduire l'ACS5 par une souche d'*E. coli*, puis nous avons purifié la protéine d'intérêt en suivant la méthode de Oikawa. *et al*, [Oikawa *et al*, 1998], en la modifiant légèrement: nous avons rajouté le passage sur une colonne d'affinité Bleue CL6B, car le profil SDS-PAGE, après la seule DEAE-Sephacel montrait une certaine contamination par d'autres protéines. Après passage sur la CL6B la protéine n'était pas visible en SDS-PAGE révélé par la coloration classique au Bleu de Coomassie R-250. Une révélation à l'argent selon la méthode de Merrill. *et al*. [Merrill *et al*, 1981] a été entreprise, fructueuse car très sensible, qui a permis la visualisation de très faibles quantité de la protéine d'intérêt. Un autre inconvénient de la colonne Bleue d'affinité est l'élution qui nécessite de fortes concentrations en triton X-100, ces dernières interdisant la mesure de la quantité totale de protéine selon la méthode de Bradford. Pour pallier ceci, une gamme de BSA a été effectuée, révélée par l'argent. Ainsi la quantité de la protéine pure a pu être évaluée. La quantité d'ACS5 produite s'est révélée être très faible. Il est tout à fait possible qu'une part importante de l'enzyme soit produite sous la forme inactive de corps d'inclusion et que seul un faible pourcentage de l'enzyme soit solubilisée par la procédure employée (triton X-100).

Le temps nécessaire à l'obtention de la l'ACS5r avait pour résultats une dégradation importante de celle-ci par les protéases naturellement produite par les cellules de la souche JM109, et ce malgré l'ajout de Mini protease®. Le caractère fastidieux de la purification de l'ACS5 par deux colonnes successives nous a conduit à développer une approche Tag-Histidine sur l'extrémité C-terminale, réputée pour sa facilité d'emploi, sa rapidité et le fait qu'elle ne modifie pas les propriétés catalytiques de la protéine native. La protéine obtenue, nommée ACS5 C-His, catalyse la thioestérification de l'acide palmitique (V_m de $3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine contre 27 pour l'ACS5r, tableau 5), avec une moindre vitesse. Mais sa purification est grandement simplifiée (**photo I**). Par contre, aucun thioester d'aucun profène testé n'a été observé, que ce soit en présence ou en absence de détergent.

Les sites actifs de l'enzyme se trouvant à proximité de l'extrémité C-terminale, la présence des six histidines supplémentaires pouvait limiter la catalyse de la thioestérification d'un certain nombre de substrats. Aussi, une protéine chimère, avec un tag histidine à l'extrémité N-terminale a été produite. Celle-ci, d'une activité comparable à la C-histidine vis-à-vis de l'acide palmitique, ne se fixe pas sur la colonne nickel. Sa purification n'étant pas simplifiée par rapport à la protéine ACS5r, nous avons abandonné cette voie.

Nous avons donc un système à double niveau: d'une part, la protéine ACS5r, pure, en très faible quantité servant à déterminer toutes les constantes cinétiques vis-à-vis des différents substrats à tester, d'autre part, la protéine ACS5 C-His, quasi-pure, produite et purifiée, à la demande, en vue de la synthèse d'anticorps polyclonaux contre l'ACS5.

Dans le tableau 6, les constantes cinétiques de l'ACS5r sont comparées à celles obtenues par une autre équipe du laboratoire [Sevoz *et al*, 2000] pour l'ACS1 et l'ACS2 recombinantes de rat. L'ACS5r a un K_m très supérieur à ceux des deux autres ACS, que le substrat soit l'acide palmitique ou le FPF. Elle est sept à huit fois moins affine pour l'acide palmitique que l'ACS1 ou l'ACS2.

L'ACS1 et l'ACS2 prennent en charge l'acide palmitique même à faible concentration avec une V_m faible, contrairement à l'ACS5 qui ne prend en charge l'acide palmitique qu'à de fortes concentrations mais avec une V_m nettement supérieure. L'ACS5 n'est probablement qu'un système d'appoint qui sert éventuellement à « écrêter » les pics d'acides gras à thioestérifier (pour pouvoir être utilisés par la suite), libérés en période post-prandiale.

	ACS1 r		ACS2 r		ACS5 r	
	Km	Vm	Km	Vm	Km	Vm
	(μ M)	(nmol/min/mg protéines)	(μ M)	(nmol/min/mg protéines)	(μ M)	(nmol/min/mg protéines)
Acide palmitique	20.8 \pm 4.63	9000 \pm 740	19.1 \pm 2.95	1500 \pm 90	153 \pm 25	26500 \pm 1490
R(-)-FPF	103 \pm 12	267 \pm 1	611 \pm 38	14 \pm 1	864 \pm 206	1.15 \pm 0.2
S(+)-FPF	0	0	0	0	0	0

Tableau 6. Constantes cinétiques de la thioestérification de trois substrats par l'ACS1r [Sevoz *et al*, 2000], l'ACS2r [Sevoz *et al*, 2000] et l'ACS5r. Les valeurs indiquées sont la moyenne \pm l'écart-type sur trois quatre mesures effectuées.

	Activité	
	(nmol/min/mg microsomes)	
	microsomes hépatiques	microsomes intestinaux
acide palmitique	96 \pm 8.03	17 \pm 1.56
R(-)-FPF	1,83 \pm 0.3	0,017 \pm 0.002

Tableau 7. Valeurs d'activité de microsomes de deux tissus vis-à-vis de l'acide palmitique et du FPF

Les microsomes hépatiques ont une activité de thioestérification du FPF qui représente $1/50^{\text{ème}}$ de celle de l'acide palmitique, tandis que, pour les microsomes intestinaux, elle ne représente qu' $1/1000^{\text{ème}}$ de celle de l'acide palmitique (tableau 7). Ceci montre que la grande majorité de l'activité ACS dans l'intestin est représentée par l'ACS5. Ceci est en accord avec les résultats du Northern Blot de Oikawa. *et al.* [Oikawa *et al.*, 1998]. Les deux Western Blot identiques (**photo III**) révélés par les deux types d'anticorps polyclonaux spécifiques d'isoforme produits (l'ACS1 et l'ACS5 C-His) en sont une preuve supplémentaire.

L'ACS5 est capable de réaliser la thioestérification intestinale des profènes, mais avec une faible affinité pour ces substrat et une V_m faible. L'utilisation d'anticorps anti-ACS5, si ceux-ci se révélaient être inhibiteurs de l'activité catalytique, permettrait d'estimer le rôle éventuel de cette enzyme dans la thioestérification intestinale des profènes.

CONCLUSION

L'expression hétérologue de l'ACS5 de rat dans un vecteur d'expression procaryote, nous a permis de caractériser les propriétés catalytiques de celle-ci vis-à-vis d'un substrat endogène, l'acide palmitique, et de substrats xénobiotiques (les profènes). L'ACS5 est une enzyme capable de catalyser la thioestérification de l'acide palmitique, avec une faible affinité, mais une grande capacité, ce qui la différencie des deux autres isoformes de la même sous-famille, l'ACS1 et l'ACS2, qui réalisent la thioestérification de l'acide palmitique avec une forte affinité mais une faible capacité. L'ACS5 n'est, par contre, que peu affine et peu efficace en ce qui concerne la thioestérification des profènes, ce qui la différencie de l'ACS1, qui réalise celle-ci, avec une forte affinité et une forte capacité.

L'étude des activités de microsomes intestinaux par rapport aux microsomes hépatiques vis-à-vis des mêmes substrats nous conforte dans l'idée de la présence majoritaire au niveau intestinale de l'ACS5. L'ACS1 présente dans l'intestin n'est que très largement minoritaire. Ceci est confirmé par les deux Western Blot identiques révélés par les deux types d'anticorps polyclonaux spécifiques d'isoforme produits. La thioestérification intestinale présystémique et extrahépatique du FPF et de l'IPF chez le rat semble être le fait de la faible quantité d'ACS1 présente dans ce tissu, plutôt que de l'ACS5.

LE PROFESSEUR RESPONSABLE
De L'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon



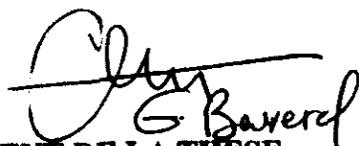
PROFESSEUR E. BENOIT

VU : LE DIRECTEUR
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

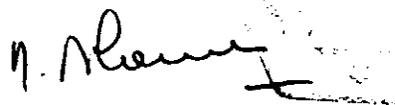


PROFESSEUR J.-F. CHARY

LE PRESIDENT DE LA THESE
PROFESSEUR G. BAVEREL



Le Président de l'Université
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales.
M. DECHAVANNE



Vu et permis d'imprimer
LYON, le 27 NOV. 2000

BIBLIOGRAPHIE

ABAS. A., MEFFIN P.J. (1987) Enantioselective disposition of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IV. Ketoprofen disposition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **240**, 637-641.

ABE T., FUJINO T., FUKUYAMA R., MINOSHIMA S., SHIMIZU N., TOH H., SUZUKI H., YAMAMOTO T. (1992) Human long-chain acyl-CoA synthetase : structure and chromosomal location. *Journal of Biochemistry*, **111**, 123-128.

ABERG G., CIAFALO V.B., PENDLETON R.G., RAY G., WEDDLE D. (1995) Inversion of (R)- to (S)-ketoprofen in eight animal species. *Chirality*, **7**, 383-387.

AHN H.Y., AMIDON G.L., SMITH D.E. (1991a) Stereoselective systemic disposition of ibuprofen enantiomers in the dog. *Pharmaceutical Research*, **8**, 1186-1190.

BAGHERI H., LHIAUBET V., MONTRASTRUC J.L., CHOUINI-LALANNE N. (2000) Photosensitivity to ketoprofen: mechanisms and pharmacoepidemiological data. *Drug Safety*, **22**, 339-349.

BANNWARTH B. (2000) Gastrointestinal tolerance of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Drugs*, **59**: 17-23.

BECK W.S., GEISLINGER G., ENGLER H., BRUNE K. (1991) Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in dogs. *Chirality*, **3**, 165-169.

BENNETT W.M., HENRICH W.L., STOFF J.F. (1996) The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations. *American Journal of Kidney Diseases*, **28**, S56-S62.

BENOIT E., DELATOUR P., OLIVIER L., CALDWELL J. (1995) (-)-R-fenoprofen: formation of fenoprofenoyl-coenzymeA by rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, **11**, 1717-1720.

BERRY B.W., JAMALI F. (1991) Presystemic and systemic chiral inversion of R-(-)-fenoprofen in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **258**, 695-701.

BLACK P.N., ZHANG Q., WEIMAR J.D., DIRUSSO C.C. (1997) Mutational analysis of a fatty acyl-coenzymeA synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 4896-4903.

BOELSTERLI U.A., ZIMMERMAN H.J., KRETZ-ROMMEL A. (1995) Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Molecular mechanisms and pathology. *Critical Reviews in Toxicology*, **25**, 207-235.

BROWNE G.S., NELSON C., NGUYEN T., ELLIS B.A., DAY R.O., WILLIAMS K.M. (1999) Stereoselective and substrate-dependent inhibition of hepatic mitochondria beta-oxidation and oxidative phosphorylation by the non-steroidal anti-inflammatory drugs ibuprofen, flurbiprofen, and ketorolac. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 837-844.

- BRUGGER R., GARCIA ALIA B., REICHEL C., WAIBEL R., MENZEL S., BRUNE K. GEISSLINGER G. (1996) Isolation and characterization of rat liver microsomal R-ibuprofenoyl-CoA synthetase. *Biochemical Pharmacology*, **52**, 1007-1013.
- BRUNE K., BECK W.S., GEISSLINGER G., MENZEL-SOGLOWECK S., PESKAR B.M., PESKAR B.A. (1991) Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia*, **47**, 257-261.
- CALDWELL J. (1982) Conjugation of xenobiotic carboxylic acids. In "Metabolic basis of detoxication", JAKOBY WB (Ed.) Academic Press, New York, pp. 271-289.
- CALDWELL J., HUTT A.J., FOURNEL-GIGLEUX S. (1988) The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 105-114.
- CHEN C.S., SHIEH W.R., LU P.H., HARRIMAN S., CHEN C.Y. (1991) Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1078**, 411-417.
- DAVIS N.M., SKJODT N.M. (2000) Choosing the right nonsteroidal anti-inflammatory drug for the right patient: a pharmacokinetic approach. *Clinical Pharmacokinetics*, **38**, 377-392.
- EVANS A.M. (1992) Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **42**, 237-256.
- FAERGEMAN N.J., KNUDSEN J. (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochemical Journal*, **323**, 1-12.
- FEARS R., BAGGALEY K.H., ALEXANDER R., MORGAN B., HINDLEY R.M. (1978) The participation of ethyl 4-benzyloxybenzoate (BRL 10894) and other aryl-substituted acids in glycerolipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, **19**, 3-11.
- FOSTER R.T., JAMALI F. (1988) Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metabolism and Disposition*, **16**, 623-626.
- FOURNEL-GIGLEUX S., CALDWELL J. (1986) The metabolic chiral inversion of 2-phenylpropionic acid in rat, mouse and rabbit. *Biochemical Pharmacology*, **35**, 4153-4159.
- FRENEAUX E., FROMENTY B., BERSON A., LABBE G., DEGOTT C., LETTERON P., LARREY D., PESSAYRE D. (1990) Stereoselective and nonstereoselective effects of ibuprofen enantiomers on mitochondrial β -oxydation of fatty acids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **255**, 529-535.
- FUJINO T., YAMAMOTO T. (1992) Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *Journal of Biochemistry*, **111**, 197-203.
- FUJINO T., KANG M.J., SUZUKI H., IJIMA H., YAMAMOTO T. (1996) Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 16748-16752.

- GHOSH B., BARBOSA E., SINGH I. (1995) Molecular cloning and sequencing of human palmitoyl-CoA ligase and its tissue specific expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **151**, 77-81.
- GOGNY M., PUYT J.-D. (1992) Activité thérapeutique des anti-inflammatoires non-stéroïdiens. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **168**, 603-608.
- GOTO J., GOTO N., NAMBARA T. (1982) Separation et détermination de naxoprofen énantiomères in serum by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **239**, 559-564.
- GRASER T.A., JORDAN J.C., KARP M., HOLCK M. (1991) Détermination of carprofen énantiomères: application to biological fluids and target species. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **87**, 247-248.
- HALPERN S.M., FITZPATRICK R., VOLANS G.N. (1993) Ibuprofen toxicity. A review of adverse reactions and overdose. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews*, **12**, 201/1-201/22.
- HAMMAN M.A., THOMPSON G.A., HALL S.D. (1997) Régiosélective and stéréosélective métabolisme of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochemical Pharmacology*, **54**, 33-41.
- HUTT A.J., CALDWELL J. (1983) The métabolique chiral inversion of 2-arypropioniques acids. A novel route with pharmacological conséquences, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **35**, 693-704.
- IJIMA H., FUJINO T., MINEKURA H., SUZUKI H., KANG M.J., YAMAMOTO T. (1996) Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2. *European Journal of Biochemistry*, **242**, 186-190.
- IWAKAWA S., SUGANUMA T., LEE S.-F., SPAHN H., BENET L.Z., LIN E.T. (1989) Direct détermination of diastéréomérique carprofen glucuronides in human plasma and urine and préliminaire measurements of stéréosélective métabolique and rénale élimination after orale administration of carprofen in man. *Drug Metabolism and Disposition*, **17**, 414-419.
- IWAKAWA S., SPAHN H., BENET L.Z., LIN E.T. (1991) Stéréosélective disposition of carprofen, flunoxaprofen and naproxen in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, **19**, 853-857.
- JAMALI F., BERRY B.W., TEHRANI M.R., RUSSEL A.S. (1988) Stéréosélective pharmacocinétique of flurbiprofen in humans and rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **77**, 666-669.
- JAMALI F., RUSSEL A.S., FOSTER R.T., LEMKO C. (1990) Ketoprofen pharmacocinétique in humans: évidence of énantiomérique inversion and lack of interaction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **79**, 460-461.
- JESKE A.H. (1999) COX-2 inhibiteurs and dental pain control. *J. Gt. Houst. Dent. Soc.*, **71**, 39-40.
- KANG M.J., FUJINO T., SASANO H., MINEKURA H., YABUKI N., NAGURA H., IJIMA H., YAMAMOTO T.T. (1997) A novel arachidonate-préférant acyl-CoA synthetase is présent in stéroïdogénique cells of the rat adrenal, ovaire, and testis. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **94**, 2880-2884.
- KECK G. (1992) Toxicité et effets indésirables des anti-inflammatoires non-stéroïdiens. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **168**, 615-620.

- KEMAL C, CASIDA J.E. (1992) Coenzyme A esters of 2-aryloxyphenoxypropionate herbicides and 2-arylpropionate anti-inflammatory drugs are potent and stereoselective inhibitors of rat liver acetyl-CoA carboxylase. *Life Sciences*, **50**, 533-540.
- KEMMERER J.M., RUBIO F.A., McCLAIN R.M., KOECHLIN B.A., (1979) Stereospecific assay and stereospecific disposition of racemic carprofen in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **68**, 1274-1280.
- KNALDER M.P., HALL S.D. (1990) Stereoselective arylpropionyl-CoA thioester formation *in vitro*. *Chirality*, **2**, 67-73.
- KNALDER M.P., BRATER D.C., HALL S.D. (1992) Stereoselective disposition of flurbiprofen in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **33**, 369-375.
- KNIGHTS K.M., DREW R., MEFFIN P.J. (1988) Enantiospecific formation of fenoprofen coenzyme A thioester *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 3539-3542.
- KNIHINICKI R.D., DAY R.O., GRAHAM G.G., WILLIAMS K.M. (1990) Stereoselective disposition of ibuprofen and flurbiprofen in rats. *Chirality*, **2**, 134-140.
- LEE E.J.D., WILLIAMS K., DAY R., GRAHAM G., CHAMPION D. (1985) Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **19**, 669-674.
- LEE Y.C., GEE W.L., BENET L.Z., LIN E.T. (1986) Stereoselective analysis of carprofen in plasma by HPLC using precolumn derivatization. *Pharmaceutical Research*, **3**, 7S.
- LEES P., DELATOUR P., BENOIT E., FOSTER A.P. (1991) Stereospecific pharmacodynamics of carprofen enantiomers in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **87**, 249-251.
- LIU L., DUDLER T., GELB M.H. (1996) Purification of a protein palmitoyltransferase that acts on H-Ras protein and on a C-terminal N-Ras peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23269-23276.
- MANOUKIAN A.V., CARSON J.L. (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatic disorders: incidence and prevention. *Drug Safety*, **15**, 64-71.
- MASUBUCHI Y., SAITO H., HORIE T. (1998) Structural requirements for hepatotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated rat hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **287**, 208-213.
- McCARTHY D.M. (1999) Comparative toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.*, **107**, 37-47.
- MENZEL-SOGLOWEK S., GEISLINGER G., BECK W.S., BRUNE K. (1992) Variability of inversion of (R)- flurbiprofen in different species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **81**, 888-891.
- MEROT Y., HARMS M., SAURAT J.H. (1983) Photosensibilisation au carprofène (Imadil ®), un nouvel anti-inflammatoire non-stéroïdien. *Dermatologica*, **166**, 301-307.

- MERRIL C.R., GOLDMAN D., SEDMAN S.A., EBERT M.H. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, **211**, 1437-1438.
- MULDER G.J., COUGHTRIE M.W.H., BURCHELL B. (1990) Glucuronidation. In "Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach", Mulder G.J. (Ed) Taylor & Francis, Londres, pp. 51-105.
- MURRAY M.D., BRATER D.C. (1997) Effects of NSAIDs on the kidney. *Progress in Drug Research*, **49**, 155-171
- NEUPERT W., BRUGGER R., EUCHENHOFER C., BRUNE K., GEISSLINGER G. (1997) Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases. *British Journal of Pharmacology*, **122**, 487-492.
- NICOLL-GRIFFITH D.A., INABA T., TANG B.K., KALOW W. (1988) Method to determine the enantiomers of ibuprofen from human urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **428**, 103-112.
- OIKAWA E., IJIMA H., SUZUKI T., SASANO H., SATO H., KAMATAKI A., NAGURA H., KANG M.J., FUJINO T., SUZUKI H., YAMAMOTO T.T. (1998) A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *Journal of Biochemistry*, **124**, 679-685.
- PICOT D., LOLL P.J., GARAVITO R.M. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein, prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature*, **367**, 243-249.
- PRESLE N., LAPICQUE F., FOURNEL-GIGLEUX S., MAGDALOU J., NETTER P. (1996) Stereoselective irreversible binding of ketoprofen glucuronides to albumin. Characterization of the site and the mechanism. *Drug Metabolism and Disposition*, **24**, 1050-1057.
- PUSPOK A., KIENER H.P., OBERHUBER G. (2000) Clinical, endoscopic, and histologic spectrum of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced lesions in the colon. *Dis. Colon Rectum*, **43**, 685-691.
- RIEDER M.J. (1993) Immunopharmacology and adverse drug reactions. *Journal of Clinical Pharmacology*, **33**, 316-323.
- ROSSETTI V., LOMBARD A., BUFFA M., CASSONE M.C. (1986) Studies on the stereoisomeric inversion of ketoprofen in rats. *IRCS Medical Science*, **14**, 256-257.
- RUBIN A., RODDA B.E., WARRICK P., RIDOLFO A.S., GRUBER C.M. (1972a) Physiological disposition of fenoprofen in man. II. Plasma and urine pharmacokinetics after oral and intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **61**, 739-745.
- RUBIN A., WARRICK P., WOLEN R.L., CHERNISH S.M., RIDOLFO A.S., GRUBER C.M. (1972b) Physiological disposition of fenoprofen in man. III. Metabolism and protein binding of fenoprofen. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **183**, 449-457.

- RUBIN A., KNALDER M.P., HO P.P.K., BECHTOL L.D., WOLEN R.L. (1985) Stereoselective inversion of (R)- fenoprofen to (S)- fenoprofen in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **74**, 82-84.
- RUDY A.C., KNIGHT P.M., BRATER D.C., HALL S.D. (1991) Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: Administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **259**, 1133-1138.
- SALLUSTIO B.C., MEFFIN P.J. KNIGHTS K.M. (1988) The stereospecific incorporation of fenoprofen into rat hepatocyte and adipose triacylglycerols. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 1919-1923.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SANINS S.M., ADAMS W.J., KAISER D.G., HALSTEAD G.W., BAILLIE T.A. (1990) Studies on the metabolism and chiral inversion of ibuprofen in isolated rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, **18**, 527-533.
- SEVOZ C., BENOIT E., BURONFOSSE T. (2000) Thioesterification of 2-arylpropionic acids by recombinant acyl-coenzyme A synthetases (ACS1 and ACS2). *Drug Metabolism and Disposition*, **28**, 398-402.
- SHIRLEY M.A., GUAN X., KAISER D.G., HALSTEAD G.W., BAILLIE T.A. (1994) Taurine conjugation of ibuprofen in human and rat liver *in vitro*. Relationship to metabolic chiral inversion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **269**, 1166-1175.
- SING G., RAMEY D.R., MORFELD D., FRIES J.F. (1994) Comparative toxicity of non-steroidal anti-inflammatory agents. *Pharmacology and Therapeutics*, **62**, 175-191.
- SMITH P.C., McDONAGH A.F., BENET L.Z. (1986) Irreversible binding of zomepirac to plasma protein *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Clinical Investigation*, **77**, 934-939.
- SOLL A.H., MCCARTHY D. (1999) NSAID-related gastrointestinal complications. *Clin. Cornerstone*, **1**, 42-56.
- SORACI A., BENOIT E., DELATOUR P. (1995) Comparative metabolism of R(-)-fenoprofen in rats and sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 167-171.
- SORACI A., JAUSSAUD P., BENOIT E., DELATOUR P. (1996) Chiral inversion of fenoprofen in horses and dogs : an *in vivo*, *in vitro* study. *Veterinary Research*, **27**, 13-22.
- SUZUKI H., KAWARABAYASI Y., KONDO J., ABE T., NISHIKAWA K., KIMURA S., HASHIMOTO T., YAMAMOTO T. (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 8681-8685.
- TANAKA T., HOSAKA K., HOSHIMARU M., NUMA S. (1979) Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme A synthetase from rat liver. *European Journal of Biochemistry*, **98**, 165-172.

TANAKA Y., SHIMOMURA Y., HIROTA T., NOZAKI A., EBATA M., TAKASAKI W., SHIGEYAMA 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**, 342-348.

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. *Molecular Pharmacology*, **56**, 226-234.

VAN BREEMEN R.B., FENSELAU C. (1985) Acylation of albumin by 1-O-acyl glucuronids. *Drug Metabolism and Disposition*, **13**, 318-320.

VANE J.R., BOTTING R.M. (1996) Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, **25**, 9-21.

VANE J.R., BOTTING R.M. (1997) Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Seminar in Arthritis and Rheumatism*, **26**, 2-10.

VERBEEK R.K., BLACKBURN J.L., LOEWEN G.R. (1983) Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs; *Clinical Pharmacokinetics*, **8**, 297-331

VILLAVERDE C., ALVAREZ A.I., REDONDO P., VOCES J., DEL ESTAL J.L., PRIETO J.G. (1995) Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica*, **25**, 433-441.

WILLIAMS K., DAY R., KNIHINICKI R., DUFFIELD A. (1986) The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue. *Biochemical Pharmacology*, **35** 3403-3405.

YAMAGUCHI T., NAKUMARA Y. (1987) Stereoselective metabolism of 2-phenylpropionic acid in rat. II. Studies on the organs responsible for the optical isomerization of 2-phenylpropionic acid in rat *in-vivo*. *Drug Metabolism and Disposition*, **15**, 535-539.

ZHAO B., GEISSLINGER G., HALL I., DAY R., WILLIAMS K. (1992) The effect of the enantiomers of ibuprofen and flurbiprofen on the β -oxidation of palmitate in the rat. *Chirality*, **4**, 137-141.

ZIMMERMAN H.J. (1990) Update of hepatotoxicity due to classes of drugs in common clinical use: nonsteroidal drugs anti-inflammatory drugs, antibiotics, antihypertensives, and cardiac and psychotropic agents. *Seminars in Liver Disease*, **10** : 322-33

LISTE DES ABREVIATIONS

ACBP : *acyl-coenzyme A binding protein*
ACC : acétyl-coenzyme A carboxylase
ACS : acyl-coenzyme A synthétase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS : anti-inflammatoire non-stéroïdien(s)
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
COX : cyclooxygénase(s)
CYP: cytochrome-P450
DO: densité optique
E. coli : *Escherishia coli*
EGF : *epidermal growth factor*
ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*
FABP: *fatty acid binding protein*
FPF : fénoprofène
FluPF : flurbiprofène
HPLC : *high performance liquid chromatography*
IFN: interféron
IL: interleukine
IPF : ibuprofène
IPTG : isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
kDa: kilodalton
Km: constante de Michaelis = concentration du substrat à $V_m/2$
KPF : kétoprofène
LR : région « luciferase-like »
LT : leucotriène
PCR : *polymerase chain reaction*
PG : prostaglandine(s)
PPRE : *peroxysome proliferator responsive element*
RT: rétrotranscription (*reverse transcription*)
SCP : *sterol carrier protein*
SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
V_m : vitesse maximale

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

<i>Figure 1.- Structure générale des profènes, dérivés de l'acide 2-aryl propionique.</i>	2
<i>Figure 2.- Structure développée de quelques profènes.</i>	2
<i>Figure 3.- Cascade des eicosanoïdes.</i>	4
<i>Figure 4.- Rôles biologiques respectifs des deux isoformes de la cyclo-oxygénase</i>	6
<i>Figure 5.- Voies métaboliques des molécules à fonction aryl-carboxylique.</i>	16
<i>Figure 6.- Variations de l'inversion chirale.</i>	20
<i>Figure 7.- Mécanisme de l'inversion chirale.</i>	24
<i>Figure 8.- Comparaison des acides aminés de l'ACS5 de rat, à ceux des quatre autres ACS connues chez le rat.</i>	26
<i>Figure 9.- Schéma indiquant les positions relatives des différentes amorces utilisées</i>	31
<i>Figure 10.- Schéma illustrant les positions relatives des deux amorces C- et N-His</i>	33

Liste des tableaux

<i>Tableau 1.- Stéréosélectivité d'action des profènes.</i>	6
<i>Tableau 2.- Données générales de l'inversion chirale de profènes chez différentes espèces</i>	22
<i>Tableau 3.- Localisation de l'inversion chirale du KPF, du FPF et de l'IPF</i>	22
<i>Tableau 4.- Synthèse de la purification de l'ACS5</i>	39
<i>Tableau 5.- Les différentes constantes cinétiques des trois formes enzymatiques produites pour chacun des substrats testés.</i>	39
<i>Tableau 6.- Constantes cinétiques de la thioestérification de trois substrats par l'ACS1r, l'ACS2r et l'ACS5r</i>	46

<i>Tableau 7.- Valeurs d'activité de microsomes de deux tissus vis-à-vis de l'acide palmitique et du FPF</i>	46
--	----

Liste des photos

<i>Photo I.- Purification ACS5-His par colonne nickel, différentes fractions.</i>	41
<i>Photo II.- Quantification de l'ACS5r purifiée sur colonne Blue Cibacron par comparaison à une gamme BSA.</i>	41
<i>Photo III.- Western Blot de microsomes hépatiques, d'ACS1r purifiée, de microsomes intestinaux, d'ACS5r purifiée, révélés par des anticorps polyclonaux anti palmitoyl-coenzyme A ligase hépatique et des anticorps anti ACS5 C-His</i>	43

FRETTON Jérôme

IMPLICATION DE L'ACYL-COENZYME A SYNTHETASE 5 DE RAT DANS LA THIOESTERIFICATION INTESTINALE DES PROFENES.

Thèse Vétérinaire : LYON 2000

RESUME :

Les profènes sont des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, médicaments parmi les plus largement utilisés sous et hors contrôle médical à travers le monde. Souvent administrés *per os*, ils ont une toxicité marquée sur le tractus digestif. La thioestérification par le coenzyme A, catalysée par des acyl-coenzyme A synthétases (ACS), est une voie métabolique importante pour ces acides carboxyliques. Celle-ci se produit très majoritairement dans le foie. Cependant, il existe une thioestérification présystémique extra-hépatique au niveau intestinal. Dans l'intestin, deux isoformes d'ACS sont présentes : l'ACS1 et l'ACS5. L'ACS1 est capable de catalyser la thioestérification des profènes. L'objet de ce travail est de savoir si l'ACS5 est capable de faire de même.

Une ACS5 recombinante hétérologue a été produite dans un système d'expression procaryote et les propriétés catalytiques de celle-ci examinées à l'égard de l'acide palmitique et des profènes. Les constantes cinétiques obtenues ont été comparées à d'autres travaux sur l'ACS1 et l'ACS2.

L'ACS5 catalyse la thioestérification de l'acide palmitique avec une faible affinité mais une forte capacité, et celle des profènes avec une faible affinité et une faible capacité. Elle semble être l'isoforme majoritairement présente au niveau intestinal, et probablement n'est pas responsable de la thioestérification intestinale extra-hépatique et présystémique observée pour le FPF et l'IPF chez le rat.

MOTS CLES :

-Thioestérification
-Profènes
-Palmitoyl-Coenzyme A ligase
-Intestin
-Rat

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Gabriel BAVEREL
1^{er} Assesseur : Monsieur le Professeur Etienne BENOÎT
2^{ème} Assesseur : Monsieur le Professeur Philippe JAUSSAUD

DATE DE SOUTENANCE :

18 décembre 2000

ADRESSE DE L'AUTEUR :

18, CHEMIN DE PLAMBOIS
38 110 SAINT DIDIER DE LA TOUR