

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2002 - Thèse n° 135

**THIOESTERIFICATION
DES ACIDES ARYL-2-PROPIONIQUES
PAR LES ACYL-COA SYNTHETASES :
ACS1 ET ACS2.**

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 2 juillet 2002
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BINOIS Agathe
Née le 23/01/1976
à la Seyne sur mer



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

Directeur : Professeur J.-F. CHARY

Le 15 Septembre 2001

DEPARTEMENT	PREX	PRE1	PRE2	MC	Commisnel, associé & IPAC	AERC	Chargés de conseil et d'enseignement
DEPART. SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie G&H, Pathologie infectieuses Parasitologie & Maladies parasitaires Qualité et Sécurité des Aliments Législation & Jurisprudence		Y. RICHARD M. PRAVE C. CHAUVE G. CHANTEGRELET	A. LACHERETZ G. BOURDOISEAU P. DEMONT A. LACHERETZ	A. KODJO D. GREZEL V. GUERIN J. VIALARD MP CALLAIT L. ZENNER C. VERNOZY A. GONTHIER	M. ARTOIS FR associé		
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE Anatomie Omnivie et Anesthésiologie Anatomie-pathologique/Dermatologie-Oncologie		E. CHATELAIN J.P. GENEVOIS J.P. MAGNOL	T. ROGER D. FAU	M.A. BERTHELET S. SAWAYA E. TRONCY D. REMY T. MARCHAL	G. CHANOIT MC	C. CAROZZO	N. DISS M. JUNOT R. PARLAUT C. DECOSNS JUNOT
DEPART. DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootéchnie, Ethologie & Economie rurale Nutrition et Alimentation Riel & Patho de la Reproduction Patho Animaux de Production		M. FRANCK J.P. DESCHANEL F. BADINAND P. BEZILLE	J.L. CADORE M. RACHAIL-BRETTIN T. ALOGRINOUIWA	L. CHABANNE P. BARTHEZ	I. BURLLOT A. JONGH-ARAGON MC MC	F. PONCE C. ESCRIOU	M. HUGONNARD.
DEPART. SCIENCES BIOLOGIQUES Physiologie Adaptatives Biophysique/Biochimie Génétique et Biologie moléculaire Pharmacologie / Toxicologie Législation de Médicaments Dio-Méthodologiques	P. DELATOUR G. LONGUE	R. BOIVIN P. GARNIER	E. BENOIT F. GRAIN P. JAUSSAUD G. XECK	D. GRANCHER L. ALYES de OLIVEIRA G. EGON P. GUERIN S. MARTINOT R. FRUKHA M.A. ABCANGHOLI D. LE GRAND	A. DERNBURG L. MOUNIER MC contractuel MC contractuel		S. BUFF N. GIBAUD.
DEPART. REPTILES Pathologie Equine Chirurgie Equine Expertise microscopique		O. LEPAGE	J.L. CADORE C. FLEURY	A. LEBLOND	C. FARMER A. FAVIER		
					A. BERNAMOU-SMITH E. CAUVIN MC MC		

A Monsieur le Professeur MORIN

De la faculté de médecine de Lyon
Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse,
Pour l'intérêt qu'il a témoigné à nos recherches,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Thierry BURONFOSSE

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
Qui nous a encadrés dans l'élaboration de cette thèse,
Pour la confiance qu'il nous a accordée,
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur VERNOZY

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Sincères remerciements.

A mes 2 grands-mères

ma ténacité et mon humeur aventureuse sont un peu corses
mon enthousiasme et ma joie de vivre sûrement belges.

A mes parents

pour leur soutien, leurs leçons de courage
car après la pluie vient toujours le beau temps.

A mes frères

si grands de cœur
Qu'on oublie leur taille.

A mes neveux et nièce

cette génération future.

A mes amis nombreux

toutes ces fêtes partagées
toutes celles à venir
et si je n'en cite aucun
c'est de peur d'en oublier un.

A Nanette, Jacqueline, Pierre

pour m'avoir permis d'étudier.

A Madeleine

A Didier

et tous ceux qui ne sont plus là
mais qui seraient sûrement fiers de moi.

INTRODUCTION	1
I^{ERE} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
I. PHARMACOLOGIE DES ACIDES ARYL-2-PROPIONIQUES	3
A. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET CONSEQUENCES BIOLOGIQUES	3
B. PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES	6
1. <i>physiopathologie de l'inflammation</i>	6
2. <i>les cyclo-oxygénases</i>	7
a) <i>structure</i>	7
b) <i>Rôle biologique respectif des isoformes de la cyclo-oxygénase</i>	7
c) <i>Inhibition par les profènes</i>	8
C. EFFETS SECONDAIRES ET EFFETS INDESIRABLES	10
1. <i>effets COX-dépendants</i>	10
a) <i>Effets gastro-intestinaux</i>	10
b) <i>Effets rénaux</i>	10
2. <i>effets cox-indépendants</i>	11
a) <i>Toxicité hépatique</i>	11
b) <i>Autres toxicités</i>	12
D. METABOLISME	13
1. <i>Oxydation</i>	13
2. <i>Glucuroconjugaison</i>	13
a) <i>mecanisme</i>	14
b) <i>enantiosélectivité</i>	14
c) <i>elimination</i>	15
3. <i>Thioestérification</i>	17
a) <i>mise en evidence</i>	17
b) <i>mécanisme</i>	18
c) <i>localisation</i>	18
d) <i>variations d'espèces et de composés</i>	18
e) <i>Caractérisation du système enzymatique</i>	19
II. LES ACYL-COA SYNTHETASES	21
A. NOMENCLATURE	21
B. LOCALISATION ET FONCTIONS BIOLOGIQUES	22
C. STRUCTURE ET TOPOGRAPHIE	25
D. HOMOLOGIE DE SEQUENCES	26
E. DOMAINES FONCTIONNELS	27
III. DEVENIR ET ROLES DES PROFENYL-COENZYME A	29
A. INVERSION CHIRALE	30
1. <i>mise en évidence</i>	30
2. <i>mécanisme de l'inversion chirale</i>	32
B. CONJUGAISON AUX ACIDES AMINES	33
C. INHIBITION DE LA β -OXYDATION MITOCHONDRIALE	34
D. INHIBITION DE L'ACETYL-COA CARBOXYLASE	35
E. INCORPORATION DANS LES LIPIDES HYBRIDES	35
F. ACYLATION DE PROTEINES	36
G. INHIBITION DE LA CYCLO-OXYGENASE 2	36

II^{EME} PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	39
I. MATERIELS ET METHODES	40
A. ANIMAUX	40
B. REACTIFS	40
C. METHODES	41
1. Préparation des ARN	41
2. Reverse Transcription Polymérase Chain Reaction (PCR)	41
3. Construction d'un plasmide d'expression d'ACS	42
4. Induction par <i>E.Coli</i> et purification de ACS1 et de ACS2	43
5. Essais pour l'activité des ACS	43
6. Etudes enzymatiques des ACS recombinantes	44
7. Electrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (PAGE) et immunobloting	45
a) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS, technique de Laemli.	45
b) Western blot	45
8. Analyse des données	46
II. RESULTATS	46
A. AMPLIFICATION ET PURIFICATION DES ACS1 ET ACS2	46
B. Caractérisation des enzymes recombinantes ACS1 et ACS2	49
C. Capacité des ACS1 et ACS2 recombinantes à métaboliser les acides aryl-2-propioniques	51
III^{EME} PARTIE :	53
DISCUSSION	53
BIBLIOGRAPHIE	62

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Acide 2-phénylpropionique
Figure 2 : Enantiomères *R* et *S* des profènes
Figure 3 : Acides aryl-2-propioniques commercialisés en France
Figure 4 : Cascade de l'acide arachidonique
Figure 5 : Rôle biologique respectif des isoformes de la cyclo-oxygénase
Figure 6 : Réaction de glucuronoconjugaison des profènes
Figure 7 : Les deux mécanismes de la formation d'adduits
Figure 8 : Thioestérification des acides aryl-2-propioniques
Figure 9 : Représentation schématique de la structure des ACS
Figure 10 : Homologie de séquences primaires entre les membres des deux sous-familles des rACS
Figure 11 : Profils plasmatiques des énantiomères de l'ibuprofène après administration de ce composé chez l'homme
Figure 12 : Variations de l'inversion chirale
Figure 13 : Mécanisme de l'inversion chirale des profènes
Figure 14 : Concentration d'acyl-CoA libres en présence d'ACBP ou de FABP
Figure 15 : SDS-PAGE des différentes étapes de purification de l'ACS1 recombinante
Figure 16 : SDS-PAGE des différentes étapes de purification de l'ACS2 recombinante
Figure 17 : Comparaison de la spécificité de substrat de l'ACS1 et l'ACS2 recombinantes envers les principaux acides gras saturés
Figure 18 : Représentation des cinétiques enzymatiques du *R*(-) -IPF et du *R*(-) -FPF par l'ACS1 recombinante

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Enantiosélectivité *in vitro* de la glucuronoconjugaison des profènes
Tableau 2 : Dénomination des formes orthologues d'ACS
Tableau 3 : Distribution tissulaire des ACS
Tableau 4 : Homologies de séquences primaires entre les différentes isoformes d'ACS
Figure 11 : Homologie de séquences primaires entre la « click-beetle » luciférase et la rACS1
Tableau 5 : Stéréosélectivité de l'action des profènes *in vitro* et *in vivo*
Tableau 6 : Résumé des étapes de purification de l'ACS1 recombinante
Tableau 7 : Résumé des étapes de purification de l'ACS2 recombinante
Tableau 8 : Constantes cinétiques de la thioestérification de l'acide palmitique, du *R*(-) -FPF et du *R*(-) -IPF pour les formes recombinantes de l'ACS1 et de l'ACS2

INTRODUCTION

Les profènes ou acides aryl-2-propioniques sont des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Cette classe thérapeutique est très largement utilisée pour ses propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques. Au plan structural, ces molécules présentent un centre d'asymétrie et existent donc sous la forme de deux énantiomères *R*(-) et *S*(+) qui diffèrent par leurs propriétés biologiques. En effet, l'énantiomère *R*(-)-profène est très faiblement actif contrairement à son antipode le *S*(+)-profène qui est considéré comme portant l'ensemble des propriétés pharmacologiques.

Au plan métabolique, ces énantiomères présentent également des propriétés individuelles. Un mécanisme particulier, connu sous l'appellation d'inversion chirale, conduit, après administration de l'énantiomère *R*(-) inactif, à l'apparition dans l'organisme de son antipode actif, l'énantiomère *S*(+). Cette réaction présente d'importantes variations, qualitative et quantitative, selon l'espèce animale, le profène utilisé ou l'état physiologique de l'individu considéré. L'inversion chirale se décompose en trois étapes successives : la thioestérification du profène par le Coenzyme A, l'épimérisation du thioester puis l'hydrolyse libérant le profène dans sa configuration opposée. La première étape est la réaction limitante et déterminante du mécanisme. Elle est catalysée par l'acyl-CoA synthétase, enzyme qui présente une spécificité de substrat importante et qui n'accepte que la configuration *R*(-) des profènes catalysés.

Récemment, cinq isoformes d'acyl-CoA synthétase (ACS1 à ACS5) ont été caractérisées mais leur importance relative dans l'inversion chirale des différents profènes reste à définir. Ces enzymes catalysent la thioestérification des acides gras à longue chaîne et de fortes préseptions laissent envisager la participation de l'ACS1 dans la thioestérification de l'ibuprofène (12). Ces enzymes présentent une spécificité d'expression tissulaire marquée qui pourrait expliquer, au moins en partie, les capacités différentes des organes à réaliser l'inversion chirale. En effet, récemment, l'existence d'une inversion chirale cérébrale a été mise en évidence (104). Hormis l'importance quantitative limitée de ce mécanisme dans le cerveau, cette voie métabolique peut être à l'origine de propriétés pharmacologiques importantes dans cet organe.

L'objectif de ce travail est de déterminer les capacités de l'ACS1, isoforme principalement exprimée dans le foie, et de l'ACS2, isoforme cérébrale, à thioestérifier le fénopropène et l'ibuprofène. L'activité de thioestérification et la spécificité de substrat de l'isoforme présente dans le cerveau: l'ACS2, afin d'envisager l'implication de cette première étape dans le phénomène de l'inversion chirale.

I^{ERE} PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PHARMACOLOGIE DES ACIDES ARYL-2-PROPIONIQUES

A. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET CONSEQUENCES BIOLOGIQUES

Les profènes sont des acides faibles, leur pKa est compris entre 3.5 et 5. Ils sont donc insolubles dans l'eau neutre et deviennent solubles dans les solutions alcalines telles que le sang (pH=7.4). Ils sont relativement liposolubles. Leur absorption après administration orale est donc rapide et complète. La diffusion tissulaire est limitée, leur localisation reste surtout extracellulaire, liquidienne (sang, exsudat inflammatoire...).

Dans le sang, les profènes sont à plus de 95% liés aux protéines plasmatiques. Donc seulement 5%, correspondant à la fraction libre, est pharmacologiquement actif. Cette forme libre peut diffuser dans l'organisme, et subir les biotransformations hépatiques et la filtration glomérulaire. La forme liée peut être assimilée à une forme de transport ou de stockage, car la fixation est un processus réversible et dynamique répondant à la loi d'action de masse ; les formes libre et liée sont donc toujours en équilibre.

Leur élimination se fait par voie urinaire après des biotransformations hépatiques essentiellement. La demi-vie de ces composés varie en fonction de l'espèce. En effet, les carnivores ont un pH urinaire acide et réabsorbent plus ces molécules au niveau tubulaire que les herbivores qui ont un pH urinaire alcalin. Le temps de demi-vie est donc augmenté chez les carnivores.

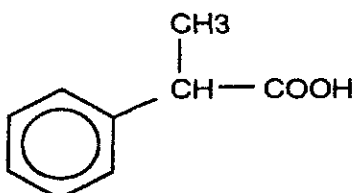


Figure 1 : Acide 2-phénylpropionique

L'acide 2-phénylpropionique (Fig. 1) est le motif structural de base des profènes. Ces composés possèdent un carbone asymétrique situé en position α de la fonction carboxylique et existent donc sous la forme de deux énantiomères de configuration spatiale opposée : *R*(-) et *S*(+). Les énantiomères *R* et *S* sont images l'un de l'autre dans un miroir et sont non superposables (Fig.2). De plus, ils dévient le plan d'une lumière polarisée dans des sens opposés : vers la droite pour la forme dextrogyre (+) et vers la gauche pour la forme lévogyre(-). Le mélange équimolaire de deux énantiomères est dit racémique et est optiquement inactif par compensation des deux pouvoirs rotatoires. Les profènes sont commercialisés dans l'Union Européenne sous forme de mélange racémique (à l'exception du naproxène).

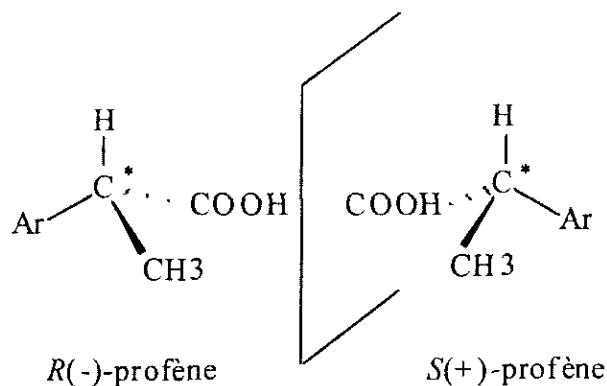
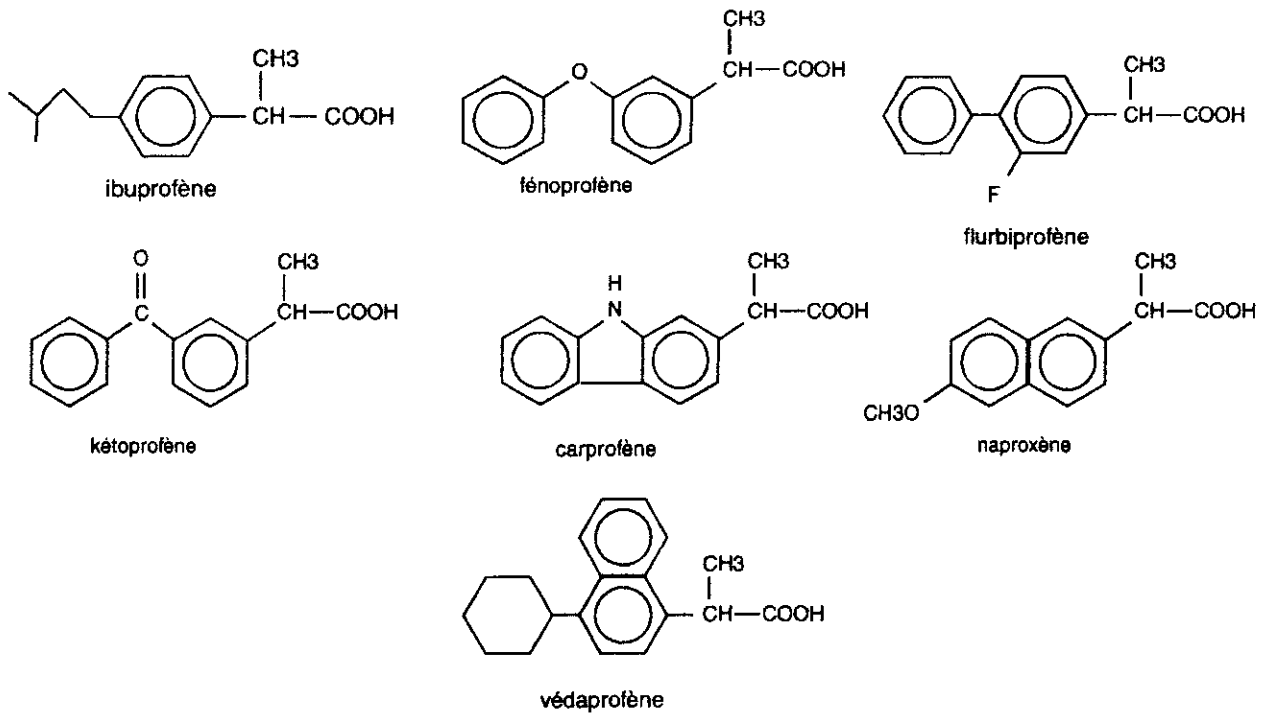


Figure 2 : Enantiomères *R* et *S* des profènes

L'introduction dans un milieu biologique anisotrope de deux molécules chirales va entraîner des différences de comportement pharmacocinétique et pharmacodynamique entre les deux énantiomères. L'interaction entre une molécule chirale et sa cible biologique (enzyme, récepteur, transporteur) est stéréosélective, voire stéréospécifique. Le rapport eudismique *S/R*, défini comme le rapport des activités biologiques des deux isomères, peut atteindre, *in vitro*, des valeurs proches de 1000 démontrant ainsi l'importance de la stéréosélectivité dans le mécanisme d'action des profènes.⁽¹⁵⁾ Ainsi, l'action pharmacodynamique des profènes est stéréosélective de l'énantiomère *S*(+).

En médecine vétérinaire



En médecine humaine

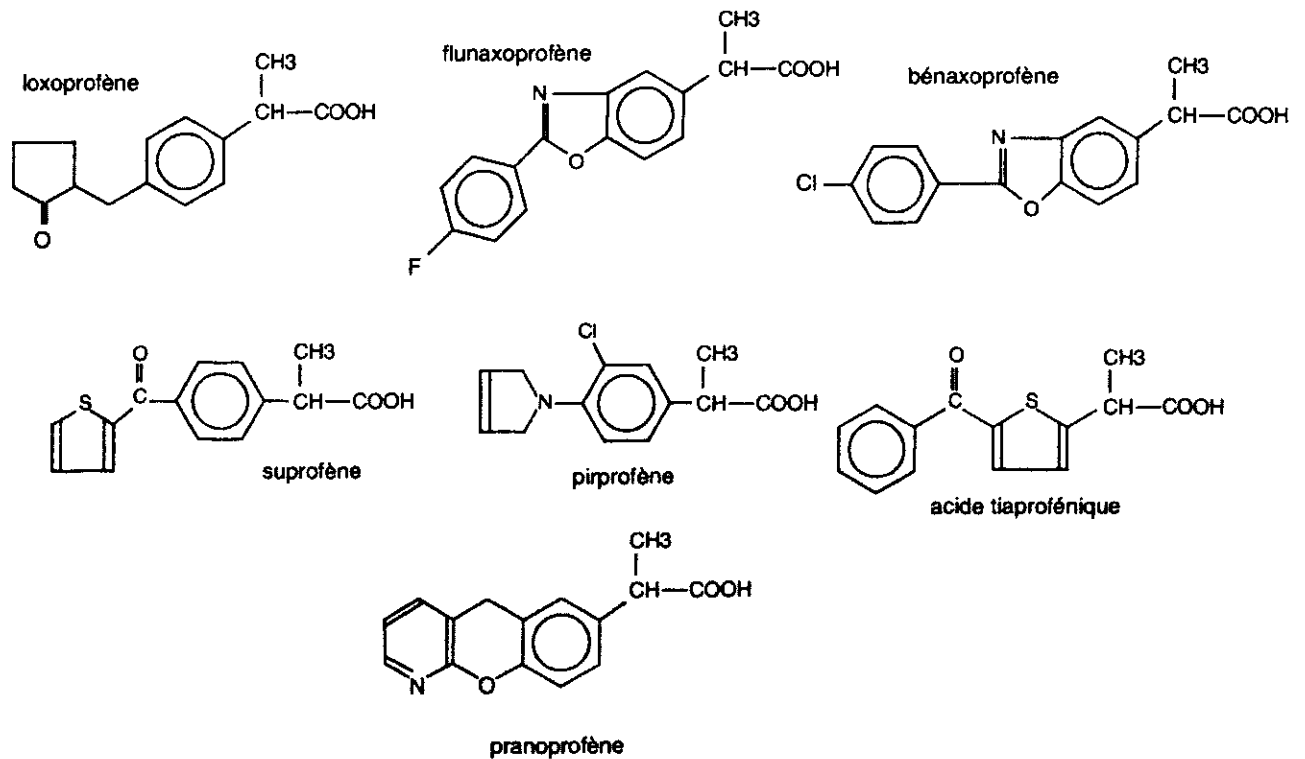


Figure 3 : Acides aryl-2-propioniques commercialisés en France

B. PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES

Les profènes diminuent la synthèse des prostaglandines. Ils inhibent les cyclo-oxygénases (COX), empêchant ainsi la formation des prostaglandines (PG) à partir de l'acide arachidonique.

1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFLAMMATION

En réponse à un stimulus hormonal, chimique ou mécanique, la phospholipase A₂ hydrolyse les phospholipides membranaires et libère ainsi l'acide arachidonique, acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone. Cet acide est substrat de deux enzymes, la cyclo-oxygénase (COX) responsable de la formation des prostaglandines (PG), prostacyclines (PGI₂) et thromboxanes (TX) et la 5-lipo-oxygénase (5-LO) responsable de la formation des leucotriènes (LT). Les profènes, sous leur configuration S(+), sont de puissants inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (Fig.4).

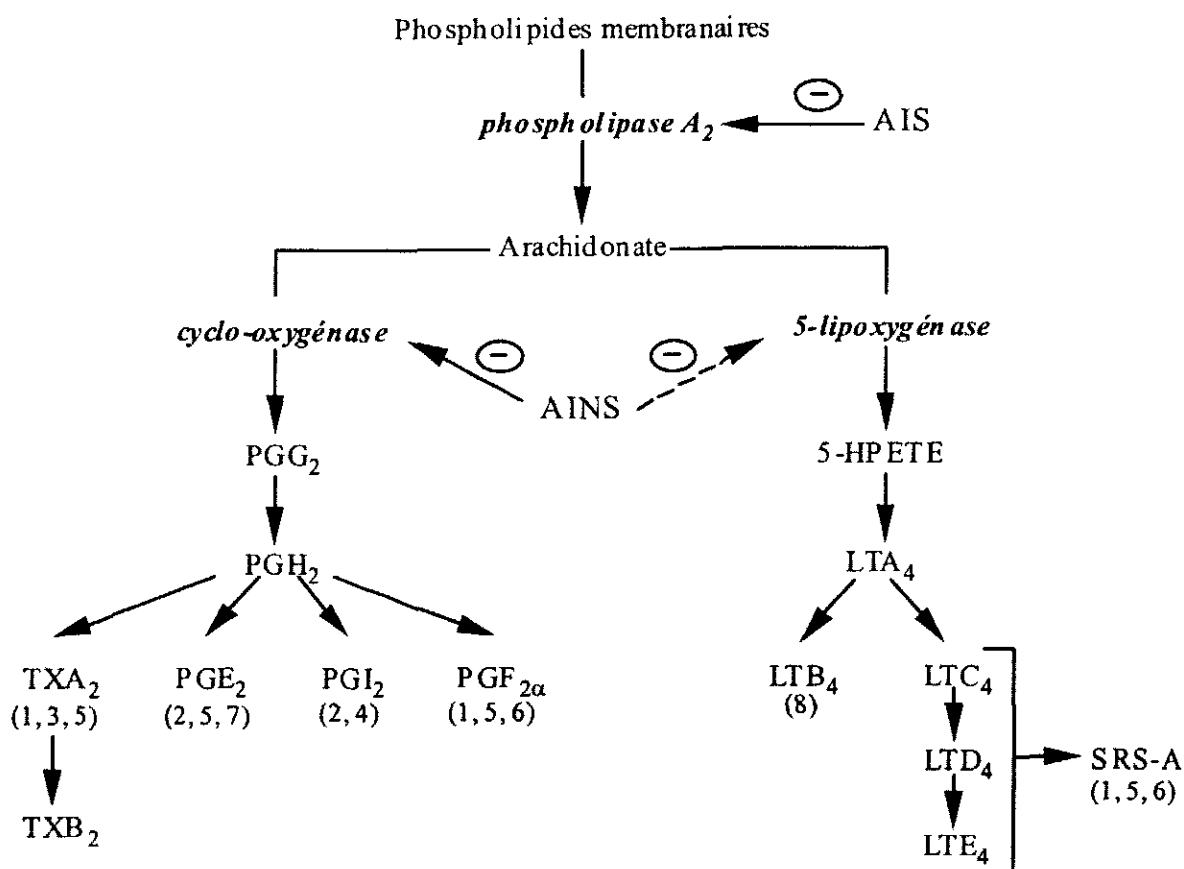


Figure 4: Cascade de l'acide arachidonique
(d'après Johnston and Budsberg, 1997)(53)

1 : vasoconstriction ; 2 : vasodilatation ; 3 : agrégant plaquettaire ; 4 : anti-agrégant plaquettaire
5 : contraction des fibres musculaires lisses ; 6 : bronchoconstricteur ; 7 : bronchodilatateur
8 : chimiotactisme, agrégation et dégranulation des leucocytes.

Les PGE₂ et PGI₂ sont de puissants médiateurs de l'inflammation, à l'origine de l'apparition de l'érythème et de l'œdème et sont impliqués, avec d'autres composés comme la bradykinine ou l'histamine, dans la genèse de la douleur et de la fièvre. Les conjugués des LTC₄, D₄ et E₄ et forment la SRS-A (« slow reacting substance of anaphylaxis ») et participent à la pathogénie de l'asthme et des réactions anaphylactiques. Le LTB₄ est un puissant agent d'attraction et d'activation des leucocytes.

2. LES CYCLO-OXYGENASES

a) STRUCTURE

La cyclo-oxygénase ou prostaglandine endoperoxyde synthase est une hémoprotéine membranaire bifonctionnelle, possédant à la fois une activité cyclo-oxygénase (oxydation de l'acide arachidonique en PGG₂) et une activité peroxydase (peroxydation de PGG₂ en PGH₂). Deux isoformes de la cyclo-oxygénase sont connues : COX-1 et COX-2. Les deux isoformes COX-1 et COX-2 possèdent les mêmes constantes cinétiques vis-à-vis de l'acide arachidonique.

Elles ont plus de 60% d'homologie et présentent une structure tridimensionnelle peu différente.

Trois unités fonctionnelles ont été mises en évidence : un domaine *N*-proximal de type « epidermal-growth-factor », un domaine d'ancrage membranaire et un domaine catalytique *C*-terminal où les deux sites, cyclo-oxygénase et peroxydase, sont adjacents mais distincts dans l'espace. Le site cyclo-oxygénase est constitué par un étroit et profond canal hydrophobe, dans lequel s'introduit et se fixe l'acide arachidonique par sa fonction carboxylique.(96) La différence de structure entre les deux isoformes serait une plus grande largeur du site cyclo-oxygénase de COX-2, du fait du remplacement d'une isoleucine par une valine moins encombrante. Cette substitution aboutirait à l'ouverture d'un diverticule supplémentaire le long du canal du site actif (67).

b) ROLE BIOLOGIQUE RESPECTIF DES ISOFORMES DE LA CYCLO-OXYGENASE

Il existe deux cyclo-oxygénases. L'une est synthétisée en permanence (COX 1), l'autre est absente des tissus sains (COX 2) et sa synthèse est induite par les stimuli pro-inflammatoires (cytokines, facteurs de croissances, endotoxines, liposaccharides bactériens).La COX-2 provoque la synthèse des prostaglandines impliquées dans l'inflammation. (25, 128, 129) Ainsi, l'inhibition de l'isoforme COX-1 est responsable des effets indésirables les plus fréquents des AINS (effets gastro-intestinaux et rénaux) tandis que l'inhibition de COX-2 est responsable de l'activité anti-inflammatoire(128) (Fig.5).

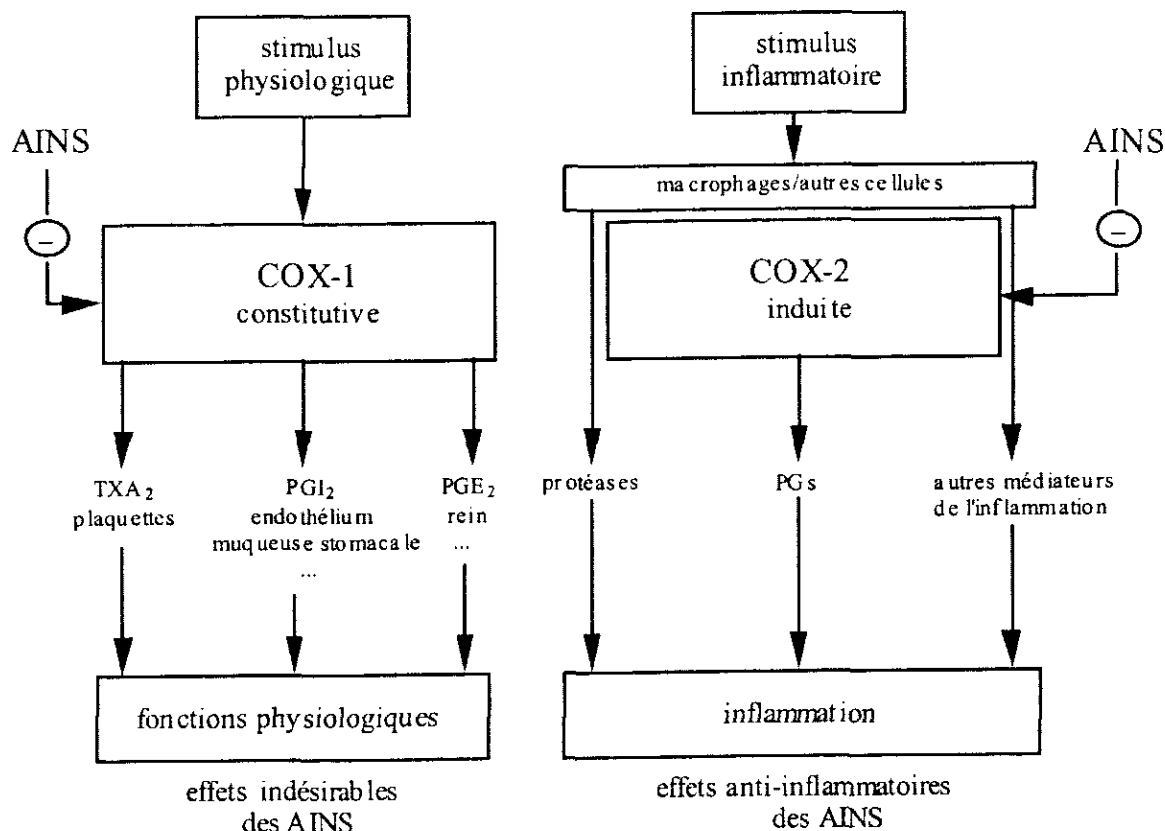


Figure 5 : Rôle biologique respectif des isoformes de la cyclo-oxygénase
(d'après Vane 1996)(127)

c) INHIBITION PAR LES PROFENES

Les profènes peuvent inhiber l'activité cyclo-oxygénase selon deux modalités différentes (19, 53). L'ibuprofène (IPF) empêcherait la fixation de l'acide arachidonique dans le site actif, par un mécanisme classique d'inhibition compétitive réversible. Le flurbiprofène (FluPF) pourrait, en se fixant par l'intermédiaire de sa fonction carboxylique et de son groupement phényle à l'entrée du site cyclo-oxygénase, en interdire l'accès à l'acide arachidonique. Cette fixation irréversible entraînerait une modification de l'enzyme, à l'origine de l'inhibition dépendante du temps observée avec ce type d'inhibiteur.

Nous avons déjà évoqué, qu'*in vitro*, l'activité anti-inflammatoire des acides aryl-2-propioniques réside presque exclusivement dans l'énantiomère *S*(+). En effet, seule cette configuration peut se fixer sur la cyclo-oxygénase et obstruer le site de fixation de l'acide arachidonique. L'inhibition des COX (COX-1 et COX-2) est due exclusivement à l'énantiomère *S*(+) pour l'IPF, le KPF et le FluPF (18, 90).

Remarque : Le *R*(-)-FluPF, qui n'a aucune activité anti-inflammatoire, possède cependant une très forte activité antalgique contrairement à son antipode optique. Cette activité demeure importante même à faible concentration et serait indépendante de l'inhibition de l'activité cyclo-oxygénase.

Les AINS peuvent donc être classés selon leur sélectivité d'inhibition vis à vis de COX-1 et de COX-2. Ainsi, l'aspirine est un inhibiteur sélectif de COX-1 tandis que le méloxicam est un inhibiteur préférentiel de COX-2 (125, 128, 38). Les autres AINS, et

notamment les profènes, sont des inhibiteurs non spécifiques. Ils peuvent toutefois présenter une affinité plus ou moins importante pour l'une des deux isoformes.

Les concentrations inhibant 50% de l'activité COX-1 et COX-2 (IC_{50}) dans le sang humain ont été déterminées pour plusieurs profènes.⁽⁵¹⁾ Les rapports des IC_{50} COX-1/COX-2 varient de 5.14 pour le fénoprophène à 8.16 pour le kétoprophène. Il est de 10.27 pour le flurbiprofène. Ces trois profènes inhibent préférentiellement donc COX-1. L'ibuprofène et le naxoprofène inhibent quasi indifféremment les deux formes, avec des rapports de 1.69 et 0.88, respectivement.

La recherche actuelle de nouveaux AINS s'oriente vers des molécules d'inhibiteurs hautement sélectifs de COX-2 ⁽¹²⁰⁾ mais aussi vers des molécules associant un AINS (naproxène, flurbiprofène, kétoprophène) au monoxyde d'azote (NO) (39, 88). En effet, le NO est un vasodilatateur qui joue un rôle dans le maintien des fonctions rénales et gastriques. L'inhibition de COX-1 et de COX-2 par ces dérivés d'AINS est maintenue, mais la libération de NO permet de réduire les effets indésirables dans le rein et la muqueuse gastrique.

C. EFFETS SECONDAIRES ET EFFETS INDESIRABLES

Si l'inhibition des cyclo-oxygénases explique pour une part les effets bénéfiques des AINS, le déséquilibre physiologique engendré par l'absence de certaines prostaglandines peut conduire à des effets indésirables non négligeables. Les effets les plus fréquents sont les effets gastro-intestinaux et les effets rénaux.

1. EFFETS COX-DEPENDANTS

a) EFFETS GASTRO-INTESTINAUX

Les effets gastro-intestinaux vont de la simple irritation de la muqueuse digestive à l'ulcère perforant dans le cas le plus grave. Ils sont dus au pouvoir irritant des AINS (par leur caractère acide) et surtout à leur action ulcérogène, en relation avec leurs propriétés antiprostaglandines.

En effet, la plupart des prostaglandines, et principalement la PGE₂, sont synthétisées dans la muqueuse gastrique et possèdent des activités cytoprotectrices. Elles diminuent la sécrétion d'acide gastrique et stimulent la production de mucus et de bicarbonates, protecteurs de la muqueuse vis-à-vis des agressions mécaniques et chimiques. Ce mucus agit comme une barrière physique qui maintient un environnement alcalin, neutralisant ainsi l'excès d'acide. Les prostaglandines favorisent également l'irrigation de la muqueuse gastrique par leur action vasodilatatrice.

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS peut donc entraîner une ischémie de la muqueuse et une augmentation de la sécrétion d'acide tout en diminuant la production des agents protecteurs ce qui favorise l'apparition de lésions nécrotiques et d'ulcères (128). Ces effets secondaires sont dose-dépendants. L'âge des individus est également un facteur prédisposant.

b) EFFETS RENAUX

Dans le rein, les prostaglandines (PGE₂ et PGI₂) sont synthétisées à la fois dans la zone corticale au voisinage des artérioles afférentes et efférentes, et dans la zone médullaire représentée par les branches ascendantes de l'anse de Henlé et les tubes collecteurs.(5, 87) Ces prostaglandines sont de puissants vasodilatateurs locaux et régulent plusieurs fonctions comme le débit sanguin local, la réabsorption de sodium et de l'eau, et la libération de rénine. Ces fonctions dépendent de l'activité COX-1 à l'exception de la sécrétion de rénine qui semble davantage liée à l'activité de COX-2 (38).

Dans des conditions physiologiques normales, les AINS n'ont que peu d'effets sur le rein du fait de la production faible des prostaglandines rénales.

En revanche, lors d'hypovolémie rencontrée dans certaines situations pathologiques telles qu'une insuffisance cardiaque, une cirrhose, une insuffisance rénale ou encore une hémorragie, il y a libération de vasoconstricteurs circulants (angiotensine II, noradrénaline,

vasopressine) permettant de maintenir la pression sanguine. Cette vasoconstriction des territoires périphériques et/ou non vitaux se fait au profit des organes essentiels. La synthèse rénale de prostaglandines vasodilatatrices est également augmentée, permettant de contrecarrer les effets des vasoconstricteurs et de protéger ainsi les fonctions hémodynamiques glomérulaires.

Dans ces conditions, la prise d'AINS va intensifier la vasoconstriction rénale par inhibition de la synthèse des prostaglandines et va conduire à une insuffisance rénale aiguë voire une nécrose tubulaire si la vasoconstriction est suffisamment intense et prolongée (87). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS peut également perturber le transport de l'eau et des électrolytes et entraîner une rétention de sodium, une hyponatrémie et une hyperkaliémie.(5, 136) Ces effets peuvent résulter de la prise concomitante d'AINS et de diurétiques.

Les effets rénaux dépendent de la dose et de la durée du traitement et sont généralement réversibles après l'arrêt du traitement. Ils concernent principalement les sujets âgés. Les AINS, et particulièrement le fénoprofène, seraient également responsables de néphrites interstitielles aiguës. Néanmoins, le mécanisme toxique passerait par la production d'un métabolite de l'acide arachidonique, cyclo-oxygénase-indépendant (5).

2. EFFETS COX-INDEPENDANTS

a) TOXICITE HEPATIQUE

Les atteintes hépatiques sont peu fréquentes avec les profènes actuellement commercialisés. L'incidence de ces atteintes par million de prescriptions est de 0.7 pour l'ibuprofène et de 1.5 pour le naproxène contre 2702 cas pour le sulindac, l'un des AINS le plus hépatotoxique (73) . Le fénoprofène, le kétoprofène et le flurbiprofène ne semblent que très peu ou pas du tout, entraîner d'effets hépatiques. Par contre, l'hépatotoxicité importante du bénomaxoprofène, du piroprofène, de l'ibufenac et du suprofène a été à l'origine de leur retrait du marché.

Les atteintes hépatiques sont plus volontiers la conséquence d'une sensibilité individuelle des patients (idiosyncrasie) que d'une toxicité intrinsèque du médicament. Elles sont plus ou moins sévères. Dans les cas les plus bénins, elles se traduisent par une élévation transitoire des transaminases et dans les cas les plus graves, elles peuvent entraîner le décès du patient à la suite d'une nécrose massive du foie (141). Les lésions correspondantes sont le plus souvent hépatocellulaires (carprofène, fénoprofène, ibuprofène et piroprofène) mais peuvent également être cholestatiques (bénomaxoprofène, naproxène) ou mixtes (sulindac). La fréquence des atteintes hépatiques est plus élevée chez les patients âgés.

Les acyl-glucuronides, esters instables et réactifs des profènes, peuvent entraîner la formation d'adduits aux protéines cellulaires. En effet, les acyl-glucuronides présentent un caractère électrophile marqué qui entraîne la fixation covalente des aryl-2-propioniques à des macromolécules. La formation d'adduits pourrait avoir deux conséquences : l'une directe, qualifiée de métabolique, l'autre indirecte par l'intermédiaire du système immunitaire (98). Dans le premier cas, les modifications conformationnelles de la protéine, induites par la formation d'adduits, peuvent entraîner la perte fonctionnelle de cette macromolécule et altérer ainsi une fonction cellulaire vitale. Dans le second cas, l'organisme peut développer une

réponse immunitaire avec une cytotoxicité marquée à l'encontre des complexes covalents que constituent les adduits.

b) AUTRES TOXICITES

Une toxicité est observée avec l'ibuprofène (91) et d'autres profènes comme le carprofène (78). Mais le plus souvent le support cellulaire ou moléculaire de cette toxicité reste à démontrer.

Les profènes peuvent également être responsables d'effets affectant le système nerveux central (49, 109). Si la céphalée est l'effet indésirable le plus fréquent, des dysfonctionnements cognitifs peuvent apparaître chez les personnes âgées. Des cas de méningites aseptique ont aussi été rapportés pour l'ibuprofène (24).

Enfin, les aryl-2-propioniques ont la possibilité d'induire des réactions anaphylactiques (118). En effet, en inhibant la synthèse des prostaglandines, ils augmentent la quantité d'acide arachidonique disponible pour la voie de la lipoxgénase et peuvent, de cette façon, favoriser indirectement la synthèse des SRS-A responsables des réactions pseudo-allergiques.

Dans les mitochondries, les profènes peuvent agir comme agents découplant de la phosphorylation oxydative : ils dissocient l'oxydation, de la phosphorylation dans la chaîne respiratoire. La respiration n'est alors plus contrôlée, car la concentration de l'ADP ou du phosphate inorganique (P_i) ne limite plus la respiration. Cette observation a été faite, *in vitro*, pour l'ibuprofène, le flurbiprofène (34) et le fénoprofène chez le rat (75).

D. METABOLISME

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, quelle que soit la voie d'administration et leur métabolisme intense. Moins de 5% de la dose de fénoprophène (100, 101), de carprofène (102), de flurbiprofène (52), d'ibuprofène (91), de naproxène (133) administrés et moins de 10% de la dose de kétoprofène (35) administré, sont retrouvés inchangés dans les urines. Des études pharmacocinétiques ont permis de distinguer trois grandes voies d'élimination : l'oxydation, la glucuroconjugaison et la thioestérification, et une particularité commune : l'énantiosélectivité.

1. OXYDATION

L'oxydation est la voie métabolique majoritaire de l'ibuprofène (IPF) chez l'homme. L'oxydation de sa chaîne latérale conduit à la formation de deux métabolites majeurs : l'hydroxy- et le carboxy-IPF (91). Ces métabolites peuvent être secondairement glucuroconjugués. Chez l'homme, l'hydroxy-IPF est majoritairement de configuration *S*(+) quel que soit l'énantiomère administré initialement. L'oxydation de l'ibuprofène en carboxy-IPF fait apparaître un second centre d'asymétrie rendant l'étude de l'énantiosélectivité un peu plus complexe. Cependant il semblerait que 85% du carboxy-IPF formé proviennent du *S*(+)-IPF (103, 32).

Le fénoprophène peut également être oxydé de manière importante en 4'-hydroxy-FPF, ultérieurement conjugué (100, 101).

L'oxydation du flurbiprofène 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 concerne surtout la configuration *R*(+) (60).

Les réactions d'oxydation des profènes sont catalysées par des monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) (9). Deux cytochromes participant à l'oxydation de l'IPF ont été identifiés (2). La 3-hydroxylation est catalysée par le CYP2C9 tandis que la 2-hydroxylation est catalysée par le CYP2C9 et le CYP2C8.

2. GLUCURONOCONJUGAISON

La glucuroconjugaison est la voie d'élimination principale des composés à fonction carboxylique (sauf pour l'ibuprofène). Ainsi, 60% ou plus du naproxène, du fénoprophène, du kétoprofène et du flurbiprofène sont retrouvés sous la forme de glucuroconjugués dans les urines (contre seulement 14% de l'ibuprofène) (130). Certains profènes peuvent subir d'autres types de conjugaison (sulfoconjugaison des métabolites hydroxylés du fénoprophène et du flurbiprofène chez l'homme (101, 58), glucosylation du pranoprophène chez la souris) (2, 3, 4).

Les métabolites ainsi formés sont éliminés par voie biliaire et urinaire, en proportion variable selon le composé administré.

a) MECANISME

La glucuroconjugaison correspond au transfert d'un acide D-glucuronique de l'acide uridine-5'-diphosphoglucuronique (UDPGA) à une molécule réceptrice, par un mécanisme de type substitution nucléophile concertée (SN₂) (84). Dans le cas des acides aryl-2-propioniques, le centre nucléophile est représenté par le groupement carboxyle. Le produit de cette réaction est alors un ester-glucuronide (O-glucuronide). Au cours de cette réaction, le C1 anomérique de l'acide α-D-glucuronique est transformé en un glucuronide de configuration β. La conjugaison des acides aryl-2-propioniques aboutit donc à la formation de 1-O-acyl-β-D-glucuronide, plus simplement appelés acyl-glucuronides (Fig.6). Les réactions de glucuroconjugaison sont catalysées par des UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT ;E.C. 2.4.1.17), principalement exprimées dans le foie et de façon plus mineure dans les reins, la muqueuse intestinale, la peau ou les poumons. (84) Les UDPGT appartiennent à la super-famille multigénique des UDP-glycosyltransférases (UGT).

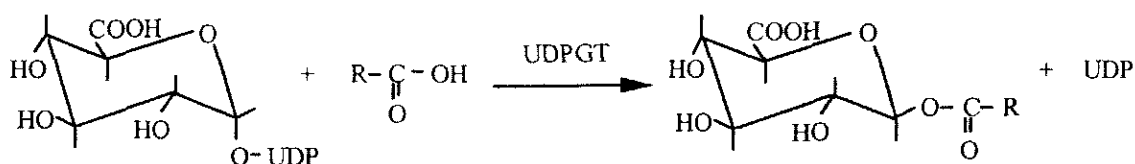


FIGURE 6 : REACTION DE GLUCURONOCONJUGAISON DES PROFENES

b) ENANTIOSELECTIVITE

L'énantiosélectivité de la glucuroconjugaison des profènes est difficile à apprécier *in vivo* du fait de l'existence d'autres processus énantiosélectifs : fixation aux protéines, hydrolyse des glucuronides, cycle entérohépatique ou encore inversion chirale. Les études conduites *in vitro* permettent d'éviter en partie ces interférences. De nombreuses études ont été réalisées avec des microsomes hépatiques, des protéines microsomales solubilisées ou encore des UDPGT immobilisées et ont montré que l'énantiosélectivité de la conjugaison des profènes dépend à la fois du composé et de l'espèce animale. Ainsi, si chez le lapin, le singe et l'homme, la glucuroconjugaison concerne l'énantiomère S(+) de l'ibuprofène, préférentiellement ; chez le rat, elle concerne surtout l'énantiomère R(-) des profènes à l'exception du naproxène (tab.1).

	Ratio R/S des glucuronides produits <i>in vitro</i>							
	homme	rat	lapin	mouton	singe	chien	cobaye	cheval
bénoxaprofène [1 ; 2]	2	2.5	0.6	0.8	0.8	-	-	-
carprofène [3]	1.3	3.5	-	1.1	-	1.6	-	1.3
fénoprofène [4]	0.97	1.43	1.33	1.51	-	-	-	-
flunoxaprofène [5]	-	2	-	0.9	-	-	-	-
flurbiprofène [6]	3.03	1.68	0.4	-	1.88	-	1.21	-
ibuprofène [1]	0.6	-	0.4	-	0.3	-	-	-
kétoprofène [7]	≠ 1	≠ 1	≠ 1	-	≠ 1	4.5	-	-
naproxène [1 ; 8] [1 ; 8]	0.88	0.67	0.3	-	1.5	-	-	-

[1] El Mouehli *et al.*, 1987 (31)

[2] Spahn *et al.*, 1989 (116)

[3] Maire-Gauthier *et al.*, 1998b (71)

[4] Volland and Benet, 1991 (131)

[5] Spahn *et al.*, 1988 (115)

[6] Hamdoune *et al.*, 1995 (47)

[7] Chakir *et al.*, 1994 (22)

[8] Mayer, 1990 (76)

Tableau 1: Enantiosélectivité *in vitro* de la glucuronoconjugaison des profènes

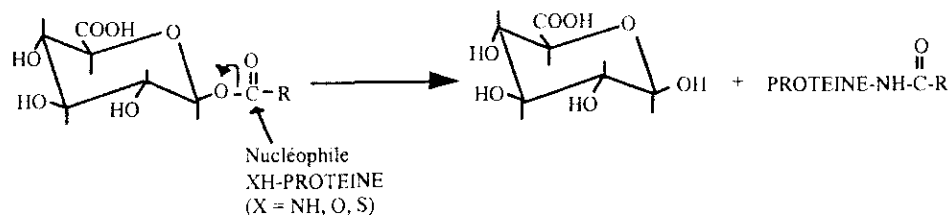
c) ELIMINATION

Les profènes et leurs métabolites (oxydés et/ou glucuronoconjugués) peuvent être éliminés par voie urinaire (homme) ou biliaire (rat) (57).

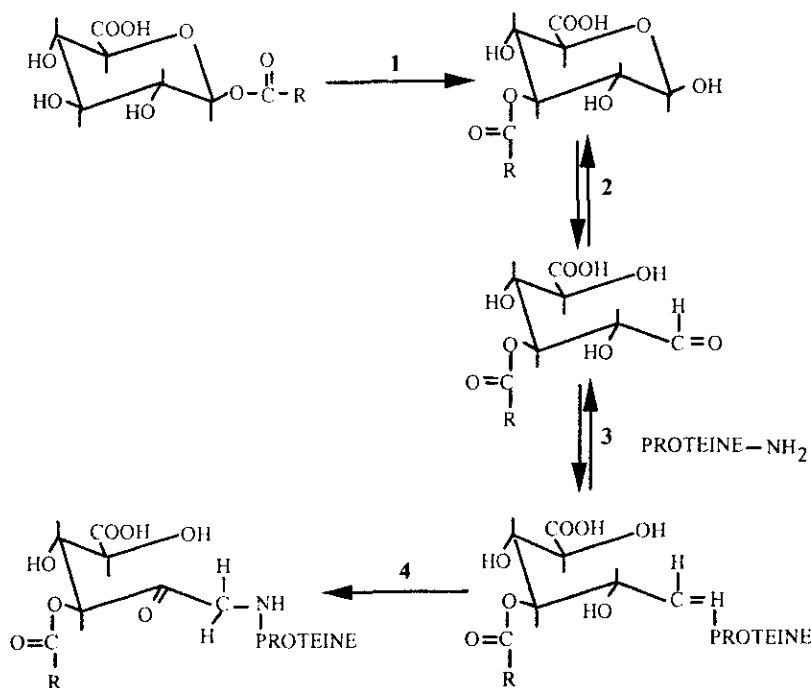
Les glucuronoconjugués éliminés par voie biliaire peuvent être hydrolysés par les β -glucuronidases de la flore intestinale, la molécule parentérale est alors réabsorbée *in situ*. Ce cycle entérohépatique peut ralentir l'élimination de la molécule ou de l'énantiomère préférentiellement éliminé par voie biliaire (192). Par ailleurs le bénoxaprofène est susceptible de subir une hydrolyse plasmatique spontanée après conjugaison. Ce « cycle futile » libère le composé 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, les acyl-glucuronides de profènes, par leur caractère électrophile, sont sensibles aux réactions de substitution par des sites nucléophiles appartenant à des macromolécules. Deux mécanismes ont été envisagés pour expliquer la formation des adduits aux protéines : par substitution, ou par l'intermédiaire d'une imine (110) (Fig.7).

MECANISME I
substitution nucléophile



MECANISME II
formation d'une imine intermédiaire (base de Schiff)



1 : acyl-migration

3 : formation d'une imine

2 : ouverture du cycle

4 : réarrangement d'Amadori

Figure 7: Les deux mécanismes de la formation d'adduits
(d'après Benet *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1993) (15, 55)

Les glucuronides de nombreux profènes (fénoprophène (261), ibuprofène, ibufénac (20, 21), carprofène (51), bénomaxoprophène (116), suprofène (111), kétoprofène (30)) sont capables de former des adduits avec l'albumine. *In vitro*, le kétoprofène se fixe également aux α et β -globulines et de façon irréversible (30). Ces adduits seraient responsables de certaines des réactions toxiques anaphylactiques observées après administration de certains profènes. *In vivo*, le suprofène formerait des adduits tissulaires chez le rat (112). Le carprofène, quant à lui, se lierait irréversiblement avec les protéines microsomaux hépatiques de rat (71).

La formation d'adduits dépend de la nature de l'aglycone. L'ibuprofène et l'ibufénac sont deux molécules très voisines, qui ne diffèrent que par la substitution d'un -H (ibufénac) par un -CH₃ (ibuprofène) sur le carbone en α de la fonction carboxylique. L'ibufénac a été retiré du marché car il a occasionné une fréquence élevée d'atteintes hépatiques (incidence de 30% : augmentation d'aminotransférases, 5% : jaunisse) . Le glucuronide d'ibufénac est responsable de la formation de deux fois plus d'adduits (21) .

3. THIOESTERIFICATION

La thioestérification est la voie caractéristique des profènes en raison de leur chiralité.

a) MISE EN EVIDENCE

L'hypothèse d'une activation des acides aryl-2-propioniques en thioester de CoA a été avancée pour la première fois par Wechter *et al.* (1974) (135), avant d'être reprise par Nakamura *et al.* (1981) (89) qui la définit comme la première étape de l'inversion chirale. La première, mais indirecte, preuve de la participation du CoA dans la biotransformation des profènes a été apportée par Fears *et al.* (1978) (34). En incubant, dans des tranches fines de foie de rat, du glycérol ou du palmitate marqué au C¹⁴ en présence de différents profènes (fénopropène, ibuprofène, kétopropène), ces auteurs ont observé la production d'un métabolite inhabituel défini comme un triglycéride hybride. Or, l'incorporation des profènes, comme celle des acides gras, dans les triglycérides hybrides n'est possible qu'après activation de ces composés en thioester de CoA.

La thioestérification des profènes est l'étape métabolique qui impose la plus forte contrainte, tant sur le plan de la sélectivité de substrat que par son énantiosélectivité. Les différentes études menées *in vitro* avec le fénopropène ou l'ibuprofène démontrent l'énantiosélectivité de la thioestérification de ces composés (61, 58, 64, 122). Plus précisément, c'est l'activation du profène sous forme de profénoyl-AMP qui déterminerait la stéréosélectivité de la première étape de l'inversion. Il a en effet été montré que seul l'énantiomère *R*(-) de l'ibuprofène est activé en *R*-ibuprofénoyl-adénylate, et que, par contre, le *S*(+)-ibuprofénoyl-adénylate, synthétisé par voie chimique, est substrat pour la suite de la réaction (77) . La thioestérification est la seule étape énantiosélective de l'inversion chirale. Elle explique le caractère unidirectionnel de cette voie métabolique qui, en règle générale, ne peut être empruntée que par les *R*(-)-profènes. De même, la sélectivité de substrat dont fait preuve la thioestérification est la même que celle observée pour l'inversion chirale. Ainsi, le *R*(-)-flurbiprofène, non inversé chez le rat, n'est pas thioestérifié *in vitro* tandis que le *R*(-)-FPF et le *R*(-)-IPF, tous deux fortement inversés *in vivo* avec 42 et 50% d'inversion respectivement (7, 65) sont thioestérifiés à hauteur de 64 et 33% (58) .

Cependant, aucune corrélation n'est observée entre ces valeurs et l'étendue de l'inversion chirale *in vivo*. Le mouton possède la V_{max} de thioestérification du FPF la plus faible et inverse ce composé à 80% tandis que rat n'inverse que 42% de la fraction (7, 113) . Cette différence peut s'expliquer par une orientation préférentielle du *R*(-)-fénopropényl-CoA formé vers l'inversion chirale chez le mouton et vers d'autres voies métaboliques chez le rat. Ainsi, si la thioestérification détermine la faisabilité de l'inversion chirale, ce n'est pas elle qui définit nécessairement l'importance du phénomène.

b) MECANISME

La thioestérification des profènes nécessite la présence d'ATP, de Coenzyme A et de $MgCl_2$.⁽⁵⁸⁾ Elle fait intervenir un mécanisme réactionnel en deux étapes.⁽⁷⁷⁾ Le mécanisme réactionnel débute par la formation d'un adénylate intermédiaire avec libération de pyrophosphate. Puis, l'attaque de l'adénylate par le groupement thiol du Coenzyme A permet la libération du profényl-CoA et de l'AMP. Ainsi un groupement CoA-SH se fixe sur la fonction carboxylique de l'énantiomère en présence d'une enzyme qui est fortement stéréospécifique (Fig. 8).

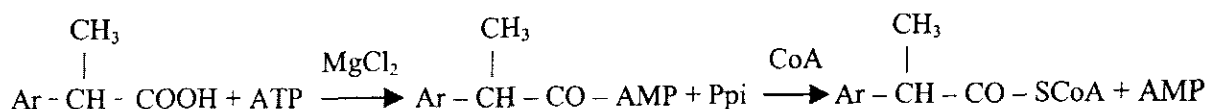


Figure 8 : Thioestérification des acides aryl-2-propioniques

c) LOCALISATION

La localisation de la thioestérification est variable en fonction de l'organe et du compartiment intracellulaire.

La thioestérification hépatique du fénoprofène et de l'ibuprofène a été observée dans les mitochondries et les microsomes, mais apparaît absente du cytosol ⁽⁵⁸⁾. De plus, il apparaît que les microsomes sont plus efficaces que les mitochondries dans la formation du FPF-CoA et de l'IPF-CoA ^(58, 122).

d) VARIATIONS D'ESPECES ET DE COMPOSES

La formation du thioester a aussi été étudiée dans les homogénats de différents tissus.⁽⁵⁸⁾ Il en ressort que le foie est au moins 50 fois plus efficace que tous les autres tissus étudiés (diaphragme, rein, poumon, muscle squelettique, intestin, cæcum).

Il existe aussi d'importantes variations en fonction du composé. Ainsi le pourcentage de thioester formé dans des conditions comparables pour un homogénat de foie de rats est de 64% pour le fénoprofène, de 33% pour l'ibuprofène et de 1% pour le flurbiprofène.

L'étude de la thioestérification microsomaux *in vitro* du fénoprofène met en évidence une grande variété de V_{max} en fonction des espèces. En effet, la vitesse de production du FPF-CoA varie de 2.1 mmol/min/mg chez le mouton à 60.6 mmol/min/mg chez le chien. Cette vitesse devient nulle pour la thioestérification du carprofène chez le rat, le chien, le mouton et le cheval ^(113, 7, 114).

La caractérisation du système enzymatique impliqué dans la thioestérification apparaît indispensable pour comprendre les variations d'espèces et de composés associées à l'activation des profènes.

e) CARACTERISATION DU SYSTEME ENZYMATIQUE

De nombreux arguments ont été rapportés suggérant l'implication de la palmitoyl-CoA synthétase dans la thioestérification des profènes.

Tout d'abord, Knights *et al.* (1988) (61) et Knihinicki *et al.* (1989) (64) ont montré que l'enzyme impliquée dans l'activation du *R(-)*-FPF et du *R(-)*-IPF se fixe sur une colonne d'affinité (Matrex Gel Red A) également utilisée pour la purification de la palmitoyl-CoA synthétase.

De plus, la thioestérification microsomale de l'acide palmitique est très fortement inhibée par le *R(-)*-FPF. Cette inhibition est compétitive, avec un K_i de 16.1 μM , et s'observe également avec les fractions peroxysomales de foie de rat (99, 62, 69).

La thioestérification microsomale hépatique de l'acide palmitique est également inhibée de façon compétitive par le *R(-)*-IPF, avec une valeur de K_i égale à 28.4 μM .(62)

Réciproquement, la formation du *R(-)*-FPF-CoA et du *R(-)*-IPF-CoA est inhibée de façon compétitive par l'acide palmitique.

Il est intéressant de noter que la valeur du K_m de l'activation de l'acide palmitique chez le rat (1.9 μM) est proche de celle du K_i de l'inhibition de thioestérification du *R(-)*-FPG (5.7 μM) et du *R(-)*-IPF (5 μM) (122, 6).

Toujours dans le cadre d'une caractérisation indirecte de l'enzyme impliquée dans la thioestérification des profènes, Soraci et Benoît (1995) (114) ont étudié la thioestérification du *R(-)*-FPF par les microsomes de foie de différentes espèces, présentant des activités palmitoyl-CoA synthétase variables (mouton, cobaye, rat et chien). Cette étude fait apparaître une corrélation parfaite entre les V_{max} observées pour l'activation de l'acide palmitique avec celles du *R(-)*-FPF. Cette corrélation est favorable à l'implication d'un système enzymatique unique, la palmitoyl-CoA synthétase, dans la thioestérification du *R(-)*-FPF. Il ressort de cette étude que la capacité intrinsèque du foie à thioestérifier le *R(-)*-FPF dépend exclusivement de la représentation de la palmitoyl-CoA synthétase dans cet organe, dans l'espèce considérée.

La première preuve directe de l'implication de la palmitoyl-CoA synthétase dans la thioestérification des profènes a été apportée par Brugger *et al.* (1996) (12). En effet, la copurification, à partir de fractions microsomales de foie de rat, de l'activité palmitoyl-CoA synthétase et de l'activité *R(-)*-ibuprofénoyl-CoA synthétase, a permis l'obtention d'une fraction homogène en SDS-PAGE de 72 kDa. Cette enzyme présente une activité spécifique élevée pour les deux substrats.

Néanmoins, une cinétique biphasique a été observée pour l'acide palmitique, et non pour le *R(-)*-IPF, laissant suggérer l'existence de plusieurs isoformes d'affinité différente. L'existence de plusieurs isoformes avait déjà été envisagée par d'autres auteurs. En observant une consommation biphasique du CoA utilisé pour la thioestérification du *R(-)*-IPF, Knighths *et al.* (1992) (63) déduisent l'existence de deux isoformes de la palmitoyl-CoA synthétase, l'une à forte affinité et à faible capacité, l'autre à faible affinité et forte capacité.

Il semble néanmoins que l'environnement physique du substrat soit strictement déterminant pour la cinétique de thioestérification. Ainsi, l'adsorption du palmitate sur de la célite, l'incorporation de cet acide gras dans des bicouches de phospholipides (92, 93) ou la présence de détergents dans le milieu d'incubation modifient très considérablement la catalyse. La valeur du K_m de la thioestérification du *R(-)*-FPF par les microsomes hépatiques de rat varie de 406 μM à 20 μM en présence de 0.05% de Triton X-100.(6) Ainsi, la modification par la présence de détergent non-ionique de l'affinité de l'enzyme pour le

substrat, sans modification de la V_{max} , montre qu'il est possible d'envisager une cinétique avec deux K_m sans que pour autant il soit impératif d'envisager l'existence de deux isoenzymes.

Ainsi l'activité profénoyl-CoA synthétase est directement liée à l'activité palmitoyl-CoA synthétase. La formation des profénoyl-CoA est donc catalysée par une acyl-CoA synthétase des acides gras à longue chaîne.

II. LES ACYL-COA SYNTHETASES

Les réactions de thioestérification sont catalysées par les acyl-CoA synthétases. Ces enzymes peuvent être classées en fonction de la longueur de chaîne des acides gras préférentiellement acceptés comme substrats. Quatre systèmes ATP-dépendants sont ainsi distingués : les acyl-CoA synthétases des acides gras à courte chaîne acceptant préférentiellement les substrats de C₂ à C₄ (EC. 6.2.1.1) ; à moyenne chaîne pour les acides gras de C₄ à C₁₀ (EC. 6.2.1.2) ; à longue chaîne pour les C₁₀ à C₂₀ (EC. 6.2.1.3) et à très longue chaîne pour les acides gras C₂₂ à C₂₄.

La palmitoyl-CoA synthétase, précédemment évoquée et impliquée dans la thioestérification des profènes, est une synthétase des acides gras à longue chaîne puisqu'elle catalyse avec une forte affinité l'acide palmitique (C_{16:0}). Nous ne présenterons donc, sous le nom d'ACS, que les données de la littérature relatives aux acyl-CoA synthétases des acides gras à longue chaîne.

A. NOMENCLATURE

Il n'existe pas de nomenclature "officielle" pour les acyl-CoA synthétases au même titre que celles qui sont proposées pour les cytochromes P450 ou les UDP-glucuronosyltransférases. Bien que les premières purifications d'ACS sous forme native datent des années 70, il faut attendre les années 90 pour qu'apparaisse une harmonisation relative de l'appellation des ACS. Cette nomenclature récente repose sur la caractérisation des ACS par des outils de biologie moléculaire. Les données obtenues avec les formes recombinantes ont été comparées à celles existantes pour les formes natives. Puisque ces dernières ne diffèrent pas des formes recombinantes, que ce soit en termes de poids moléculaire, de spécificité de substrat ou d'antigénicité croisée, elles sont progressivement "renommées" d'après la nomenclature existante pour les formes recombinantes.

Depuis 1990, cinq ADNc distincts ont été clonés et séquencés chez le rat. Cinq formes d'ACS recombinantes ont été purifiées après expression de ces ADNc. Un chiffre arabe de 1 à 5 a alors été attribué à chacune de ces formes, au fur et à mesure de leur caractérisation. Quatre ou cinq ADNc distincts ont ensuite été séquencés chez l'homme. La dénomination de ces ACS humaines est alors réalisée, le plus souvent, en fonction de leur homologie de séquence avec les ACS de rat à l'exception de la FACL2 (16, 42) et de la LACS5 (72). Pour ces deux formes, la nomenclature devra être révisée afin d'éviter toute confusion puisque la FACL2 possède une homologie de séquence primaire plus importante avec l'ACS1 qu'avec l'ACS2 de rat et que la LACS5 s'avère être plus proche de l'ACS2 que de l'ACS5 de rat.

De manière à faciliter la lecture des paragraphes suivants, nous avons choisi de présenter les ACS de rat et les ACS humaines sous les termes respectifs de rACS et de hACS. Nous avons également modifié la dénomination numérique des hACS en fonction de leur homologie avec les rACS. (Tab. 2)

RAT			HOMME		
les articles	dénomination donnée dans le texte		les articles	dénomination donnée dans le texte	
ACS1	Suzuki <i>et al.</i> , 1990 Iijima <i>et al.</i> , 1996	rACS1	FACL2	Cantu <i>et al.</i> , 1995 Ghosh <i>et al.</i> , 1995	hACS1
			HACS	Abe <i>et al.</i> , 1992	hACS1
ACS2	Fujino and Yamamoto, 1992 Iijima <i>et al.</i> , 1996	rACS2	LACS5	Malhotra <i>et al.</i> , 1999	hACS2
			ACS2	Yagasaki <i>et al.</i> , 1999	
ACS3	Fujino <i>et al.</i> , 1996	rACS3	ACS3	Minekura <i>et al.</i> , 1997	hACS3
ACS4	Kang <i>et al.</i> , 1997	rACS4	FACL4	Cao <i>et al.</i> , 1998 Piccini <i>et al.</i> , 1998	hACS4
ACS5	Oikawa <i>et al.</i> , 1998	rACS5			

Tableau 2 : Dénomination des formes orthologues d'ACS

B. LOCALISATION ET FONCTIONS BIOLOGIQUES

L'activité palmitoyl-CoA synthétase hépatique est présente dans les membranes des microsomes et des peroxysomes ainsi que dans la membrane externe des mitochondries.(82,134)

Dans le foie de rat, les enzymes purifiées à partir de ces trois organites possèdent le même poids moléculaire, la même composition en acides aminés, la même spécificité de substrat et la même antigénicité suggérant ainsi l'existence d'une seule et même enzyme.(121,82) La distribution de l'activité hépatique est estimée entre 43 et 63% pour les microsomes, entre 30 et 50% pour les mitochondries et 7% pour les peroxysomes (66) .

Chez l'homme la distribution de l'activité est équivalente à celle décrite chez le rat avec 60% de l'activité hépatique microsomale, 25% mitochondriale et 15% peroxysomale.(30)

Ces activités sont à rapprocher de l'expression de la rACS1 ou de la hACS1, isoformes majoritairement présentes dans le foie. Cependant, aucune séquence peptide signal *N*-terminale permettant d'expliquer la distribution dans les différents organites cellulaires n'a été identifiée sur la séquence de la rACS1 ou de la hACS1 (95).

L'activité palmitoyl-CoA synthétase est également observée dans le cerveau, le rein, le poumon, l'intestin grêle, le cœur, les plaquettes sanguines. Cette activité a été également mise en évidence dans la membrane plasmique des hépatocytes et des érythrocytes (27, 28) .

La distribution ubiquiste de l'activité acyl-CoA synthétase paraît légitime si l'on considère que les acyl-CoA formés sont des intermédiaires indispensables à la production d'énergie *via* la β -oxydation dans les mitochondries et les peroxysomes, à la synthèse des lipides comme les phospholipides membranaires, les triacylglycérols ou les esters de

cholestérol dans les microsomes et au renouvellement des phospholipides dans la membrane plasmique.

Ces différentes localisations sont maintenant à redéfinir en fonction des cinq isoformes d'ACS identifiées.

En effet, bien que les ACS1 et les ACS2 possèdent près de 65% d'homologie dans leur séquence, la distribution tissulaire de ces deux formes est totalement différente. Chez le rat, l'ARNm codant pour la rACS1 est principalement présent dans le foie, le cœur, le tissu adipeux et, de façon mineure, dans le cerveau avec seulement 10% de son expression hépatique, alors que l'ARNm de la rACS2 est majoritairement présent dans le cerveau de rat adulte, aussi bien dans les hémisphères cérébraux que dans le cervelet et le tronc cérébral (119, 40). L'ARNm codant pour la rACS3 est également majoritaire dans le cerveau mais, contrairement à la rACS2, le niveau maximum est atteint chez un rat âgé de 15 jours (40, 41). Les ARNm codant pour la rACS4 et la rACS5 sont principalement détectés dans les organes de la stéroïdogénèse et dans l'intestin grêle, respectivement (94, 55). La distribution tissulaire des hACS est identique à celle du rat à l'exception de la hACS4 qui n'est pas exprimée dans le foie ou le poumon contrairement à sa forme orthologue. La hACS2 est également exprimée dans les réticulocytes et les érythrocytes (72). Toutefois, cette localisation cellulaire n'a pas été étudiée pour la rACS2. (Tab. 3)

	Niveau de détection de l'ARNm		
	majoritaire	élevé	faible (ou nul)
rACS1 [1 ; 2]	foie	cœur, tissu adipeux	cerveau, poumon intestin grêle
hACS1 [3]	foie	muscle squelettique, cœur, rein	cerveau
rACS2 [2 ; 4]	cerveau	surrénale, cœur	foie, poumon, rein intestin grêle, tissu adipeux
hACS2 [5]	cerveau		foie, poumon, rein, cœur, rate pancréas, muscle squelettique
rACS3 [6]	cerveau	poumon, surrénale, rein intestin grêle, tissu adipeux	cœur, foie
hACS3		non déterminé	
rACS4 [7]	surrénale	foie, cerveau, rein, poumon tissu adipeux, vésicule séminale épididyme, testicule, ovaire	intestin grêle, cœur rate, utérus muscle squelettique
hACS4 [8 ; 9]	surrénale, cerveau, testicule, ovaire, rate, cœur, rein muscle squelettique		foie, intestin grêle, colon poumon, pancréas
rACS5 [10]	intestin grêle	poumon, foie, rein, surrénale tissu adipeux	cerveau, cœur

[1] Suzuki <i>et al.</i> , 1990 (119)	[6] Fujino <i>et al.</i> , 1996 (41)
[2] Iijima <i>et al.</i> , 1996 (50)	[7] Kang <i>et al.</i> , 1997 (55)
[3] Ghosh <i>et al.</i> , 1995 (42)	[8] Cao <i>et al.</i> , 1998 (17)
[4] Fujino and Yamamoto, 1992 (40)	[9] Piccini <i>et al.</i> , 1998 (95)
[5] Malhotra <i>et al.</i> , 1999 (72)	[10] Oikawa <i>et al.</i> , 1998 (94)

Tableau 3 : Distribution tissulaire des ACS

En dépit d'une architecture structurale commune, les ACS présentent une distribution tissulaire et une régulation de la transcription différentes. La spécificité de substrat varie également d'une forme à l'autre. Ces différences reflètent très vraisemblablement le rôle biologique propre à chacune des isoformes.

L'ACS1, forme majoritaire du foie, serait impliquée dans la synthèse des triacylglycérols compactés avec des apolipoprotéines particulières en VLDL (lipoprotéines de très faible densité).

Le cerveau est le tissu le plus riche en lipides. La myéline, en particulier, est composée à 80% de lipides. La composition lipidique du cerveau variant en fonction de l'âge et la rACS3 étant exclusivement exprimée chez le jeune, il est imaginé que cette isoforme participerait plus volontiers à la myélinisation des axones et la rACS2, présente chez l'adulte, posséderait d'autres fonctions biologiques différentes (40, 50).

La rACS4 est majoritairement présente dans les cellules de la stéroïdogénèse (zones fasciculées et réticulées de la corticosurrénale, corps jaune et follicule ovarien, cellules de Leydig). Dans ces cellules, le cholestérol, provenant essentiellement des esters de cholestérol contenus dans les HDL (lipoprotéines de densité élevées), est métabolisé en hormones stéroïdiennes. Chez le rat, la moitié des acides gras constituant les esters de cholestérol est représentée par l'acide arachidonique. Cet acide gras est le substrat préférentiel de la rACS4. La rACS4 convertirait donc activement l'acide arachidonique libéré des esters de cholestérol en arachidonoyl-CoA, empêchant ainsi la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes dans les cellules de la stéroïdogénèse (55).

Les lipides alimentaires, hydrolysés en acides gras libres dans la lumière intestinale, sont absorbés par les cellules épithéliales intestinales où ils sont convertis en acyl-CoA pour la synthèse de triacylglycérols. Ces triacylglycérols sont alors incorporés dans les chylomicrons qui vont migrer à travers le système lymphatique et sanguin vers les tissus cibles. Oikawa *et al.* (1998) (94) ont localisé par hybridation *in situ*, l'ARNm de la rACS5 dans les cellules épithéliales de l'iléon. Cette localisation préférentielle de la rACS5 permet de penser que cette forme est impliquée dans l'activation des acides gras dérivés des lipides alimentaires. L'ARNm de la rACS5 comme celui de la rACS1 est également présent dans les adipocytes. Mais contrairement aux transcrits de la rACS1 induits après la différenciation des adipocytes, les transcrits de la rACS5 sont détectés dans les pré-adipocytes à un niveau qui reste constant après la différenciation. La rACS5 fournirait donc les acyl-CoA nécessaires à la synthèse des lipides cellulaires au cours du processus de différenciation des adipocytes. Dans les adipocytes matures, la rACS1 et la rACS5 permettraient la réestérification des acides gras pour un stockage sous forme de triacylglycérols.(186)

C. STRUCTURE ET TOPOGRAPHIE

Les ACS sont des protéines membranaires de 70 à 80 kDa. Ces enzymes possèdent une architecture structurale commune et sont organisées en cinq domaines à savoir une extrémité NH₂ terminale, deux régions "luciférase-like", un domaine de liaison entre les régions luciférase et une extrémité COOH-terminale (Fig.9). Les domaines les mieux conservés entre les rACS et les hACS correspondent aux deux régions "luciférase-like" et à l'extrémité C-terminale, suggérant ainsi leur importance pour l'activité catalytique de ces enzymes.

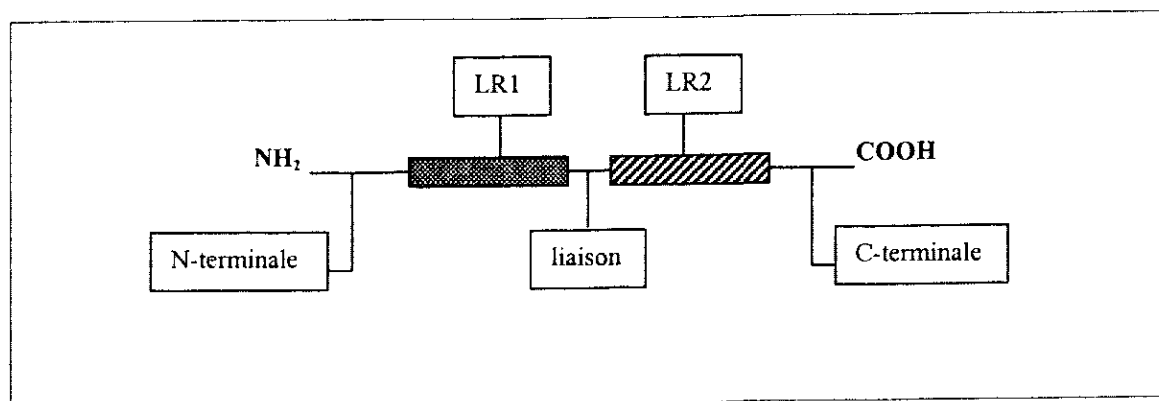


Figure 9: Représentation schématique de la structure des ACS

Il existe très peu de données relatives à l'organisation des ACS dans l'espace. Cependant, l'architecture commune de ces protéines suggère qu'elles possèdent des structures secondaire et tertiaire identiques.(40) Les seules informations disponibles sont encore hypothétiques et concernent la hACS2, protéine de 697 acides aminés. Cette hACS serait constituée d'une hélice transmembranaire hydrophobe de 16 résidus (résidus 25 à 41). Les résidus 42 à 697 seraient exposés du côté cytoplasmique (72). Cette hypothèse est cohérente avec la localisation du côté cytoplasmique du site actif des ACS, à la fois dans les membranes des microsomes et des peroxysomes(138) et dans la membrane externe des mitochondries (48).

L'environnement membranaire des ACS est fondamental pour l'activité catalytique des ces enzymes. Mara et De Alaniz (1999) (74) ont montré qu'un changement de l'état physico-chimique de la bicouche de lipidique entraîne une modification des propriétés cinétiques de l'enzyme. Ainsi, l'activité palmitoyl-CoA synthétase microsomale est plus importante chez des rats déficients en calcium, l'affinité de l'enzyme pour son substrat n'étant pas modifiée. Cette déficience entraîne une augmentation de la quantité d'acides gras saturés à la fois dans les triglycérides et les phospholipides membranaires, corrélée à une diminution de la fraction d'acides gras polyinsaturés des phospholipides. Après solubilisation de l'enzyme par du Triton X-100, l'activité spécifique de l'enzyme est identique entre les rats normaux et les rats déficients en calcium.

D. HOMOLOGIE DE SEQUENCES

Les homologies de séquences en acides aminés permettent de distinguer deux sous-familles chez le rat ; les rACS1, rACS2, rACS5 d'une part et les rACS3, rACS4 d'autre part les rACS du premier groupe présentent plus de 55% d'homologie de séquence en acides aminés.(50,94) La rACS3 et la rACS4 possèdent 68% d'acides aminés identiques (55) et moins de 30% des acides aminés sont conservés entre les deux sous-familles (41, 94) (Fig. 10). Ces mêmes deux sous-familles existent aussi pour les ACS humaines puisque le groupe constitué de la hACS1 et de la hACS2 (65% d'identité) et le groupe associant la hACS3 et la hACS4 (62% d'identité) possèdent également moins de 30% d'acides aminés identiques (72).

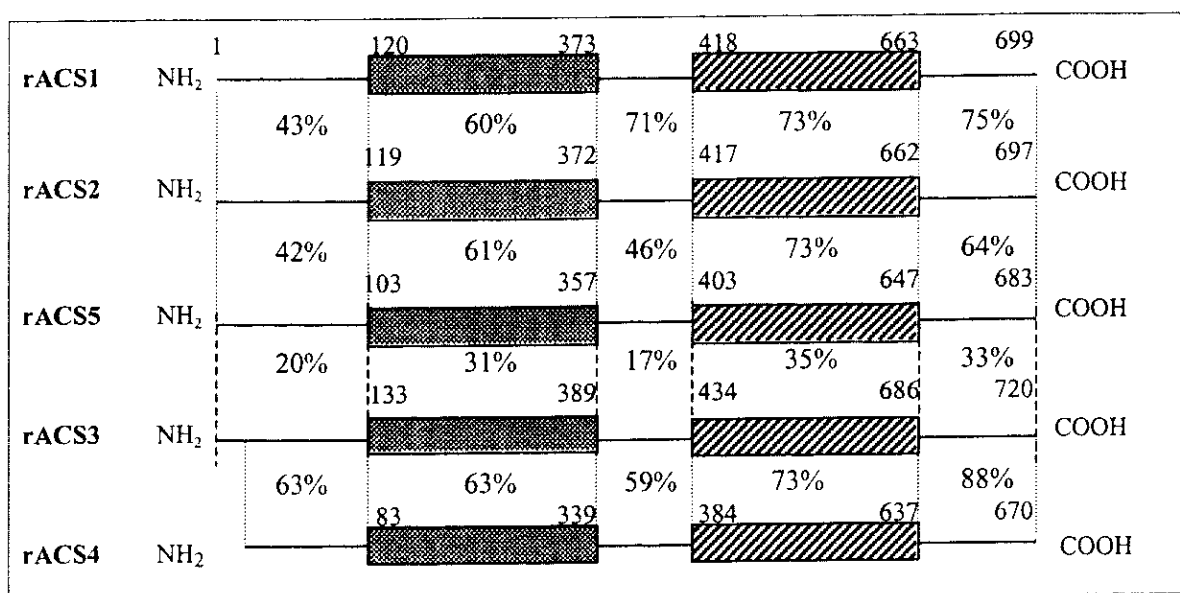


Figure 10: Homologie de séquences primaires entre les membres des deux sous-familles des rACS

(D'après Iijima *et al.*, 1996 (50) ; Kang *et al.*, 1997 (55) ; Oikawa *et al.*, 1998 (94))

Une autre forme humaine (HACS), également obtenue à partir d'une banque d'ADNc de foie humain, serait orthologue de la rACS1 avec 85% d'homologie dans leurs séquences primaires (1). Néanmoins, la séquence nucléotidique de la HACS est identique à seulement 93% à la hACS1 (42). Ces derniers auteurs n'excluent pas que les différences observées entre les deux séquences d'ADNc puissent être la conséquence "d'erreurs" de séquençage ; les deux ADNc représenteraient alors bien le même gène. Néanmoins, il apparaît plus vraisemblable que ces différences soient le reflet d'une variation polymorphique ou de l'existence de deux gènes distincts.

Pour la forme humaine orthologue de la rACS2, deux séquences d'ADNc existent également (138, 72). Ces séquences ont été publiées en même temps, par deux équipes indépendantes. Mais dans ce cas, seule l'extrémité 3' non codante de la séquence nucléotidique varie d'un groupe à l'autre. Il est vraisemblable qu'il s'agisse d'un seul et même ADNc.

La hACS4 publié par Cao *et al.* (1998) (17) et la hACS4 publiée par Piccini *et al.* (1998) (95) sont à 100% identiques et possèdent 97% d'homologie avec la rACS4. Les homologies de séquence observées entre les ACS sont résumées dans le **tableau 4**.

La comparaison des séquences protéiques permet de repérer des portions de séquence ou des sites jouant un rôle dans l'activité biologique d'une protéine. Les domaines fonctionnels des ACS ont ainsi pu être définis, en comparant les séquences connues entre les espèces et également, en comparant les séquences ACS avec les séquences d'autres protéines.

Acides aminés identiques (%)										
	rACS1	rACS2	rACS3	rACS4	rACS5	hACS1 (HACS)		hACS2	hACS3	hACS4
rACS1	100									
rACS2	65	100								
rACS3	30	29	100							
rACS4	27	28	68	100						
rACS5	60	57	29	29	100					
hACS1	83	63	29	30	60	100				
(HACS)	85	64	29	30	61	96	100			
hACS2	65	91	28	30	60	65	66	100		
hACS3	30	29	92	67	31	30	30	28	100	
hACS4	27	28	62	97	28	28	28	30	62	100

Tableau 4 : Homologies de séquences primaires entre les différentes isoformes

E. DOMAINES FONCTIONNELS

Iijima *et al.* (1996) (50) ont évalué l'importance de chacun des cinq domaines pour l'activité catalytique de la rACS1. Ils ont construit cinq plasmides d'expression dans lesquels l'un des cinq domaines a été entièrement délété. Aucune des ACS délétées obtenues après expression hétérologue des mutants, ne possède d'activité. Les cinq domaines apparaissent donc indispensables à l'expression fonctionnelle de la rACS1.

Parmi les cinq régions des ACS, deux (LR1 et LR2) présentent une forte homologie en acides aminés avec les enzymes de la famille de la luciférase (Fig. 11). Les pourcentages d'identité entre les domaines LR1 et LR2 des ACS et les régions correspondantes de la luciférase s'élèvent à 26% et 27% pour la rACS1, 21% et 26% pour la rACS2 (40) et 21% et 25% pour la rACS3 (41). Or la formation d'un adénylate intermédiaire est une étape commune des réactions catalysées par les ACS et les luciférases.

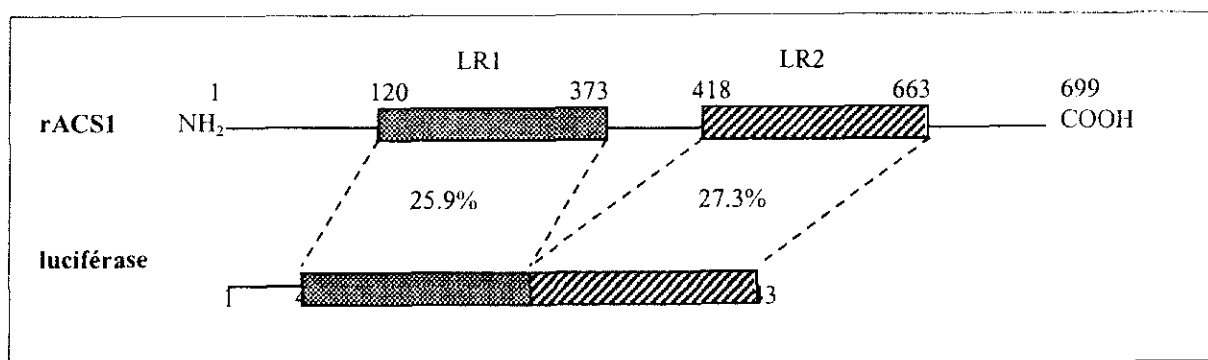


Figure 11: Homologies de séquences primaires entre la "click-beetle" luciférase et la rACSI (d'après Fujino and Yamamoto, 1992)(40)

III. DEVENIR ET ROLES DES PROFENYL-COENZYME A

La conséquence la plus évidente de la formation du *R(-)*-profényl-CoA est sa contribution, *via* l'épimérisation et l'hydrolyse, à la production de l'énantiomère actif *S(+)* responsable des effets thérapeutiques souhaités mais aussi des effets indésirables COX-dépendants.

Néanmoins, le thioester de CoA du profène demeure un élément potentiellement réactif du fait même de la présence de la liaison thiolate et, la perte immédiate de cette activation par hydrolyse est, sans aucun doute, le devenir intracellulaire du xénobiotique le plus limité que l'on puisse imaginer.

En effet, la présence de cette liaison riche en énergie, équivalente à celle que possèdent les acides gras activés, doit théoriquement permettre d'envisager une interaction du profényl-CoA avec l'ensemble des voies métaboliques empruntées par les acides gras à longue chaîne. La mise en évidence de l'incorporation de l'ibuprofène, du fénoprophène et du kétoprofène dans les acyl-glycérols conduisant à la formation de triglycérides hybrides est un exemple remarquable de cette réactivité.

Les voies métaboliques des acyl-CoA sont complexes et les systèmes enzymatiques impliqués ne sont pas toujours parfaitement caractérisés. Parmi les devenirs les plus importants des acyl-CoA, les voies métaboliques les plus caractéristiques sont indispensables à la bioénergétique cellulaire. Mais les acyl-CoA participent également à la synthèse des phosphoacyl-glycérols qui sont des constituants amphiphiles majeurs des structures membranaires participant à la communication intracellulaire et à la coopération cellulaire. En effet, les acyl-CoA sont de puissants modulateurs d'enzymes soit comme effecteur allostérique, soit par acylation.

En plus de l'intégration directe des aryl-2-propionyl-CoA dans les voies métaboliques dédiées aux acyl-CoA, rien ne s'oppose à ce qu'ils puissent exercer, comme les acyl-CoA, des actions directes sur des constituants cellulaires (enzymes ou protéines de transport). Quoiqu'il en soit, l'interaction des aryl-2-propionyl-CoA avec ces voies métaboliques est le plus souvent spéculative et les connaissances rapportées sont fragmentaires. L'objectif de cette partie est de rassembler les données relatives à l'implication des aryl-2-propionyl-CoA avec les voies métaboliques et/ou les systèmes enzymatiques dédiés au métabolisme des acides gras.

A. INVERSION CHIRALE

1. MISE EN EVIDENCE

La première mise en évidence, *in vivo*, de l'inversion chirale a été apporté par Mills *et al.* en 1973 (80). En effet, chez l'homme, les métabolites urinaires de l'ibuprofène sont dextrogyres quel que soit l'énantiomère administré. D'autres équipes ont également montré par un suivi de la cinétique plasmatique de chacun des énantiomères, que la clairance de l'énantiomère *R*(-) administré s'accompagnait de l'apparition de l'énantiomère *S*(+) tandis que seul l'énantiomère *S*(+) est retrouvé dans le plasma après l'administration de cet isomère (Fig. 12)

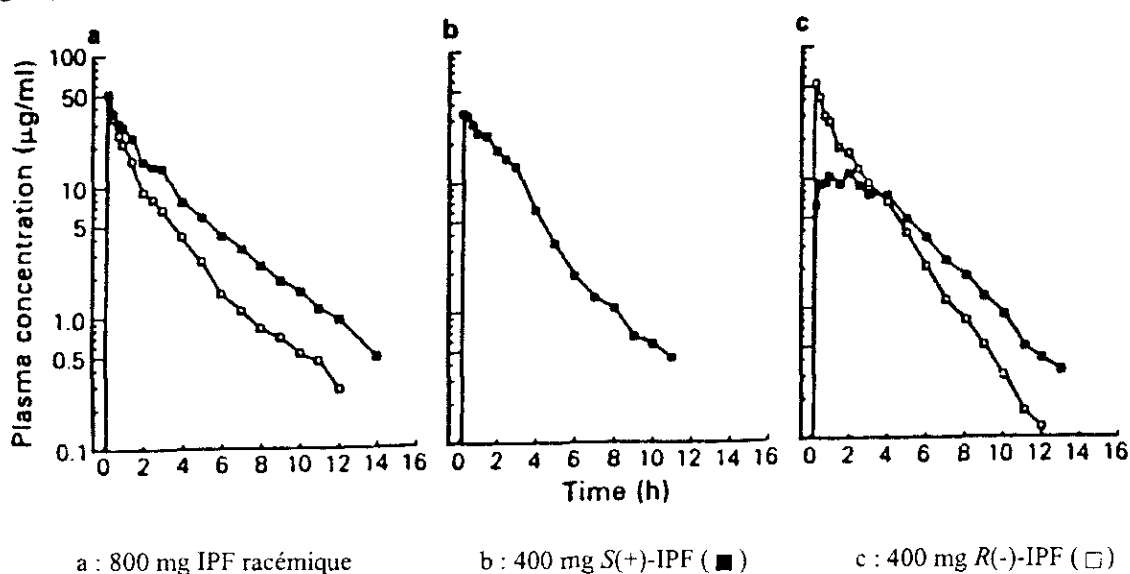


Figure 12 : Profils plasmatiques des énantiomères de l'ibuprofène après administration de ce composé chez l'homme
(d'après Lee *et al.* 1985)

En plus de l'existence de l'inversion chirale permettant la transformation de l'énantiomère *R*(-) inactif en son antipode actif *S*(+), ces résultats démontrent également le caractère unidirectionnel (*R* vers *S*) de cette voie métabolique particulière. L'inversion de l'énantiomère *S*(+), bien que constatée chez le rat (36) et le chien pour l'acide phényl-2-propionique et chez le cobaye pour l'ibuprofène (23), reste le plus souvent absente en ce qui concerne les autres composés (85, 32). L'inversion chirale a également été étudiée *in vitro* grâce à l'utilisation de techniques telles que les organes isolés et perfusés ou les hépatocytes en suspension. En revanche, l'utilisation de fractions subcellulaires, microsomaux en particulier, ne permet pas, le plus souvent, de mettre aussi facilement en évidence l'inversion chirale (74).

L'inversion chirale des aryl-2-propioniques permet d'expliquer les différences observées entre les rapports eudismiques *S/R* *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, la valeur proche de 1000 obtenue *in vitro* et démontrant la stéréospécificité d'action de l'énantiomère *S*(+) du flurbiprofène chez le cobaye, est abaissée à 8 *in vivo* (tab. 5)

Rapports eudismiques S/R			
		<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 5 : Stéréosélectivité de l'action des profènes *in vitro* et *in vivo*
(d'après Caldwell *et al.*, 1988) (15)

Ces rapports eudismiques varient également en fonction de l'espèce et du composé étudié. Cette disparité est à rapprocher des variations interspécifiques et intercomposés dont fait preuve l'inversion chirale.

Une même espèce peut inverser de façon très variable différents profènes. Un même composé peut aussi être inversé de façon très variable par différentes espèces. Certains profènes, comme le carprofène, ne semble pas subir d'inversion chirale quelle que soit l'espèce, alors que d'autres composés comme le fénoprofène ou l'ibuprofène sont toujours largement inversés. De même, il existe une variation de l'inversion chirale en fonction des individus d'une même espèce (Fig. 13).

Variation de l'inversion chirale

<u>Variation selon l'espèce animale d'intérêt</u>	<u>Variation selon le profène étudié</u>	<u>Variation selon l'individu considéré</u>
<p>FluPF : cobaye 10 % chien 39 % homme 0 %</p> <p>KPF : rat 39 % chien 73 % homme 10 % lapin 10 %</p>	<p>Rat : KPF 79 % FPF 42 % carprofène 0 %</p>	<p>Homme sujet à l'ostéo-arthrite IPF 65 % (35 à 85 %)</p>

Figure 13 : Variations de l'inversion chirale
(d'après Fretton J, 2001) (37)

L'inversion chirale est essentiellement hépatique mais la participation d'autres organes n'est pas à négliger. Hall *et al.*, 1992 (44) ont montré en utilisant des préparations de poumon

isolé et perfusé de lapin, une inversion pulmonaire du fénoprofène et de l'ibuprofène. Cette inversion n'est observée qu'en l'absence d'albumine dans le liquide de perfusion, les profènes liés à l'albumine n'étant plus suffisamment disponibles pour le tissu pulmonaire. La possibilité d'une inversion chirale pré-systémique a été mise en évidence *in vivo* après administration orale de kétoprofène chez le rat (35) ou *in vitro* dans les différents segments intestinaux pour le bénomprofène (108) et le fénoprofène (7). L'estomac ne semble pas participer à l'inversion chirale du fénoprofène tandis que le duodénum et surtout le jéjunum l'inversent activement. Yamagushi et Nakamura (1987) (139) ont également montré la participation du rein dans l'inversion, *in vivo*, de l'acide 2-phénylpropionique. La participation de cet organe dans l'inversion chirale de l'ibuprofène n'a pu être mise en évidence. La capacité des différents tissus à inverser les profènes peut avoir d'importantes implications thérapeutiques et toxicologiques. L'activation locale des énantiomères *R*(-) en leurs antipodes inhibiteurs de COX-1 et COX-2 peut augmenter les effets gastro-intestinaux et rénaux de ces médicaments.

2. MECANISME DE L'INVERSION CHIRALE

L'inversion chirale est un processus métabolique intégrant plusieurs systèmes enzymatiques et qui conduit, après l'administration exclusive de l'énantiomère *R*(-) des profènes, à l'apparition de l'antipode *S*(+). Le mécanisme de l'inversion chirale se décompose en trois étapes (Fig. 14).

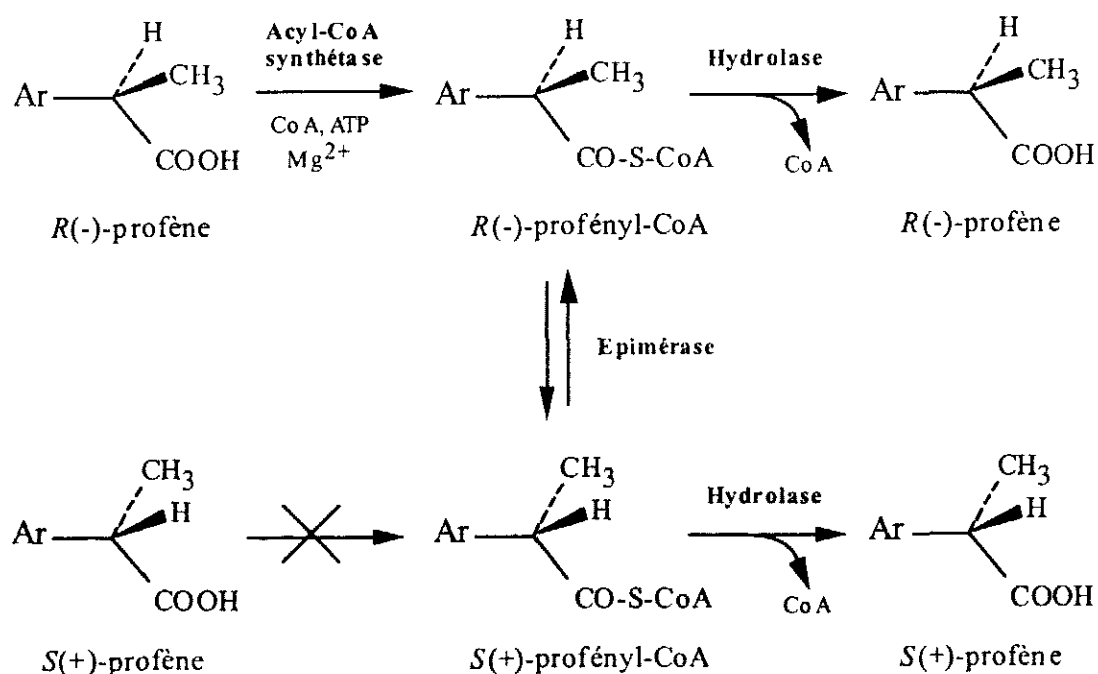


Figure 14: Mécanisme de l'inversion chirale des profènes

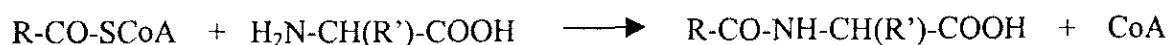
La première étape correspond à l'activation du profène sous la forme d'un thioester de coenzyme A (CoA). Cette première étape détermine la faisabilité de l'inversion chirale et contrôle la stéréosélectivité du phénomène et lui confère ainsi son caractère unidirectionnel.

Le thioester formé est ensuite épimérisé et enfin, une hydrolyse enzymatique permet la libération des deux énantiomères du profène. Toutes ces étapes sont catalysées par des systèmes enzymatiques.

B. CONJUGAISON AUX ACIDES AMINES

La conjugaison aux acides aminés des xénobiotiques possédant une fonction acide carboxylique facilite l'élimination de ces composés. En ce qui concerne les profènes, la conjugaison aux acides aminés reste un processus limité et représente donc une voie d'élimination mineure. Mais comme l'activation préalable du xénobiotique sous forme de thioester de coenzyme A est indispensable au processus de conjugaison et comme la réaction est catalysée par des *N*-amino-acyltransférases mitochondriales, la présence même de ces conjugués dans les urines est l'évidence d'une thioestérification et de la réactivité des thioesters formés. Et, sans que l'on puisse exclure la participation des ACS mitochondriales dans cette conjugaison, elle laisse néanmoins envisager un devenir du thioester de profène plus conséquent que la simple hydrolyse et notamment sa prise en charge par d'autres systèmes enzymatiques représentés, *a minima*, par la carnitine-palmitoyltransférase et la carnitine-acylcarnitine translocase, tous deux indispensables pour le passage du thioester du compartiment cytosolique à la matrice mitochondriale.

La réaction de conjugaison correspond à la formation d'une liaison amide entre la fonction carboxylique du xénobiotique et la fonction amine de l'acide aminé ou de son dérivé représenté principalement par la glycine, la taurine ou la glutamine. La réaction de conjugaison peut être schématisée de la façon suivante :



L'activité des *N*-amino-acyltransférases, enzymes solubles, est principalement localisée dans le rein et le foie (14). L'activité rénale semble plus importante que l'activité hépatique.

Ainsi, Shirley *et al.* (1994) ont découvert un nouveau métabolite urinaire chez l'homme, après administration orale d'ibuprofène racémique. Ce métabolite a été identifié comme étant conjugué à la taurine. Il s'agit d'une voie de transformation mineure de l'ibuprofène puisque moins de 2% de la dose administrée est retrouvée, sous cette forme, 24 heures après l'administration. Le conjugué est majoritairement de configuration *S*(+). Les auteurs proposent l'existence d'une stéréosélectivité soit de formation soit d'excrétion du conjugué.

La conjugaison du l'ibuprofényle-CoA à la taurine est également observée *in vitro*, avec des fractions mitochondriales hépatiques ainsi qu'avec des hépatocytes de rat. Les auteurs supposent l'existence d'une conjugaison avec la glycine bien qu'aucun métabolite de cette forme ne soit détecté dans les urines. La conjugaison concerne également le loxoprofène chez le chien (89) et le bénaxoprofène chez le rat (83). L'acide 2-phénylpropionique peut aussi se conjuguer à la glycine.

Chez le chien, 24 heures après administration orale de l'acide 2-phénylpropionique racémique, de l'énantiomère *R*(-) ou de l'énantiomère *S*(+), 20.6%, 21.4% et 23.1%

respectivement de la dose administrée sont retrouvés, dans les urines, conjugués 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 facilement se comprendre en raison de l'inversion chirale, celle observée après administration de l'énantiomère $S(+)$ ne peut que s'expliquer par l'existence d'une thioestérification de cet énantiomère. Les auteurs concluent donc à l'existence d'une inversion chirale et à une thioestérification de l'acide $S(+)$ -2-phénylpropionique chez le chien.

Les aryl-2-propionyl-CoA possèdent d'autres actions dans le compartiment mitochondrial ; ils interfèrent notamment avec le catabolisme des acides gras.

C. INHIBITION DE LA β -OXYDATION MITOCHONDRIALE

L'oxydation cellulaire des acides gras, en générant de l'acyl-CoA, est une voie majeure de production d'énergie et est, entre autres, utilisée pour la gluconéogenèse, voie indispensable au maintien de la glycémie. L'oxydation des acides gras s'effectue dans un compartiment cellulaire différent de celui de leur synthèse et est exclusivement mitochondriale. Toutes les étapes font intervenir des dérivés acyl-CoA et font participer des systèmes enzymatiques isolés et spécifiques. Les acides aryl-2-propioniques peuvent interférer avec les systèmes impliqués dans le catabolisme des acyl-CoA.

Cette inhibition serait à l'origine de l'accumulation de triglycérides hépatiques et par la suite, de stéatose microvésiculaire .

Deux mécanismes d'inhibition sont possibles, l'un est CoA-dépendant et stéréosélectif de l'énantiomère $R(-)$, l'autre est CoA-indépendant, non stéréosélectif et serait la conséquence d'un découplage de la phosphorylation oxydative (140) . Seul le mécanisme CoA-dépendant nous intéressera dans cette partie. Il peut s'expliquer par une compétition vis-à-vis du pool de CoA libre entre les énantiomères $R(-)$ des profènes et les acides gras et/ou par une compétition entre les énantiomères $R(-)$ et les acides gras pour l'acyl-CoA synthétase des acides gras à longue chaîne (11) . Enfin, ce n'est pas que sous la forme d'un acylcarnitine que les acides gras à longue chaîne, initialement activés en acyl-CoA, pénètrent dans les mitochondries pour y être oxydés. Les énantiomères $R(-)$ des profènes ont été proposés pour former des petites quantités de *R*-profénycarnitines et, ainsi s'opposer directement à la β -oxydation mitochondriale des acides gras (140) .

Si les profènes interfèrent avec le catabolisme mitochondrial des acides gras, ils vont également perturber, par leur intermédiaire thioester, les voies cytosoliques de biosynthèse des acides gras.

D. INHIBITION DE L'ACÉTYL-CoA CARBOXYLASE

La biosynthèse des acides gras est assurée par une voie métabolique spécifique localisée dans le cytosol, qui accomplit la synthèse totale du palmitate à partir de l'acétyl-CoA. La production de malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA est l'étape initiale et celle qui contrôle l'ensemble de la voie de la lipogenèse. Elle fait intervenir une enzyme biotine dépendante : l'acyl-CoA carboxylase.

L'effet hypolipémiant, décrit pour l'ibuprofène, le kétoprofène et le fénoprofène chez le rat, traduit une inhibition de la synthèse des acides gras et une diminution des lipides plasmatiques. Kemal *et al.* (1991) (56) ont montré une inhibition, en faveur du *S(+)*-IPF-CoA, de l'acétyl-CoA carboxylase.

Les aryl-2-propionyl-CoA sont également "confondus" avec les acyl-CoA par les systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse des lipides structuraux.

E. INCORPORATION DANS LES LIPIDES HYBRIDES

L'intégration des profènes dans des motifs structuraux est vraisemblablement le devenir du thioester permettant la conservation cellulaire la plus longue du motif profène.

L'hypothèse que les profènes puissent remplacer l'un des trois acides gras des triglycérides a été évoqué dès 1978 par Fears *et al.* (34) à la suite de l'observation d'une incorporation massive dans les triglycérides du tissu adipeux de rat d'un analogue structural aux propriétés hypolipémiantes, le BRL 10894. Ces mêmes auteurs ont constaté, *in vitro*, la production d'un métabolite inhabituel lorsque l'ibuprofène, le fénoprofène ou le kétoprofène étaient incubés, dans des tranches fines de foie de rat, avec du [¹⁴C]-glycérol ou du [¹⁴C]-palmitate. Ce composé anormal a été défini comme un triglycéride hybride. Les auteurs ont également montré que le flurbiprofène, qui n'est pas thioestérifié dans le foie de rat, ne forme pas de triglycérides hybrides.

Une étude équivalente *in vivo* a également été menée par Williams *et al.* ; (1986) (137) mettant en évidence l'incorporation de l'ibuprofène dans les triglycérides du tissu adipeux de rat. De plus, la production de triglycérides hybrides n'est pas observée après l'administration répétée de *S(+)*-IPF. En revanche, après l'administration l'ibuprofène racémique ou de *R(-)*-IPF conduit à une incorporation des deux isomères optiques. Seul l'énantiomère *R(-)* est activé en thioester de CoA et peut donc, avec le racémique, aboutir à la production de triglycérides hybrides. L'incorporation de l'énantiomère *S(+)* dans ces lipides hybrides s'effectue après la racémisation du *R(-)*-profénoyl-CoA formé en *S(+)*-profénoyl-CoA.

Cette stéréosélectivité de formation est également observée *in vivo* pour le *R(-)*-KPF dans le tissu adipeux de rat et *in vitro* pour le *R(-)*-KPF et le *R(-)*-FPF dans les hépatocytes et les adipocytes de rat.

Scheuerer *et al.* (1998) (106) ont montré qu'un prétraitement au clofibrate augmente l'incorporation de l'ibuprofène dans les lipides hybrides, conséquence de l'induction de l'expression des acyl-CoA synthétases. Ainsi, l'énantiospécificité n'existe que pour l'étape de

thioestérification, l'acylation ultérieure des acyl-glycérols n'étant apparemment pas stéréosélective.

Les triglycérides hybrides peuvent se comporter comme des réservoirs de médicaments à longue rémanence. Chez l'homme, l'ibuprofène incorporé dans les triglycérides possède une demi-vie d'environ deux jours (90). Même si les répercussions toxicologiques de la formation de ces lipides hybrides ne sont pas encore connues et apparaissent limitées, ces résidus peuvent avoir des conséquences soit par eux-mêmes, soit par le relargage de l'acide initial. Cette approche représente néanmoins une phase initiale de l'incorporation de xénobiotiques dans des constituants architecturaux cellulaires. L'hypothèse d'une intégration équivalente dans des phospholipides, notamment les glycérophospholipides et en particulier les phosphatidylcholines, ou les étherphospholipides, a été avancée et laisse envisager des conséquences toxicologiques beaucoup plus importantes, notamment en ce qui concerne la production du second messager et l'activation de la protéine kinase C (45).

F. ACYLATION DE PROTEINES

Les acyl-CoA sont des éléments modulateurs de nombreuses enzymes (autres que l'ACC) impliquées soit dans le métabolisme énergétique, soit dans les signaux cellulaires.

L'un des mécanismes entraînant une modification de la structure et de la fonction des protéines est celui conduisant à la palmitoylation de la protéine. Il s'agit d'un mécanisme unique dans le domaine des modifications de structure par des acides gras. Il est réversible, régulé et à la base des interactions entre la protéine et son environnement membranaire ou encore avec d'autres protéines (79, 86).

En règle générale, une mutation abolissant cette acylation entraîne la perte de la fonction biologique. La palmitoylation, catalysée par une palmitoyl acyltransférase, apparaît donc comme une régulation réversible post-traductionnelle impliquant la fixation covalente par une liaison thioester du palmitate à certains résidus cystéine.

Parmi les protéines cibles, nombreuses sont celles qui participent à la communication intracellulaire. L'implication d'aryl-2-propionyl-CoA dans l'acylation de protéines intracellulaires n'a jamais été envisagée. Il s'agit d'une conséquence potentielle, importante des profènes subissant une thioestérification.

G. INHIBITION DE LA CYCLO-OXYGENASE 2

Les thioesters de profènes pourraient également inhiber les cyclo-oxygénases. Neupert *et al.* (1997) (90) ont montré que si le *R*(-)-IPF n'inhibe ni COX-1, ni COX-2 aux concentrations thérapeutiques usuelles, le *R*(-)-IPF-CoA, lui, peut inhiber COX-2. Cette inhibition de COX-2 a également été observée avec le *S*(+)-IPF-CoA. Néanmoins, environ 35% des thioesters d'IPF étaient hydrolysés dans les conditions d'incubation et moins de 2% étaient racémisés. L'inhibition de COX-2 observée avec le *S*(+)-IPF-CoA, peut donc être due à la présence de *S*(+)-IPF, obtenu après hydrolyse du thioester. Néanmoins, cette explication ne peut s'appliquer au *R*(-)-IPF-CoA puisque le *R*(-)-IPF n'affecte pas l'activité de COX-2 ($IC_{50} > 250 \mu M$ versus $5.6 \mu M$ pour le *R*(-)-IPF-CoA). Il reste à découvrir si cette inhibition

par le thioester est propre à l'ibuprofène ou si elle peut être généralisée à d'autres profènes ainsi que le mécanisme mis en œuvre pour assurer cette inhibition.

Ainsi, nous avons vu que les profényl-CoA sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques normalement dédiées aux acyl-CoA en "abusant" les systèmes enzymatiques impliqués. Ces systèmes enzymatiques sont nombreux et leur importance est à rapprocher du rôle clé joué par les acyl-CoA à longue chaîne dans la cellule, qui impose une régulation extrêmement fine.

En effet, la concentration du pool d'acyl-CoA cellulaire est comprise, en condition physiologique normale, dans un intervalle de 110 à 150 μM dans les hépatocytes ou le cœur (84). Bien que cette concentration puisse varier de façon importante en fonction du type cellulaire ou de l'état physiologique, il est difficile de concevoir que de telles concentrations puissent exister à l'état libre.

En effet, les acyl-CoA sont des molécules amphiphiles pouvant, aux concentrations élevées, s'associer sous la forme de micelles. La concentration micellaire critique est estimée entre 30 et 60 μM ou entre 70 et 80 μM entraînant, sous cette forme, une action détergente puissante et la destruction de la cellule. De plus, les acyl-CoA possèdent des propriétés inhibitrices puissantes sur des enzymes clés du métabolisme intermédiaire à des concentrations largement inférieures à celles décrites (l'ACC avec un K_i de 5.5 nM, l'ANT "adenine nucleotide translocase" avec un $K_i < 1\mu\text{M}$, l'ACS mitochondriale avec un K_i de 4 μM , la glucose 6-phosphatase avec un K_i de 50 μM , la glucokinase avec un K_i de 0.5 μM). Il apparaît donc évident que des concentrations de plus de 100 μM ne peuvent exister à l'état libre et, qu'en tout état de cause, cette concentration ne peut excéder le K_i de l'ACC. Un système complexe de transporteurs protéiques cytosoliques, en assurant une régulation extrêmement fine de la concentration libre en acyl-CoA, possède un rôle fonctionnel pivot dans la cellule. Ces protéines de liaison sont représentées essentiellement par les ACBP ("acyl-CoA binding protein" et les FABP ("fatty acid binding protein"). L'ACBP est présente à une concentration de 50 μM et possède un K_d moyen pour les acyl-CoA de 1 nM. Dans ces conditions, elle assure une concentration libre d'acyl-CoA inférieure à 10 nM lorsque le rapport ACBP/acyl-CoA est inférieur à 1. Lorsque ce ratio se rapproche de 1, les concentrations libres s'accroissent rapidement jusqu'à tendre vers la concentration d'acyl-CoA totale pour un rapport supérieur à 1. ainsi, lorsque ce rapport dépasse 1, les FABP (K_d de l'ordre de 1 μM) prennent en charge les acyl-CoA excédentaires (Fig. 15) . Avec une concentration libre en acyl-CoA en excès même si d'autres systèmes (les phospholipides membranaires et les systèmes enzymatiques utilisant les acyl-CoA) participent également au maintien du pool d'acyl-CoA (33) .

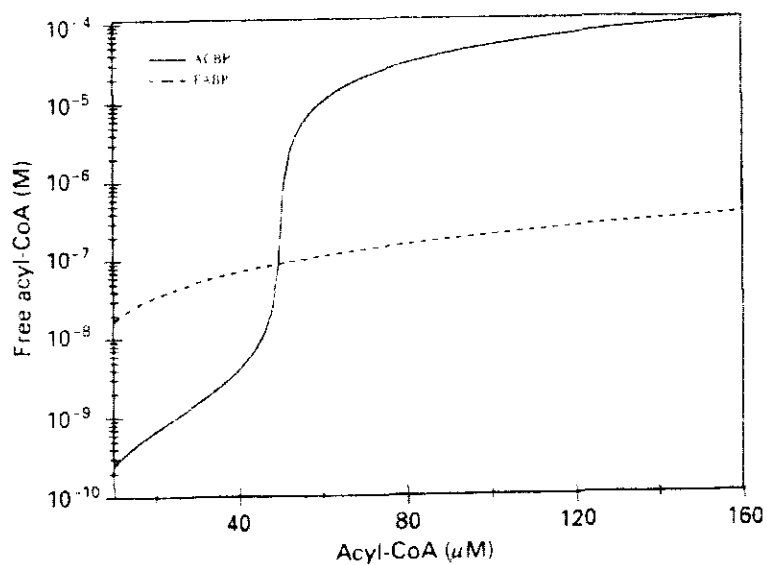


Figure 15 : Concentration d'acyl-CoA libres en présence d'ACBP ou de FABP

II^{EME} PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

Objectifs

Les profènes représentent une classe thérapeutique importante par leur propriété anti-inflammatoire et sont distribués dans de nombreux tissus y compris le cerveau.

Ormis leur action pharmacologique locale, des études préliminaires avaient permis de mettre en évidence l'existence d'un métabolisme cérébral. En effet, l'existence d'une inversion chirale cérébrale précédemment montrée (Sevoz *et al.*, 1999 (105)) laisse envisager l'existence d'une thioestérification des profènes dans cet organe puisque cette étape est l'étape limitante et déterminante de cette particularité pharmacologique.

La thioestérification des aryl-2-propioniques implique les acyl-CoA synthétases (ACS) à longue chaîne. Cinq isoformes d'ACS ont actuellement été décrites et présentent une spécificité d'expression tissulaire marquée. L'isoforme principalement exprimée dans le cerveau de rat adulte est l'ACS2 même si l'ACS1 et l'ACS3 y sont également représentées en très faible quantité.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la réelle participation de l'ACS2 dans le métabolisme des anti-inflammatoires. La démarche expérimentale choisie repose sur l'évaluation de la capacité de l'ACS2 et de l'ACS1 recombinantes, obtenues par expression hétérologue, à thioestérifier le fénoprophène et l'ibuprofène.

I. MATERIELS ET METHODES

A. ANIMAUX

Les animaux utilisés sont des rats de sexe mâle, souche Spague-Dewley (IFFA-CREDO). Ils pesaient entre 200 et 250 g. Ils étaient nourris avec un régime industriel standard adapté, sans caractéristiques particulières, et abreuvés à volonté.

B. REACTIFS

Pour cette étude trois profènes ont été utilisés : l'ibuprofène (IPF), le fénoprofène (FPF) et le flurbiprofène (FluPF).

Les énantiomères $S(+)$ et $R(-)$ du FluPF sont un don du professeur Gerd Geisslinger (département de pharmacologie et de toxicologie expérimentales et cliniques, université d'Erlangen, Nürnberg, Allemagne). La pureté optique des énantiomères est de 98.5% pour le $S(+)$ et de 99.1% pour le $R(-)$.

Les énantiomères $S(+)$ et $R(-)$ de l'IPF ont été obtenu auprès du Research Biochemicals, Inc. (Natick, MA ; pureté >98%). Le FPF, sous forme de mélange racémique a été obtenu auprès de SIGMA (Saint-quentin Fallavier, France).

Les énantiomères $R(-)$ et $S(+)$ -FPF ont été obtenus par cristallisation stéréosélective. La (-)-méthylbenzylamine est utilisée comme inducteur chiral. La pureté finale des $R(-)$ et $S(+)$ -FPF a été estimée par HPLC, après dérivation avec de la L-leucinamide, à 96.4% et 98.8%, respectivement. Les différents $R(-)$ -profényl-CoA ont été synthétisés par la méthode de Chen *et al.* (1991) (23) (Annexe I) et ont servi d'étalon analytique pour les dosages HPLC.

Afin de réaliser une droite étalonnage (relation surface du pic avec la concentration en thioester), différentes dilutions des thioesters produits par voie chimique (5 concentrations différentes) ont été injectés séparément dans le système HPLC. La concentration en thioester a ensuite été déterminée à partir des mêmes dilutions après hydrolyse alcaline (2N KOH, 55°C, 45 min), permettant ainsi de relier la quantité de thioester initialement présents à la quantité d'aryl-2-propioniques libérée par hydrolyse.

Les DNAPolymérase ont été acquises auprès de Promega (Charbonnières, France) et toutes les enzymes de restriction ont été obtenues auprès de Roche Diagnostics (Meylan, France). Tous les autres composants et réactifs ont été obtenus auprès de différentes sources commerciales.

Les techniques de biologie moléculaire ont été utilisées essentiellement telles qu'elles sont décrites par Sambrook *et al.* (1989) (104).

C. METHODES

1. PREPARATION DES ARN

Les ARN messagers ont été obtenus à partir d'un foie de rat adulte fraîchement tué en utilisant un kit commercial de préparation des ARN messagers en suivant le protocole du fournisseur ("PolyAtract mRNA isolation system", Proméga). Brièvement, 100 mg de tissu frais, broyés dans de l'azote liquide, sont récupérés et dilués dans le tampon dissociation fourni. Les ARN poly-A sont séparés du milieu en utilisant des billes paramagnétiques greffées avec de la streptavidine et 150 pmol d'oligo-dT biotinylé. Les ARN sont élués dans 800 µL d'eau RNase free. La qualité des ARN est vérifiée par le ratio de l'absorbance à 260/280 nm et la quantité est estimée par l'absorbance à 260 nm en utilisant le rapport 40 µg/mL par unité d'absorbance.

Les ARN totaux ont été obtenus à partir de cerveau de rat fraîchement tué et broyé dans de l'azote liquide. Les ARN totaux sont purifiés à partir de 80 mg de tissu en utilisant le kit "SV RNA total" (Proméga). Après digestion de l'ADN par 5 µL de DNaseI RNase free, les ARN totaux sont élués par 100 µL d'eau RNase free. La qualité et la quantité d'ARN sont estimées comme précédemment.

2. REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Le mélange d'ADNc a été synthétisé à partir de 50 ng d'ARN-poly(A) et de 100 ng d'ARN total en utilisant 20 pmol d'oligo-dT et 2 U de reverse transcriptase du virus myéloblastique aviaire (AMV-RT) dans un volume final de 50µL de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 8.3 à 25°C, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 0.5 mM spermidine, et 0.2 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate) à 37°C pendant une heure et à 65°C pendant 15 min. Avant incubation, les ARN ont été dénaturés par un préchauffage de 1 min à 62°C.

Les produits de la réaction ont été purifiés sur des colonnes (Qiagen) et stockée à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Cinq microlitres des ADNc produits ont été amplifiés par PCR (Saiki *et al.*, 1988) en utilisant des amorces spécifiques (20 pmol de chaque) déterminés à partir des séquences publiées de l'ACS1 (Suzuki *et al.*, 1990 (119)) et de l'ACS2 (Fujino et Yamamoto, 1992 (40)) dans 50 µL de solution tampon pour PCR (Tris-HCl 10 mM pH 9.0 à 25°C, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton), 0.2 mM de chaque désoxyribonucléotide phosphate, 1 U de *Taq* ADN polymérase et 0.3 U de *Pfu* ADN polymérase. Les séquences des codons sens et des codons anti-sens étaient 5'-GGAATTCATGGAAGTCCACGAATTGTTCCGG-3' (incluant le site *EcoRI*) et 5'-CTGCAGGGTACGAGGAGGATTGTGGAGGTGGCGCC-3' (incluant le site *PstI*) pour l'ACS1, respectivement et 5'-ACCATGCAGACCCAGGAGATCC TGAGGATCCTGCGG-3' et 5'-GCAAGCTTGAGCTTCACATGGAGATTGAG-3' (incluant le site *HindIII*), pour l'ACS2 respectivement. Les conditions de PCR étaient de 94°C pendant 2 min suivis de 30 cycles à 94°C pendant 45 s de dénaturation, 45 s à 55°C d'appariement et 4 min d'élongation à 68°C avec un incrément de 6 s par cycle. L'élongation terminale est assurée par 5 min à 72°C.

Les fragments de 2.1 kb issus de la PCR sont visualisés sur gel d'agarose (1.2%) en présence de bromure d'éthidium (0.5 µg/mL de BET).

3. CONSTRUCTION D'UN PLASMIDE D'EXPRESSION D'ACS

La production des protéines déduites des séquences de l'ACS1 et de l'ACS2 est assurée en utilisant un vecteur d'expression procaryote pKK223-3 (Amersham) par *E. Coli* (BL21). Les produits de 2.1 kb sont extraits sur gel après digestion de l'agarose et purifiés sur colonne (Qiagen). Les fragments de PCR sont soumis à une digestion spécifique par 10 à 20 U d'enzyme de restriction (*i.e.*, *EcoRI* et *PstI* pour ACS1 et *HindIII* pour l'ACS2) pendant 30 min à 37°C. Les produits issus de cette digestion ont été purifiés à nouveau sur colonnes (Qiagen). Deux µg de plasmide d'expression (pKK223-3, Amersham, Annexe II) ont été digérés de la même façon par *EcoRI-PstI* et une quantité équivalente de plasmide par *EcoRI-HindIII*. Les deux plasmides linéarisés sont purifiés sur colonne.

L'ADNc de l'ACS1 de rat a été lié dans le vecteur pKK linéarisé *EcoRI-PstI* tandis que l'ADNc de l'ACS2 de rat a été inséré dans le vecteur linéarisé *EcoRI-HindIII*. L'insertion du côté 5' de l'ACS2 est de nouveau lié en bouts-francs après restauration du site *EcoRI* par 1 U de T4-DNA polymérase en présence de dNTP. Cette construction permet de respecter la séquence Shine-Dalgarno, garantissant une production efficace de la protéine recombinante. Les ligations ont été réalisées par 3 U de T4-DNA ligase en présence du tampon fourni contenant l'ATP (Boehringer) et la ligation est réalisée en 20 min à température ambiante.

Le produit de ligation (1 µL) est inséré, par choc thermique (30 s à 42°C), dans un hôte bactérien (*E. coli* JM109) rendu chimiquement compétent par 0.1 M de CaCl₂. Les bactéries ont été mises en culture dans 100 µL de SOC pendant 1 heure puis coulées sur boîte de gélose de LB Broth contenant 100 µg/mL d'ampicilline, utilisé comme facteur de sélection. Les boîtes ont été mises en incubation (37°C sous agitation) sur 12-18 h. Les colonies isolées ont été reprises de façon stérile et mises en bouillon LB-Broth contenant le facteur de résistance sur une période de 12-18h. Puis, 1.5 mL du milieu de culture a été prélevé et centrifugé. Le culot est soumis à une lyse alcaline et les plasmides sont purifiés par précipitation éthanolique puis par passage sur colonne. La présence de l'insert est vérifiée sur chacun des clones par PCR en utilisant les amorces spécifiques du plasmide d'expression. Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'agarose et la taille de l'amplicon est estimée par un marqueur de poids moléculaire. Deux clones possédant l'insert de bonne taille sont amplifiés, les plasmides purifiés comme précédemment, et un clone de chaque ACS a été vérifié par séquençage d'ADN (Génôme Express).

A l'issue du séquençage, la séquence codante en nucléotides montrait trois mutations pour le pKK-ACS1 comparé à celui de Suzuki *et al.*, 1990 (119) (position 966 : un C à la place d'un T ; position 1605 : C/T, position 1845 :A/G si l'on considère le nucléotide 1 comme étant le A du codon initiateur) et deux mutations pour pKK-ACS2 comparé avec celui de Fujino et Yamamoto (1992) (40) (position 1206 : A/G, position 1443 : G/A). Comme ces mutations n'induisent aucune variation de la séquence déduite en acides aminés, ces plasmides ont été utilisés pour l'expression des protéines recombinantes.

4. INDUCTION PAR *E. COLI* ET PURIFICATION DE ACS1 ET DE ACS2

Une souche BL21 d'*E. Coli* a été transformée par choc thermique avec les plasmides respectifs pKK-ACS1 et pKK-ACS2 et a été cultivée sur 12-18 h en présence de LB Broth supplémenté à 100 µg/mL d'ampicilline. Quatre millilitres sont inoculés par litre de bouillon de LB Broth Miller (1% de tryptone, 0.5% d'extraits de levures, 2.5% de NaCl, pH 7.0) supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) à 37°C pendant 5 h sous agitation jusqu'à une $600A = 0.6-1.0$. L'expression de la protéine recombinante est ensuite déclenchée par l'ajout de 1 mM d'isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG). Après environ 5 h d'induction supplémentaire, les cellules ont été récupérées par centrifugation (13.000 g, 20 min, 4°C) et remises en suspension dans une solution tampon A (phosphate de potassium 50 mM pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, et 10% (v/v) de glycérol) contenant 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluorure (inhibiteurs des protéases à sérine). Les cellules ont été lysées par trois passages successifs dans une "french press" (80-100 bars) et la solution a été agitée modérément pendant 1 h à 4°C dans une solution de solution tampon A contenant 1% de Triton X-100 (solution tampon B), puis centrifugée à 110.000 g pendant 1 h à 4°C. Toutes ces étapes additionnelles pour la purification des ACS ont été effectuées en accord avec Iijima *et al.*, 1996 à l'exception de la colonne d'affinité CL-6B bleue-sépharose (Amersham). En effet, 70 mL de broyat bactérien ont été déposés sur une colonne DEAE sephacel (50 mL environ) préalablement équilibrée en solution tampon B à une vitesse de dépôt de 0.3 mL/min. La colonne a ensuite été rincée par 150 mL de solution tampon B (0.35 mL/min) puis 150 mL de solution tampon C (solution tampon A + 0.1% Triton X-100). La colonne est éluée dans un gradient linéaire (0.2%/min) de solution tampon C et solution tampon C + 0.5 M de NaCl. Les fractions éluées ont été récupérées par fraction de 4 mL et ont été testées pour leur activité à thioestérifier le palmitate. Les fractions contenant la plus grande activité sont collectées (63 mL), mélangées et mises à dialyser sur la nuit contre une solution tampon C. Après dialyse, cette fraction est déposée sur une colonne bleue-sépharose (30 mL environ) à un débit de 0.3 mL/min. La colonne a été rincée par 45 mL de solution C (0.3 mL/min) puis par 30 mL de solution tampon C + 0.15 M de NaCl à 0.3 mL/min. La colonne a été éluée dans un gradient linéaire de solution tampon C + 0.15 M de NaCl et de solution tampon C + 1.5 M de NaCl + 10 mM d'ATP. Les fractions portant l'activité ont été mélangées puis concentrées par le PEG 8000 puis dialysées contre la solution tampon A. Les fractions ont été conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Un aliquot de chaque étape a été conservé pour déterminer son activité et sa concentration en protéines permettant la construction des tableaux de purification. L'activité spécifique a été évaluée par HPLC en utilisant l'acide palmitique comme substrat. Les protéines ont été déterminées par la méthode de Bradford en utilisant la fraction V de la BSA comme standard (Bradford, 1976) (8).

5. ESSAIS POUR L'ACTIVITE DES ACS

L'activité des ACS à thioestérifier des acides gras de longueur de chaîne différente a été évaluée par spectrophotométrie à partir de la méthode proposée par Tanaka *et al.*, 1979 (121) dont le principe et le mode opératoire sont rapportés en **Annexe IV**. Cette dernière a été seulement utilisée pour les enzymes purifiées et l'activité a été déterminée en utilisant le facteur $6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2$ comme coefficient d'extinction molaire.

En utilisant le palmitate comme substrat de référence, le rapport de l'activité mesurée par spectrophotométrie sur l'activité mesurée par HPLC est de 1.2:1.4. La méthode HPLC est rapportée en **Annexe IV**.

6. ETUDES ENZYMATIQUES DES ACS RECOMBINANTES

Les fractions purifiées ACS1 et ACS2 ont été utilisées pour évaluer leur capacité à thioestérifier le fénoprophène, l'ibuprofène et le flurbiprofène pour chacun des 2 énantiomères.

Les incubations ont été faites dans milieu standard (0.25 mL) contenant du Tris-HCl (150 mM, pH 8.0 à 37°C), du Triton X-100 (0.8% v/v), de l'ATP (2.5 mM), du MgCl₂ (6.2 mM), du CoASH (0.6 mM), du dithiothreitol (3 mM), et du *R(-)*-IPF (0.05-2 mM) ou du *R(-)*-FPF (0.05-2 mM). Le milieu a été préchauffé (1 min, 37°C) et la réaction a été initiée par l'adjonction des protéines recombinantes (2 µg d'ACS1 et de 17 µg d'ACS2). L'incubation a été conduite à 37°C pendant 10 et 15 min respectivement pour ACS1 et ACS2. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 µL d'acétonitrile à froid. Un échantillon de 50 µl a été immédiatement injecté dans le système HPLC dont les caractéristiques sont rapportées en **Annexe IV**.

Les incubations sont effectuées avec du *S(+)*-IPF (1 mM), du *S(+)*-FPF (1 mM) et du *R(-)* ou du *S(+)*-FluPF (1 mM) dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. L'IPF-CoA et le FPF-CoA ont été dosées en utilisant une méthode HPLC spécifique de chaque thioester dont les paramètres sont rapportés en **annexe III** sur un système gradient (Merck modèle L-6200A Intelligent Pump) équipé d'un détecteur UV (255 nm ; model L-4250A) et d'un intégrateur Helwett-Packard 3390A. Les thioesters ont été élués en phase inverse sur une colonne RP-18 avec recouvrement terminal (250mm x 4 mm, particules de 5 µm) avec un solvant A : l'acétonitrile et un solvant B : 10 mM de sulfate de tétrabutylammonium, 50 mM de citrate d'ammonium. La phase mobile a été ajustée dans un gradient linéaire de 14 min contenant de 38 à 48% de solvant A pour l'IPF-CoA et de 35 à 45% de solvant A pour le FPF-CoA. Le débit est constant et de 1.5 mL/min. La détection des thioesters est assurée à 255 nm. Dans ces conditions analytiques, le temps de rétention (t_R) observé était de 11.2 min pour le FPF-CoA et de 8.7 min pour l'IPF-CoA. Le FluPF-CoA est élué dans un gradient du solvant A de 37 à 50% en 18 min ($t_R = 10.2$ min). La limite de détection pour chacun des thioesters était approximativement de 25 pmol par injection ; ce qui permettait la mesure d'une production de thioester d'au moins 50 pmol/min/mg de protéine.

Les paramètres cinétiques de la thioestérification de l'acide palmitique ont été déterminés en utilisant la méthode spectrophotométrique décrite précédemment (Tanaka *et al.*, 1979 (121)) avec des concentrations allant de 2.5 à 100 µM dans le milieu d'incubation en présence de 4 µg d'ACS1 recombinante et de 22 µg d'ACS2 recombinante.

7. ELECTROPHORESE SUR GEL SDS-POLYACRYLAMIDE (PAGE) ET IMMUNOBLOTTING

SDS-PAGE et Western blot ont été réalisés tels qu'ils ont été initialement décrits par Laemmli (1970) (68) et Towbin *et al.* (1979) (128) respectivement.

a) ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS, TECHNIQUE DE LAEMMLI.

Les protéines à analyser ont été séparées sur gel de polyacrylamide (10%) en milieu dissociant et réducteur. Les protéines ont été initialement dénaturées et chargées négativement dans un tampon de dissociation contenant 10% de SDS et 10% de β -mercaptoéthanol et 0.5 M de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 pendant 2-5 min à 100°C. Elles perdent ainsi leur structure secondaire notamment par la rupture des ponts disulfures sous l'action du β -mercaptoéthanol. Les protéines sont ensuite séparées selon la masse moléculaire à travers un polymère d'acrylamide et de bis-acrylamide par l'application d'un champ électrique (180 V, 1 h environ). Le pourcentage d'acrylamide est ajusté en fonction de la taille des molécules à séparer ; les fractions recombinantes ACS1 et ACS2 présentant des masses moléculaires attendues de 78 kDa environ (699 et 697 acides aminés pour respectivement ACS1 et ACS2), la résolution a été obtenue sur un gel SDS-PAGE de 10%. A l'issue de la migration, les protéines ont été visualisées par coloration du gel par le bleu de Coomassie R250.

b) WESTERN BLOT

Une synthétase native de palmitoyl-CoA avait été purifiée au préalable au laboratoire à partir de microsomes de foie de rat selon la méthode de Tanaka *et al.*, 1979 (121). Cette fraction homogène en SDS-PAGE a été utilisée pour immuniser des lapins blancs de Nouvelle-Zélande. Les immunoblots ont été réalisés en utilisant les fractions d'immunoglobulines polyclonales obtenues après leur purification sur colonne d'affinité avec de la protéine-A (Affi-Gel Protein A MAPS II Kit, Bio-Rad) comme anti-corps primaire (1:1000).

En résumé, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (4% de gel de concentration et 10% de gel de résolution) a été réalisée selon la technique décrite par Laemmli (1970). Après résolution, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinyl diène difluoride, 80 V 1 h). Après saturation des sites non occupés par du PBS avec 10% de lait écrémé, l'anticorps primaire est appliqué sur la membrane à une dilution 1:1000 pendant 2 heures. L'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin est ensuite déposé, après rinçage de la membrane, au titre de 1:800 pendant 30 minutes. La réaction est révélée par l'activité de la phosphatase alcaline en présence de son substrat précipitant : le BCIP-NBT (5-bromo 4-chloro indonyl phosphate, nitro bleu de tétrazolium, Bio-Rad).

8. ANALYSE DES DONNEES

L'estimation de paramètres cinétiques a été obtenue par l'incubation d'au moins dix concentrations différentes du substrat. Les incubations ont été réalisées deux ou trois fois chacune. La détermination des paramètres enzymatiques michaéliens a été obtenue soit par régression linéaire après transformation en Lineweaver-Burk, soit par régression non linéaire en utilisant la vitesse comme variable et en définissant les paramètres michaéliens entraînant la plus faible différence de la somme des carrés des résidus (Gill et Murray, 1978).

II. RESULTATS

A. AMPLIFICATION ET PURIFICATION DES ACS1 ET ACS2

Pour obtenir les fractions recombinantes de l'ACS1 et de l'ACS2 de rat à partir de colonies d'*E.coli*, un plasmide d'expression contenant la totalité de la région codante de l'ADNc correspondante a été créé. L'expression du plasmide dans les cellules compétentes d'*E.coli* a été induite par l'IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactopyrasonide) conduisant à une augmentation de plusieurs centaines de fois de l'activité palmitoyl-CoA synthétase comparée à celle observée dans les cellules transformées par le vecteur seul. Cette activité était tributaire de la présence en acides gras, en ATP et en CoASH, et n'a été mise en évidence qu'après la solubilisation des lysats bactériens.

Pour caractériser les propriétés cinétiques des ACS, les deux isoformes recombinantes de l'ACS1 et de l'ACS2 ont été purifiées sur colonne échangeuse d'ions (DEAE séphacel) puis sur une colonne d'affinité (bleu-sépharose). Les résultats de la purification des deux fractions recombinantes obtenues à partir des lysats bactériens sont représentés dans le tableau 1 pour l'ACS1 et dans le tableau 2 pour l'ACS2. Les fractions enzymatiques ont été purifiées 21 fois pour l'ACS1, avec un rendement de 9%, et 4 fois pour l'ACS2, avec un rendement de 6%. Les enzymes purifiées montraient une activité spécifique pour le palmitate de 6.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour ACS1 et 1.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour ACS2 par spectrophotométrie en utilisant l'acide palmitique comme substrat. A l'issue de la purification, aucune des fractions purifiées de protéines recombinantes ne contenaient d'enzymes interférant avec l'ATP ou présentant une activité oxydante du NADH permettant l'emploi de ces fractions lors de la méthode spectrophotométrique de thioestérification des acides gras.

Tableau 6. Résumé des étapes de purification de l'ACS1 recombinante.

Un litre de culture d'*E. coli* transformées avec le pKK-ACS1 a été lysé par "French Press" après 5 heures environ d'induction de l'expression par 1 mM d'IPTG. Cette fraction solubilisée (Triton-X100 1%) était l'étape initiale de la purification. L'activité enzymatique a été déterminée par une méthode HPLC spécifique en utilisant l'acide palmitique comme substrat.

Etape	Protéines totales mg	Activité totale nmol/min	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines	Rendement %
Lysat solubilisé (Triton X-100)	516	167	0.32	100
DEAE-Séphacel	245	152	0.62	91
Bleue-Sépharose	2.1	14.5	6.9	8.7

Tableau 7. Résumé des étapes de purification de l'ACS2 recombinante

Un litre de culture d'*E. coli* transformées avec le pKK-ACS2 a été lysé par "French Press" après 5 heures environ d'induction de l'expression par 1 mM d'IPTG. Cette fraction solubilisée (Triton-X100 1%) était l'étape initiale de la purification. L'activité enzymatique a été déterminée par une méthode HPLC spécifique en utilisant l'acide palmitique comme substrat.

Etape	Protéines totales mg	Activité totale nmol/min	Activité spécifique $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines	Rendement %
Lysat solubilisé (Triton X-100)	581	207	0.36	100
DEAE-Séphacel	82	60	0.73	29
Bleue-Sépharose	9.5	12.4	1.3	6

La **figure 16** représente un SDS-PAGE des différents stades de purification de l'ACS1 recombinante et illustre le processus de purification.

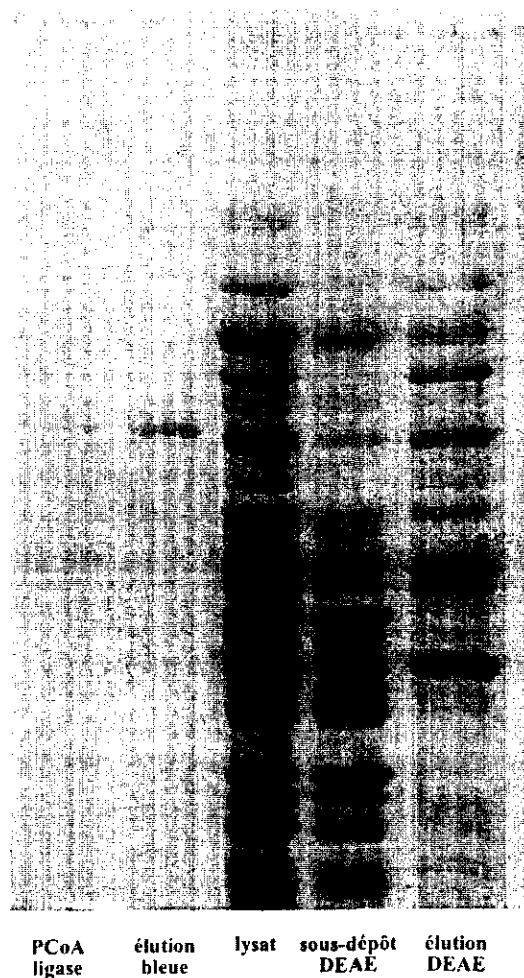


Figure 16: SDS-PAGE des différentes étapes de purification de l'ACS1 recombinante.

Un litre de culture d'*E. coli* transformées avec le pKK-ACS1 a été lysé par "French Press" après 5 heures environ d'induction de l'expression par 1 mM d'IPTG. La fraction solubilisée (Triton-X100 1%) ou lysat est considéré comme l'étape initiale de la purification. Un aliquot de 15 μ L de chaque étape de purification a été soumis à un SDS-PAGE ainsi que 2 μ g de fraction native de la palmitoyl-CoA ligase hépatique de rat.

β-CARACTERISATION DES ENZYMES RECOMBINANTES ACS1 ET ACS2

La migration électrophorétique en SDS-PAGE a permis de résoudre la forme recombinante de l'ACS1 en une seule bande homogène présentant une masse moléculaire apparente de 76 kDa. La fraction recombinante de l'ACS2 a été purifiée jusqu'à une relative homogénéité puisque cette fraction montre l'existence d'une bande principale avec une masse moléculaire apparente de 74 kDa associée à une bande mineure de 50 kDa environ (Figure 17 A).

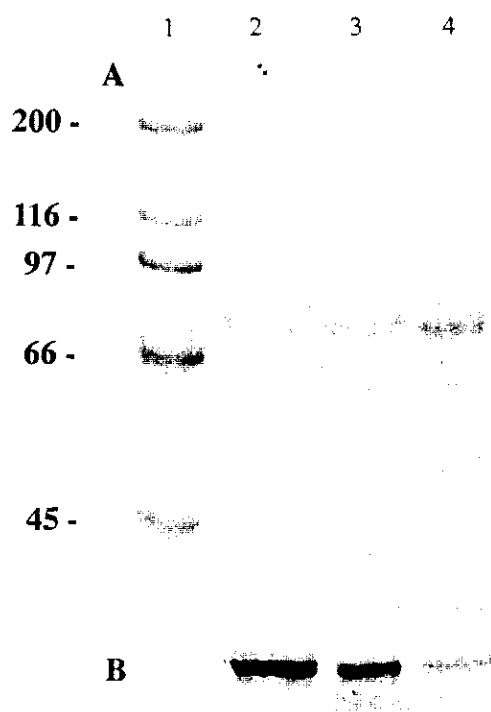


Figure 17

A : SDS-PAGE des isoformes recombinantes de l'ACS1 et de l'ACS2.

Les masses moléculaires des étalons sont représentées dans la colonne 1. La palmitoyl-CoA ligase (2 µg) est représentée dans la colonne 2. L'ACS1 recombinante (2 µg, colonne 3) et l'ACS2 recombinante (10 µg).

B : Western-blot correspondant

Un µg d'IgG purifiées obtenues chez le lapin après immunisation avec la palmitoyl-CoA ligase purifiée à partir du foie de rat, a été utilisé comme anticorps primaire.

Les anticorps polyclonaux développés contre la forme native de la palmitoyl-CoA préalablement purifiée à partir de microsomes de foie de rat reconnaît l'ACS1 recombinante comme une bande unique et de même poids moléculaire que la palmitoyl-CoA ligase. Le Western blot a montré également une réactivité croisée, mais très limitée, envers l'ACS2 recombinante (Figure 17 B).

Les formes ACS1 et ACS2 recombinantes ont également été caractérisées pour leur capacité à métaboliser les acides gras saturés. Les deux enzymes purifiées catalysent efficacement les acides gras saturés de C10:0 à C18:0 avec une préférence marquée de l'ACS2 pour les substrats ayant une longueur de chaîne légèrement supérieure (Figure 18).

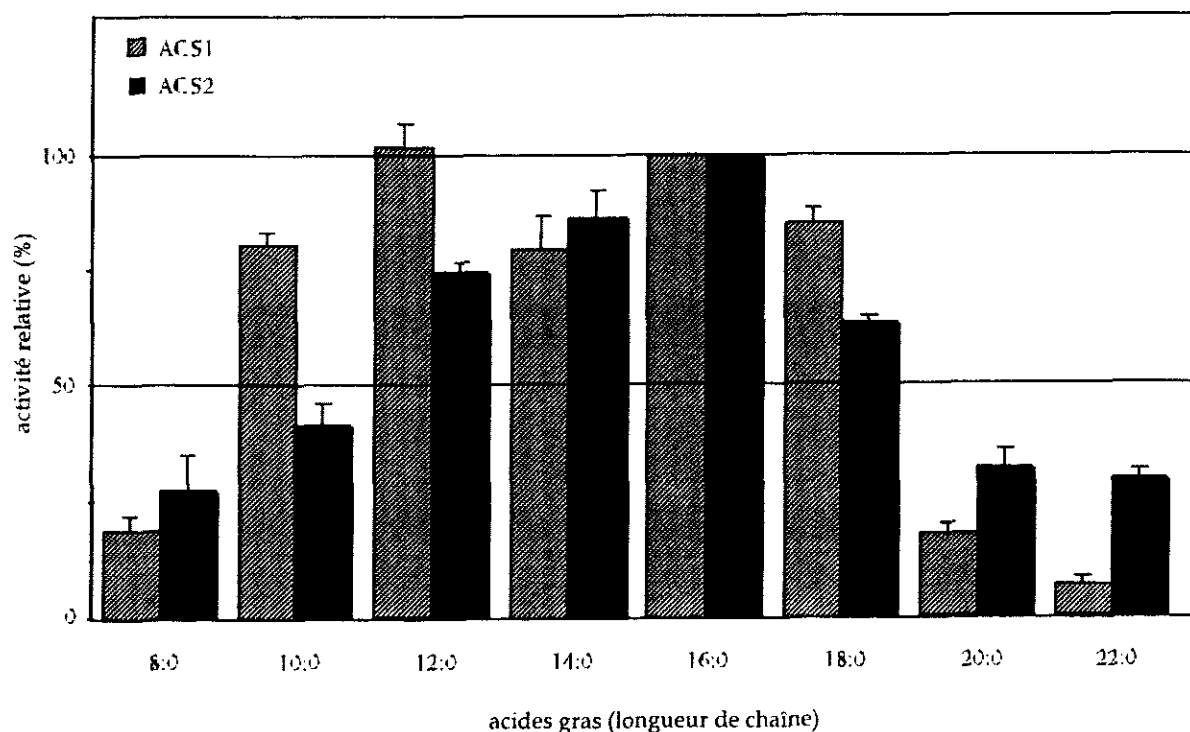


Figure 18 : Comparaison de la spécificité de substrat de l'ACS1 et l'ACS2 recombinantes envers les principaux acides gras saturés.

L'activité enzymatique a été déterminée par spectrophotométrie avec une concentration finale de 0.2 mM pour chaque acide gras. L'activité enzymatique déterminée est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité de la même isoforme pour le palmitate. Les données représentent la moyenne \pm SD de 3 essais indépendants. C8:0, a. octanoïque ; C10:0, a. décanoïque ; C12:0, a. laurique ; C14:0, a. myristique ; C16:0, a. palmitique ; C18:0, a. stéarique ; C20:0, a. arachidique ; C22:0, a. docosanoïque.

Les valeurs apparentes du K_M et de la V_{max} de la thioestérification de l'acide palmitique par les deux isoformes recombinantes sont présentées dans le tableau 3. Les ACS1 et ACS2 recombinantes n'ont pas de différence significative entre leur valeur apparente du K_M pour le palmitate, mais il existe un rapport de 6 entre les valeurs de V_{max} des deux isoformes recombinantes.

Tableau 8: Constantes cinétiques de la thioestérification de l'acide palmitique, du *R(-)*-FPF et du *R(-)*-IPF pour les formes recombinantes de l'ACS1 et de l'ACS2.

	ACS1		ACS2	
	(1)	V_{max}	(2)	V_{max}
	^m (3) μM	(nmol/min/mg protein)	^m (4) μM	(nmol/min/mg protein)
A. Palmitique ^a	20.8 ± 4.63	9.0 ± 0.74 ^c	19.1 ± 2.95	1.5 ± 0.09 ^c
(-) <i>R</i> -IPF ^b	1686 ± 93	353 ± 45	2365 ± 318	65 ± 13
(-) <i>R</i> -FPF ^b	103 ± 12	267 ± 10	611 ± 38	14 ± 1

Les données représentent la moyenne ± SD d'au minimum 4 essais séparés.

^a L'activité palmitoyl-CoA synthétase a été évaluée par la méthode spectrophotométrique.

^b Les 2-arylpropionyl-CoA ont été déterminés par une méthode spécifique de dosage par HPLC.

^c V_{max} est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines

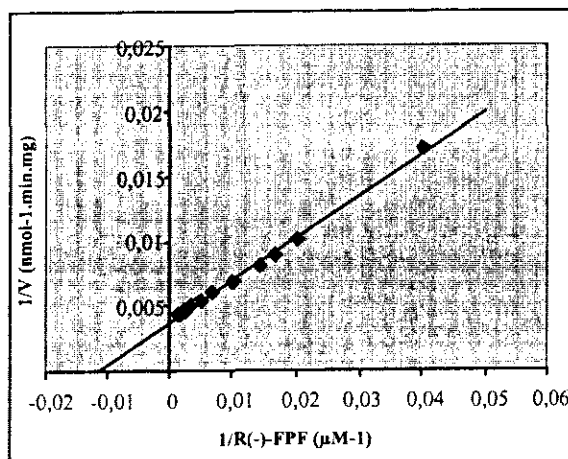
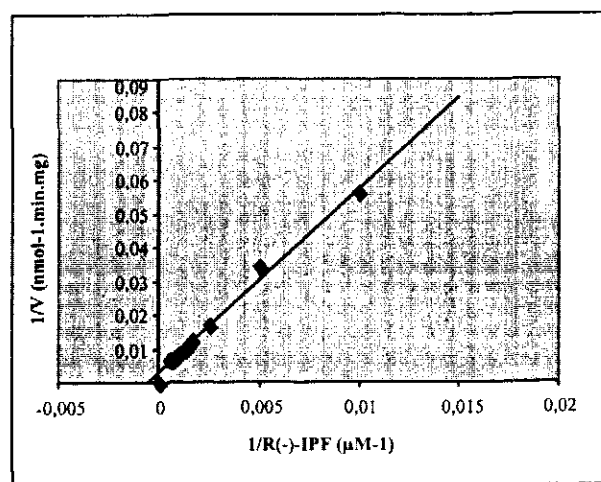
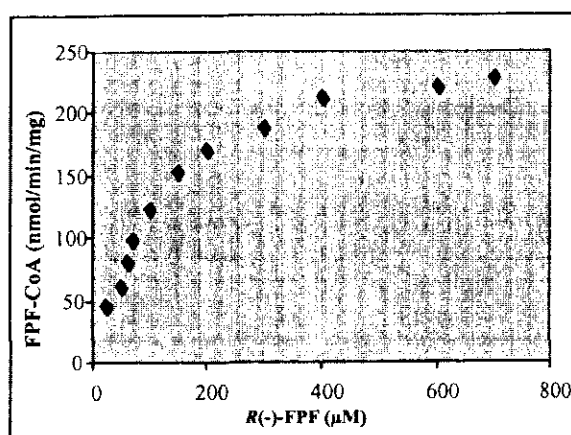
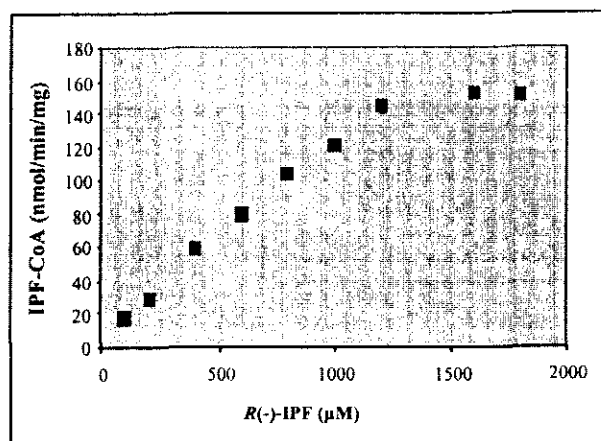
C- CAPACITE DES ACS1 ET ACS2 RECOMBINANTES A METABOLISER LES ACIDES ARYL-2-PROPIONIQUES

La spécificité de substrat et les propriétés cinétiques de l'ACS1 et de l'ACS2 recombinantes ont été étudiées avec les principaux acides aryl-2-propioniques qui subissent une inversion chirale chez le rat.

Les incubations, réalisées en présence du *S*(+)-FPF ou du *S*(+)-IPF ainsi que celles effectuées en présence du *S*(+)- ou du *R*(-)-FluPF comme substrat n'ont pas permis de produire une quantité de thioester détectable quel que soit l'isoforme testée.

La synthèse des profénoyl-CoA a été vérifiée comme restant linéaire sur une période d'au moins 15 min d'incubation et étant proportionnelle à la quantité de protéines incubées jusqu'à 4 μg pour la fraction recombinante de l'ACS1 et de 25 μg pour l'ACS2.

La formation des profénoyl-CoA à partir *R*(-)-FPF ou de *R*(-)-IPF suit une cinétique classique de Michaelis-Menten, en regard de la concentration du substrat quand les incubations sont réalisées en présence de détergent (Triton X-100 1% final v/v). Le tableau 3 présente les valeurs apparentes des K_M et de la V_{max} pour tous les substrats testés. La figure 4 représente une des cinétiques obtenues pour l'ACS1 recombinante.



R(-)-IPF
 $K_m = 1629,6 \mu\text{M}$
 $V_{max} = 299,1 \text{ nmol/min/mg}$

R(-)-FPF
 $K_m = 85,8 \mu\text{M}$
 $V_{max} = 264,1 \text{ nmol/min/mg}$

Figure 19 : Représentation des cinétiques enzymatiques du *R(-)-IPF* et du *R(-)-FPF* par l'ACS1 recombinante.

Deux μg d'ACS1 recombinante ont été incubés en accord avec "Matériels et méthodes" en présence de *R(-)-IPF* (0.05 à 2 mM) et de *R(-)-FPF* (0.025 à 0.8 mM). La quantité de thioester formé a été évaluée par HPLC.

Les figures du haut représentent l'évolution de la cinétique en coordonnées directes, les figures du bas correspondent à la représentation en Lineweaver et Burk des mêmes données.

III^{EME} PARTIE :

DISCUSSION

Pour évaluer la spécificité de substrat des isoformes ACS1 et ACS2 envers les principaux acides aryl-2-propioniques subissant une inversion chirale, la stratégie expérimentale adoptée repose sur l'obtention d'une forme recombinante purifiée de chaque isoforme. La production a été réalisée chez un Procaryote après transformation par un plasmide d'expression. Cette stratégie présente plusieurs avantages :

- la garantie d'avoir la protéine correspondant à l'ADNc
- la possibilité d'obtenir la protéine en grande quantité
- une phase de purification limitée.

Une méthode de chromatographie liquide de bonne sensibilité (HPLC) permet la quantification directe des thioesters formés en milieu standard d'incubation et ainsi l'analyse cinétique de la thioestérification des profènes et de l'acide palmitique. La méthode spectrophotométrique (Tanaka *et al.*, 1979 (121)) est rapide à réaliser mais présente une moins bonne sensibilité et requiert des fractions d'enzymes recombinantes parfaitement purifiées. Elle ne présente un intérêt que pour les substrats étant rapidement métabolisés par l'enzyme.

Dans cette étude, les ACS à longue chaîne ont été obtenus à partir des séquences publiées de l'ACS1 et de l'ACS2 de rat. Les clones sélectionnés pour l'expression hétérologue montrent une séquence déduite en acides aminés équivalente à celle décrite par Suzuki *et al.* (1990) (237) pour l'ACS1 et par Fujino et Yamamoto (1992) (40) pour l'ACS2. Les formes recombinantes ont été produites dans *E.Coli* et purifiées jusqu'à homogénéité afin d'étudier la capacité de ces enzymes à structure similaire à métaboliser les acides aryl-2 propioniques.

L'ACS1 de rat est prédominante dans le foie (119), organe considéré comme ayant le plus d'importance dans le mécanisme de l'inversion chirale (117) tandis que l'ACS2 est plus abondante dans le cerveau des rats comparée à toutes les autres isoformes d'ACS (41). Les enzymes purifiées montrent une activité palmitoyl-CoA synthétase spécifique de 6.9 et 1.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine pour les enzymes recombinantes ACS1 et ACS2 respectivement. Cette activité est 3 et 6 fois moins importante que ce qui avait été précédemment décrit avec l'enzyme native ACS1 ou les fractions recombinantes (121, 94). Ce résultat inattendu peut être dû à l'utilisation d'une méthode différente de dosage pour évaluer l'activité de ces enzymes et, au moins pour l'ACS2, par la présence d'une bande mineure de 50 kDa qui tend à diminuer l'activité spécifique. Malgré cette différence, l'activité spécifique de ces enzymes recombinantes est 20 à 500 fois plus importante que celle mesurée dans les microsomes des organes correspondants (184, 13, 105).

L'expression fonctionnelle de l'ADNc révèle que les deux enzymes utilisent efficacement les acides gras saturés à longue chaîne avec la même spécificité de substrat que ce qui avait été observé lors d'études précédentes et ce dans les mêmes conditions (99) et

reconnaît, presque toujours, le palmitate comme meilleur substrat, comme c'est le cas dans les microsomes. En effet, l'environnement lipidique apparaît fondamental pour ces enzymes fortement liées aux membranes cellulaires et pour lesquelles les agents détergents peuvent modifier ou altérer leur activité (17). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, il semble raisonnable d'affirmer que la spécificité de ces enzymes recombinantes vis-à-vis d'un substrat xénobiotique sera la même que dans les membranes biologiques.

Les données expérimentales révèlent que l'ACS1 recombinante accepte le *R(-)*-FPF comme substrat avec un K_M apparent proche de celui qui a été précédemment observé dans les microsomes hépatiques de rats (17, 105) et rejète les mêmes acides aryl-2-propioniques : à savoir le FPF et l'IPF dans leur configuration *S(+)*- et les deux énantiomères du FluPF, à l'origine, pour ce dernier, d'une très faible voire inexistante inversion chirale (58, 64). Le *R(-)*-IPF est fortement métabolisé par l'ACS1 recombinante. Néanmoins, la différence entre la valeur du K_M apparent et celle observée dans les microsomes ou avec l'ACS native purifiée est en désaccord avec les hautes affinités observées avec ces fractions (62, 63, 12).

Néanmoins, l'ACS1 recombinante purifiée ne peut pas être distinguée, que ce soit par sa migration en SDS-PAGE, par ses propriétés catalytiques ou par son antigénicité, de la forme native palmitoyl-CoA synthétase initialement purifiée dans notre laboratoire à partir de microsomes hépatiques de rat (Benoît, Olivier et Buronfosse, données non publiées) en accord avec le protocole décrit par Tanaka *et al.* (1979) (121). Cette enzyme native montre également une activité fénoprofénoyl-CoA synthétase importante et semble avoir les mêmes caractéristiques que la *R(-)*-ibuprofénoyl-CoA décrite par Brugger *et al.* (1996) (12).

Malgré une importante similitude entre les séquences en acides aminés de la forme cérébrale (ACS2) et l'isoforme hépatique (ACS1) de l'ordre de 64.7 à 83.4% (incluant les modifications conservatrices) et une spécificité de substrat globalement similaire vis-à-vis des acides gras saturés, l'ACS2 recombinante utilise les acides aryl-2-propioniques avec une très faible efficacité. Cette activité spécifique limitée envers ces xénobiotiques laissent présager une très faible participation de cette isoforme dans le métabolisme *in situ* des profènes. Ainsi, notre étude a démontré que l'ACS1 recombinante possède une importante efficacité dans la thioestérification des xénobiotiques associée à une stéréosélectivité et une stéréospécificité marquées. Ces mêmes spécificités sont retrouvées lors de l'inversion chirale des acides aryl-2-propioniques chez le rat et sont donc en accord avec la distribution préférentiellement hépatique de l'ACS1, organe reconnu comme majoritairement impliqué dans l'inversion chirale (58, 12).

Ainsi, en ce qui concerne le cerveau, ces résultats suggèrent que la première étape de l'inversion chirale dépend davantage de la capacité intrinsèque de l'ACS1 à thioestérifier le composé plutôt que de l'implication des autres isoformes et en particulier l'ACS2. La faible thioestérification du *R(-)*-FPF par des microsomes cérébraux qui avait été initialement décrite (environ 10 fois plus faible que celle réalisée par des microsomes hépatiques (105)) est très vraisemblablement tributaire de la faible représentation de l'ACS1 dans cet organe (10% de la quantité d'ARNm par rapport à celle du foie (119)).

Néanmoins, l'importance de l'inversion chirale *in vivo* ne doit pas être exclusivement restreinte à l'étape de la thioestérification, et la contribution des systèmes enzymatiques impliqués dans les autres étapes de l'inversion chirale (*i.e.*, racémases et hydrolases) doit être prise en compte comme cela a déjà été montré pour le FPF dans le cerveau (105).

CONCLUSION

Les profènes ou acides aryl-2-propioniques constituent une famille chimique de composés ayant des propriétés pharmacologiques semblables et forment une classe thérapeutique extrêmement utilisée en médecine humaine et vétérinaire du fait de leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques communes. Ces anti-inflammatoires présentent un métabolisme particulier qui est en partie tributaire de l'existence d'un centre d'asymétrie et qui passe par leur conjugaison au coenzyme-A. La première étape est catalysée par acyl-coenzyme A synthétase des acides gras à longue chaîne (ACS) ou la palmitoyl-CoA synthétase qui confère un caractère stéréosélectif et unidirectionnel à cette réaction. L'existence d'une thioestérification cérébrale du fénoprofène et de l'ibuprofène a déjà été mise en évidence. Parce que le métabolisme *in situ* de l'anti-inflammatoire peut avoir des répercussions pharmacologiques et toxicologiques locales, l'objectif de cette étude était d'évaluer la participation de l'ACS2, forme principalement exprimée dans le cerveau, dans le métabolisme local de ces anti-inflammatoires. L'expression de formes recombinantes d'ACS1 et d'ACS2 de rat a permis de montrer que l'ACS2 possède des paramètres cinétiques extrêmement défavorables au métabolisme du fénoprofène et de l'ibuprofène. La faible activité intrinsèque de l'ACS2 envers ces substrats laisse envisager une très faible participation de cette isoforme au métabolisme cérébral des profènes. Il apparaît plus vraisemblable d'imaginer que ce soit l'ACS1, isoforme très faiblement exprimée dans cet organe, qui soit responsable de l'activité catalytique du cerveau même si ces résultats ne peuvent pas être directement transposés au métabolisme cérébral tant l'environnement membranaire de ces enzymes est important. Néanmoins, l'existence d'une activation cérébrale d'un profène en thioester de coenzyme-A est une étape métabolique importante dont les conséquences restent à évaluer car cette étape limitante offre la possibilité à ces xénobiotiques d'emprunter les voies métaboliques dédiées aux acides gras.

Le Professeur responsable
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
Vétérinaire de Lyon

Le Président de la thèse
Professeur André MORIN

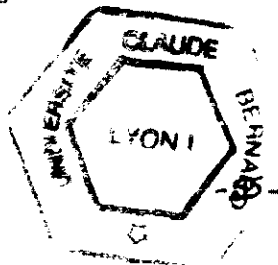
Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 20 JUIN 2002
Pour le Président de l'Université
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales
Professeur F. MAUGUIERE

Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale

Pour le Directeur empêché
Le Directeur - Assesseur

Professeur J-F CHARY

Professeur Guy CHANTEGRELET



ANNEXE I

Synthèse des thioesters des acides aryl-2-propioniques Méthodes de Chen *et al.*

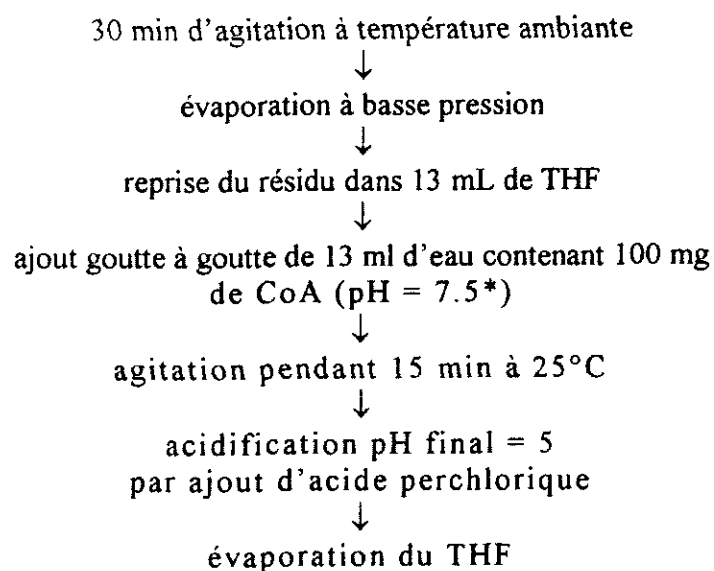
Réactifs

0.56 mol de profène dans 15 mL de CH_2Cl_2

0.56 mol de lutidine

0.56 mol d'éthylchloroforme

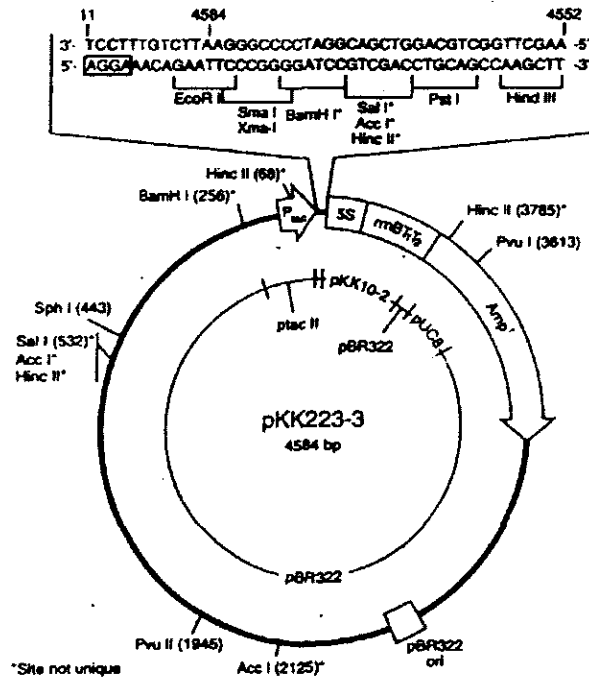
Méthode



* le pH est maintenu entre 7.2 et 7.5 par l'addition de soude à 0.5 M

ANNEXE II

Séquence du MCS du plasmide d'expression pKK223-3



ANNEXE III

Mesure de l'activité acyl-CoA synthétase (ACS) par la méthode spectrophotométrique (D'après Tanaka *et al.*, 1979) (121)

PRINCIPE

Mesure de la disparition de NADH en fonction du temps après ajout d'un acide gras et de la forme purifiée d'ACS par un système enzymatique couplant constitué de la pyruvate kinase (PK), de l'adénylate kinase (AK) et de la lactate deshydrogénase (LDH).

MÉTHODE

ACS	a. gras + ATP + CoASH	--- >	a. gras-CoA + AMP
AK	AMP + ATP	--- >	2 ADP
PK	phosphoénolpyruvate + ADP	---- >	a. pyruvique + ATP
LDH	a. pyruvique + NADH	---- >	a. lactique + NAD ⁺

PROTOCOLE

Préparation des solutions :

1- DTT (MW 154.2 ; 5 mM final)	500 mM (7.7 mg/100 µL d'eau)
2- ATP (MW 551.1 ; 10 mM final)	1000 mM (55.1 mg/100 µL d'eau)
3- CoASH (MW 767.5 ; 0.6 mM final)	60 mM (4.6 mg/100 µL d'eau)
4- PEP (MW 206.1 ; 0.2 mM final)	20 mM (4.1 mg/1 mL d'eau)
5- NADH (MW 709.4 ; 0.15 mM final)	15 mM (1.0 mg/100 µL d'eau)
6- a. gras (0.1 mM final)	10 mM (dans MeOH)
7- a. gras (0.2 mM final)	20 mM (Triton X-100 20% dans l'eau)

- Tampon :
- Tris-HCl (Trizma 8.3) 200 mM pH 8.0 (à 37°C)
soit 2.7 g pour 100 mL (MW 135.4)
 - KCl 300 mM
soit 2.24 g pour 100 mL (MW 74.55)
 - MgCl₂ 30 mM
soit 610 mg pour 100 mL (MW 203.31)

- Enzymes :
- AK 4.5 µg/mL d'incubation
soit 9 µL (Myokinase Boehringer 107514 – 10 mg/2 mL)
 - PK 3.0 µg/mL d'incubation
soit 6 µL (Boehringer 109 045 – 10 mg/mL)
 - LDH 3.0 µg/mL d'incubation
soit 6 µL (127 230 – 10 mg/2 mL)

Pour 1 mL d'incubation à 37°C

- 500 µL de tampon Tris-HCl, MgCl₂, KCl
- 10 µL des solutions 1 à 6 (60 µL au total)
- 9 µL AK
- 6 µL PK
- 6 µL LDH
- ACS forme purifiée
- eau qsp 1 mL

La réaction est initiée par l'introduction du CoASH

Lecture en continu à 340 nm

Lecture contre une cuve sans a. gras

Remplacement des enzymes par :

- . myokinase 1000 U (Réf 127272 – Roche - 360 U/mg)
- . pyruvate kinase 200 U/mg (Réf 109045 – 10 mg/mL)
- . LDH 550 U/mg (Réf 127221 – Roche – 25 mg/2.5 mL)

Pour 1 mL d'incubation à 37°C

- 500 µL de tampon Tris-HCl, MgCl₂, KCl
- 10 µL des solutions 1 à 6 (60 µL au total)
- 3 µL AK
- 3 µL PK
- 3 µL LDH
- ACS forme purifiée
- eau qsp 1 mL

ANNEXE IV

Méthodes HPLC

ACTIVITE PALMITOYL-COA LIGASE SUR SOLUBILISAT ACS1 ET ACS2

Incubations de 10 min à 37°C (µsomes foie)

Tris HCl 150 mM pH 8 à 37°C qsp 250 µL	162.5 µL
ATP	12.5 µL
CoASH	15 µL
Acide palmitique 100 µM	50 µL
microsomes de foie de rat au 100è	10 µL
arrêt par 100 µL CH3CN	

Programme HPLC 255 nm

A : acétonitrile et B : TBA 10 mM/Citrate 50 mM

1.5 mL/min, 255 nm

Boucle de 50 µL

T (min)	0	2	2.1	8	9	9.1	12.1
% B	45	45	39	29	29	45	45

P-CoA à 8.7 min

Incubations de 10 min à 37°C (ACS1 et ACS2)

Tris HCl 150 mM pH 8 à 37°C qsp 250 µL	142.5 µL
ATP	12.5 µL
CoASH	15 µL
Acide palmitique 100 µM	50 µL
solubilisat	30 µL
arrêt par 100 µL CH3CN	
thioesterification avec rACS1 et rACS2 clone 11	

ACTIVITE FENOPROFENOYL-COA LIGASE SUR SOLUBILISAT ACS1 ET ACS2

Incubations de 20 min à 37°C (µsomes foie)

Tris HCl 150 mM pH 8 à 37°C qsp 250 µL	162.5 µL
ATP	12.5 µL
CoASH	15 µL
FPF 1 mM	50 µL
microsomes de foie de rat au 20è	10 µL
arrêt par 100 µL CH3CN	

Programme HPLC 255 nm

A : acétonitrile et B : TBA/Citrate

Débit : 1.5 mL/min

Boucle de 50 µL

T (min)	0	2	8	10.5	11	14
% B	65	65	55	55	65	65

FPF-CoA à 11.2 min

FPF à 13.6 min

Flurbiprofène

Débit : 1.5 mL/min

255 nm

T(min)	0	4	10	13	14	18
% C	63	63	50	50	63	63

BIBLIOGRAPHIE

1. ABE T, FUJINO T, FUKUYAMA R, MINOSHIMA S, SHIMIZU N, TOH H, SUZUKI H et YAMAMOTO T (1992)
Human long chain acyl-CoA synthetase : structure and chromosomal location .
Journal of Biochemistry, **111**, 123-128.
2. ARIMA N (1990)
Acyl glucuronidation and glucosidation of pranoprofen, a 2-arylpropionic acid derivative, in mouse liver and kidney homogenates.
Journal of Pharmacobio-Dynamics, **13**, 724-732.
3. ARIMA N et KATO Y (1990)
Species differences in absorption, metabolism and excretion of pranoprofen, a 2-arylpropionic acid derivative, in experimental animals. .
Journal of Pharmacobio-Dynamics, **13**, 739-744.
4. BENET LZ, SPAHN-LANGGUTH H UWAKAWA S, VOLLAND C, MIZUMA T, MAYER S, MUTSCHLER E et LIN ET (1993)
Predictability of the covalent binding of acidic drugs in man.
Life Science, **53**, 141-146.
5. BENNETT WM, HENRICH WL et STOFF JS (1996)
The renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations.
American Journal of Kidney Diseases, **28**, S56-S62.
6. BENOIT E, DELATOUR P, OLIVIER L et CALDWELL J (1995)
R (-)-fenoprofen : formation of fenoprofenyl-coenzyme A by rat liver microsomes.
Biochemical Pharmacology, **11**, 1717-1720.
7. BERRY BW et JAMALI F (1991)
Presystemic and systemic chiral inversion of *R* (-)-fenoprofen in the rat.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **258**, 695-701.
8. BRADFORD M (1976)
A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem, **72**, 248-254.
9. BOELSTERLI UA, ZIMMERMAN Hjet KRETZ6ROMMEL A (1995)
Idiosyncratic liver toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Molecular mechanisms and pathology.
Critical reviews in toxicology, **25**, 207-235.

10. BRONFMAN M, INESTROSA NC, NERVI FO et LEIGHTON F (1984)
Acyl-CoA synthetase and the peroxisomal enzymes of β -oxidation in human liver.
Biochemical Pharmacology, **224**, 709-720.
11. BROWNE GS, NELSON C, NGUYEN T, ELLIS BA, DAY RO et WILLIAMS KM (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.
12. BRUGGER R, GARCIA ALIA b REICHEL C, WAIBEL R, MENZEL S, BRUNE K et GEISSLINGER G (1996)
Isolation and characterization of rat liver microsomal R-ibuprofenoyl-CoA synthetase.
Biochemacal Pharmacology, **52**, 1007-1013.
13. BUSHAN A ET SINGH I (1987)
Purification of palmitoyl-CoA ligase from brain microsomes.
Preparatory Biochemistry, **17**, 173-193.
14. CALDWELL J (1982)
Conjugaison of xenobiotic carboxillic acids.
In "*Metabolic basis of detoxication*", JAKOBY WB (Ed) Academic Press, NY, 271-289.
15. CALDWELL J., HUTT A.J. ET RANCE D. (1988)
The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences.
Biochimical Pharmacology, **37**, 105-114
16. CANTU ES, SPINKLE TJ, GHOSH B et SINGH I (1995)
The human palmitoyl-CoA ligase (FACL2) gene maps to the chromosome 4q34-4q35 region by fluorescence in situ hybridization (FISH) and somatic cell hybrid panels.
Genomics, **28**, 600-602.
17. CAO Y, TRAER E, ZIMMERMAN GA, McINTYRE TM et PRESCOTT SM (1998)
Cloning, expression and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4).
Genomics, **49**, 327-330.
18. CARABAZA A., SUESA N., TOST D., PASCUAL J., GOMEZ M., GUTIERREZ M., ORTEGA E., MONTSERRAT X., GARCIA A.M., MIS R., CABRE F., MAULEON D. et CARGANICO C. (1996)
Stereoselective metabolic pathways of ketoprofen in the rat: incorporation into triacylglycerols and enantiomeric inversion.
Chirality, **8**, 163-172.

19. CASHMAN J. ET MCANULTY G. (1995)
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in perisurgical pain management. Mechanisms of action and rationale for optimum use.
Drugs, **49**, 51-70.
20. CASTILLO M et SMITH PC (1991)
Covalent binding of ibuprofen acyl glucuronide to human serum albumin *in vitro*.
Pharmaceutical Research, **8**, S242.
21. CASTILLO M et SMITH PC (1995)
Disposition and reactivity of ibuprofen and ibufenac acyl glucuronides *in vivo* in the rhesus monkey and *in vitro* with human serum albumin.
Drug metabolism Disposition, **23**, 566-572.
22. CHAKIR S, MAURICE MH, MAGDALOU J, LEROY P, DUBOIS N, LAPICQUE F, ABDELHAMID Z et NICOLAS A (1994)
High-performance liquid chromatographic enantioselective assay for the measurement of ketoprofen glucuronidation by liver microsomes.
Journal of Chromatography (B: Biomedical Applications), **29**, 1-6.
23. CHEN CS, SHIEH WR, LU PH, HARRIMAN S et CHEN CY (1991)
Metabolic stereomeric inversion of ibuprofen in mammals.
Biochemica et Biophysica Acta, **1078**, 411-417.
24. CHEZ M, SILA CA, RANSOHOFF RM, LONGWORTH DL et WEIDA BS (1989)
Ibuprofen-induced meningitis : detection of intrathecal IgG synthesis and immune complexes.
Neurology, **39**, 1578-1580.
25. CROFFORD L.J.(1997)
COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions.
Journal of Rheumatology, **24**, 15-19.
26. CRYER B et FELDMAN M (1998)
Cyclooxygenase 1 and Cyclooxygenase-selectivity of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs.
American Journal of Medecine , **104**, 413-421.
27. DAVIDSON BC et CANTRILL RC (1985)
Erythrocyte membrane acyl-CoA synthetase activity.
FEBS Letters, **193**, 69-74.
28. DAVIDSON BC et CANTRILL RC (1986)
Rat hepatocyte plasma membrane acyl-CoA Synthetase activity.
Lipids, **21**, 571-574.

29. DING A, OJINGWA JC AF, Mc DONAGH AF, BURLINGAME AL et BENET LZ (1993)
Evidence for covalent binding of acyl glucuronides to serum albumin via an imine mechanism as revealed by tandem mass spectrometry.
Proceedings of the National Academy of Sciences, **21**, 617-623.
30. DUBOIS N, LAPICQUE F, MAURICE MH, PRITCHARD M, FOURNEL-GIGLEUX S, MAGDALOU J, ABITEBOUL M, SIEST G et NETTER P (1993)
In vitro irreversible binding of ketoprofen glucuronide to plasma proteins.
Drug Metabolism and Disposition, **21**, 617-623.
31. EL MOUELHI M, RUELIUS HW, FENSELAU C et DULIK DM (1987)
Species-dependent enantioselective glucuronidation of three 2-arylpropionic acids: naproxen, ibuprofen, and benaxoprofen.
Drug Metabolism and Disposition, **15**, 767-772.
32. EVANS AM (1992)
Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs.
European Journal of Clinical Pharmacology, **42**, 237-256.
33. FAERGEMAN NJ, SIGURSKJOLD BW, KRAGELUND BB, ANDERSEN KV et KNUDSEN J (1996)
Role of a long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling.
Biochemical Journal, **323**, 1-12.
34. FEARS R, BAGGALEY KH, ALEXANDER R, MORGAN B et HINDLEY RM (1978)
The participation of ethyl 4-benzyloxybenzoate (BRL 10984) and other aryl-substituted acids in glycerolipid metabolism.
Journal of Lipid research, **19**, 3-11.
35. FOSTER RT, JAMALI F, RUSSEL AS et ALBALLA SR (1988)
Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following single and multiple doses.
Journal of Pharmaceutical Sciences, **77**, 70-73.
36. FOURNEL-GIGLEUX S et CALDWELL J (1986)
The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acid in rat, mouse and rabbit.
Biochemical Pharmacology, **35**, 4153-4159.
37. FRETTON J (2000)
Implication de l'acyl-coenzyme A synthetase 5 de rat dans la thioestérification intestinale des profènes
Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Claude-Bernard I, Lyon, 84 p.
38. FRÖLICH J.C. (1997)

A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclo-oxygenase isoenzymes.

Trends in Pharmacological Sciences, **18**, 30-34.

39. FUJIHARAC.K., MALHEIROS D.M., DONATO J.L., POLIA., DE NUCCI G. et ZATZ R. (1998)
Nitroflurbiprofen, a fatty acyl-CoA.
The Journal of Biological Chemistry, **273**, 11049-11055.
40. FUJINO T et YAMAMOTO T (1992)
Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase in brain.
Jouranl of Biochemistry, **111**, 197-203.
41. FUJINO T, KANG MJ, SUZUKI H, IJIMA H et YAMAMOTO Y (1996)
Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase3.
The Journal of Biological Chemistry, **271**, 16748-16752.
42. GHOSH B, BARBOSA E et SINGH I (1995)
Molecular cloning and sequencing of human palmitoyl-CoA ligase and its tissue specific expression.
Molecular and Cellular Biochemistry, **151**, 77-81.
43. GOSSET RE, FROLOV AA, ROTHS JB, BEHNKE WD, KIER AB et SCHROEDER F (1996)
Acyl-CoA binding proteins: multiplicity and function.
Lipids, **31**, 895-918.
44. HALL SD, HASSANZADEH-KHAYYAT M, KNADLER MP et MAYER PR (1992)
Pulmonary inversion of 2-aryl-propionic acids: influence of protein binding.
Chirality, **4**, 349-352.
45. HALL SD et XIAOTAO Q (1994)
The role of coenzyme A in the biotransformation of 2-arylpropionic acids.
Chemico-Biological Interactions, **90**, 235-251.
46. HALPERN SM, FITZPATRICK R et VOLANS GN (1993)
Ibuprofen toxicity. A review of adverse reactions and overdose.
Adverse Drug Reactions and Toxicology Reviews, **12**, 201/1-201/22.
47. HAMDOUNE M, MOUNIE J, MAGDALOU J, MASMOUDI T, GOUDOUNET H et ESCOUSSE A (1995)
Characterization of the *in vitro* glucuronidation of flurbiprofen enantiomers.
Drug Metabolism and Disposition, **23**, 343-348.
48. HESLER CB, OLYMBIOS C et HALDAR D (1990)
Transverse-plane topography of long -chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane.
The Journal of Biological Chemistry, **25**, 6600-6605.

49. HOPPMANN RA, PEDEN JG et OBER SK (1991)
Central nervous system side effects of non steroidal anti-inflammatory drugs. Aseptic meningitis, psychosis, and cognitive dysfunction .
Archives of internal Medecine, **151**, 1309-1313.
50. IJIMA H, FUJINO T, MINEKURA H, SUZUKI H, KANG MJ et YAMAMOTO T (1996)
Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2.
European Journal of Biochemistry, **242**, 186-190.
51. IWAKAWA S, SPAHN H, BENET LZ et LIN ET (1991)
Stereoselective disposition of carprofen , flunaxoprofen, and naproxen in rats.
Drug Metabolism and Disposition, **19**, 853-857.
52. JAMALI F, BERRY BW, TERHANI MR et RUSSEL AS (1988)
Stereoselective pharmacokinetics of flurbiprofen in humans and rats.
Journal of Pharmaceutical Sciences, **13**, 1-9.
53. JOHNSTON SA et BUDSBERG SC (1997)
Non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids for the management of osteoarthritis.
Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **27**, 841-862.
54. JOUZEAU JY, TERLAIN B, ABID A, NEDELEC E et NETTER P (1997)
Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Drugs, **53**, 563-582.
55. KANG MJ, FUJINO T, SASANO H, MIKENURA H, YABUKI N, NAGURA H, IJIMA H et YAMAMOTO TT (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis.
Proceedings of the National Academy of Sciences, **94**, 2880-2884.
56. KEMAL C et CASIDA JE (1991)
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.
57. KING AR et DICKINSON RG (1996)
The utility of the bile-exteriorized rat as a source of reactive acyl glucuronides: studies with zomepirac.
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, **36**, 131-136.
58. KNADLER MP et HALL SD (1989)
High-performance liquid chromatographic analysis of the enantiomers of flurbiprofen and its metabolites in plasma and urine.
Journal of Chromatography, **494**, 173-182.
59. KNADLER MP et HALL SD (1990)

- Stereoselective arylpropionyl-CoA thioester formation *in vitro*.
Chirality, **2**, 67-73.
60. KNADLER MP, BRATER DC et HALL SD (1992)
Stereoselective disposition of flurbiprofen in normal volunteers.
British Journal of Clinical Pharmacology, **33**, 369-375.
 61. KNIGHTS KM, DREW R et MEFFIN PJ (1988)
Enantiospecific formation of fenopufen Coenzyme A thioester *in vitro*.
Biochemical Pharmacology, **37**, 3539-3542.
 62. KNIGHTS KM et JONES ME (1992)
Inhibition kinetics of microsomal long chain fatty acid-CoA ligase by 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Biochemical Pharmacology, **43**, 1465-1471.
 63. KNIGHTS KM, TALBOT UM et BAILLIE TA (1992)
Evidence of multiple forms of rat liver microsomal coenzyme A ligase catalysing the formation of 2-arylpropionyl-coenzyme A thioesters.
Biochemical Pharmacology, **44**, 2415-2417.
 64. KNIHINICKI RD, WILLIAMS KM et RAY RO (1989)
Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. I. *In vitro* studies of ibuprofen and flurbiprofen.
Biochemical Pharmacology, **38**, 4389-1395.
 65. KNIHINICKI RD, RAY RO, GRAHAM GG et WILLIAMS KM (1990)
Stereoselective disposition of ibuprofen and flurbiprofen in rats.
Chirality, **2**, 134-140.
 66. KRISANS SK, MORTENSEN RM et LAZAROW PB (1980)
Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxysomes.
The Journal of Biological Chemistry, **255**, 9599-9607.
 67. KURUMBAIL R.G., STEVENS A.M., GIERSE J.K., MC DONALD J.J., STEGEMAN R.A., PAK J.Y., GILDEHAUS D., MIASHIRO J.M., PENNING T.D., SEIBERT K., ISAKSON P.C. et STALLING W.C. (1996)
Structural basis for selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 by anti-inflammatory agents.
Nature, **384**, 644-648.
 68. LAEMMLI UK, (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, **227**, 680-685.
 69. LAGEWEG W et WANDERS RJ (1993)
Studies on the effects of fenopufen on the activation and oxidation of long chain and very long chain fatty acids in hepatocytes and subcellular fractions from rat liver.
Biochemical Pharmacology, **46**, 79-85.

70. LAZO O, CONTRERAS M et SINGH I (1990)
Topographical localization of peroxisomal acyl-CoA ligases: differential localization of palmitoyl-CoA and lignoceroyl-CoA ligases.
Biochemistry, **29**, 3981-3986.
71. MAIRE-GAUTHIER R, BURONFOSSE T, MAGDALOU J, HERBER R, BESSE S, DELATOUR P et BENOIT E (1998)
Species-dependent enantioselective glucuronidation of carprofen.
Xenobiotica, **28**, 595-604.
72. MALHOTRA KT, MALHOTRA K, LUBIN BH et KUYPERS FA (1999)
Identification and molecular characterization of acyl-CoA synthetase in human erythrocytes and erythroid precursors.
Biochemical Journal, **344**, 135-143.
73. MANOUKIAN AV et CARSON JL (1996)
Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced hepatic disorders: incidence and prevention.
Drug Safety, **15**, 64-71.
74. MARRA CA et ALANIZ MJ (1999)
Acyl-CoA synthetase activity in liver microsomes from calcium-deficient rats.
Lipids, **34**, 343-354.
75. MASUBUCHI Y, SAITO H et HORIE T (1998)
Structural requirements for hepatotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in isolated rat hepatocytes.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **287**, 208-213.
76. MAYER JM (1990)
Stereoselective metabolism of anti-inflammatory 2-arylpropionates.
Acta Pharmaceutica Nordica, **2**, 197-213.
77. MENZEL S, WAIBEL R, BRUNE K et GEISLINGER G (1994)
Is the formation of *R*-ibuprofenoyl-adenylate the first stereoselective step of the chiral inversion?
Biochemical Pharmacology, **48**, 1056-1058.
78. MEROT Y, HARMS M et SAURAT JH (1983)
Photosensibilisation au carprofène (Imadyl®), un nouvel anti-inflammatoire non stéroïdien.
Dermatologica, **166**, 301-307.
79. MILLIGAN G, PARENTI M et MAGEE AI (1995)
The dynamic role of palmitoylation in signal transduction.
Trends in Biochemical Science, **20**, 181-187.

80. MILLS RFN, ADAMS SS, CLIFFE EE, DICKINSON A et NICHOLSON JS (1973)
The metabolism of ibuprofen.
Xenobiotica, 3, 589-598.
81. MINEKURA H, FUJINO T, KANG MJ, FUJITA T, ENDO Y et YAMAMOTO TT (1997)
Human acyl-CoenzymeA synthetase 3 cDNA and localization of its gene (ACS3) to chromosomes band 2q34-2q35.
Genomics, 42, 180-181.
82. MIYAZAWA S, HASHIMOTO T et YOKATA S (1985)
Identity of long chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria and peroxisomes in rat liver.
Journal of Biochemistry, 98, 723-733.
83. MOHRI K, OKADA K et BENET LZ (1998)
Stereoselective metabolism of benaxoprofen in rats. Biliary excretion of benaxoprofen taurine conjugate and glucuronide.
Drug Metabolism and Disposition, 26, 332-337.
84. MULDER GJ, COUGHTRIE MWH et BURCHELL B (1990)
Glucuronidation.
In "*conjugaison reactions in drug metabolism: an integrated approach*", Mulder GJ (Ed.) Taylor & Francis, Londres, 51-105.
85. MULLER N, PAYAN E, LAPICQUE F, BANNWARTH B et NETTER P (1990)
Pharmacological aspect of chiral inversion non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Fundamental and Clinical Pharmacology, 4, 617-634.
86. MUMBY SM (1997)
Reversible palmitoylation of signaling proteins.
Current Opinion in Cell Biology, 9, 148-154.
87. MURRAY MD et BRATER DC (1997)
Effects of NSAIDs on the kidney.
Progress in Drugs Research, 49, 155-171.
88. MUSCARA MN, McKNIGHT W, DEL SOLDATO P et WALLACE JL (1998)
Effect of a nitric oxide-releasing naproxen derivative on hypertension and gastric damage inducing by chronic nitric oxide inhibition in the rat.
Life Science, 62, PL235-PL240.
89. NAKAMURA Y, YAMAGUCHI T, TAKAHASHI S, HASHIMOTO S, IWATANI K et NAKAGAWA Y (1981)
Optical isomerization mechanism of *R(-)*-hydratopic acid derivatives.
Journal of Pharmacobio-Dynamics, 4, S-1.

90. NEUPERT W., BRUGGER R., EUCHENHOFER C., BRUNE K. et GEISSLINGER G. (1997)
Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases.
British Journal of Pharmacology, **122**, 487-492.
91. NICOLL-GRIFFITH DA, INABA T, TANG BK et KALOW W (1988)
Method to determine the enantiomers of ibuprofen from human urine by high-performance liquid chromatography.
Journal of Chromatography, **428**, 103-112.
92. NOY N et ZAKIM D (1985)
Fatty acids bound to unilamellar lipid vesicles as substrates for microsomal acyl-CoA ligase.
Biochemistry, **24**, 3521-3525.
93. NOY N et ZAKIM D (1985)
Substrate specificity of fatty-acyl-CoA ligase in liver microsomes.
Biochimica et Biophysica Acta, **833**, 239-244.
94. OIKAWA E, IJIMA H, SUZUKI T, SASANO H, SATO H, KAMATAKI A, NAGURA H, KANG MJ, FUJINO H, SUZUKI H et YAMAMOTO TT (1998)
A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes.
Journal of Biochemistry, **124**, 679-685.
95. PICCINI M, VITELLI F, BRUTTINI M, POBER NR, JONSSON JJ, VILLANOVA M, ZOLLO M, BORSANI G, BALLABIO A et RENIERIO A (1998)
FACL4, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation.
Genomics, **47**, 350-358.
96. PICOT D., LOLL P.J. et GARAVITO R.M. (1994)
The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1.
Nature, **367**, 243-249.
97. PRIYMEMKO N, GARNIER F, FERRE JP, DELATOUR P et TOUTAIN PL (1998)
Enantioselectivity of the enterohepatic recycling of carprofen in the dog.
Drug Metabolism and Disposition, **26**, 170-176.
98. RIEDER MJ (1993)
Immunopharmacology and adverse drug reactions.
Journal of Clinical Pharmacology, **33**, 316-323.
99. ROBERTS BJ et KNIGHTS KM (1992)
Inhibition of rat peroxysomal palmitoyl-CoA ligase by xenobiotic carboxylic acids.
Biochemical Pharmacology, **44**, 261-267.

100. RUBIN A, RODDA BE, WARRICK P, RIDOLFO AS et GRUBER CM (1972)
Physiological disposition of fenoprofen in man. II. Plasma and urine pharmacokinetics after oral and intravenous administration.
Journal of Pharmaceutical Sciences, **61**, 739-745.
101. RUBIN A, WARRICK P, WOLEN RL, CHERNISH SM, RIDOLFO AS et GRUBER CM (1972)
Physiological disposition of fenoprofen in man. III. Metabolism and protein binding of fenoprofen.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **183**, 449-457.
102. RUBIO F, SAEWALLS S, POCELINKO R, DE BARBIERI B, BENZ W, BERGER L, MORGAN L, PAO J, WILLIAMS TH et KOECHLIN B (1980)
Metabolism of carprofen, a non-steroidal anti-inflammatory agent in rats, dogs and humans.
Journal of Pharmaceutical Sciences, **69**, 1245-1253.
103. RUDY AC, KNIGHT PM, BRATER DC et HALL SD (1991)
Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans : administration of *R*-, *S*- and racemic ibuprofen.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **259**, 1133-1138.
104. SAMBROOK J, FRITSCH EF et MANIATIS T (1989)
Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
105. SEVOZ C, ROUSSELLE C, BENOIT E et BURONFOSSE T (1999)
In vitro study of fenoprofen chiral inversion in rat : Comparison of brain versus liver.
Xenobiotica, **29**, 1007-1016.
106. SCHEUERER S, WILLIAMS KM, BRUGGER R, MCLACHLAN AJ, BRUNE K, DAY RO et GEISSLINGER G (1998)
Effect of clofibrate on the chiral disposition of ibuprofen in rats.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **284**, 1132-1138.
107. SHINOHARA Y, MAGARA H et BABA S (1991)
Stereoselective pharmacokinetics and inversion of suprofen enantiomers in humans.
Journal of Pharmaceutical Sciences, **80**, 1075-1078.
108. SIMMONDS RG, WOODAGE TJ, DUFF SM et GREEN JJ (1980)
Stereospecific inversion of *R*(-)-benaxoprofen in rat and human.
European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, **5**, 169-172.
109. SINGH G, RAMEY DR, MORFELD D et FRIES JF (1994)
Comparative toxicity of non-steroidal anti-inflammatory agents.
Pharmacology and Therapeutics, **62**, 175-191.
110. SMITH PC, Mc DONAGH AF et BENET LZ (1986)
Irreversible binding of zomepirac to plasma protein *in vitro* and *in vivo*.
Journal of Clinical Investigation, **77**, 934-939.

111. SMITH PC et LIU JH (1993)
Covalent binding of supoffen acyl glucuronide to albumin *in vitro*.
Xenobiotica, **23**, 337-348.
112. SMITH PC et LIU JH (1995)
Covalent binding of suprofen to renal tissue of rat correlates with excretion of its acyl glucuronide.
Xenobiotica, **25**, 531-540.
113. SORACI A et BENOIT E (1995)
In vitro fenoprofenoyl-coenzyme A thioester formation: Interspecies variations.
Chirality, **7**, 534-540.
114. SORACI A, BENOIT E et DELATOUR P (1995)
Comparative metabolism of R (-)-fenoprofen in rats and sheep.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, **18**, 167-171.
115. SPAHN H, IWAKAWA S et BENET LZ (1988) Stereoselective formation and degradation of flunaxoprofen glucuronides in microsomal incubations. *Pharmaceutical Research*, **5**, S200.
116. SPAHN H, IWAKAWA S, LIN ET et BENET LZ (1989) Procedures to characterize *in vivo* and *in vitro* enantioselective glucuronidation properly: studies with benaxoprofen glucuronides. *Pharmaceutical Research*, **6**, 125-132.
117. SPAHN H, NÄTHKE I, MOHRI K, ZIA-AMIRHOSSEINI P et BENET LZ (1990) Preliminary characterization of proteins to which benaxoprofen glucuronide binds irreversibly. *Pharmaceutical Research*, **7**, S257.
118. SPAHN-LANGGUTH H et BENET LZ (1992) Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as detoxification mechanism? *Drug Metabolism Reviews*, **24**, 5-48.
119. SUZUKI H, KAWARABAYASI Y, KONDO J, ABE T, NISHIKAWA K, KIMURA S, HASHIMOTO T et YAMAMOTO T (1990)
Structure and regulation of a rat long-chain acyl-CoA synthetase.
The Journal of Biological Chemistry, **265**, 8681-8685
120. TALEY JJ (1997)
Pulmonary-allergy, dermatological, gastrointestinal and arthritis. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2.
Expert Opinion on Therapeutic Patents, **7**, 55-62.
121. TANAKA T, HOSAKA K, HOSHIMARU M et NUMA S (1979)
Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme A synthetase from a rat liver.
European Journal of Biochemistry, **98**, 165-172.
122. TRACY TS, WIRTHWEIN DP et HALL SD (1993)
Chiral inversion of ibuprofen: formation of fenoprofenoyl-CoA.
Drugs Metabolism and Disposition, **21**, 114-120.

123. TOWBIN H, HOSAKA KT, HOSHIMARU M et NUMA S (1979)
Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Academy of Science Of USA, **76**, 4350-4354.
124. VAN BREEMEN RB et FENSELAU C (1985)
Acylation of albumin by 1-O-acyl glucuronides.
Drug Metabolism and Disposition, **13**, 318-320.
125. VANE JR (1971)
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin like drugs.
Nature, **231**, 232-235.
126. VANE J.RJ et BOTTING R.M. (1995)
New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs.
Inflammation Research, **44**, 1-10.
127. VANE JR (1996)
Introduction : mechanism of action of NSAIDs.
British Journal of Rheumatology, **35**, 1-3.
128. VANE J.RJ et BOTTING R.M. (1997).
Mechanism of action of aspirin-like drugs.
Seminars in Arthritis and Rheumatology, **26**, 2-10.
129. VANE J.R., BAKHLE Y.S. ET BOTTING R.M. (1998).
Cyclo-oxygenases 1 and 2.
Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **38**, 97-120.
130. VERBEEK RK, BLACKBURN JI et LOEWEN GR (1983)
Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Clinical Pharmacokinetics, **8**, 297-331.
131. VOLLAND C et BENET LZ (1991)
In vitro enantioselective glucuronidation of fenoprofen.
Pharmacology, **43**, 53-60.
132. VOLLAND C, SUN H, DAMMEYER J et BENET LZ (1991)
Stereoselective degradation of the fenoprofen acyl glucuronide enantiomers and irreversible binding to plasma protein.
Drug Metabolism and Disposition, **19**, 1080-1086.
133. VREE TB, VAN DEN BIGGELAAR-MARTEA M, VERWEY-VAN WISSEN CPWGM, VREE ML et GUELEN PJ (1993)
The pharmacokinetics of naproxen, its metabolite *O*-desmethylnaproxen, and their acyl-glucuronides in humans. Effects of cimetidine.
British Journal of Clinical Pharmacology, **35**, 467-472.

134. WAKU K (1992)
Origins and fates of fatty acyl-CoA esters.
Biochimica et Biophysica Acta, **1124**, 101-111.
135. WECHTER WJ, LOUGHHEAD DG, REISCHER RJ, VANGIESSEN GJ et KAISER DJ (1974)
Enzymatic inversion of saturated carbon: nature and mechanism of the inversion of R(-)-p-iso-butyl hydratopic acid.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **61**, 833-837.
136. WEN SF (1997)
Nephrotoxicities of non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Journal of Formosan Medical Association, **96**, 157-171.
137. WILLIAMS KM, KNIHINICKI RD et DAY RO (1991)
Pharmacokinetics of the enantiomers of ibuprofen in the rabbit.
Agents and Action, **34**, 381-386.
138. YAGASAKI F, JINNAI I, YOSHIDA S, YOKOYAMA Y, MATSUDA A, KUSUMOTO S, KOBAYASHI H, TERASAKI H, OHYASHIKI K, ASOU N, MUROHASHI, BESSHO M et HIRASHIMA K (1999)
Fusion of *TEL/ETV* to a novel *ACS2* in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13).
Genes, Chromosomes & Cancer, **26**, 192-202.
139. YAMAGUCHI T et NAKAMURA 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.
140. ZHAO B, GEISLINGER G, HALL I, DAY RO et WILLIAMS KM (1992) The effect of the enantiomers of ibuprofen and flurbiprofen on the β -oxydation of the palmitate in the rat.
Chirality, **4**, 137-141.
141. ZIMMERMAN HJ (1990)
Update of hepatotoxicity due to classes of drugs in common clinical use: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, antibiotics, antihypertensives, and cardiac and psychotropic agents. *Seminars in Liver Disease*, **10**, 322-338.

BINOIS Agathe

**THIOESTERIFICATION DES ACIDES ARYL-2-PROPIONIQUES
PAR LES ACYL-COA SYNTHETASES ACS1 ET ACS2**

Thèse Vétérinaire : LYON 2002

RESUME :

L'étude *in vitro* de la thioestérification des acides aryl-2-propioniques par les acyl-coenzyme A synthetases a permis de mettre en évidence l'implication de l'isoforme hépatique de rat (ACS1). Par contre, la participation de l'ACS2, forme majoritairement cérébrale, reste très limitée. Ainsi, il apparaît que la capacité intrinsèque et/ou le niveau d'expression de l'ACS1 sont en partie, à l'origine des variations de la thioestérification des profènes. Le thioester de CoA ainsi formé peut conduire à l'inversion chirale.

MOTS CLES :

- acides aryl-2-propioniques
- inversion chirale
- acyl-Coenzyme A
- profènes
- thioestérification

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur	Morin
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur	Buronfosse
2ème Assesseur :	Madame le Docteur	Vernozy

DATE DE SOUTENANCE : 2 juillet 2002

ADRESSE DE L'AUTEUR :

le forum B
52 rue du capitole
83 200 TOULON