



HAL
open science

Etude par mutagenèse dirigée de la topologie des sites actifs et des spécificités de substrats des cytochromes P450 2C9 et 2C8 humains

Armelle Melet

► **To cite this version:**

Armelle Melet. Etude par mutagenèse dirigée de la topologie des sites actifs et des spécificités de substrats des cytochromes P450 2C9 et 2C8 humains. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris 5 Sorbonne Descartes, 2004. Français. NNT: . tel-01413358v2

HAL Id: tel-01413358

<https://hal.science/tel-01413358v2>

Submitted on 12 Dec 2016

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

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

Université Paris V
Spécialité : Sciences pharmaceutiques

THESE
présentée par **Armelle MELET**
pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de l'université Paris V

**Etude par mutagenèse dirigée de la topologie
des sites actifs et des spécificités de substrats
des cytochromes P450 2C9 et 2C8 humains**

Soutenance : Lundi 2 février 2004

Membres du jury :

Rapporteurs : Dr Jean-Pierre Salaun
Dr Danièle Werck-Reichhart
Examineurs : Pr Christiane Garbay
Dr Daniel Mansuy

Thèse réalisée au Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques
(CNRS UMR8601), sous la direction du Dr Daniel Mansuy
Université René Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie et Biochimie pharmacologiques et toxicologiques (UMR8601) à l'université Paris V.

Je tiens à remercier deux personnes en particulier :

- **Daniel Mansuy** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour avoir dirigé cette thèse et corrigé mon manuscrit en pleine canicule du mois d'août.
- **Marie-Agnès Sari**, pour m'avoir encadrée pendant mon DEA et conseillée pendant ma thèse. Je lui suis reconnaissante de m'avoir initié à la biologie moléculaire et à la microbiologie, malgré mon lourd passé de chimiste! Sa bonne humeur constante contribue à rendre les journées moins difficiles.

Je remercie également Mme Danièle Werck-Reichhart, Mr Jean-Pierre Salaun et Mme Christiane Garbay qui ont accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je souhaite aussi citer toutes les autres personnes qui ont contribué au bon déroulement de ce travail:

- **L'expert ès bibliographie et HPLC, Patrick Dansette**, pour sa grande disponibilité. Je me serai retrouvée bien des fois au chômage technique s'il ne m'avait pas aidée à remédier aux caprices de l'HPLC.
- **Les modélisateurs : Cristina Marques**, ma comparse de promo, qui a construit les modèles de CYP2C9 et CYP2C8. Nous avons conjugué nos efforts et nos travaux de thèse (Cristina sur le versant modélisation et moi du côté biologie moléculaire) pour avancer dans la connaissance topologique des CYP2C9 et CYP2C8. Merci également à **Roger Attias** qui a répondu avec une grande disponibilité à toutes mes questions de modélisation.
- **Les biochimistes : Maryse Jouen** pour sa gentillesse et pour m'avoir initié au Western Blot. Un grand merci également à **Anne-Christine Macherey et Ludivine Gras** qui m'ont aidé à déterminer les derniers Vm-Km de cette thèse.
- **Enfin merci à l'experte ès synthèse organique, Sylvie Dijols**, qui synthétise des dérivés de sulfaphénazole en un temps record.

Je remercie encore Daniel Mansuy, Marie-Agnès Sari et Patrick Dansette qui ont relu ce manuscrit.

Enfin, je terminerai ces remerciements par une pensée à mes compagnons d'infortune, Delphine Mathieu et David Lefèvre, qui soutiennent aussi leur thèse cette année.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES MOLECULES (chapitre II)	14
LISTE DES MOLECULES (chapitre III)	15
CHAPITRE I : Introduction	15
I.A LA SUPERFAMILLE DES CYTOCHROMES P450	17
I.A.1 Un bref historique... ..	17
I.A.2 Nature biochimique des cytochromes P450 : des protéines à hème thiolate	18
I.A.3 Une multiplicité de gènes et de séquences protéiques	19
I.A.4 Diversité fonctionnelle.....	20
I.A.4.a Biosynthèse et biodégradation des composés endogènes	21
I.A.4.b Métabolisme des xénobiotiques (catabolisme)	21
I.A.4.c Spécificités de substrats	21
I.A.5 Nomenclature : classification selon l'identité de séquence protéique	21
I.B FONCTIONNEMENT DES P450	22
I.B.1 Interactions enzyme/ligand	22
I.B.2 Transferts d'électrons aux cytochromes P450	23
I.B.3 Cycle catalytique.....	25
I.B.3.a Cycle productif	26
I.B.3.b Voies abortives (découplage du cycle productif).....	26
I.B.4 Etude du mécanisme catalytique du P450cam.....	27
I.B.4.a Structures des intermédiaires réactionnels du P450cam.....	27
I.B.4.b Mécanisme d'activation du dioxygène.....	28
I.C STRUCTURES RX	29
I.C.1 Structures RX de P450 solubles.....	29
I.C.1.a Allure générale	31
I.C.1.b Site actif.....	32
I.C.1.c Canal d'accès au site actif.....	33
I.C.2 Structures RX du premier P450 de mammifère : le CYP2C5 de lapin	34
I.C.2.a Cristallisation du CYP2C5	34
I.C.2.b Structure RX du CYP2C5/3LVdH sans substrat	35
I.C.2.c Structures du CYP2C5/3LVdH en présence de substrat (DMZ ou diclofénac)	38
I.D LES P450 HUMAINS	42
I.D.1 Les différentes isoformes et leur distribution tissulaire	42
I.D.1.a Les familles de P450 humains	43
I.D.1.b Distribution tissulaire	44
I.D.2 Importance pharmaco-toxicologique des P450 humains	45
I.D.2.a Le métabolisme des médicaments par les cytochromes P450 hépatiques	45
I.D.2.b Production de métabolites réactifs toxiques	46
I.D.2.c Les variations interindividuelles du métabolisme des médicaments et leurs conséquences pharmaco-toxicologiques	47
I.D.2.d Utilisation des P450 à des fins thérapeutiques.....	50
I.D.3 La sous-famille 2C.....	50
I.D.3.a Les différentes isoformes et leur distribution tissulaire	50
I.D.3.b Importance physiologique des CYP2C	52
I.D.3.c Etudes structure/activité des CYP2C	55
I.D.4 Etudes des spécificités de substrats des CYP2C9 et 2C8 : état de l'art au début de ma thèse	55
I.D.4.a Substrats et inhibiteurs connus	55
I.D.4.b Bilan des études topologiques	60
I.D.5 Intérêt de la structure RX du CYP2C5 de lapin pour l'étude topologique des CYP2C humains	64
I.E OBJECTIFS DE LA THESE	66

CHAPITRE II : Etude de la topologie du site actif du CYP2C9 par mutagenèse dirigée 69

II.A	PRESENTATION DE L'ARTICLE	71
II.A.1	Topologie du site actif modèle du CYP2C9	71
II.A.2	Positionnement de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole dans le site actif modèle du CYP2C9 et choix des acides aminés à muter.....	73
II.B	ARTICLE	76
II.C	RESULTATS ET DISCUSSION.....	89
II.C.1	Construction et expression des mutants du CYP2C9	89
II.C.2	Rôle de la sérine 365 dans l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique	91
II.C.3	Effets des mutations des phénylalanines 94, 110, 114 et 476 sur la reconnaissance des substrats et inhibiteurs par le CYP2C9 : importance des résidus 114 et 476.....	92
II.C.4	Autres mutations du CYP2C9 publiées au cours de ma thèse : importance du canal d'accès des substrats	94
II.C.5	Les structures RX du CYP2C9 seul ou en présence de substrat	96
II.C.5.a	<i>La structure RX du CYP2C9 sans substrat</i>	<i>96</i>
II.C.5.b	<i>Les structures RX du CYP2C9 avec substrat</i>	<i>98</i>
II.C.6	Complexe CYP2C9/(S)-warfarine	99
II.D	CONCLUSION SUR CE CHAPITRE.....	100

CHAPITRE III : Etude de la topologie du site actif du CYP2C8 par analyse « in silico » des résidus responsables de la spécificité de substrats de cette isoforme et mutagenèse dirigée de ces résidus 103

III.A	ANALYSE DU MODELE D'INTERACTION CYP2C8/SUBSTRATS.....	105
III.A.1	Présentation du pharmacophore des substrats.....	105
III.A.1.a	<i>Substrats utilisés</i>	<i>105</i>
III.A.1.b	<i>Construction du pharmacophore</i>	<i>106</i>
III.A.1.c	<i>Bilan : Modèle de pharmacophore des substrats du CYP2C8.....</i>	<i>107</i>
III.A.2	Topologie du site actif modèle du CYP2C8	109
III.A.2.a	<i>Le site actif modèle du CYP2C8</i>	<i>109</i>
III.A.2.b	<i>Le canal d'accès des substrats</i>	<i>111</i>
III.A.2.c	<i>Bilan : les principales caractéristiques topologiques du CYP2C8.....</i>	<i>112</i>
III.A.3	Modèle d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats	113
III.A.3.a	<i>Docking de la fluvastatine dans le site actif modèle du CYP2C8.....</i>	<i>113</i>
III.A.3.b	<i>Bilan : modèle d'interaction CYP2C8/substrats.....</i>	<i>115</i>
III.A.4	Choix des mutations.....	116
III.B	ETUDE FONCTIONNELLE DE MUTANTS DU CYP2C8	117
III.B.1	Construction et expression des mutants du CYP2C8	117
III.B.2	Substrats utilisés pour les tests d'activité.....	119
III.B.2.a	<i>Le Taxol, marqueur d'activité du CYP2C8</i>	<i>119</i>
III.B.2.b	<i>L'Acide rétinolique, la fluvastatine et la troglitazone, substrats communs aux CYP2C8 et 2C9..</i>	<i>119</i>
III.B.2.c	<i>Le DMZ et le diclofénac, substrats communs aux CYP2C humains et au CYP2C5 de lapin</i>	<i>121</i>
III.B.3	Etude de l'effet des mutations sur l'activité du CYP2C8	123
III.B.4	Recherche du résidu interagissant avec la fonction anionique ou polaire terminale des substrats	126
III.B.4.a	<i>Résultats</i>	<i>127</i>
III.B.4.b	<i>Discussion</i>	<i>130</i>
III.B.5	Recherche du ou des résidus interagissant avec le motif hydrophobe des substrats.....	132
III.B.5.a	<i>Résultats</i>	<i>132</i>
III.B.5.b	<i>Discussion</i>	<i>136</i>
III.B.6	Recherche des résidus interagissant avec les fonctions polaires secondaires des substrats..	137
III.B.6.a	<i>Résultats</i>	<i>138</i>
III.B.6.b	<i>Discussion</i>	<i>141</i>
III.B.7	Influence des résidus de la boucle C-terminale sur la spécificité de substrats et les vitesses d'hydroxylation du CYP2C8	142
III.B.7.a	<i>Résultats</i>	<i>142</i>
III.B.7.b	<i>Discussion</i>	<i>143</i>
III.C	CONCLUSION	144
III.D	ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION.....	146

CHAPITRE V : Matériel et Méthodes

175

V.A	PRODUITS ET ENZYMES EMPLOYES	177
V.A.1	Produits commerciaux	177
V.A.2	Produits synthétisés : dérivés du sulfaphénazole	177
V.A.3	Milieux de culture et tampons	177
V.A.4	Matériel biologique : souches et vecteurs	178
V.A.4.a	<i>Souches bactériennes d'Escherichia coli</i>	178
V.A.4.b	<i>Souches de levures Saccharomyces cerevisiae</i>	178
V.A.4.c	<i>Vecteurs</i>	179
V.B	CONSTRUCTION DES MUTANTS	179
V.B.1	Mutagenèse dirigée et clonage	179
V.B.1.a	<i>Essai de mutagenèse avec le kit Quick Change (Stratagene)</i>	179
V.B.1.b	<i>Mutagenèse par double PCR</i>	180
V.B.1.c	<i>Clonage par recombinaison homologue dans la levure</i>	183
V.B.2	Analyse des transformants	183
V.C	PREPARATIONS MICROSOMALES	183
V.C.1	Culture cellulaire	183
V.C.2	Préparation des microsomes	184
V.C.3	Caractérisation des préparations microsomales	184
V.C.3.a	<i>Dosage de la concentration en cytochrome P450</i>	184
V.C.3.b	<i>Dosage des protéines microsomales</i>	184
V.C.3.c	<i>Dosage de l'activité de la NADPH-cytochrome P450-réductase</i>	184
V.C.3.d	<i>Immunodétection des CYP2C par Western Blot</i>	185
V.D	MESURE DE CONSTANTES DE DISSOCIATION K_S	185
V.E	MESURES D'ACTIVITES HYDROXYLASES	186
V.E.1	Conditions générales d'incubation des cytochromes P450	186
V.E.2	5-hydroxylation des dérivés 2-aryylthiophènes par les CYP 2C et cinétique d'inactivation du CYP2C9 et du mutant S365A par l'acide tiénilique	186
V.E.2.a	<i>5-hydroxylation des dérivés 2-aryylthiophènes</i>	186
V.E.2.b	<i>Cinétiques d'inactivation par l'acide tiénilique : activité résiduelle en fonction du temps de préincubation en présence d'inhibiteur suicide</i>	187
V.E.3	Hydroxylation du diclofénac	187
V.E.4	Hydroxylation du DMZ par les CYP2C	188
V.E.5	6 α -hydroxylation du taxol par le CYP2C8	189
V.E.6	5-hydroxylation de la fluvastatine par le CYP2C8	190
V.E.7	4-hydroxylation de l'acide rétinolique par le CYP2C8	191
V.E.8	Mesure des constantes cinétiques des activités d'oxydation catalysées par les P450	191
V.F	MESURE DU POUVOIR INHIBITEUR D'UNE MOLECULE	192
V.F.1	Mesure de CI_{50}	192
V.F.2	Mesure de constantes d'inhibition compétitive K_i	192
V.G	METHODES DE MODELISATION MOLECULAIRE	193
V.G.1	Minimisation de l'énergie d'une structure 3D	193
V.G.2	Construction de modèles des CYP 2C9 et 2C8 par mutagenèse virtuelle du CYP2C5 ..	193
V.G.3	Modélisation de la structure 3D de molécules	194
V.G.4	« Docking » de substrats et inhibiteurs dans les modèles 3D de CYP 2C9 et 2C8	194
V.G.5	Construction d'un « pharmacophore »	194
V.G.6	Réalisation des images de modélisation	194

ANNEXES

195

Annexe A : Expression hétérologue de P450 humains	197
Annexe B : Les acides aminés et leurs propriétés	202
Annexe C : Alignement de séquence des CYP2	204
Annexe D : Etudes complémentaires sur une série de mutants F476X du CYP2C9	209
Annexe E : Bilan des mutations ayant un effet notable sur les propriétés catalytiques du CYP2C9	213
Annexe F : Etude de chimères 2C8/2C9	216

BIBLIOGRAPHIE	217
----------------------------	------------

ABREVIATIONS

AT	Acide tiénilique
CI50	Concentration d'inhibiteur qui diminue l'activité enzymatique de 50%
CYP	Cytochrome P450
DMZ	4-méthyl-N-méthyl-N-(2-phényl-2H-pyrazole-3-yl)-benzène sulfonamide
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FMN	Flavine MonoNucléotide
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
kcat	Vitesse maximale de Michaelis-Menten
Ki	Constante d'inhibition
KI	Constante d'inactivation
Km	Constante de Michaelis-Menten
Ks	Constante de dissociation
NADPH	Nicotinamide dinucléotide phosphate sous forme réduite
ORF	Open Reading Frame (phase ouverte de lecture)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
P450	Cytochrome P450
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SRS	Substrate Recognition Site
SPA	Sulfaphénazole
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Tween	Polyoxyéthylènesorbitan
UV	Ultra-Violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Représentation schématique d'un cytochrome P450.....	18
Figure 2 :	Protoporphyrine IX de fer présente dans les cytochromes P450.....	18
Figure 3 :	Séquences consensus des cytochromes P450.....	19
Figure 4 :	Les oxydations catalysées par les cytochromes P450.....	20
Figure 5 :	Nomenclature internationale.....	21
Figure 6 :	Les différents types d'interaction P450/ligand et les spectres différentiels correspondants.....	23
Figure 7 :	Représentation schématique des différents systèmes de transfert d'électrons des cytochromes P450 de classe I et II.....	24
Figure 8 :	Le cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monooxygénase.....	25
Figure 9 :	Comparaison des complexes du Fe ^{II} -camphre et Fe ^{II} -O ₂ -camphre du P450cam.....	28
Figure 10:	Structures secondaire et tertiaire des cytochromes P450 solubles (exemple du P450BM-3).....	31
Figure 11 :	Eléments structuraux associés aux différents SRS (Substrate Recognition Site).....	33
Figure 12 :	Ancrage membranaire des cytochromes P450 eucaryotes via une hélice transmembranaire N-terminale.....	34
Figure 13 :	Structure du CYP2C5 et orientation possible par rapport à la membrane.....	36
Figure 14 :	Vues du site actif du CYP2C5/3LVdH.....	37
Figure 15 :	Entrées du canal d'accès des substrats (a) et du canal d'accès du solvant (b) dans le CYP2C5/3LVdH.....	38
Figure 16 :	Structure chimique et sites d'oxydation du DMZ.....	38
Figure 17 :	Conformation fermée du CYP2C5/3LVdH en présence de DMZ.....	39
Figure 18 :	Hydratation de la fonction carboxyle du diclofénac dans la partie distale du complexe CYP2C5/3LVdH-diclofénac.....	41
Figure 19 :	Les cytochromes P450 humains impliqués dans le métabolisme de composés endogènes.....	44
Figure 20 :	(a) Proportions des différents cytochromes P450 présents dans le foie humain et (b) Proportions de médicaments métabolisés par les cytochromes P450 de foie humain.....	45
Figure 21 :	Les métabolites réactifs produits par les cytochromes P450 et leur devenir cellulaire.....	46
Figure 22 :	Mécanisme proposé pour le métabolisme de l'acide tiénilique (AT), l'inactivation suicide du CYP2C9 et le début du phénomène hépatotoxique.....	47
Figure 23 :	Les trois voies de vasodilatation dépendante de l'endothélium.....	53
Figure 24 :	La cascade de l'acide arachidonique.....	54
Figure 25 :	Exemples de molécules reconnues par le CYP2C9.....	57
Figure 26 :	Structure de la quercétine, un inhibiteur du CYP2C8.....	60
Figure 27 :	Superposition de six ligands du CYP2C9.....	61
Figure 28 :	Modèle d'interaction du sulfaphénazole avec le CYP2C9.....	61
Figure 29 :	Etude des motifs chimiques importants pour la reconnaissance de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole par le CYP2C9.....	62
Figure 30 :	Alignement de séquences entre les CYP2C humains et le CYP2C5 de lapin.....	64
Figure 31:	Comparaison des sites actifs du CYP2C5/3LVdH et du modèle de CYP2C9.....	71
Figure 32 :	Comparaison de l'entrée du canal d'accès des substrats entre le CYP2C5/3LVdH et le CYP2C9 modélisé.....	72
Figure 33 :	Modèles d'interaction de l'acide tiénilique (a), du sulfaphénazole (b) et du diclofénac (c) avec le CYP2C9.....	74

Figure 34 :	Stratégie d'étude de l'interaction Phe114-ligand.....	76
Figure 35 :	Immunodétection des CYP microsomaux en présence d'anticorps polyclonaux anti-2C	90
Figure 36 :	Proposition de mécanisme d'inactivation suicide du CYP2C9 au cours de la métabolisation de l'acide tiénilique	91
Figure 37 :	Interaction du diclofénac avec le CYP2C5/3LVdH observée par diffraction aux rayons X.....	94
Figure 38 :	Structure du CYP2C9 (a) repliement général (b) rôle structural de Arg97	96
Figure 39 :	Le site actif du CYP2C9 (vue de dessus)	97
Figure 40 :	L'entrée du canal d'accès des substrats (a) du CYP2C9 cristallisé (b) du CYP2C9 modèle.....	98
Figure 41 :	Mode de fixation du flurbiprofène dans le site actif du CYP2C9.....	98
Figure 42 :	Position de la (S)-warfarine dans le site actif du CYP2C9.....	99
Figure 43 :	Mode de fixation de la (S)-warfarine dans le site actif du CYP2C9.....	100
Figure 44 :	Conformations des substrats utilisés pour la construction du pharmacophore	105
Figure 45 :	Construction du pharmacophore par superposition successive des différents substrats du CYP2C8	106
Figure 46 :	Modèle de pharmacophore pour les substrats du CYP2C8.....	107
Figure 47 :	Superpositions du DMZ et du vérapamil avec la fluvastatine.	108
Figure 48 :	Structure chimique du sulfaphénazole, du DMZ et autres dérivés	109
Figure 49 :	Comparaison des sites actifs du modèle du CYP2C8 et de la structure RX du CYP2C5/3LVdH	110
Figure 50 :	Superposition des entrées des canaux d'accès des substrats du CYP2C5/3LVdH et du CYP2C8	112
Figure 51 :	« Docking » de la fluvastatine dans le site actif modèle du CYP2C8.....	114
Figure 52 :	Modèle d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats	115
Figure 53 :	Les sites d'oxydation du taxol par les cytochromes P450 de foie humain.	119
Figure 54 :	Les différents sites d'oxydation de la fluvastatine par les cytochromes P450 de foie humain.	120
Figure 55 :	Oxydation de la troglitazone en métabolite quinonique catalysée par les cytochromes P450 hépatiques (CYP2C8 et CYP3A4 principalement).....	121
Figure 56 :	Les substrats du CYP2C8 utilisés pour cette étude et les motifs structuraux mis en évidence lors de la construction du pharmacophore (représentation à pH physiologique).....	122
Figure 57 :	Activités d'hydroxylation du taxol 50 μ M, de l'acide rétinoïque 200 μ M., et de la fluvastatine 100 μ M par le CYP2C8 et ses mutants.....	123
Figure 58 :	Activités d'hydroxylation du diclofénac 800 μ M par le CYP2C8 et ses mutants et rapport de produits formés 5OH/4'OH.....	124
Figure 59 :	Représentation schématique des interactions potentielles entre les fonctions acides ou polaires terminales des substrats et trois arginines du CYP2C8.	126
Figure 60 :	Histogrammes permettant de visualiser les différences de Km et kcat entre le CYP2C8 et ses mutants en positions 97, 105 et 241.....	128
Figure 61 :	Représentation schématique des interactions possibles entre le motif hydrophobe du pharmacophore et le toit du site actif (résidus Phe201 et Phe205).	132
Figure 62 :	Histogrammes permettant de visualiser les différences de Km et kcat entre le CYP2C8 et ses mutants en positions 201 et 205 pour 4 substrats : taxol, DMZ, acide rétinoïque et fluvastatine.	135
Figure 63 :	Représentation schématique des interactions potentielles entre les fonctions polaires secondaires présentes dans certains substrats et 6 résidus polaires du CYP2C8.....	137
Figure 64 :	Histogrammes permettant de visualiser les différences de Km et kcat entre le CYP2C8 et ses mutants en positions 99, 100, 103, 114, 115 et 359.....	139
Figure 65 :	Structures de l'acide tazaroténique et de l'amodiaquine	146
Figure 66 :	Superpositions de l'acide tazaroténique avec l'acide rétinoïque et la fluvastatine	146
Figure 67 :	Volumes des sites actifs des CYP2C8 et CYP2C5.....	146

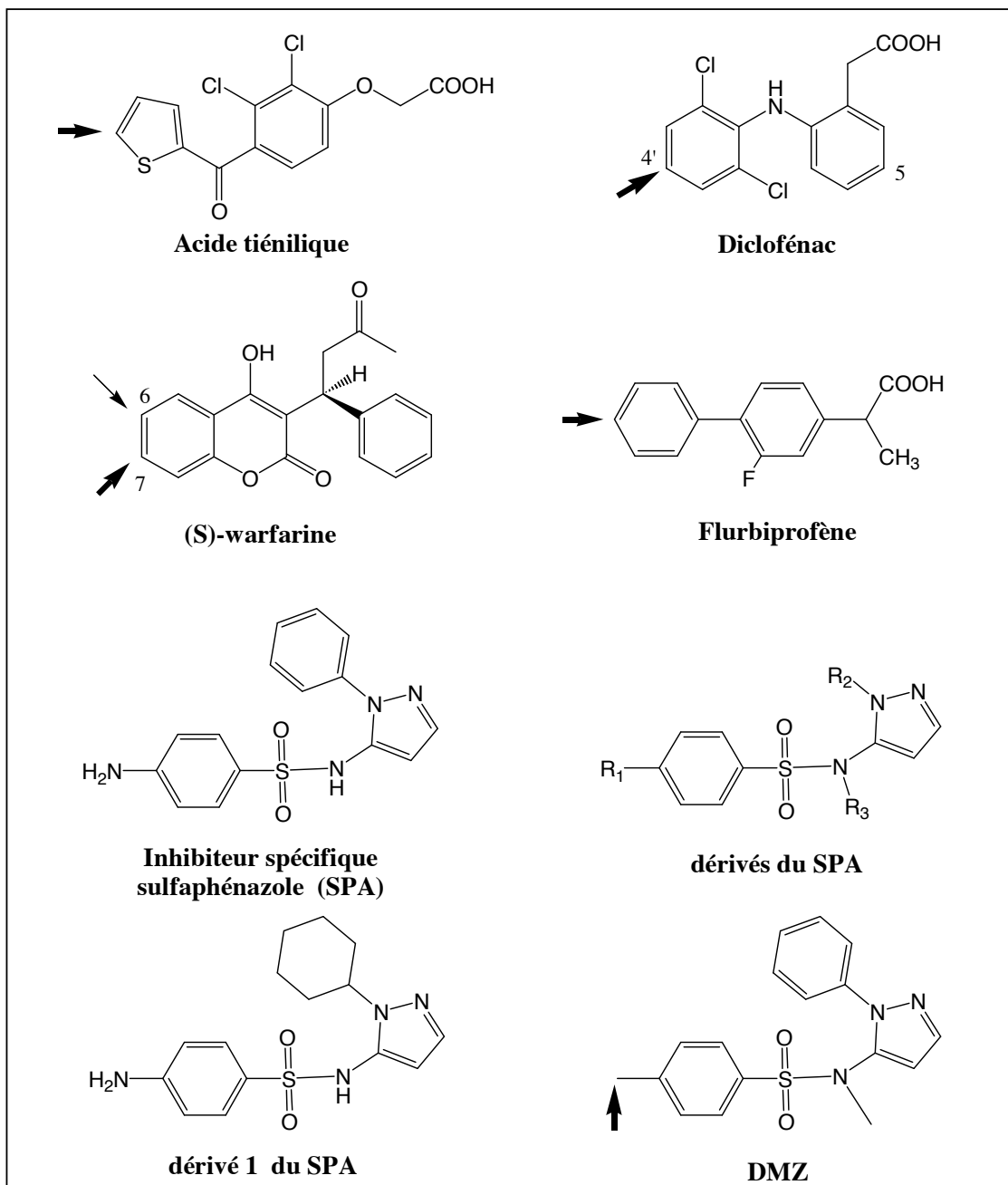
Figure 68:	Vecteur d'expression pYeDP60 portant l'ORF du CYP2C9.....	179
Figure 69 :	Principe du kit Quick Change (Stratagene)	180
Figure 70 :	Stratégie générale de construction des mutants des CYP2C8 et CYP2C9	181
Figure 71 :	Métabolisme de l'acide tiénilique et de ses dérivés par les CYP 2C humains.....	187
Figure 72 :	Les principes de l'expression hétérologue de cytochromes P450.....	197
Figure 73 :	Structure des acides aminés, masses moléculaires et pKa.....	202
Figure 74 :	Hydrophobicités relatives des acides aminés.....	202
Figure 75 :	Echelle de polarité des différents acides aminés.....	203
Figure 76 :	Représentation schématique des séquences des chimères CYP2C8/CYP2C9.....	216
Figure 77 :	Construction des chimères A et B par recombinaison homologue dans la levure W(N).....	218

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Exemples de rôles physiologiques des cytochromes P450 dans différents types d'organisme.	20
Tableau 2 :	Code d'accès des principales structures RX de P450 solubles déposées à la Protein Data Bank ...	30
Tableau 3 :	Liste des résidus en contact avec le DMZ (dans ses deux orientations) et leur appartenance aux différents SRS.....	39
Tableau 4 :	Liste des résidus situés à moins de 5 Å du diclofénac et leur appartenance aux différents SRS. ...	40
Tableau 5 :	Les différentes familles de P450 humains et leurs principaux rôles biologiques	42
Tableau 6 :	Les trois premières familles de CYP et leurs principaux substrats	43
Tableau 7 :	Exemples de polymorphismes génétiques de cytochromes P450 humains	48
Tableau 8 :	Principaux inducteurs des cytochromes P450	48
Tableau 9 :	Exemples d'inhibiteurs des principales familles de CYP hépatiques	49
Tableau 10 :	Les EDHFs identifiés à l'heure actuelle : sigle, nom, références bibliographiques.....	53
Tableau 11 :	Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide tiénilique et du diclofénac par les différents CYP2C humains exprimés dans des microsomes de levure W(R)fur.....	56
Tableau 12 :	Inhibition par le sulfaphénazole de différentes activités spécifiques des CYP2C humains exprimés dans des microsomes de levure W(R)fur.....	56
Tableau 13 :	Les principaux substrats du CYP2C8 connus au début de ma thèse.....	58
Tableau 14 :	Identités de séquence entre le CYP2C5 de lapin et les CYP2C humains	65
Tableau 15 :	Constantes cinétiques d'hydroxylation du DMZ et du diclofénac par le CYP2C5 et les CYP2C9 et 2C8 humains	65
Tableau 16 :	Les principaux résidus du site actif du CYP2C9 et les acides aminés correspondants du CYP2C5 et des autres CYP2C humains.	72
Tableau 17 :	Les principaux résidus polaires à l'entrée du canal d'accès des substrats du CYP2C9 et les acides aminés correspondants chez le CYP2C5 et les autres CYP2C humains.....	73
Tableau 18 :	Les trois stratégies envisagées pour la construction des mutants du CYP2C9	89
Tableau 19 :	Rapports molaires réductase/P450 des microsomes de levure contenant le CYP2C9 et ses différents mutants.	90
Tableau 20 :	Caractéristiques structurales des substrats du CYP2C8 : longueur des molécules et distances au site d'oxydation des différents motifs structuraux (en Å).....	107
Tableau 21 :	Principaux résidus du site actif des CYP2C humains et du CYP2C5 de lapin, susceptibles d'interagir avec les substrats.....	110
Tableau 22 :	Quelques résidus polaires spécifiques du CYP2C8, comparés aux résidus correspondants dans les CYP2C humains et le CYP2C5	111
Tableau 23 :	Liste des mutations du CYP2C8 réalisées au cours de cette thèse.	117
Tableau 24 :	Caractérisation biochimique des microsomes de levure exprimant le CYP2C8 et ses mutants ...	118
Tableau 25 :	Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque par des microsomes de cellules lymphoblastiques exprimant les CYP2C8, 2C9 et 3A4.....	120
Tableau 26 :	Constantes cinétiques d'hydroxylation de la fluvastatine par des microsomes de cellules d'insectes exprimant les CYP2C8, 2C9 et 3A4.....	120
Tableau 27 :	Constantes cinétiques d'oxydation de la troglitazone par des microsomes de cellules d'insectes exprimant les CYP2C8, 2C9, 2C19 et 3A4 (Supersomes, Gentest)	121
Tableau 28 :	Comparaison des activités du CYP2C8 et des mutants R97A et R97K envers le taxol 50 µM, l'acide rétinoïque 200 µM, la fluvastatine 100 µM et le diclofénac 800 µM.....	124
Tableau 29 :	Les quatre groupes de résidus sélectionnés pour cette étude de mutagenèse.....	126

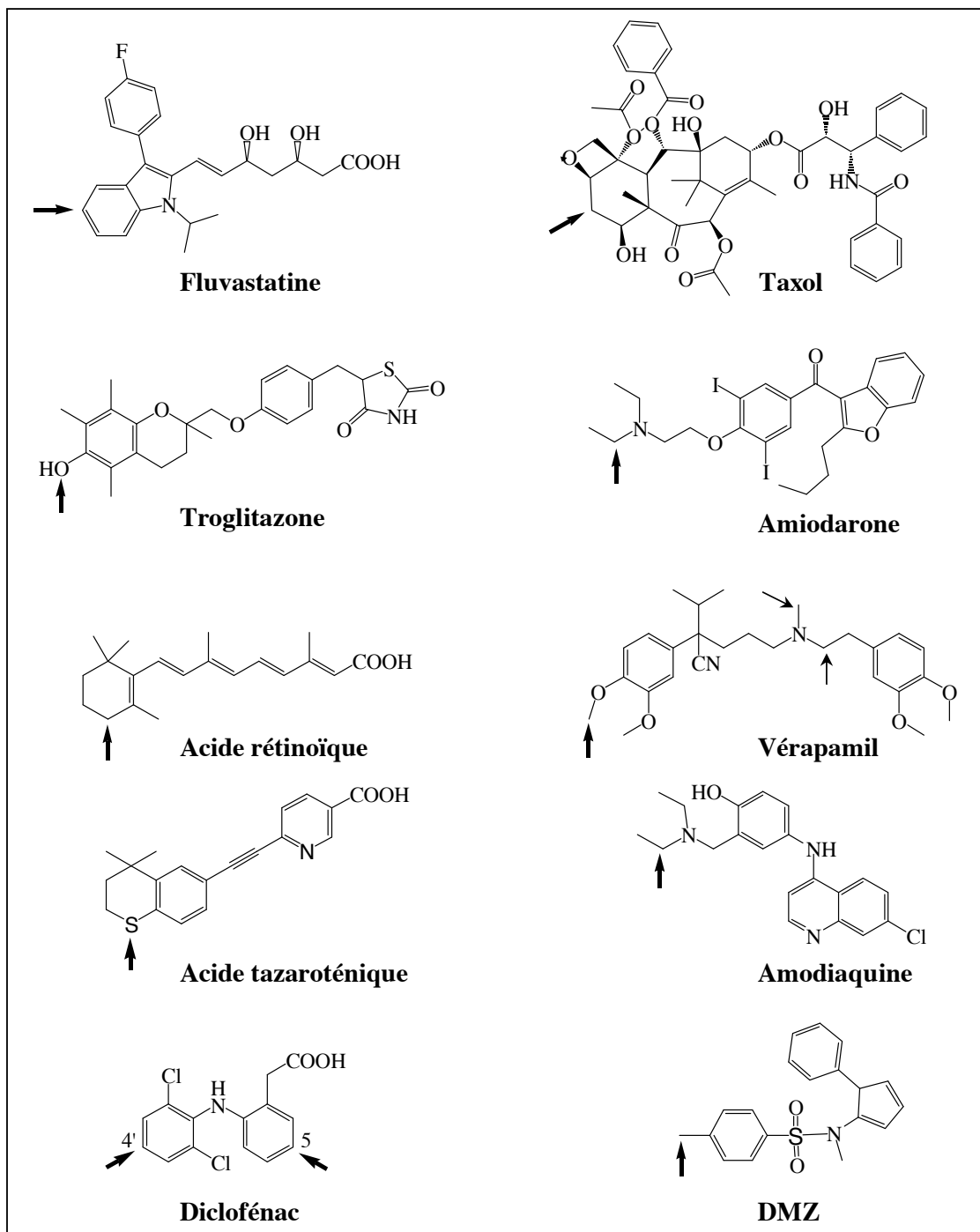
Tableau 30 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol et du DMZ (substrats non chargés) par le CYP2C8 et ses mutants en positions 97, 105 et 241	127
Tableau 31 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine (substrats anioniques à pH physiologique) par le CYP2C8 et ses mutants en positions 97, 105 et 241	127
Tableau 32 : Comparaison des Km ou CI50 du CYP2C8 et du mutant R241A vis-à-vis de quatre substrats	129
Tableau 33 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol et du DMZ par le CYP2C8 et ses mutants en positions 201 et 205	133
Tableau 34 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine par le CYP2C8 et ses mutants en positions 201 et 205	133
Tableau 35 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du diclofénac par le CYP2C8 et ses mutants F205A et F205I	134
Tableau 36 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et du DMZ par le CYP2C8 et ses mutants en positions 99, 100, 103, 114, 115 et 359	138
Tableau 37 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol et de la fluvastatine par le CYP2C8 et ses mutants en positions 99, 100, 103, 114, 115 et 359	138
Tableau 38 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol par le CYP2C8 et ses mutants T473V, K474N et I476F	143
Tableau 39 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine par le CYP2C8 et ses mutants T473V, K474N et I476F	143
Tableau 40 : Composition des milieux de culture (par litre de milieu)	177
Tableau 41 : Composition des solutions tampons utilisées (à 25°C)	178
Tableau 42 : Composition des mélanges de PCR et programmes utilisés	181
Tableau 43 : Oligonucléotides de synthèse utilisés pour réaliser la mutagenèse dirigée du CYP2C9 par PCR	182
Tableau 44 : Oligonucléotides de synthèse utilisés pour réaliser la mutagenèse dirigée du CYP2C8 par PCR	182
Tableau 45 : Caractéristiques des différents systèmes d'expression hétérologue	198
Tableau 46 : Volumes de Van der Waals des différents acides aminés	203
Tableau 47 : Caractérisation biochimique des microsomes de levure W(R) exprimant des mutants du CYP2C9 en position 476	209
Tableau 48 : Activité spécifique et constantes cinétiques de 5-hydroxylation de l'acide tiénilique par des microsomes de levure exprimant le CYP2C9 et ses mutants en position 476	210
Tableau 49 : Comparaison des propriétés catalytiques du CYP2C9, de ses mutants 476 et du CYP2C8 vis-à-vis de l'hydroxylation du diclofénac	210
Tableau 50 : Liste des mutations ayant un effet notable sur les propriétés catalytiques du CYP2C9	214
Tableau 51 : Caractérisation biochimique des microsomes de levure contenant le CYP2C8, le CYP2C9 et les chimères A, B, C et D	217
Tableau 52 : Activités d'hydroxylation du taxol 50 μ M, de la fluvastatine 100 μ M et du diclofénac 1 mM par le CYP2C8 et les chimères A, B, C, D	219
Tableau 53 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du diclofénac par le CYP2C8 et les chimères A et C	219
Tableau 54 : Liste des résidus qui diffèrent entre le CYP2C8 et le CYP2C9 dans la partie de séquence 360-431	220

LISTE DE MOLECULES (Chapitre II) : Substrats et inhibiteurs du CYP2C9



Les sites d'oxydation des substrats par le CYP2C9 sont indiqués par des flèches.

LISTE DE MOLECULES (Chapitre III) : Substrats du CYP2C8



Les sites d'oxydation des substrats par le CYP2C8 sont indiqués par des flèches.

CHAPITRE I : Introduction

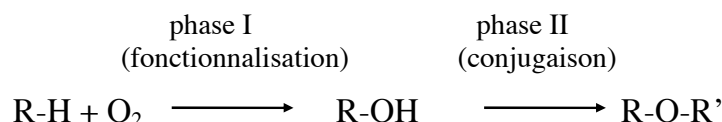
I.A LA SUPERFAMILLE DES CYTOCHROMES P450

I.A.1 Un bref historique...

La découverte des cytochromes P450 s'inscrit dans la continuité de recherches menées dès le 19^{ème} siècle sur la détoxification de composés exogènes (les xénobiotiques) par l'organisme (Conti, 1977; Omura, 1999; Estabrook, 1999; Estabrook, 2003).

A la fin des années 1940s, une littérature déjà abondante décrit la réponse métabolique des animaux après ingestion de substances chimiques (toxines, médicaments). Les composés ingérés sont retrouvés dans les urines sous forme plus hydrosoluble, i.e. oxydés ou conjugués à des molécules hydrophiles. L'ensemble de ces résultats permet à RT. Williams d'énoncer en 1947 les principes fondateurs du métabolisme des xénobiotiques (Williams, 1947).

Ainsi, les organismes vivants sont exposés en permanence à de nombreux xénobiotiques aux structures chimiques variées (aliments, polluants, médicaments). Ces substances sont fréquemment hydrophobes et peuvent comporter des groupements chimiques réactifs. Afin d'éviter leur accumulation toxique pour l'organisme, un système de détoxification a été mis en place au cours de l'évolution. Le métabolisme des xénobiotiques s'effectue en deux phases:



La **phase I** est une phase de fonctionnalisation au cours de laquelle des fonctions hydrophiles (alcool, amine, acide ou thiol) sont greffées au xénobiotique RH, par oxydation ou plus rarement par hydrolyse ou réduction.

La **phase II** est une phase de conjugaison avec des composés endogènes très hydrophiles (glutathion, acide UDP glucuronique, sulfate...). La molécule conjuguée est alors suffisamment hydrosoluble pour être excrétée dans les urines.

Les scientifiques ont ensuite cherché à identifier les systèmes enzymatiques impliqués dans ces deux phases du métabolisme. En 1953, GC. Müller et JA. Miller démontrent *in vitro* le rôle du foie dans la biotransformation de carcinogènes chez le rat (Müller and Miller, 1953). Deux ans plus tard, J. Axelrod et B. Brodie découvrent que des enzymes membranaires hépatiques sont capables de convertir des composés exogènes en présence de NADPH et de dioxygène de l'air (Axelrod, 1955; Brodie et al., 1955). En 1958, M. Klingenberg (Klingenberg, 1958) et D. Garfinkel (Garfinkel, 1958) mettent en évidence, indépendamment, un pigment dans des fractions microsomales de foie de rat et de cochon, réductible par le NADPH et le dithionite. A l'état réduit, ce pigment a une absorption caractéristique à 450 nm en présence de monoxyde de carbone. La nature biochimique de ces pigments est déterminée en 1964 par T. Omura et R. Sato : ce sont des hémoprotéines de type cytochromes baptisées « cytochromes P450 » (Omura and Sato, 1964). Enfin, l'année suivante, JR. Cooper et RW. Estabrook établissent le 1^{er} lien fonctionnel entre les cytochromes P450 et les activités oxydantes du foie, en inhibant ces dernières par le monoxyde de carbone (Cooper et al., 1965).

Les cytochromes P450 sont donc des enzymes de phase I qui catalysent l'oxydation de substrats divers à partir de l'oxygène moléculaire. En 1963, RW. Estabrook, JR. Cooper et O. Rosenthal ont également mis en évidence le rôle endogène de ces enzymes dans la biotransformation de stéroïdes (Estabrook et al., 1963).

Depuis, de par leur rôle métabolique et leur impact en santé humaine, les cytochromes P450 ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique. De la première purification en 1970 (Yu and Gunsalus, 1970) à la première cristallisation d'un cytochrome P450 membranaire début 2000 (Williams et al., 2000a et 2000b), les recherches sur les cytochromes P450 ont permis d'appréhender toute la complexité de ces enzymes : multiplicité des isoformes, diversité des substrats métabolisés et des réactions catalysées.

I.A.2 Nature biochimique des cytochromes P450 : des protéines à hème thiolate

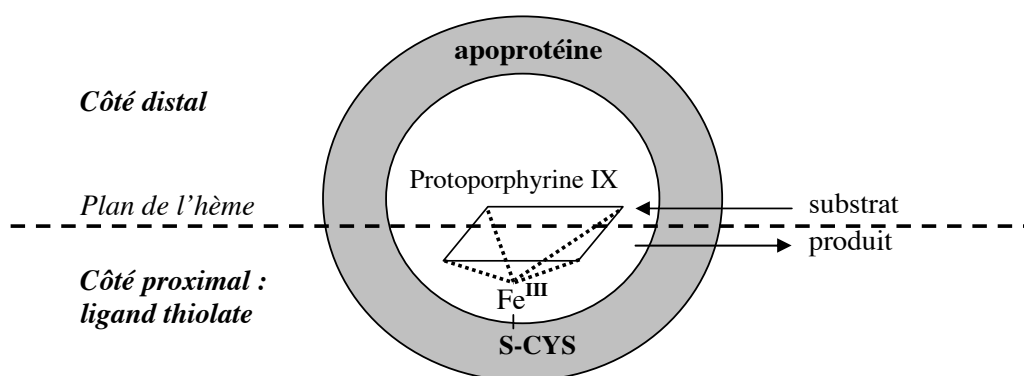


Figure 1 : Représentation schématique d'un cytochrome P450.

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines constituées d'une apoprotéine reliée à un groupement prosthétique (l'hème) par le groupement thiolate d'une cystéine. L'union internationale de biochimie et de biochimie moléculaire préconise la dénomination « **protéines à hème thiolate** » pour les désigner.

L'apoprotéine est un chaîne polypeptidique de masse moléculaire entre 45 et 60 kDa et de séquence très variable. Sa composition en acides aminés et sa conformation conditionnent la sélection en taille comme en fonctionnalité des substrats acceptés.

Le groupement prosthétique est une protoporphyrine IX de fer (Figure 2). Le fer à l'état Fe^{III} peut accepter une coordinence 6. Au sein des P450, il est lié aux 4 azotes pyrroliques de la protoporphyrine, à une cystéine axiale et éventuellement à un sixième ligand (H₂O, CO, autre molécule...).

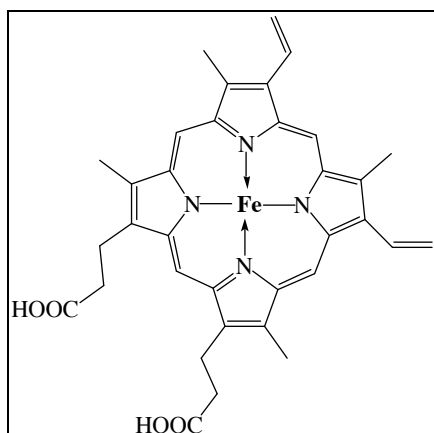


Figure 2 : Protoporphyrine IX de fer présente dans les cytochromes P450.

La liaison cystéinate-fer est à l'origine des propriétés spectrales particulières des cytochromes P450 (**complexe Fe^{II}-CO absorbant à 450 nm, bande de Soret**). Son existence a été démontrée à l'aide de systèmes modèles (Stern and Peisach, 1974) puis confirmée plus tard par analyse de la structure RX du P450cam (cf. partie I.C.1) (Poulos et al., 1985). Cette cystéine axiale permet de définir formellement deux régions par rapport au plan de l'hème : **une région proximale (du côté thiolate) et une région distale (côté opposé)**.

I.A.3 Une multiplicité de gènes et de séquences protéiques

Les techniques de biologie moléculaire ont permis l'identification d'un grand nombre de gènes et d'ADNc. Plus de 2500 séquences de cytochromes P450 ont été répertoriées à ce jour et avec le séquençage de nouveaux génomes, leur nombre ne cesse de croître. Une liste de ces séquences est régulièrement mise à jour sur le site du Dr Nelson (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

Les gènes de P450 sont exprimés dans tous les types d'organismes vivants (bactéries, champignons, plantes, insectes, animaux) en protéines cytosoliques chez les procaryotes ou membranaires chez les eucaryotes (cytochromes P450 mitochondriaux et cytochromes P450 microsomaux, ancrés aux membranes du réticulum endoplasmique).

Sur la base d'alignements de séquences, DR. Nelson et HW. Strobel ont proposé en 1987 un arbre phylogénique d'évolution (Nelson and Strobel, 1987). La superfamille des cytochromes P450 dériverait d'un gène ancestral commun datant de 3,5 milliard d'années (Gonzalez and Gelboin, 1991). Les premiers gènes proviendraient des bactéries, des levures et des plantes. Les protéines correspondantes participeraient au métabolisme des stérols, essentiel à l'intégrité des membranes biologiques. L'émergence de nombreux cytochromes P450 chez les espèces animales correspondrait à l'apparition de nouvelles substances toxiques dans l'environnement. Les espèces animales auraient alors diversifié leurs systèmes de détoxification pour se défendre. Les gènes de cytochromes P450 se seraient ainsi dupliqués et auraient divergé au cours de l'évolution pour constituer une **superfamille génique**. Cette superfamille est caractérisée par deux séquences consensus au niveau protéique (Figure 3):

- une séquence consensus proximale **FxxGx(R/H)xCxG**, conservée dans presque tous les cytochromes P450 et signature de ces hémoprotéines. Cette séquence contient la cystéine axiale liée à l'hème et forme un motif structural appelé « Cys-Pocket », participant au maintien de l'hème (cf. partie I.C.1.a).
- une séquence consensus distale **(G/A)Gx(E/D)T** : moins bien conservée que la Cys-Pocket, elle jouerait un rôle dans la fixation et l'activation de l'oxygène moléculaire au cours du cycle catalytique (cf. paragraphe I.B.4).

n° résidu du P450cam	350			353		355		357		359			249			252		
P450cam	F	G	H	G	S	H	L	C	L	G			G	G	L	D	T	V
P450BM-3	F	G	N	G	Q	R	L	C	L	G			A	G	H	E	T	L
P4501A1	F	G	L	G	K	R	L	C	L	G			A	G	F	D	T	V
P4502C8	F	S	A	G	K	R	I	C	A	G			A	G	T	E	T	T
P4503A4	F	G	S	G	P	R	L	C	L	G			A	G	T	E	T	T
n° résidu du P4502C8	428			431		433		435		437			298			301		
Consensus	F	-	-	G	-	H/R	-	C	-	G			G/A	G	-	E/D	T	-
	Première séquence consensus										Deuxième séquence consensus							
	contenant la cystéine liée au fer																	

Figure 3 : Séquences consensus des cytochromes P450.

I.A.4 Diversité fonctionnelle

Les cytochromes P450 sont des enzymes qui catalysent une grande diversité de réactions: des monooxygénations variées à partir du dioxygène de l'air (Figure 4), mais aussi des isomérisations, des déshydratations et des réductions (Mansuy and Renaud, 1995). Leur fonctionnement catalytique, dépendant de partenaires protéiques, sera détaillé ultérieurement.

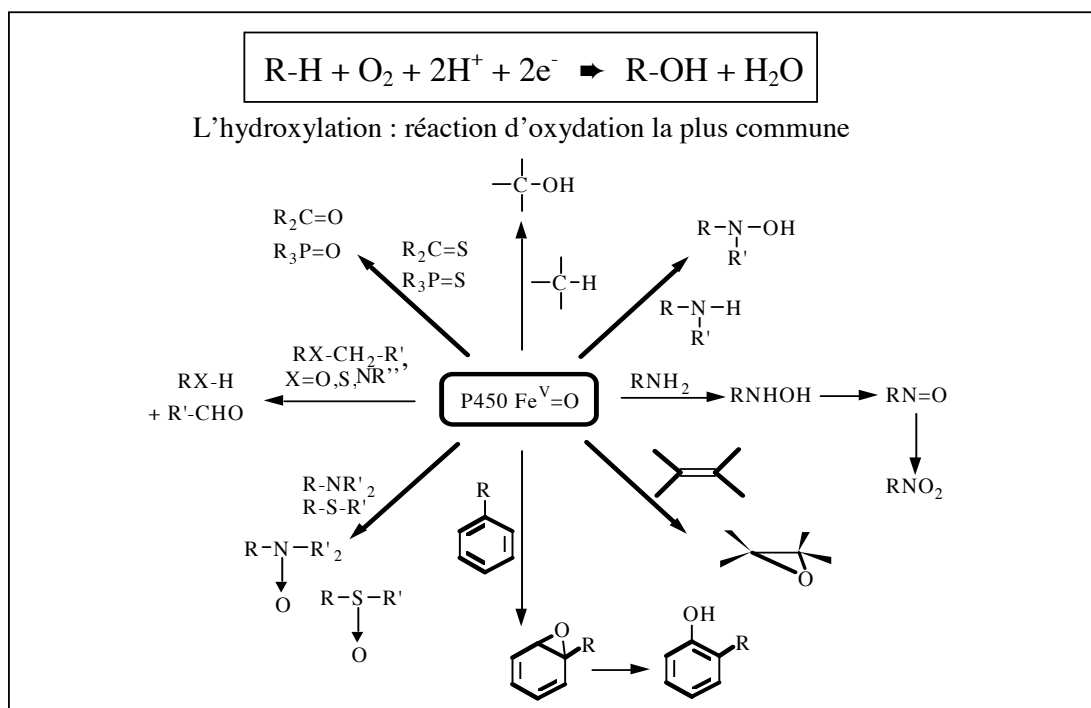


Figure 4 : Les oxydations catalysées par les cytochromes P450 d'après (Mansuy and Renaud, 1995).

Cette diversité de réactions correspond à une grande diversité fonctionnelle sur le plan biologique. Les cytochromes P450 jouent ainsi un rôle majeur dans le métabolisme de nombreux composés endogènes et exogènes (Tableau 1).

Type d'organisme	Métabolisme de composés endogènes	Métabolisme de xénobiotiques
Procarotes	Biosynthèse d'antibiotiques (ex : érythromycine)	Assimilation du carbone provenant de molécules exogènes (terpènes)
Eucaryotes inférieurs	Biosynthèse de l'ergostérol (levure) Biosynthèse de toxines, stéroïdes, antibiotiques (champignons)	Oxydation de xénobiotiques
Plantes	Métabolisme des acides gras et des terpènes	Détoxication des herbicides
Insectes	Biosynthèse des hormones et phéromones	Détoxication des insecticides et des toxines végétales
Mammifères	Métabolisme des acides gras, leucotriènes, stéroïdes, vitamines A et D, molécules signal	Détoxication des polluants, toxines, médicaments

Tableau 1 : Exemples de rôles physiologiques des cytochromes P450 dans différents types d'organisme.

1.A.4.a Biosynthèse et biodégradation des composés endogènes

Certains cytochromes P450 sont impliqués dans la biosynthèse de molécules importantes pour l'organisme comme des stérols (eucaryotes), des antibiotiques défensifs chez les bactéries, des pigments (flavonoïdes) et des lignines chez les plantes ou des phéromones chez les insectes. La biosynthèse de stérols est indispensable chez les eucaryotes car ces molécules sont des constituants de la membrane plasmique. Ainsi, la délétion du gène du P450 51A1 (lanostérol 14- α déméthylase) est-elle létale chez la levure (Kalb et al., 1987). Chez les mammifères, les cytochromes P450 participent à la biosynthèse et à la biodégradation des stérols, des hormones stéroïdes, des acides gras, et des vitamines A /D.

1.A.4.b Métabolisme des xénobiotiques (catabolisme)

Les cytochromes P450 sont les principales enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques. Ils contribuent à l'élimination de molécules exogènes de faible poids moléculaire (polluants, toxines, aliments, médicaments) et complètent ainsi l'action défensive du système immunitaire, qui prend en charge les macromolécules.

Dans de rares cas, l'activité de ces enzymes, initialement destinée à la détoxification peut devenir une source de toxicité (génotoxicité, cytotoxicité). Certains substrats sont transformés en métabolites réactifs électrophiles qui peuvent échapper à la prise en charge par les enzymes de phase II et alkyliser les macromolécules cellulaires (cf. I.D.2.b).

1.A.4.c Spécificités de substrats

Les cytochromes P450 métabolisent un nombre considérable de molécules (plusieurs dizaines de milliers rien que pour les cytochromes P450 humains : Guengerich, 1995). Ceux qui prennent en charge les xénobiotiques ont une spécificité de substrats beaucoup plus large que ceux qui métabolisent les composés endogènes. Contrairement à une enzyme classique qui transforme un substrat unique en un seul produit, ils peuvent métaboliser plusieurs substrats de taille et polarité distinctes en plusieurs produits. De plus, un même substrat peut être métabolisé par plusieurs cytochromes P450. Par conséquent, il est impossible de classer les cytochromes P450 sur la base de leur activité catalytique pour un substrat donné, à l'inverse de toute autre enzyme. Un nouveau système de nomenclature a donc été développé.

1.A.5 Nomenclature : classification selon l'identité de séquence protéique

La superfamille des P450 est divisée en familles et sous familles selon un critère d'identité de séquence protéique. Au sein d'une même famille, l'identité de séquence est supérieure à 40%. Au sein d'une même sous-famille, elle est d'au moins 55%. Les gènes et les ADNc de P450 sont désignés par le préfixe *CYP*, les protéines correspondantes par *CYP*. Chaque cytochrome P450 est identifié par un nombre en chiffres arabes indiquant sa famille, puis par une lettre désignant sa sous-famille, et enfin par un autre nombre l'identifiant individuellement. Ainsi, CYP2C9 désigne une protéine appartenant à la sous-famille C de la famille 2.

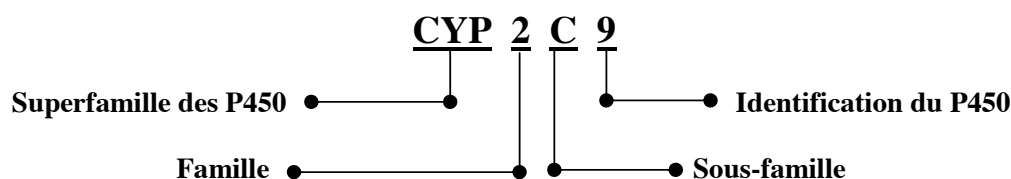


Figure 5 : Nomenclature internationale selon (Nebert et al., 1991).

La dernière classification (mai 2002, <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>) recensait 265 familles dont 18 familles et 43 sous-familles chez les mammifères. Par la suite, nous utiliserons les termes P450 (ou CYP) pour cytochromes P450. Les familles et sous familles seront indiquées selon la nomenclature officielle (ex : CYP2C).

I.B FONCTIONNEMENT DES P450

I.B.1 Interactions enzyme/ligand (Jefcoate, 1978)

En l'absence de ligand, le fer de l'hème, Fe^{III}, est en équilibre entre deux états de spin :

- *un état bas spin* $S = 1/2$: le fer est hexacoordiné et dans le plan de l'hème. Le sixième ligand, du côté distal, est une molécule d'eau ou un groupe hydroxylé d'un résidu de l'apoprotéine. Le maximum d'absorption de cette espèce se situe autour de 417 nm.
- *un état haut spin* $S = 5/2$: le fer, pentacoordiné, est légèrement en dehors du plan de l'hème. Le maximum d'absorption de cette espèce se situe vers 390 nm.

En présence d'un ligand : la formation du complexe P450/ligand peut être suivie par spectroscopie différentielle UV-visible. On distingue trois types d'interactions P450/ligand, chacune étant caractérisée par un spectre particulier (Figure 6):

- *une interaction de type I* : le ligand hydrophobe chasse les molécules d'eau présentes dans le site actif et en particulier la molécule d'eau jouant le rôle de sixième ligand du fer. Le fer passe alors d'un état hexacoordiné bas spin, à une configuration pentacoordinée, haut spin. Ceci se traduit spectralement par un déplacement du maximum d'absorption de la bande de Soret de 417 à 390 nm. Le spectre en absorption différentielle UV-visible comporte alors un minimum vers 420 nm, et un maximum vers 390 nm.
- *une interaction de type I inversé* : ce type de modification spectrale est observé en présence de molécules portant un atome d'oxygène accessible au fer (ex : fonction alcool ou éther). En se liant à cet atome, le fer passe alors d'un état pentacoordiné haut spin à une configuration hexacoordinée, bas spin. Cette situation est également observée quand la fixation du ligand dans le site actif favorise la coordination d'une molécule d'eau sur le fer. Spectralement, ceci se traduit par un déplacement du maximum d'absorption de la bande de Soret de 390 à 417 nm. Le spectre d'absorption différentielle se caractérise alors par un minimum vers 390 nm et un maximum vers 420 nm.
- *une interaction de type II* : elle se manifeste avec des molécules portant un atome de soufre ou d'azote, capable de créer une liaison de coordination avec le fer. Le spectre d'absorption différentielle montre alors un minimum vers 390-410 nm et un pic vers 425-435 nm.

L'étude de ces interactions par spectroscopie différentielle UV-Visible permet de mesurer l'affinité d'un substrat ou d'un inhibiteur pour un P450, par la mesure des constantes de dissociation, K_s , des complexes correspondants (cf. partie V.D du Matériel et Méthodes).

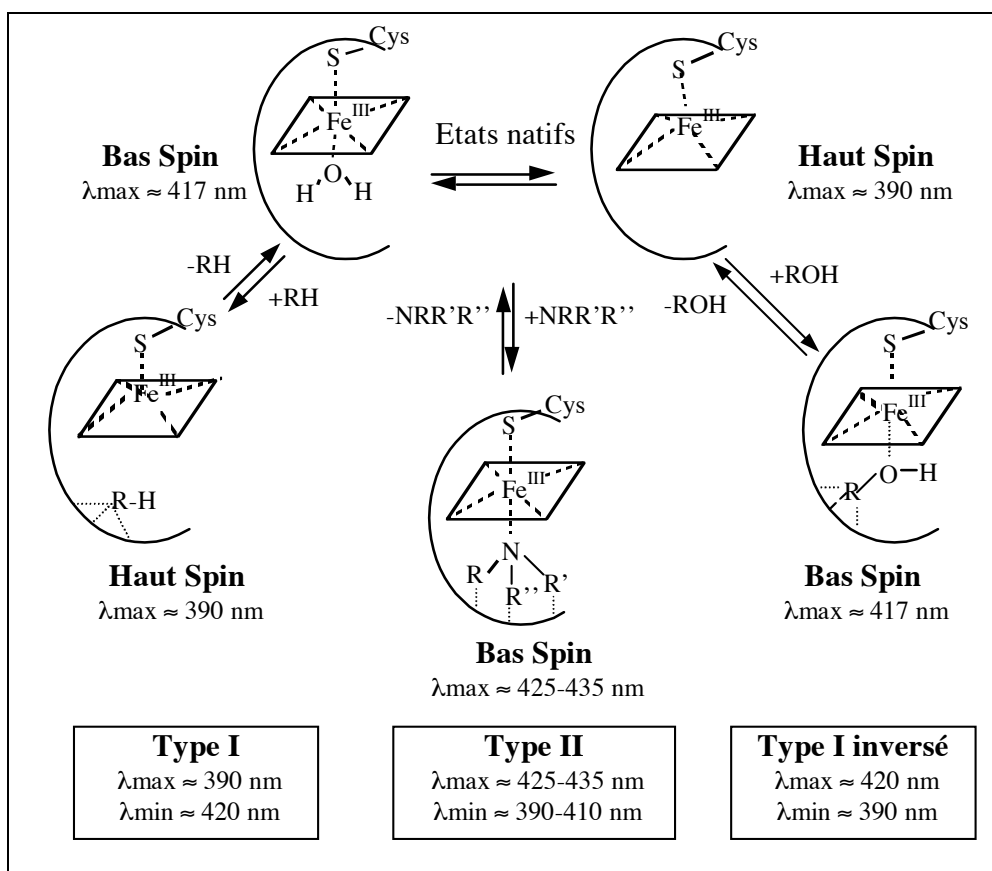
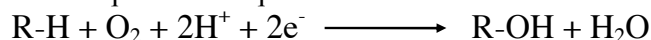


Figure 6 : Les différents types d'interaction P450/ligand et les spectres différentiels correspondants.

I.B.2 Transferts d'électrons aux cytochromes P450

Les cytochromes P450 ont le plus souvent besoin d'oxygène et d'électrons pour catalyser leurs réactions, comme indiqué dans l'équation bilan ci-dessous:



Les électrons proviennent d'un donneur d'électrons (le NADPH ou le NADH) et sont transférés au P450 via des protéines de transfert.

On distingue quatre classes de P450 selon leur système de transfert d'électrons (Peterson and Graham, 1998), les deux premières classes étant les plus importantes.

Les cytochromes P450 de **classe I** (regroupant les P450 procaryotes solubles et les P450 mitochondriaux, Figure I-7) reçoivent leurs électrons du NADH via une flavoprotéine à FAD puis une ferredoxine (protéine fer-soufre). Ces protéines sont spécifiques à chaque cytochrome P450. Dans cette classe, CYP51 de *Methylococcus capsulatus* est une protéine particulière constituée par un domaine P450 et une ferredoxine fusionnée (Jackson et al., 2002).

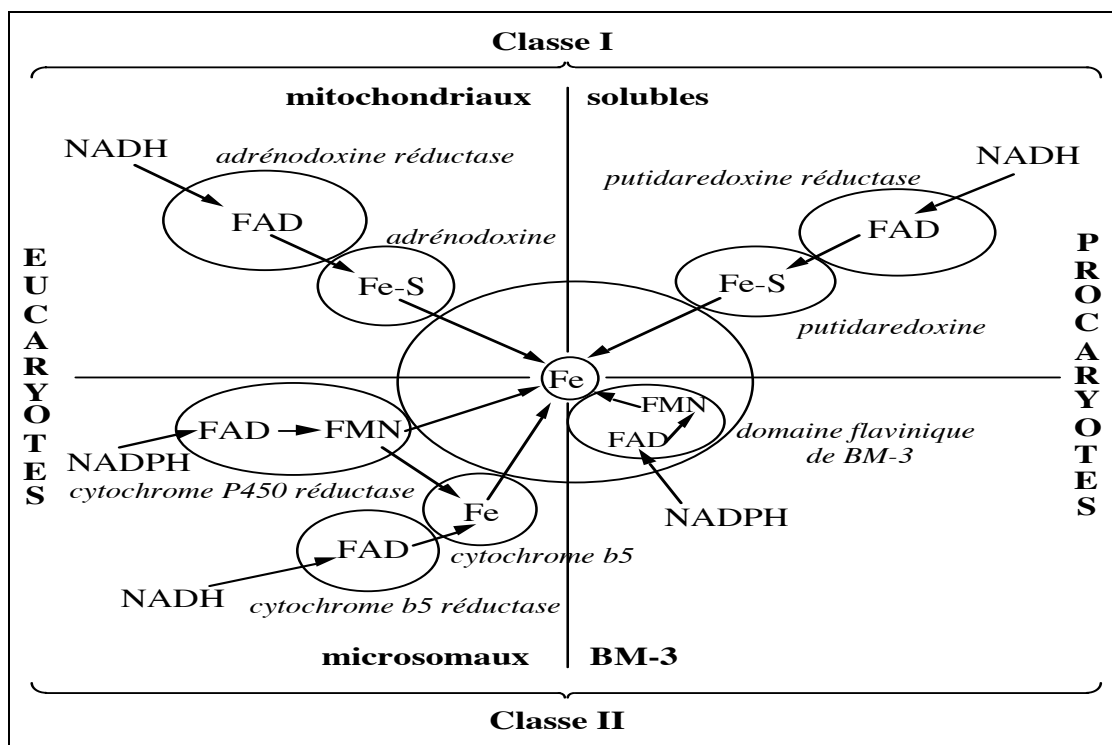


Figure 7 : Représentation schématique des différents systèmes de transfert d'électrons des cytochromes P450 de classe I et II.

Les cytochromes P450 de **classe II** (Figure 7) reçoivent leurs électrons via la NADPH-cytochrome P450 réductase qui est une flavoprotéine à FAD et FMN membranaire, spécifique aux P450 d'une même espèce. Il existe aussi un deuxième système de transfert d'électrons, non spécifique aux P450, via la cytochrome b_5 réductase et le cytochrome b_5 (Hlavica, 1984; Ingelman-Sundberg and Johansson, 1980). Les cytochromes P450 de cette classe sont tous des P450 eucaryotes microsomaux, excepté deux cytochromes P450 bactériens, le P450BM-3 et le P450ca. Le P450BM-3 a en plus la particularité d'être une protéine de fusion entre un domaine P450 et un domaine réductase intégré à la protéine.

Les cytochromes P450 de **classe III** n'ont pas besoin de donneur extérieur d'électrons car leurs substrats (des endoperoxydes ou hydroperoxydes) sont déjà très riches en électrons. Ils n'utilisent pas non plus de dioxygène car les réactions qu'ils catalysent ne sont pas des monoxygénations mais des isomérisations et des déshydratations.

Le P450nor est l'unique représentant de la **classe IV**. Il catalyse la réduction du NO en recevant ses électrons directement du NADH sans l'aide de protéines de transfert (Nakahara et al., 1993).

Le mécanisme de transfert d'électrons des partenaires redox à l'hème n'est pas encore élucidé. On a supposé la participation de résidus aromatiques du P450. Selon Straub et al., Trp120 serait impliqué dans le transfert d'électrons au CYP2C2 (Straub et al., 1993). De même, d'après Lehnerer et al., la phénylalanine 244 de l'hélice G influencerait sur le transfert d'électrons de la putidarédoxine au CYP2B4 (Lehnerer et al., 2000). D'autres études ont été moins concluantes. En particulier, deux résidus aromatiques ont été très étudiés, F350 du P450cam (Yasukochi et al., 1994) et les résidus correspondants du CYP 1A2 et 2E1 (Shimizu

et al., 1988; Porter, 1994), Trp97 du P450 BM-3 (Munro et al., 1994) et le résidu correspondant du CYP2C2 (Straub et al., 1993) mais leur rôle semble limité à la fixation et l'orientation de l'hème dans le site actif.

I.B.3 Cycle catalytique (Figure 8)

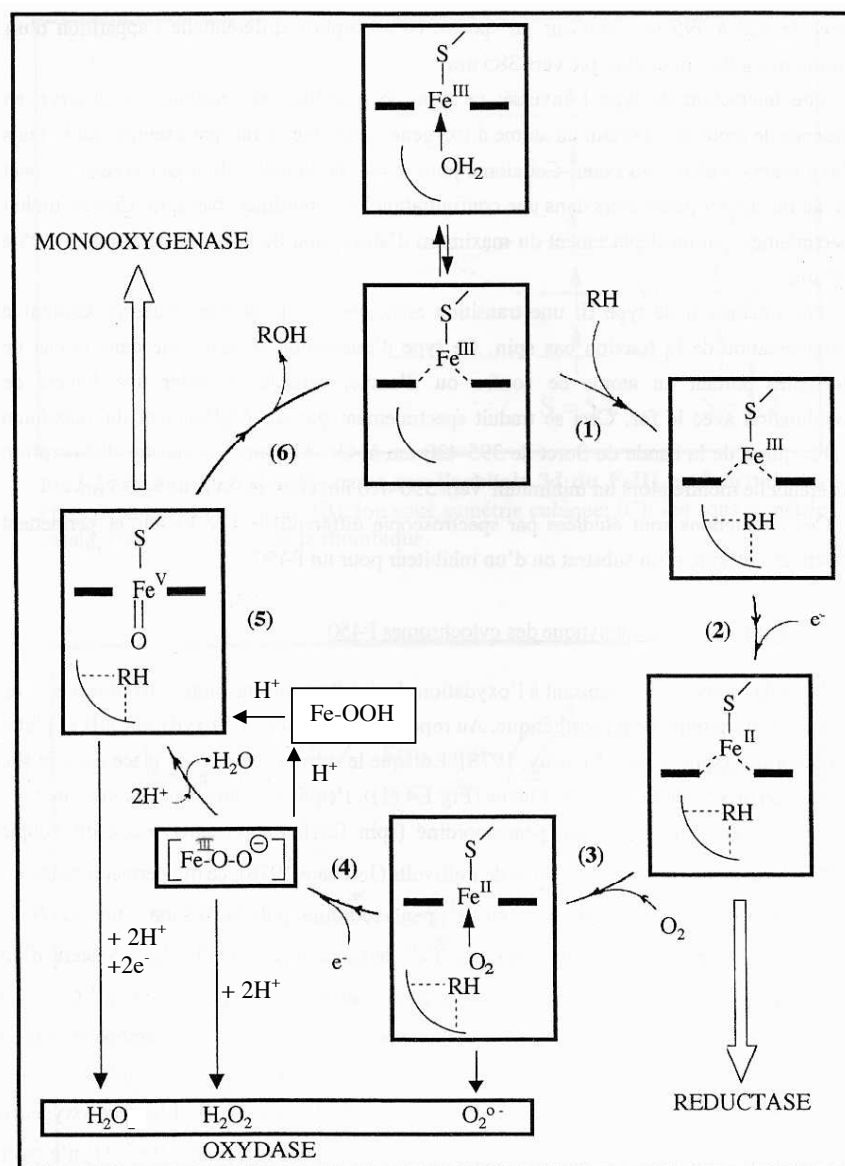


Figure 8 : Le cycle catalytique des cytochromes P450 à activité monoxygénase (Mansuy and Renaud, 1995) (1) Fixation du substrat (2) Réduction monoélectronique du fer (3) Fixation de l'oxygène moléculaire (4) Transfert du deuxième électron (5) Formation du complexe oxydant $Fe^V=O$ (6) Oxydation du substrat et retour à l'état initial.

Considérons le cycle catalytique classique des cytochromes P450 à activité monoxygénase.

I.B.3.a Cycle productif

Le cycle catalytique conduisant à l'oxydation d'un substrat a été étudié à partir de porphyrines de fer modèles (Guengerich and MacDonald, 1990; Mansuy et al., 1989; White and Coon, 1980; White et al., 1980). Il se déroule en trois grandes étapes : fixation du substrat, fixation et activation de l'oxygène moléculaire et enfin oxygénation du substrat qui quitte le site actif du P450 (Figure 8).

Au repos, le fer, à l'état d'oxydation +III, est en équilibre entre deux états: haut spin pentacoordiné et bas spin hexacoordiné, le 6^{ème} ligand étant une molécule d'eau (Mansuy and Renaud, 1995). Le plus souvent, l'entrée du substrat dans le site actif expulse la molécule d'eau liée au fer et déplace l'équilibre vers l'état pentacoordiné. Le potentiel rédox du couple Fe^{III}/Fe^{II} est augmenté d'une centaine de millivolts (Jefcoate, 1978), ce qui permet le transfert d'un premier électron (2) et la réduction du fer en Fe^{II} . Une molécule de dioxygène (3) peut alors se fixer au fer pour donner le complexe $Fe^{II} \leftarrow O_2$. Le transfert d'un deuxième électron (4) permet la formation d'un complexe $[Fe^{III}-O_2^-]$ qui par protonation conduit à un hydroperoxyde $Fe^{III}-OOH$. Une deuxième protonation provoque la rupture hétérolytique de la liaison O-O avec production d'une molécule d'eau et d'un complexe fer-oxo noté formellement $[Fe^V=O]$ (5). Cette entité à haut degré d'oxydation, très réactive, transfère alors son oxygène au substrat. Le métabolite oxydé est alors libéré (6), et le fer de l'hème régénéré à son état initial.

En présence d'agents oxydants, donneurs d'atome d'oxygène (iodosobenzène, hydroperoxydes, peracides, anions oxygénés ClO_2^- , IO_4^-), l'espèce réactive fer-oxo (5) peut être obtenue directement à partir de l'état natif. Ceci constitue le **cycle court** des cytochromes P450 (Hrycay et al., 1976; White et al., 1980).

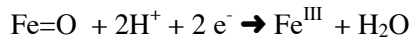
Récemment, les équipes de SG. Sligar et MJ. Coon ont montré que l'espèce $Fe^{III}-OOH$ pouvait oxyder directement le substrat sans passer par le complexe fer-oxo, dans le cas particulier de l'époxydation d'oléfines. Toutefois, ce deuxième complexe oxydant serait beaucoup moins efficace que le fer-oxo (Jin et al., 2003; Newcomb et al., 2003).

I.B.3.b Voies abortives (découplage du cycle productif)

Théoriquement, la consommation d'une seule molécule de NADPH suffit pour l'oxydation d'une molécule de substrat dans un cycle productif complet. C'est le cas lors de l'oxydation du camphre par le P450cam.

Par contre, chez les eucaryotes, le cycle catalytique n'est pas efficace à 100%. Il existe des voies dites abortives qui détournent les électrons du cycle productif et régénèrent le Fe^{III} avant oxydation du substrat. L'interruption du cycle ou « **découplage** » peut intervenir à trois niveaux :

- l'espèce $Fe^{II} \leftarrow O_2$ peut se décomposer en Fe^{III} et ion superoxyde. Cet ion se dismute alors en H_2O_2 et O_2 : $Fe^{II} \leftarrow O_2 \rightarrow Fe^{III} + O_2^-$ et $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- l'espèce $Fe^{III}-O_2^-$ peut revenir à l'état Fe^{III} en libérant une molécule d' H_2O_2 après addition de deux protons : $Fe^{III}-O_2^- + 2H^+ \rightarrow Fe^{III} + H_2O_2$
- le complexe fer-oxo (5) très réactif peut retourner directement à l'état natif en régénérant une molécule d'eau, après addition de deux nouveaux électrons et de deux protons :



Les cytochromes P450 génèrent par découplage des espèces oxydantes telles que O_2^- et H_2O_2 qui sont des sources potentielles de **stress oxydant**. Ceci constitue l'**activité oxydase des cytochromes P450**. On définit le **pourcentage de couplage d'un cytochrome P450** comme le rapport entre la quantité de produit formé sur la quantité de NADPH consommée. La plupart des P450 microsomaux sont des enzymes faiblement couplées qui produisent une grande quantité de peroxyde d'hydrogène et d'eau.

I.B.4 Étude du mécanisme catalytique du P450cam

Le mécanisme catalytique des P450 a été étudié en détail dans le cas du P450cam qui catalyse l'hydroxylation régio et stéréosélective du camphre.

I.B.4.a Structures des intermédiaires réactionnels du P450cam

Tous les intermédiaires postulés du cycle catalytique, excepté l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}^-$ (4) et $\text{Fe}=\text{O}$ (fer-oxo) (5), ont pu être observés (Schlichting et al., 2000).

Schlichting et al. ont piégé les espèces instables du cycle par cryogénéisation et déterminé leurs structures RX par cryocristallographie avec une résolution de 0,91 à 1,5 Å (Schlichting et al., 2000). Les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{camphre}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{camphre}$ ont des structures globalement similaires. Aucune molécule d'eau n'est présente près de l'hème, celle-ci étant remplacée par le substrat. Par contre, la fixation de l'oxygène apporte des modifications nettes par rapport au complexe initial $\text{Fe}/\text{camphre}$ (Figure 9) :

- **Fixation de O_2 et déplacement du camphre**: Dans le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\leftarrow\text{O}=\text{O}$, les trois atomes forment un coude; l'oxygène qui n'interagit pas avec le fer pointe vers la thréonine 252, résidu très conservé dans les cytochromes P450 (résidu de la deuxième séquence consensus); il est également en contact de Van Der Waals avec le camphre qui s'est légèrement éloigné de l'hème pour laisser la place au dioxygène.

- **Changement conformationnel de Asp251 et Thr252** : deux résidus très conservés du site actif (Asp251, Thr252) ont changé de conformation. Asp 251 s'est écarté de 90° pour former une liaison hydrogène avec Asn255. Thr252 a pivoté vers l'hème pour stabiliser le dioxygène et une nouvelle molécule d'eau H_2O 901.

- **Apparition de deux nouvelles molécules d'eau H_2O 901 et H_2O 902** :

Un réseau de molécules d'eau est apparu au sein du site actif. Il comporte deux nouvelles molécules d'eau par rapport au complexe initial $\text{Fe}/\text{camphre}$, proches de l'hème :

- la première, H_2O 901, se trouve à proximité du ligand O_2 , dans un sillon créé au sein de l'hélice I par des liaisons hydrogènes entre la fonction alcool de la thréonine 252 et le carbonyle de la glycine 248 (résidus de la deuxième séquence consensus, Figure 3). Ce sillon, présent dans tous les P450, constituerait une niche pour la fixation de O_2 et de molécules d'eau. H_2O 901 y est stabilisée par liaisons hydrogènes avec le groupe NH de la thréonine 252 et avec les groupes carbonyles de la valine 247 et de la glycine 248.
- la seconde, H_2O 902, se trouve impliquée dans un réseau de molécules d'eau, allant de la thréonine 252 à l'acide glutamique 366. Glu 366 servirait de point d'ancrage pour cette chaîne de molécules d'eau.

La dernière structure RX observée après addition d'un électron est plus ambiguë. La coupure de liaison O-O a eu lieu mais cette réaction n'a pas été totale. Le cristal obtenu serait un mélange de deux espèces : une forme minoritaire FeO_2 et une forme transformée majoritaire FeO . La distance fer/oxygène, estimée à 1,65 Å, semble représentative d'une liaison $\text{Fe}=\text{O}$ (distance normale de 1,8Å). Une nouvelle molécule d'eau, H_2O 903, est observée à proximité de FeO et correspondrait au produit de coupure de la liaison O-O. Le carbone C5 du camphre est à proximité du fer, dans une position favorable à une hydroxylation. Par contre, le degré d'oxydation exact de l'espèce FeO n'a pu être précisé. Il pourrait s'agir d'une forme $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ ou plus probablement d'une forme $\text{P}^+\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, comme dans le cas des peroxydases (Hiner et al., 2002; Rodriguez-Lopez et al., 2001).

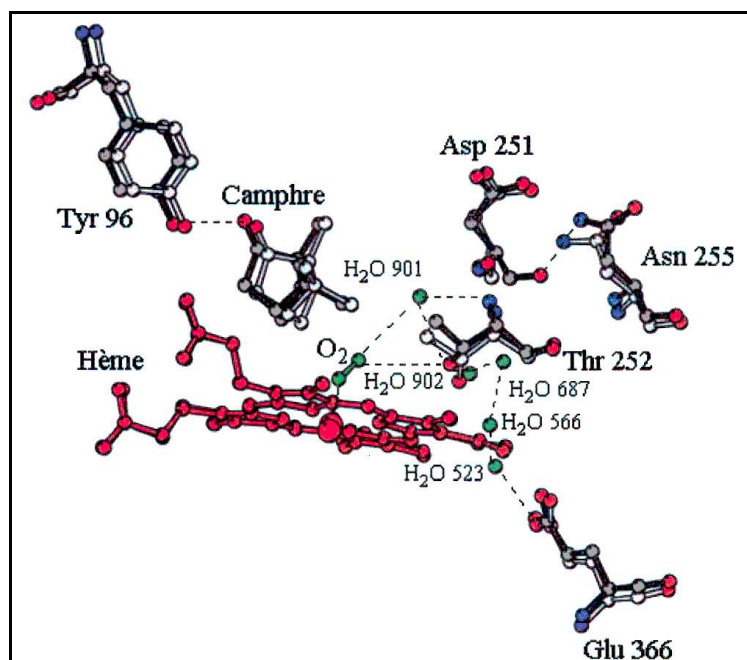


Figure 9 : Comparaison des complexes du Fe^{II}-camphre et Fe^{II}-O₂-camphre du P450cam (Schlichting et al., 2000). Lors de la fixation de O₂, deux nouvelles molécules d'eau apparaissent (H₂O 901 et 902) et le groupement carbonyle de Asp251 pivote pour former une liaison hydrogène avec Asn255. Le réseau de liaisons hydrogènes est indiqué en pointillés.

I.B.4.b Mécanisme d'activation du dioxygène

Les structures obtenues par Schlichting et al. (Schlichting et al., 2000) confortent l'hypothèse, pour le P450cam, d'un mécanisme de coupure de liaison O-O faisant intervenir un transfert de protons impliquant un réseau de molécules d'eau et deux résidus conservés Thr252 et Asp251. Elles corroborent les résultats obtenus par spectroscopie par d'autres groupes et éclairent les données sur certains mutants du site actif comme T252A et D251N :

- **Asp251** semble intervenir dans un réseau de liaisons hydrogènes impliquées dans le transfert de protons. La mutation D251N désorganiserait ce réseau, ce qui expliquerait l'activité réduite de ce mutant (Deprez et al., 1994; Gerber and Sligar, 1994).
- **Thr252** forme des liaisons hydrogènes avec le dioxygène et une molécule d'eau. L'implication de ce résidu dans le transfert de protons a été confirmée par Davydov et al. (Davydov et al., 2001). Les auteurs ont utilisé les spectroscopies RPE et ENDOR pour suivre l'évolution du complexe camphre/P450_{cam} Fe^{II}←O=O cryogénisé (77 K) après l'injection d'un électron par irradiation γ suivie d'une remontée progressive en température. Avec le P450cam, ils observent la formation de l'espèce Fe^{III}-OOH (à 77K) et de produit hydroxylé (à 200K). Avec le mutant T252A, ils détectent bien l'espèce Fe^{III}-OOH mais l'hydroxylation n'a pas lieu. Les auteurs concluent que Thr252 serait impliqué dans le transfert du deuxième proton du cycle catalytique : sa mutation en alanine bloquerait ce transfert, empêchant ainsi la formation du complexe fer-oxo et du produit hydroxylé.

Il est légitime de se demander si ce mécanisme de coupure est généralisable à l'ensemble des P450. Les substitutions des thréonines correspondant à Thr252 du P450cam ont de

profonds effets sur l'activité catalytique des CYP2A1, 2B1, 2B4, 2C2 et 2E1 (Lewis, 1998). Par contre, le P450eryF ne possède pas de thréonine distale, celle-ci étant remplacée par une alanine. D'après des études de mutagenèse du CYP1A2, Thr319 supposée équivalente à Thr252 ne semble pas non plus jouer de rôle dans l'activation du dioxygène lors de l'hydroxylation de la 7-éthoxycoumarine (Hiroya et al., 1994). Enfin, il existe un mécanisme secondaire d'époxydation des oléfines faisant intervenir le complexe oxydant Fe^{III}-OOH au lieu de fer-oxo (Jin et al., 2003; Newcomb et al., 2003). Thr252 n'est pas impliquée dans ce mécanisme car le mutant T252A garde une certaine capacité d'époxydation. En conclusion, le modèle de catalyse proposé pour le P450cam permet de mieux comprendre le mécanisme réactionnel des cytochromes P450 (transfert de protons, chaîne de molécules d'eau) mais ne peut manifestement pas s'appliquer totalement aux autres isoformes, en particulier au niveau des résidus impliqués dans cette catalyse.

I.C STRUCTURES RX

A ce jour, les structures RX de 15 P450 (12 P450 de bactéries, 1 P450 de champignon, et 2 P450 de mammifère dont 1 P450 humain cf. chapitre II) figurent dans la Protein Data Bank (PDB). Au début de ma thèse (octobre 1999, DEA inclus), les seules structures RX disponibles étaient celles de P450 bactériens solubles, la cristallisation de P450 membranaires posant plus de problèmes.

I.C.1 Structures RX de P450 solubles

Les différents P450 solubles cristallisés, leur fonction et leurs principales structures PDB référencées sont récapitulés dans le Tableau 2 (page suivante).

Historiquement, le premier P450 cristallisé a été le P450cam (Poulos et al., 1985). Issu de la bactérie *Pseudomonas putida*, il hydroxyle le camphre de façon régiosélective et stéréosélective en position 5-exo. C'est le P450 qui a été le plus étudié sur le plan mécanistique. Depuis 1985, de nombreuses structures de ce P450 ou de mutants (dans différents états redox ou en présence de substrats ou inhibiteurs) ont été ajoutées à la PDB. De 1993 à 2003, les structures de treize autres P450 solubles ont été successivement résolues (cf. Tableau 2). Le P450sca, utilisé industriellement pour la biosynthèse de la pravastatine (médicament contre l'hypercholestérolémie) a été cristallisé en 1997 mais sa structure n'est pas publiée pour raison de confidentialité.

Tous ces P450 solubles proviennent de procaryotes excepté le P450nor purifié à partir d'un champignon. Ils présentent plusieurs différences notables:

- Ils n'ont qu'une **faible identité de séquence** entre eux ($\leq 45\%$).
- Ils catalysent des **réactions distinctes avec des substrats variés**: des hydroxylations principalement mais aussi la réduction du NO pour le P450nor. Les substrats métabolisés (la toute petite molécule NO, le camphre un petit terpène, les acides gras à longues chaînes, les gros macrolides...) ont des structures et des tailles variables.
- Pour catalyser ces réactions, ces P450 interagissent avec des **protéines de transfert d'électrons différentes**. Les P450 cam, terp, eryF, CYP51 et CYP154C1 sont de classe I alors que le P450 BM-3 est de classe II. Le P450 BM-3 a de plus la particularité d'être une protéine de fusion entre un domaine monooxygénase et un domaine réductase. Le P450nor, quant à lui, catalyse la réduction du NO par le NADPH sans partenaire redox. **Malgré ces disparités, les structures 3D des P450 solubles cristallisés sont globalement très analogues.**

CHAPITRE I : Introduction

CYP	organisme	Classe	Fonction	Code PDB	Res(Å)	Référence
CYP101 (P450cam)	Bactérie <i>Pseudomonas putida</i>	I	Hydroxylase du camphre	2cyp (+camphre) 2ccp (+camphre) 1phc (sans substrat) 1pha (+ (+)-inhibiteur) 1phb (+ (-)-inhibiteur)	2,6 1,63 1,6 1,63 1,6	Poulos et al. 1985 Poulos et al. 1987 Poulos et al. 1986 Raag et al. 1993
CYP102 (P450BM-3)	Bactérie <i>Bacillus megaterium</i>	II	Monoxygénase des acides gras	2hpd (sans substrat) 1fag (+substrat) 1bvy (+domaine FMN)	2 2,7 2,03	Ravichandran et al. 1993 Li and Poulos 1997 Sevrioukova et al. 1999
CYP108 (P450terp)	Bactérie <i>Pseudomonas</i>	I	Hydroxylase de l' α -terpinol	1cpt (sans substrat)	2,3	Hasemann et al. 1994
CYP107 (P450eryF)	Bactérie <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	I	Hydroxylase impliquée dans la biosynthèse l'erythromycine	1oxa (+substrat) 1JIN (+ kétoconazole)	2,1 2,3	Cupp-Vickery and Poulos, 1995 Cupp-Vickery et al. 2001
CYP55A1 (P450nor)	Champignon <i>Fusarium oxysporum</i>	IV	Réductase de NO	1rom (sans substrat)	2	Park et al. 1997
CYP119 (thermostable)	Archéobactérie <i>Sulfolobus solfataricus</i>	?	Fonction postulée : oxydation de composés soufrés	1F4U (sans substrat) 1F4T (+inhibiteur) 1I07 (sans substrat)	2,69 1,93 1,5	Yano et al. 2000 Yano et al. 2000 Park et al. 2000
CYP51	Bactérie <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	I	Déméthylase de 14 α -stéroïls	1E9X (+ inhibiteur 4-PI) 1EA1 (+ inhibiteur FLU)	2,1 2,21	Podust et al.2000 Podust et al.2000
P450oxyB	Bactérie <i>Amycolatopsis orientalis</i>	?	Couplage oxydatif des phénols dans la biosynthèse de la vancomycine	1LFK (sans substrat)	1,7	Zerbe et al. 2002
CYP175A1 (thermostable)	Bactérie thermophile <i>Thermus thermophilus</i>	?	?	1N97 (+inhibiteur)	1,8	Yano et al. 2003
CYP 154C1	Bactérie <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	I	Monoxygénase de polykétides	1gwi (sans substrat)	1,92	Podust et al. 2003
P450oxyC	Bactérie <i>Amycolatopsis orientalis</i>	?	Couplage oxydatif des phénols dans la biosynthèse de la vancomycine	1UED	1,9	Pylypenko et al. 2003
P450epoK	Mycobactérie <i>Sorangium cellulosum</i>	?	Epoxidation d'épothilones C et D en épotohilonones A et B	1Q5E (sans substrat) 1PKF (+substrat) 1Q5D (+produit)	2,65 2,1 1,93	Nagano et al. 2003

Tableau 2 : Code d'accès des principales structures RX de P450 solubles déposées à la Protein Data Bank. Le P450sca ne figure pas dans cette liste car sa structure RX n'a pas été publiée.

I.C.1.a Allure générale (Graham and Peterson, 1999)

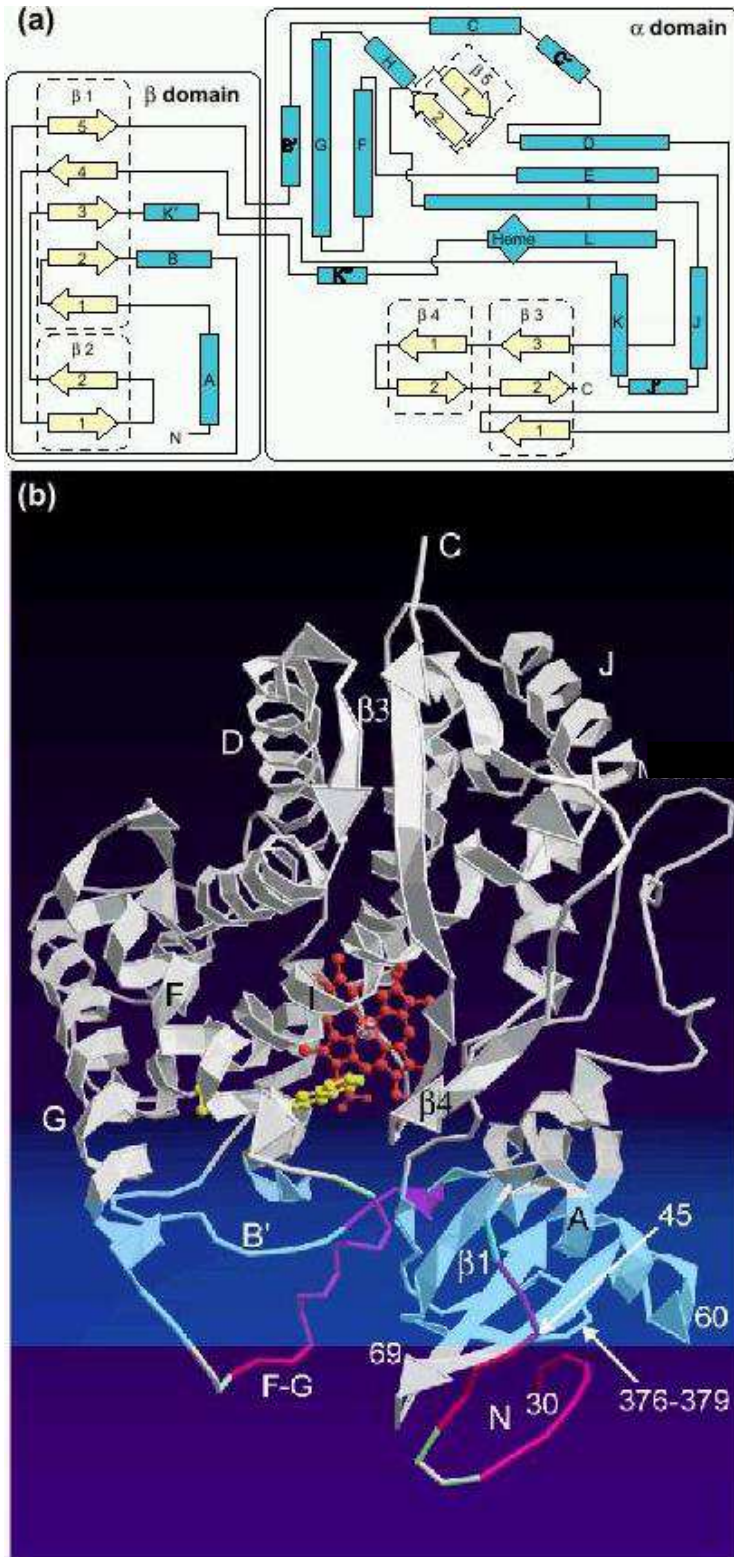


Figure 10 : Structures secondaire et tertiaire des cytochromes P450 solubles (exemple du P450BM-3).

(a) Topologie et nomenclature des éléments de structure secondaire du P450BM-3.
 (b) Structure tertiaire du P450BM-3

Illustration issue de (Werck-Reichart and Feyereisen, 2000)

Les P450 solubles semblent vérifier le paradigme selon lequel **la structure tertiaire des protéines est plus conservée que leur séquence**. En effet, malgré une faible homologie de séquence, les P450 solubles cristallisés ont un **repliement général semblable**. Ils adoptent une **forme de prisme triangulaire** d'environ 60 Å de haut sur une base de 30 Å avec deux régions distinctes : une zone riche en hélices α , qui représente environ 40 % de l'enzyme, et un domaine structuré en feuillets β reliés par des boucles sur 10 % de la protéine. Une nomenclature des éléments de structure secondaire a été définie par Poulos et al. (Poulos et al., 1985). Les 13 hélices α sont nommés A, B, B' et C à L et les feuillets β sont numérotés de 1 à 5 (Figure I-10).

L'**hème** est ancré au cœur du cytochrome P450 par trois types d'interactions :

- des interactions hydrophobes
- des liaisons hydrogènes entre ses propionates et des résidus basiques de l'apoprotéine
- la coordination du fer au thiolate d'une cystéine appartenant à une boucle très conservée appelée « Cys-Pocket » (cf. paragraphe I.A.2).

L'ensemble de la protéine s'articule autour de l'hème central et d'une longue hélice distale, l'hélice I. **Les éléments structuraux conservés sont les hélices D, E, I, L, les hélices J et K et les feuillets β 1 et β 2**. Les quatre hélices antiparallèles, D, E, I et L, forment un tonneau, qui prend l'hème en sandwich entre hélices I côté distal et L côté proximal. La partie centrale de l'hélice I porte une séquence consensus impliquée dans le transfert de protons dans la partie distale de l'hème. La boucle Cys-Pocket, qui précède l'hélice L, comprend la séquence signature des P450 et contribue à stabiliser la fixation de la cystéine à l'hème. L'hélice K contient le motif conservé ExxR qui serait impliqué dans la stabilisation du squelette structural sur la face proximale. Quant aux feuillets β 1 et β 2, ils contribueraient à la formation du canal d'accès des substrats.

Si la région proximale du P450 semble très conservée, il n'en est pas de même pour le côté distal qui comporte plusieurs zones variables. Les structures des P450 solubles **diffèrent principalement au niveau des hélices B', F et G et de la boucle entre les hélices F et G** (notée boucle F-G) qui ont une longueur et un positionnement variables. Ainsi, le P450_{BM3} possède une boucle F-G plus longue que le P450_{cam}. Dans le CYP154C1, l'hélice G est plus courte et les hélices F/G sont translattées vers le côté proximal.

I.C.1.b Site actif

Le site actif forme une cavité hydrophobe au sein de l'apoprotéine, du côté distal, au dessus de l'hème. Il est bordé par l'**hélice I**, la **boucle B-C**, la **boucle après l'hélice K**, et la **boucle C-terminale**. **L'extrémité de l'hélice F et la boucle F-G** constituent le toit du site actif. Ces éléments structuraux contiennent six zones qui seraient impliquées dans l'interaction des cytochromes P450 avec les substrats, les **SRS** (« Substrate Recognition Sites ») définis par Gotoh (Gotoh, 1992). Ces zones, réparties tout le long de la séquence primaire, correspondent à des acides aminés fortement variables dans les cytochromes P450, ce qui expliquerait la différence de reconnaissance de substrats par ces hémoprotéines (Figure 11).

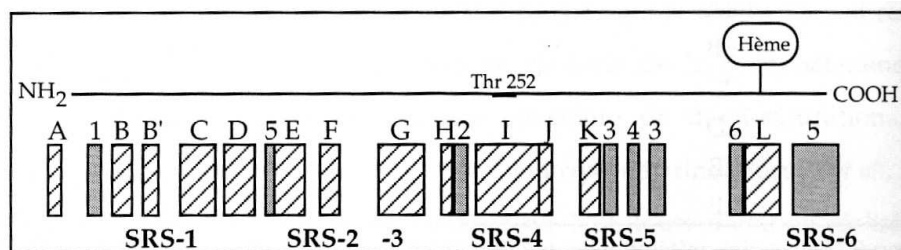


Figure 11 : Eléments structuraux associés aux différents SRS (Substrate Recognition Site). Exemple du P450cam. Les hélices sont nommées par des lettres et les feuillets β sont numérotés.

Le **volume du site actif** est variable selon le P450 et la taille des substrats qu'il métabolise (1060 \AA^3 chez le P450epoK, 240 \AA^3 seulement chez le P450cam). Il dépend en grande partie de la position des hélices B', F et G. Par exemple, en comparant le P450eryF qui métabolise un macrolide au P450cam qui a pour substrat un petit terpène (le camphre), on constate que l'hélice B' a une orientation modifiée, perpendiculaire à l'hème. L'hélice F, plus courte s'écarte de l'hème. Ces modifications ont pour conséquence d'agrandir le site actif pour permettre la fixation de plus gros substrats.

I.C.I.c Canal d'accès au site actif

Les substrats accèdent au site actif par l'intermédiaire d'un canal d'accès. L'ouverture du site actif au solvant est visible dans les structures des P450BM-3, P450nor, CYP51, P450oxyb et CYP154C1 sans substrat. Un canal d'accès des substrats a été bien caractérisé dans le cas du P450BM-3, par comparaison des structures RX de ce P450 seul ou complexé à l'un de ses substrats, l'acide palmoléique (Li and Poulos, 1997). Dans la structure sans substrat, le canal d'accès est un tunnel hydrophobe de 8-10 \AA de diamètre, qui se glisse sous les hélices F et G, le long du domaine de feuillets β . Dans la structure avec substrat, l'acide palmoléique fixé à une arginine 47 à l'entrée, s'étend dans le canal hydrophobe, et s'approche à 3 \AA de l'hème, pour être hydroxylé. Le canal s'est contracté autour de ce ligand pour former des interactions hydrophobes, grâce à un mouvement des hélices F et G et de la boucle F-G.

Le grand potentiel de mobilité de l'entrée du canal d'accès a été visualisé par dynamique moléculaire sur le P450BM-3 sans substrat (Paulsen and Ornstein, 1995). Le P450BM-3 oscillerait entre deux conformations, ouverte et fermée, figées par les structures RX. Ce passage entre deux conformations est également montré par des expériences de cinétique de fixation du CO au site actif. Un canal ouvert, plus accessible au CO du solvant est caractérisé par une vitesse de fixation de CO plus grande que celle de la conformation fermée. Le P450BM-3 sans substrat a une cinétique biphasique, témoignant d'un équilibre entre deux conformations ouverte et fermée. En présence d'un substrat du P450BM-3, la cinétique devient monophasique avec une vitesse caractéristique de la position fermée (McLean et al., 1996).

Les changements conformationnels du canal d'accès au site actif s'effectuent au niveau des hélices F et G et de la boucle F-G. La boucle F-G, très flexible, a dans tous les P450 cristallisés un facteur de température élevé qui empêche même la détermination de sa structure RX dans le cas du P450_{terp} (Haseman et al., 1994). Les hélices F et G sont également des éléments mobiles dont la longueur peut varier pour adapter la taille du site actif au volume du substrat lié (Yano et al., 2000). Ce phénomène est visible dans le cas du CYP119, en comparant les structure RX obtenues avec deux ligands du fer, l'imidazole et le 4-

phénylimidazole. En présence du plus petit ligand, l'imidazole, l'hélice F s'est déroulée d'un tour. La boucle F-G ainsi allongée, peut plonger dans le site actif pour interagir avec cette petite molécule. Enfin, la structure du CYP51 sans substrat révèle la présence de deux canaux potentiels : un canal fermé perpendiculaire à l'hème (comme dans le P450BM-3) et un canal ouvert parallèle à l'hème. La rotation des hélices F et G pourraient induire un mouvement synchronisé d'ouverture/fermeture des deux canaux et permettre l'accès du substrat par un canal et l'expulsion du produit par l'autre (Podust et al., 2001).

Les hélices F et G et la boucle F-G sont donc des éléments structuraux mobiles qui contrôlent l'accès au site actif, et s'adaptent pour interagir avec le substrat.

I.C.2 Structures RX du premier P450 de mammifère : le CYP2C5 de lapin (Williams et al., 2003a et 2003b)

I.C.2.a Cristallisation du CYP2C5 (Cosme and Johnson, 2000; Cosme and Johnson, 2002)

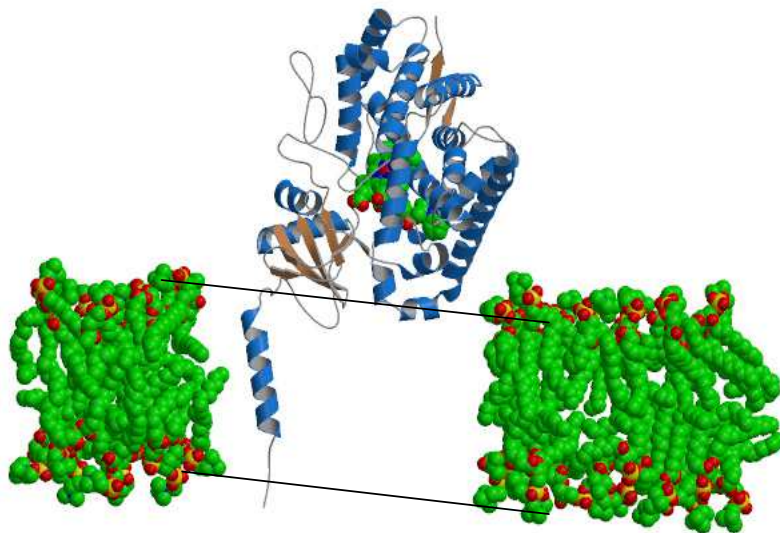


Figure 12 : Ancrage membranaire des cytochromes P450 eucaryotes via une hélice transmembranaire N-terminale (image publiée avec l'autorisation d'Eric Johnson).

Contrairement aux P450 de procaryotes, les cytochromes P450 de mammifères ne sont pas solubles. Ils sont ancrés aux membranes cellulaires par une hélice transmembranaire N-terminale, de 20 à 30 résidus (Nelson and Strobel, 1989) et par des interactions hydrophobes de surface (Ohta et al., 1994). Pour les cristalliser, il faut d'abord réussir à les solubiliser sous forme monomérique.

La coupure de l'hélice transmembranaire des P450 microsomaux produit généralement des enzymes catalytiquement actives mais peu solubles en l'absence de détergents (Von Wachenfeldt and Johnson, 1995; Poulos, 1996 ; Von Wachenfeldt et al. 1997), . Ces P450 tronqués conservent des interactions de surface avec les membranes ou s'agrègent une fois dissociés, ce qui empêche leur cristallisation.

Au début de mon travail de thèse, l'équipe d'Eric Johnson (Scripps Institute, La Jolla, USA) a réussi à cristalliser le premier cytochrome P450 membranaire, le CYP2C5 de lapin, sous une forme modifiée (2C5/3LVdH) (Williams et al., 2000a et 2000b). Deux principales modifications ont été nécessaires pour aboutir à un P450 soluble cristallisable (Cosme and Johnson, 2000):

- Délétion de l'hélice transmembranaire pour diminuer la force des interactions membranaires (+Addition d'une queue de 4 histidines en C-terminal pour permettre la purification sur colonne d'affinité) (2C5dH)
- Substitution de 5 résidus du CYP2C5 par ceux du CYP2C3 de lapin afin d'augmenter la solubilité de l'enzyme tout en limitant les phénomènes d'agrégation (2C5/3LVdH).

Les CYP2C5 et CYP2C3 de lapin, utilisés dans cette expérience, sont des enzymes parentes qui hydroxylent la progestérone avec des régiosélectivités différentes (21-hydroxylation pour le CYP2C5, 16 α -hydroxylation pour le CYP 2C3) (Cosme and Johnson, 2000). Les enzymes tronquées 2C5dH et 2C3dH ont été purifiées après expression dans *E. coli*. Elles sont catalytiquement actives mais s'agrègent en solution respectivement sous forme tétramères et dimères. D'après l'équipe de EF. Johnson, ces différences d'agrégation pourraient s'expliquer par les différences de résidus au niveau de l'hélice F et de la boucle F-G, régions normalement impliquées dans les interactions membranaires de surface (Cosme and Johnson, 2000). Pour confirmer cette hypothèse, les résidus 201-210 du CYP2C5 ont été remplacés par ceux du CYP2C3. La chimère 2C5/3dH ainsi obtenue est soluble sous forme monomérique mais n'est plus catalytiquement active. Pour conserver l'activité de 21-hydroxylation de la progestérone, il faut garder les résidus Leu 201 et Val 205 du CYP2C5. La chimère ainsi mutée, nommée 2C5/3LVdH, est soluble et monomérique, et conserve un tiers de l'activité du CYP2C5. C'est cette enzyme modifiée qui a été finalement cristallisée. Sa structure RX, publiée début 2000, a été obtenue avec une résolution de 3 Å.

I.C.2.b Structure RX du CYP2C5/3LVdH sans substrat (Williams et al., 2000a et 2000b)

Structure générale (Figure 13)

Malgré sa très faible homologie de séquence avec les P450 cytosoliques cristallisés, le CYP2C5/3LVdH présente un **repliement général similaire**; on reconnaît la forme caractéristique de prisme triangulaire avec une région riche en hélices α et un domaine riche en feuillets β . Le **mode de fixation de l'hème** est également **conservé**. L'hème est pris en sandwich entre l'hélice I distale et l'hélice L proximale. Il est maintenu au cœur de la protéine par la cystéine 432, ligand axial de l'hème et des liaisons hydrogènes entre ses groupement propionates et des résidus basiques de la protéine, conservés chez les mammifères. L'architecture du site de fixation de l'hème serait identique entre les espèces pour préserver la capacité des P450 à catalyser leurs réactions.

Interactions avec le membrane (Figure 13)

Le CYP2C5/3LVdH tronqué de son hélice N-terminale transmembranaire, comporte une large surface hydrophobe qui interagirait également avec la membrane. Cette surface comprend une partie N-terminale adjacente à l'hélice transmembranaire (résidus 30-45 et 60-69), les résidus 376-379 et l'extrémité C-terminale de la boucle F-G. Elle fixerait le P450 dans une orientation spécifique par rapport à la membrane.

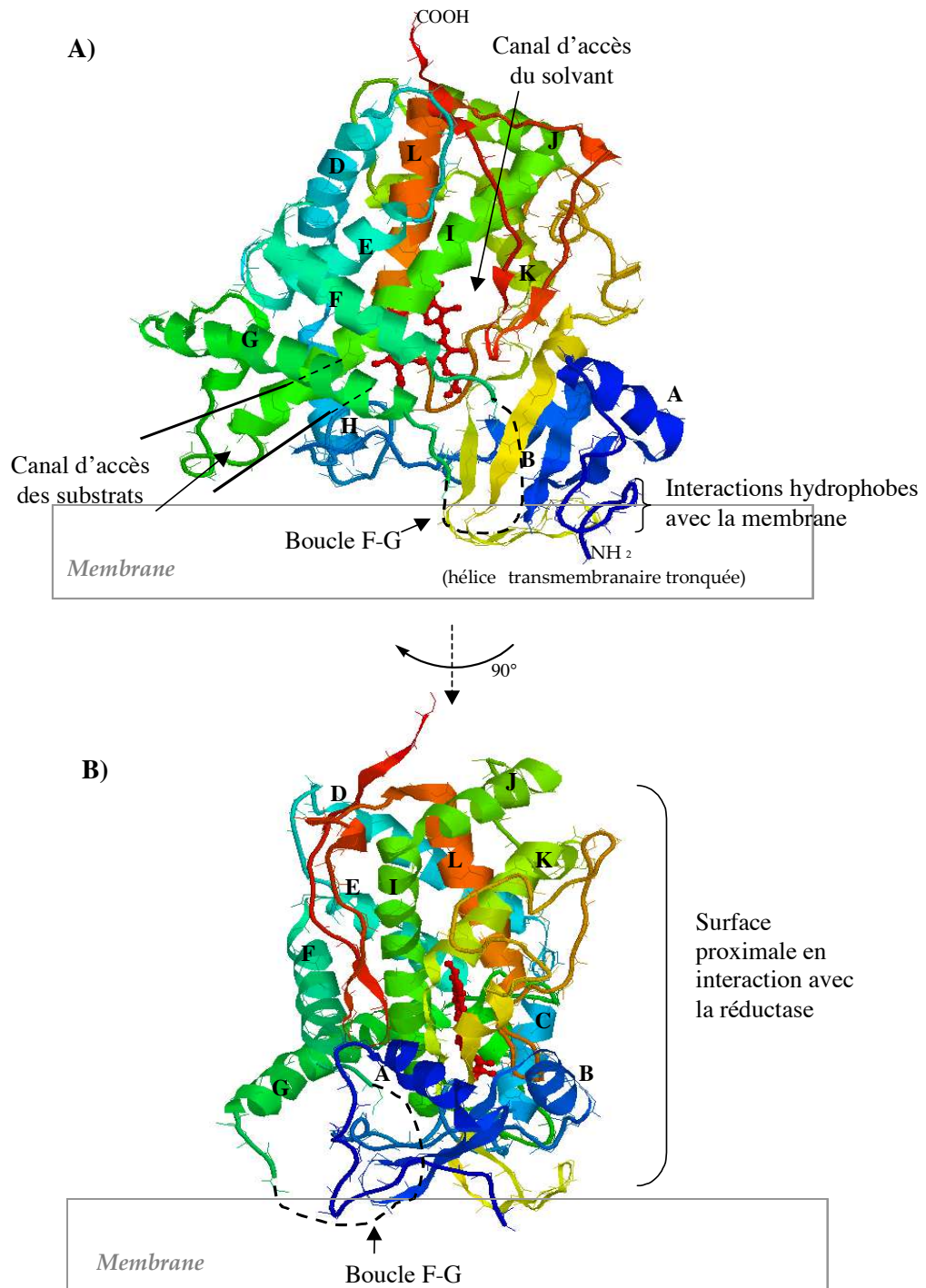


Figure 13 : Structure du CYP2C5 et orientation possible par rapport à la membrane (illustration de Marques-Soares, 2002 : la surface proximale du P450 est positionnée perpendiculairement à la membrane afin de maximiser son interaction avec la réductase.

Interactions avec la réductase (Figure 13)

Comme dans les P450 solubles cristallisés, la surface proximale interagirait avec la cytochrome P450 réductase. En effet, elle comporte des résidus très conservés, chargés positivement (Arg121, Arg125, Arg132, Lys138, Arg418, Arg429, Arg439) qui formeraient des liaisons ioniques avec des résidus chargés négativement de la réductase. L'orientation du CYP2C5 par rapport à la membrane positionnerait la face proximale perpendiculairement à la membrane pour maximiser l'interaction avec son partenaire redox.

Le site actif

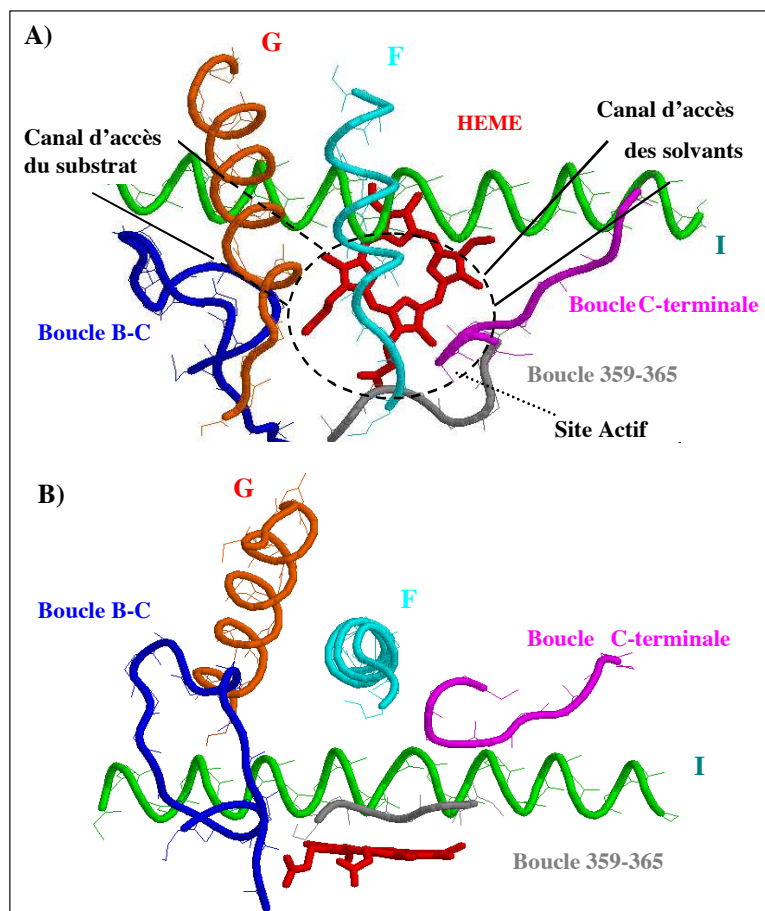


Figure 14 : Vues du site actif du CYP2C5/3LVdH. (A) Vue de dessus (côté distal) et (B) vue de profil (Illustration de Marques-Soares, 2002).

Le site actif distal est légèrement plus large que celui du P450cam (360 \AA^3 au lieu de 300 \AA^3). Il est constitué par les mêmes éléments de structure secondaire, avec les mêmes SRS que les P450 cytosoliques. Il est bordé sur les côtés par l'hélice I, la boucle B-C, la boucle 359-365 après l'hélice K et la boucle C-terminale. L'extrémité de l'hélice F et une partie de la boucle F-G forment le toit du site actif. Par contre, l'arrangement spatial de tous ces éléments, excepté l'hélice I, diverge de façon significative, surtout au niveau de la boucle B-C (SRS1) et l'hélice F (SRS2). En conséquence, la forme globale du site actif du CYP2C5 est assez différente de celle du P450BM-3, P450 bactérien le plus proche par alignement de séquence. Les divergences spatiales des éléments qui forment le site actif couplées à des divergences de séquence seraient à l'origine de la diversité fonctionnelle des P450.

Canal d'accès des substrats et canal du solvant

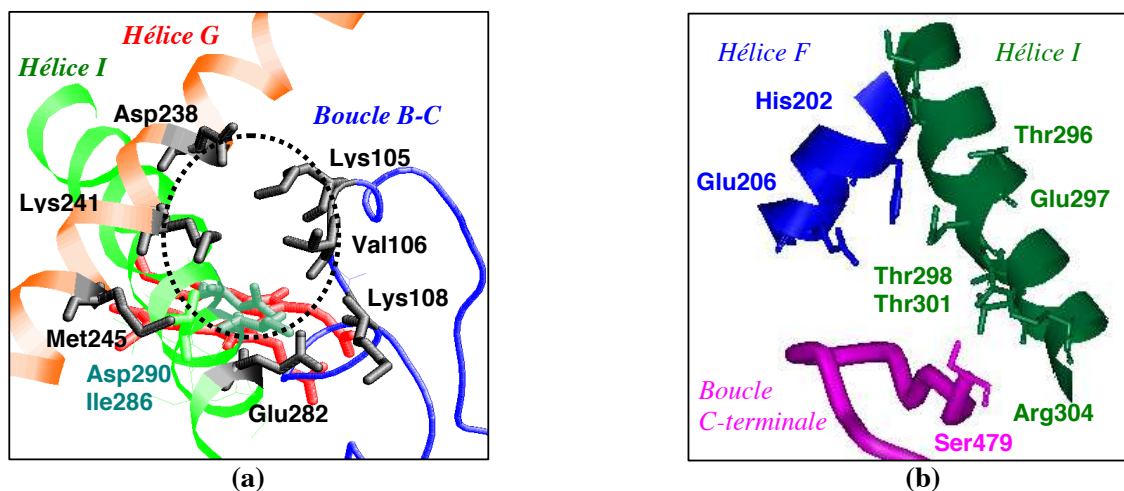


Figure 15 : Entrées du canal d'accès des substrats (a) et du canal d'accès du solvant (b) dans le CYP2C5/3LVdH

Le **canal d'accès des substrats**, analogue à celui du P450BM-3, aurait une entrée localisée dans la membrane du CYP2C5 mais bouchée par la boucle F-G plus longue que dans le P450 BM-3. Un autre canal d'accès est visible sous la boucle F-G, entre la boucle B-C et l'hélice G, le long de l'hélice I. L'entrée de ce canal est représenté en Figure 15.

Un **canal d'accès du solvant** est visible entre la boucle C-terminale, l'hélice I et l'hélice F. Il est bordé par de multiples résidus hydrophiles : Ser479, Thr298 et 301, Arg304, Glu206 et 297 et His202.

I.C.2.c Structures du CYP2C5/3LVdH en présence de substrat (DMZ ou diclofénac)

Les premières structures RX de complexes P450 de mammifère-substrat ont été publiées à la fin de ma thèse, grâce à une collaboration entre les équipes de E.F. Johnson et D. Mansuy. Une recherche systématique de nouveaux substrats du CYP2C5 a conduit à l'identification de deux substrats communs au CYP2C5 de lapin et aux CYP2C humains : le 4-méthyl-N-méthyl-N-(2-phényl-2H-pyrazol-3-yl) benzènesulfonamide (DMZ) et le diclofénac. Ces deux composés, de taille et de polarité distinctes, ont été co-cristallisés avec le CYP2C5/3LVdH (Wester et al., 2003a et 2003b). La comparaison des structures des deux complexes correspondants permet d'étudier la flexibilité conformationnelle du CYP2C5 et son importance dans la reconnaissance de substrats divers.

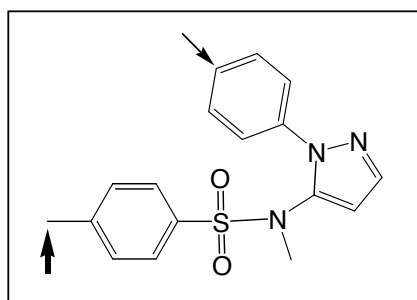


Figure 16 : Structure chimique et sites d'oxydation du DMZ. Les sites d'oxydation par les CYP2C sont indiqués par des flèches.

Structure du complexe 2C5/3LVdH-DMZ (résolution 2,3 Å) (Wester et al., 2003a)

• **fixation du substrat**

Le CYP2C5 catalyse l'hydroxylation majoritaire du groupement 4-méthyle du DMZ et l'hydroxylation très minoritaire du noyau phényle-pyrazole (Figure 16).

La structure RX montre que le DMZ est placé dans un canal hydrophobe qui s'ouvre au solvant entre la boucle B'-C et les hélices I et G (le canal dont l'entrée est représentée Figure 15). Il établit des contacts purement hydrophobes avec la protéine et peut se lier au fer selon deux orientations antiparallèles :

- une orientation productive qui place le groupe 4-méthyle à 4,4 Å du fer (AC1)
- une orientation non-productive qui place le phényle du noyau imidazole à 5,9 Å du fer (AC2)

Les résidus du CYP2C5 situés à moins de 5Å du DMZ appartiennent aux 6 SRS définis par Gotoh (Gotoh, 1992) (plus deux résidus hors SRS).

SRS	Résidus en contact avec le DMZ
SRS1	Leu103, Val106, Ala113, Phe114
SRS2	Leu201, Asn204, Val205
SRS3	Ala237, Ile240
SRS4	Ser289 (AC2), Asp290, Gly293, Ala294, Thr298
SRS5	Leu359, Leu363
SRS6	Phe473, Val474 (AC2)

Tableau 3 : Liste des résidus en contact avec le DMZ (dans ses deux orientations) et leur appartenance aux différents SRS.

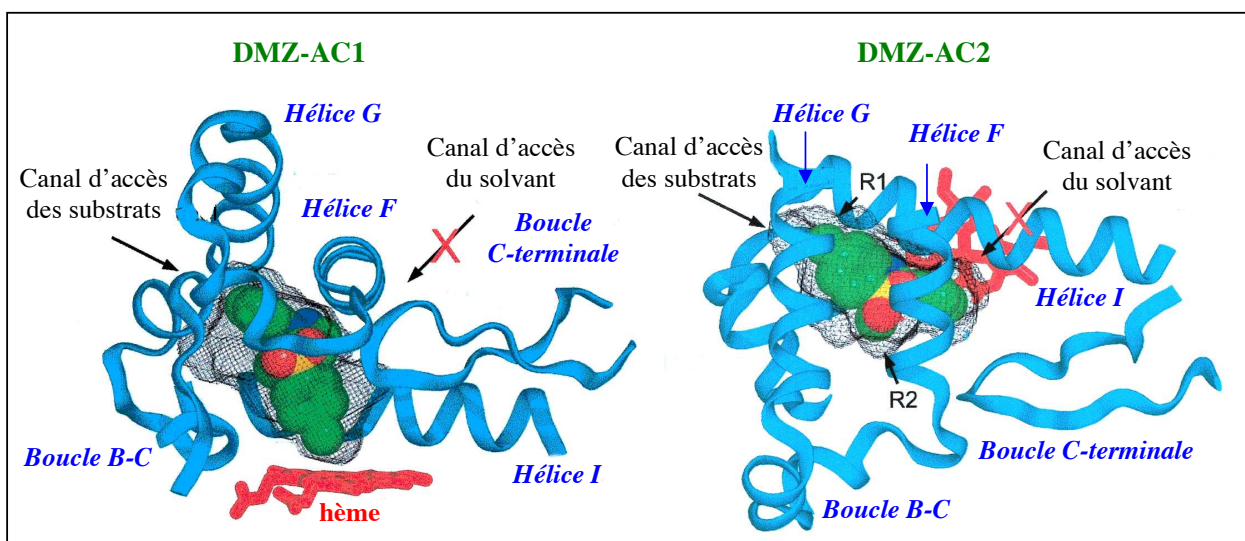


Figure 17 : Conformation fermée du CYP2C5/3LVdH en présence de DMZ d'après (Wester et al., 2003a) (les deux orientations du DMZ, AC1 et AC2, sont représentées).

- **comparaison avec la structure du CYP2C5/3LVdH sans substrat**

La structure du complexe 2C5/3LVdH-DMZ correspond à une conformation fermée de l'enzyme (Figure 17) comme observé dans la structure du P450cam avec substrat (Poulos et al., 1985). La protéine s'est contractée autour du DMZ et a restreint l'accès de l'eau au site actif grâce à un remodelage important des régions flexibles du site actif, du côté distal. Ainsi, les hélices F et G se sont translattées perpendiculairement à l'axe de l'hélice I. L'hélice I s'est légèrement courbée et une hélice B' est apparue entre les hélices B et C pour maximiser les contacts hydrophobes avec le substrat. Comme dans le P450cam, le mouvement de l'hélice F par rapport à l'hélice I ferme le canal d'accès du solvant (Figure 17), contrôlant ainsi l'accès des protons à l'hème pendant le cycle catalytique. Ces changements de conformation et de position de l'hélice F semblent donc une caractéristique générale de la fixation des substrats aux P450 procaryotes et eucaryotes. La boucle B-C serait quant à elle une porte d'entrée flexible contrôlant l'accès des substrats au site actif.

Structure du complexe 2C5/3LVdH-diclofénac (résolution 2,1 Å) (Wester et al., 2003b)

Le CYP2C5 de lapin catalyse la 4'-hydroxylation du diclofénac comme le CYP2C9 humain. Par contre, d'après des mesures de K_s à différents pH, le CYP2C5 reconnaît mieux la forme neutre COOH du diclofénac.

- **fixation du substrat**

D'après la structure RX, les carbones 3' et 4' du noyau dichlorophényle du substrat sont positionnés à 4,4 et 4,7 Å du fer de l'hème. Le diclofénac interagit avec les acides aminés répertoriés dans le Tableau 4. Ses cycles aromatiques forment en particulier des interactions de type π - π avec deux résidus du site actif : **Phe114** et **Phe473**. Le groupement carboxyle polaire du diclofénac forme des liaisons hydrogènes avec un réseau de molécules d'eau localisé dans la partie distale inoccupée du site actif et relié au squelette de la protéine (résidus **Asn204**, **Lys241**, **Ser289** et **Asp290**) par des liaisons hydrogènes (Figure 18).

SRS	Résidus en contact avec le diclofénac
SRS1	Val100, Leu103, Ala113, Phe114
SRS2	Asn204, Val205
SRS4	Asp290, Gly293, Ala294, Glu297, Thr298
SRS5	Leu359, Leu363
SRS6	Phe473, Val474

Tableau 4 : Liste des résidus situés à moins de 5 Å du diclofénac et leur appartenance aux différents SRS.

- **comparaison avec le complexe 2C5/3LVdH-DMZ**

Le complexe CYP2C5/3LVdH-diclofénac se distingue du complexe CYP2C5/3LVdH-DMZ par une hydratation plus importante du site actif et quelques modifications conformationnelles. Le réseau de molécules d'eau qui entoure la fonction acide carboxylique du diclofénac n'était pas présent dans le complexe CYP2C5/3LVdH-DMZ. Sur le plan

topologique, les principales différences sont constatées au niveau des portions flexibles du site actif (boucle B-C, hélice B', hélices F et G) qui s'adaptent à la taille et à l'hydratation du substrat. Le repositionnement marqué de l'hélice B' et de la boucle B'-C permet de maximiser les interactions de Van der Waals avec le diclofénac, substrat de plus petite taille, en tenant compte de l'hydratation de sa fonction polaire dans la partie distale du site actif. Des différences de position des hélices F et G sont également visibles alors que l'hème et l'hélice I ont une position conservée.

Le CYP2C5 stabilise donc des réseaux de molécules d'eau dans son site actif pour hydrater les fonctions polaires des substrats. Il fait également preuve d'une grande flexibilité conformationnelle pour accommoder des substrats de taille, de forme et de polarité distinctes.

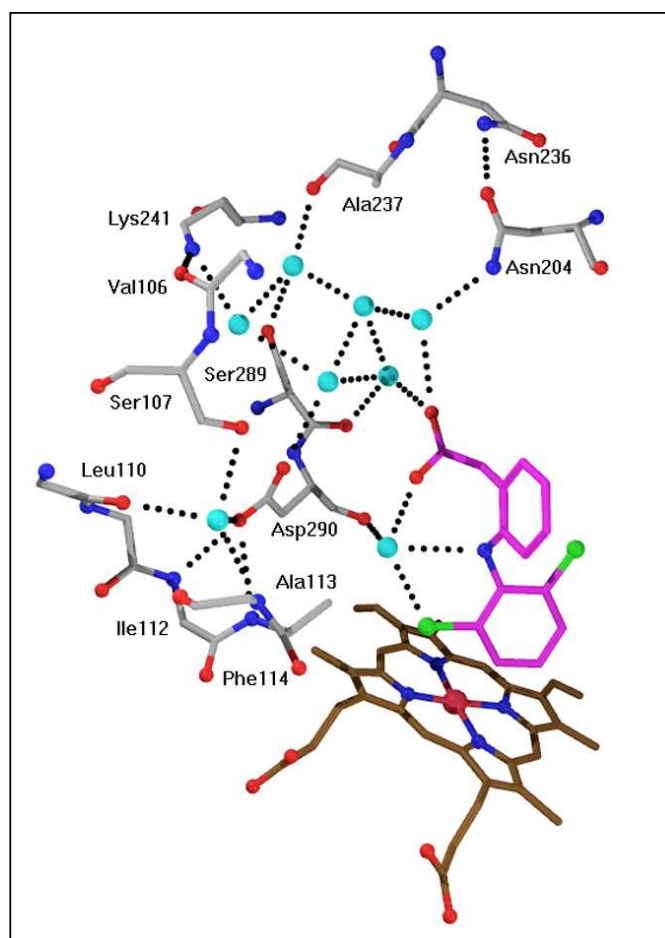


Figure 18 : Hydratation de la fonction carboxyle du diclofénac dans la partie distale du complexe CYP2C5/3LVdH-diclofénac d'après (Wester et al., 2003b). Les pointillés indiquent les liaisons hydrogènes établies entre le diclofénac, les molécules d'eau et certains résidus de l'apoprotéine.

Bilan : Les cytochromes P450 ont un repliement commun et un mode de fixation de l'hème conservé. Les principales différences spatiales sont observées dans la partie distale au niveau de régions variables très flexibles : les boucles B-C et F-G et les hélices F et G. Ces éléments mobiles contrôlent l'accès des substrats et des protons au site actif et s'adaptent à la taille, à la forme et la polarité des substrats pris en charge. Cette flexibilité conformationnelle couplée à la capacité d'hydratation des fonctions polaires des substrats explique sans doute l'aptitude des P450 à métaboliser des molécules très diverses.

I.D LES P450 HUMAINS

I.D.1 Les différentes isoformes et leur distribution tissulaire

Famille	Sous-familles	Principaux rôles biologiques
CYP1 (3 sous-familles, 3gènes, 1 pseudogène)	1A, 1B	Métabolisme des xénobiotiques
CYP2 (13 sous-familles, 16 gènes, 16 pseudogènes)	2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2J, 2R, 2S, 2T, 2U, 2W	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3 (1 sous-famille, 4 gènes, 2 pseudogènes)	3A	Métabolisme des xénobiotiques
CYP4 (5 sous-familles, 12 gènes, 10 pseudogènes)	4A, 4B, 4F, 4V, 4X	Métabolisme des acides gras ou de l'acide arachidonique
CYP5 (1 sous-famille, 1 gène)	5A	Biosynthèse du Thromboxane A2 impliquée dans l'agrégation plaquettaire
CYP7 (2 sous-familles, 2 gènes)	7A 7B	Biosynthèse des acides biliaires (7- α hydroxylase du noyau stéroïde) 7- α hydroxylase spécifique du cerveau
CYP8 (2 sous-familles, 2 gènes)	8A 8B	Biosynthèse de la prostacycline (contrecarre l'action du CYP5) Biosynthèse des acides biliaires
CYP11 (2 sous-familles, 3 gènes)	11A, 11B	Biosynthèse des stéroïdes (11 β -hydroxylase)
CYP17 (1 sous-famille, 1 gène)	-	Biosynthèse des stéroïdes (17- α hydroxylase)
CYP19 (1 sous-familles, 1 gène)	-	Biosynthèse des stéroïdes (aromatase)
CYP20 (1 sous-familles, 1 gène)	-	Fonction inconnue
CYP21 (1 sous-famille, 1 gène, 1 pseudogène)	-	Biosynthèse des stéroïdes (21-hydroxylase)
CYP24 (1 sous-famille, 1 gène)	-	Dégradation de la vitamine D (24-hydroxylase de la vitamine D3)
CYP26 (3 sous-familles, 3 gènes)	26A 26B et 26C	Hydroxylase de l'acide rétinolique (important pour le développement) Hydroxylases de l'acide rétinolique (probable)
CYP27 (3 sous-familles, 3 gènes)	27A 27B 27C	Biosynthèse des acides biliaires 1- α hydroxylase de la vitamine D3 Fonction inconnue
CYP39 (1 sous-familles, 1 gène)	-	7- α hydroxylase du 24-hydroxy-cholestérol
CYP46 (1 sous-familles, 1 gène)	-	24-hydroxylase du cholestérol
CYP51 (1 sous-familles, 1 gène, 3 pseudogènes)	-	Biosynthèse du cholestérol (14- α déméthylase du lanostérol)

Tableau 5 : Les différentes familles de P450 humains et leurs principaux rôles biologiques d'après (Nebert and Russell, 2002).

I.D.1.a Les familles de P450 humains

Le dernier recensement, fin 2002, (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), dénombrait 57 gènes de P450 humains répartis en 18 familles et 43 sous-familles (Tableau 5). Ce sont principalement les trois premières familles (CYP1, CYP2 et CYP3) qui assurent le métabolisme des xénobiotiques dans leur grande diversité. Les familles CYP1 et CYP3 comportent respectivement 3 membres (1A1, 1A2, 1B1) et 4 membres (3A4, 3A5, 3A7, 3A43). La famille CYP2 est la famille la plus large. Composée de 13 sous-familles (2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2J, 2R, 2S, 2T, 2U, 2W), elle regroupe le tiers des P450 humains. Des exemples de substrats identifiés pour ces trois premières familles sont indiqués ci-dessous (liste non exhaustive).

Famille	CYP	Exemples de substrats	Marqueur d'activité
CYP1	1A1	phénacétine, méthoxyrésorufine, hydrocarbures aromatiques polycycliques	O-dééthylation de la phénacétine (1A), O-déméthylation de la métoxyrésorufine (1A)
	1A2	phénacétine, caféine, antipyrine, (R)-warfarine, aflatoxine B1	N3-déméthylation de la caféine
	1B1	benzopyrène, amines aromatiques	
CYP2	2A6	coumarine, nicotine, N-itosodiéthylamine, aflatoxine B1	7-hydroxylation de la coumarine
	2B6	cyclophosphamide, diazepam, nitrosamines du tabac, testostérone	16 β -hydroxylation de la testostérone
	2C8	taxol, fluvastatine, amiodarone, troglitazone, amodiaquine, acide rétinoïque, acide arachidonique	6 α -hydroxylation du taxol
	2C9	acide tiénilique, diclofénac, phénytoïne, (S)-warfarine, tolbutamide, ibuprofène, losartan, acide arachidonique	4 ⁷ -hydroxylation du diclofénac
	2C18	verapamil, warfarin, (S)-méphénytoïne, AT3C	5-hydroxylation de l'AT3C (dérivé de l'acide tiénilique)
	2C19	(S)-méphénytoïne, oméprazole, diazepam	4 ⁷ -hydroxylation de la (S)-méphénytoïne
	2D6	débrisoquine, codéine, dextrométorphan, paracétamol, spartéine, bufuralol	1'-hydroxylation du bufuralol
	2E1	chlorzoxazone, éthanol, chloroforme	6-hydroxylation de la chlorzoxazone
	2J2	ébastine, acide linoléique, acide arachidonique	
CYP3	3A4	cyclosporine, érythromycine, quinidine, DHEA, testostérone, aflatoxine B1	6 β -hydroxylation de la testostérone
	3A5	vérapamil, aflatoxin B1, naphtalène, testostérone	
	3A7	codéine, aniline, cortisol, DHEA, testostérone	
	3A43	testostérone	

Tableau 6 : Les trois premières familles de CYP et leurs principaux substrats d'après (Lin and Lu, 1998) et la banque de données Gentest (Human Metabolism Database http://www.gentest.com/human_p450_database/index.htm).

Les P450 des autres familles sont plutôt impliqués dans la biosynthèse et le métabolisme de composés endogènes (stéroïdes, acides gras, vitamine D, cholestérol) (Figure 19). Ce sont généralement des P450 à spécificité de substrat assez restreinte. Par exemple, on retrouve chez l'homme le CYP51 qui catalyse la 14-hydroxylation du lanostérol, étape clé de la biosynthèse du cholestérol. Il s'agit du P450 le plus conservé entre les espèces : il pourrait être l'ancêtre de tous les P450.

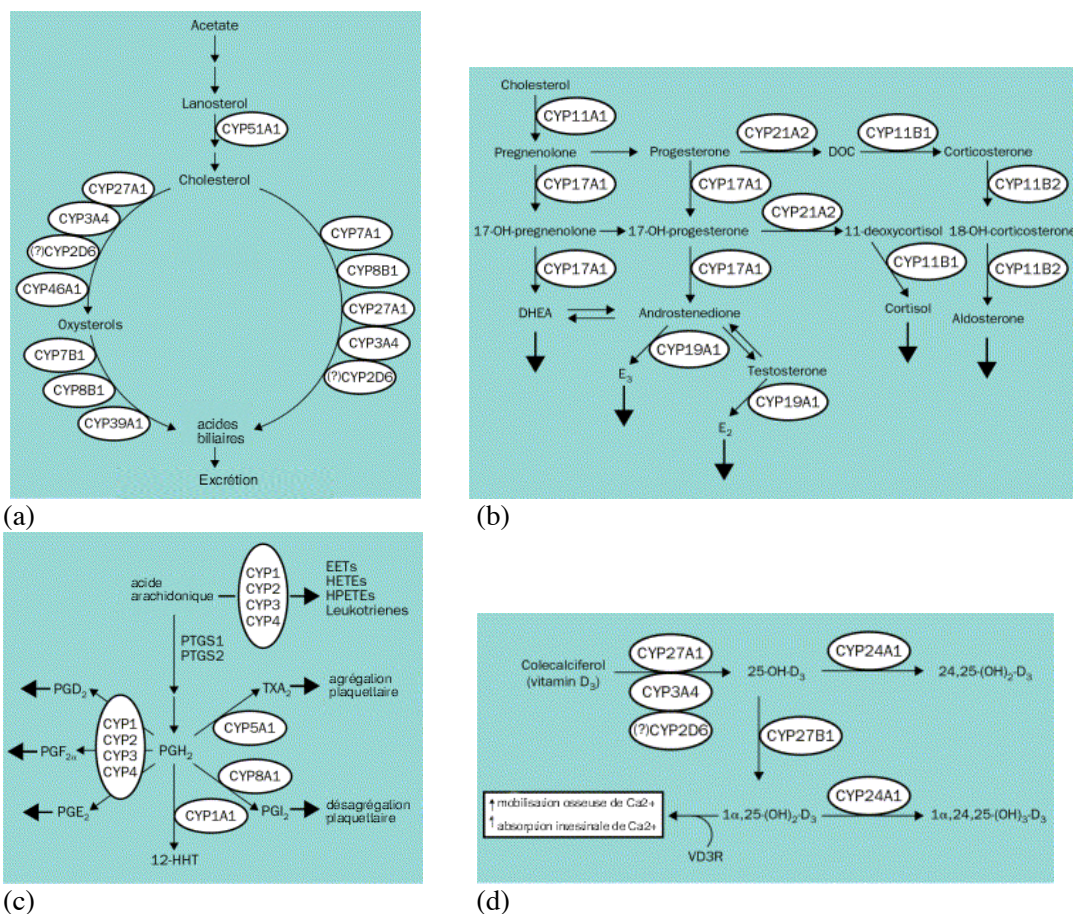


Figure 19 : Les cytochromes P450 humains impliqués dans le métabolisme de composés endogènes d'après (Nebert and Russell, 2002). (a) les P450 impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des acides biliaires (b) les P450 participant à la biosynthèse des hormones stéroïdes (c) les P450 impliqués dans la cascade de l'acide arachidonique (d) les P450 nécessaires à l'action de la vitamine D.

I.D.1.b Distribution tissulaire

Les P450 humains sont localisés majoritairement dans le foie, et dans une moindre mesure, dans d'autres sites extrahépatiques (intestin, reins, poumons, peau et cerveau) (Ding and Kaminsky, 2003). Si la plupart des P450 sont présents à la fois aux niveaux hépatique et extrahépatique, certaines isoformes s'expriment uniquement dans le foie comme le CYP1A2 et d'autres sont exclusivement extrahépatiques comme le CYP2J2.

La distribution tissulaire des P450 humains correspond à celle de leurs substrats (endobiotiques ou xénobiotiques). Les P450 impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes (CYP11A, 11B, 17 et 19) s'expriment surtout dans les tissus stéroïdogènes (cortex surrénal, gonades) tandis que les P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques se retrouvent dans les organes de filtrage du sang (foie, rein) et aux différents points d'entrée des xénobiotiques dans l'organisme (**appareil gastro-intestinal** : œsophage, estomac, intestin grêle, colon / **appareil respiratoire** : muqueuse nasale, trachée, poumon/ **peau**).

La plupart des sous-familles de CYP sont aussi présentes dans **le cerveau**, à une concentration 100 fois inférieure de celle du foie. Les P450 y joueraient le rôle de filtre au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Hedlund et al., 2001) mais cette contribution au métabolisme des xénobiotiques est toujours spéculative. De nouveaux P450 du cerveau,

récemment découverts, auraient des fonctions spécifiques telles que la régulation des niveaux endogènes d'agonistes des récepteurs GABA (CYP7B), la maintenance de l'homéostasie du cholestérol (CYP46) et l'élimination des rétinoïdes (CYP26).

Des P450 tels que les CYP2C8 et 2J2 ont également été détectés au niveau de l'endothélium du système cardiovasculaire (cœur, veines, artères, vaisseaux). Ils joueraient un rôle dans le contrôle du tonus et de la croissance vasculaires, sujet dont nous reparlerons plus loin (cf. I.D.3.b).

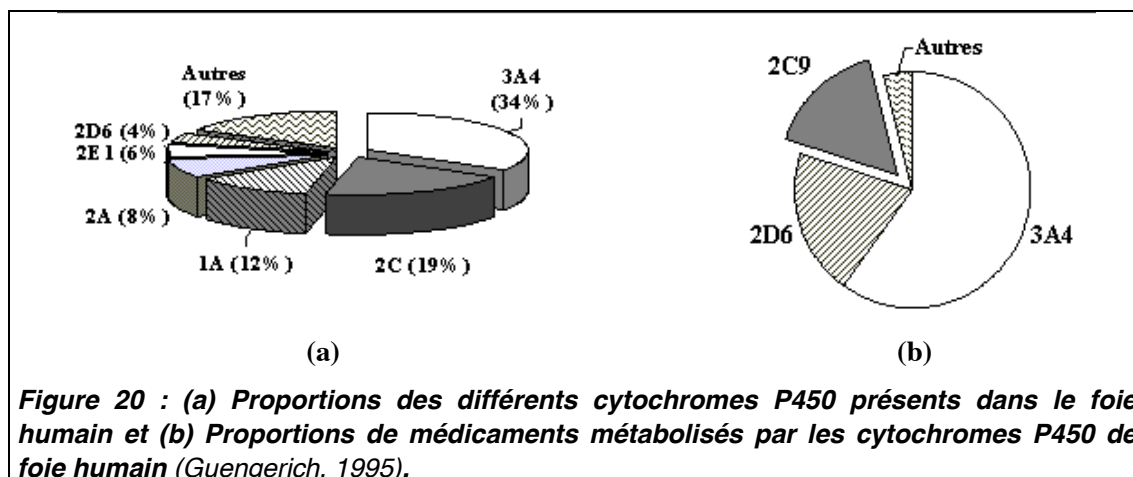
I.D.2 Importance pharmaco-toxicologique des P450 humains

Les cytochromes P450 ont un impact important en pharmaco-toxicologie :

- L'oxydation de médicaments par les cytochromes P450 conditionne **leur vitesse d'élimination**, et donc leur taux plasmatique et leur biodisponibilité.
- Dans certains cas, cette oxydation initialement destinée à la détoxification peut devenir une source de toxicité : les médicaments sont transformés en **métabolites réactifs, potentiellement toxiques** pour l'organisme.
- L'activité des P450 peut être modulée par des facteurs génétiques (polymorphismes) ou environnementaux (induction, inhibition). Les **variations de métabolisme** qui en résultent sont responsables d'**inefficacité thérapeutique (élimination accrue) ou de toxicité**, en particulier pour les médicaments à fenêtre thérapeutique étroite.

I.D.2.a *Le métabolisme des médicaments par les cytochromes P450 hépatiques*

La majorité des médicaments sont oxydés au niveau hépatique. Dans le foie, la quantité totale de P450 est très élevée (ie 18000 nmoles pour un foie de 1,5 kg; Kaminsky et al., 1984) et relativement constante. Les proportions moyennes des différentes isoformes sont indiquées Figure 20. En pratique, ces proportions subissent de grandes variations interindividuelles, induites par la génétique (polymorphisme) et l'environnement (inducteurs) (voir le paragraphe suivant).



Ces P450 hépatiques ont un rôle prépondérant dans le métabolisme des médicaments (Figure 20). Ainsi, plus de 90% des médicaments sont métabolisés par six cytochromes P450 hépatiques : les CYP3A4, 2D6, 2C9, 2E1, 1A2 et 2C19. Le CYP3A4 métabolise plus de 50%

des médicaments à lui seul (Guengerich, 1995). Ce P450, le plus abondant du foie, prend en charge des substrats de taille et de structures très variées. Le CYP2D6, assez peu exprimé dans le foie, oxyde pourtant un grand nombre de médicaments de classes thérapeutiques variées : des antiarythmiques (ex : la propafénone), des antidépresseurs (ex : fluoxétine /Prozac), des antipsychotiques (ex : clorpromazine), des bêta-bloquants (ex : propranolol), des analgésiques (ex : codéine) et des antihypertenseurs (débrisoquine, dextrometorphan). Les CYP2C occupe la troisième position par ordre d'importance dans le métabolisme des médicaments, dans l'état actuel de nos connaissances.

1.D.2.b Production de métabolites réactifs toxiques (Park et al., 1995)

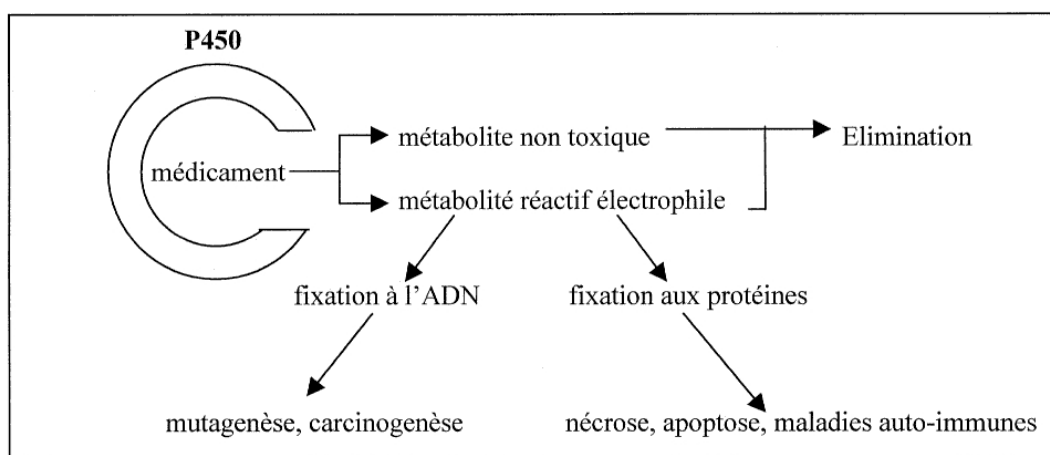


Figure 21 : Les métabolites réactifs produits par les cytochromes P450 et leur devenir cellulaire.

Certaines molécules peuvent être transformées par les P450 en métabolites réactifs électrophiles capables d'alkyler les macromolécules cellulaires (ADN ou protéines). S'ils ne sont pas réparés, les adduits à l'ADN, sont à l'origine de phénomènes de mutagenèse et de carcinogénèse (Harris, 1989) et les adduits aux protéines cellulaires provoquent des processus de nécrose (Park et al., 1995) ou d'apoptose (Haouzi et al., 2000) ou des maladies auto-immunes (Park and Kitteringham, 1990). Tout candidat médicament doit donc subir une batterie de tests évaluant ses propriétés génotoxiques et cytotoxiques. Ces tests ne sont pas toujours infaillibles : de nombreux médicaments comme l'acide tiénilique ont dû être retirés du marché à cause d'une activation métabolique par les cytochromes P450.

Exemple de l'hépatite auto-immune induite par l'acide tiénilique

L'acide tiénilique est un diurétique uricosurique commercialisé en 1976 sous le nom de Diflurex®. Sa vente fut suspendue au début des années 90 car il provoquait dans 1 cas sur 10000 une hépatite médicamenteuse de type immuno-allergique, parfois mortelle (Homborg et al., 1984). Cette pathologie auto-immune est caractérisée par la présence d'anticorps circulants, dirigés contre les microsomes de foie et de rein et spécifiques du CYP2C9 (Beaune et al., 1987). Des recherches ont permis d'établir le mécanisme d'inactivation suicide du CYP2C9 au cours de la métabolisation de l'acide tiénilique (Jean et al., 1996; Lopez-Garcia et al., 1994). L'acide tiénilique est oxydé par le CYP2C9 en un intermédiaire réactif très électrophile : un sulfoxyde (Lopez-Garcia et al., 1994). Ce dernier pourrait alors évoluer selon trois voies (Figure 22). De façon très minoritaire, il diffuserait en dehors du site actif pour

réagir avec des protéines microsomaes (fixation covalente non spécifique). Dans le site actif, il pourrait :

- être inactivé par addition d'une molécule d'eau formant le produit 5-hydroxylé
- ou se fixer de façon covalente à un résidu nucléophile du cytochrome P450, ceci inactivant l'enzyme irréversiblement (Lopez-Garcia et al., 1994). Le P450 alkylé serait alors externalisé sur la face externe de la membrane plasmique. Formant un nouvel antigène, il initierait la réponse immunitaire (Beaune et al., 1987; Beaune et al., 1994).

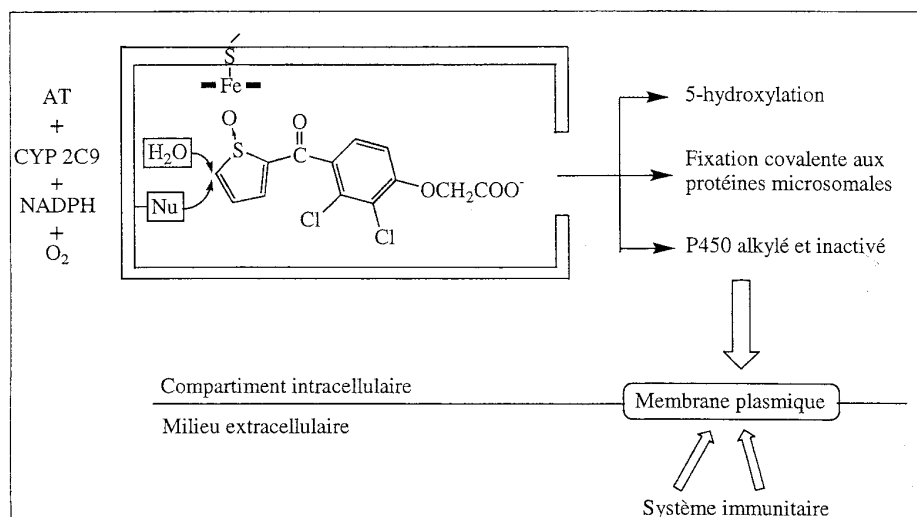


Figure 22 : Mécanisme proposé pour le métabolisme de l'acide tiénilique (AT), l'inactivation suicide du CYP2C9 et le début du phénomène hépatotoxique (d'après Lopez-Garcia et al., 1994 et Beaune et al., 1994).

I.D.2.c Les variations interindividuelles du métabolisme des médicaments et leurs conséquences pharmaco-toxicologiques

Des facteurs endogènes (polymorphisme génétique) ou exogènes (induction, inhibition) tendent à moduler l'activité et le niveau d'expression des P450. Or, les variations de métabolisme qui en résultent peuvent avoir des conséquences pharmaco-toxicologiques importantes.

Polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique est l'une des causes principales des variations interindividuelles de l'effet des médicaments. Un polymorphisme génétique désigne une variation allélique présente à une fréquence d'au moins 1% dans une population. Ces modifications génétiques génèrent des enzymes absentes ou inactives, des P450 à activité catalytique diminuée ou altérée ou des P450 à activité accrue. Un polymorphisme divise une population en au moins deux phénotypes en fonction de la capacité métabolique des individus envers un médicament donné (métaboliseurs lents ou rapides). Si le médicament est inactivé par le P450, le phénotype métaboliseur lent se traduit par une amplification souvent néfaste de l'effet pharmacologique du médicament et des effets toxiques associés. Chez un métaboliseur rapide, le médicament est éliminé plus rapidement ce qui diminue son efficacité thérapeutique. Prenons l'exemple du CYP 2D6, P450 polymorphique le mieux étudié. De nombreuses variations alléliques ont été identifiées. Elles définissent trois phénotypes pour le

métabolisme de l'antihypertenseur débrisoquine : les métaboliseurs lents (homozygotes mutés), les métaboliseurs rapides (hétérozygotes ou homozygotes sauvages) et les métaboliseurs ultrarapides qui possèdent plusieurs copies fonctionnelles du P450. Chez les métaboliseurs lents, la débrisoquine administrée à dose normale peut créer des accidents d'hypotension.

Les différents polymorphismes associés aux P450 et leur nomenclature sont répertoriés sur internet (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>). Quelques exemples sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Enzyme	Variants alléliques	Modifications génétiques	Conséquences
CYP2A6	CYP2A6*2 CYP2A6del	Mutant L160H Délétion du gène	Enzyme inactive Pas d'enzyme
CYP2C8	CYP2C8*2 CYP2C8*3	Mutant I269F Double Mutant R139K, K399R	Perte d'efficacité catalytique Perte d'efficacité catalytique
CYP2C9	CYP2C9*2 CYP2C9*3 CYP2C9*4 CYP2C9*5 CYP2C9*6	Mutant R144C Mutant I359L Mutant I359T Mutant D360E Codon stop prématuré	Diminution de l'affinité envers la réductase Perte d'efficacité catalytique Perte d'efficacité catalytique Perte d'efficacité catalytique Enzyme tronquée inactive
CYP2C19	CYP 2C19*2 CYP 2C19*2	Site aberrant de coupure Codon stop prématuré	Pas d'enzyme Pas d'enzyme
CYP 2D6	CYP 2D6*2xN CYP 2D6*4 CYP 2D6*5 CYP 2D6*10 CYP 2D6*17	Plusieurs copies du gène Défaut d'épissage Délétion du gène Mutants P34S, S486T Triple Mutant T107I, R296C, S486T	Augmentation de l'activité Enzyme inactive Pas d'enzyme Enzyme instable Réduction de l'affinité pour des substrats

Tableau 7 : Exemples de polymorphismes génétiques de cytochromes P450 humains d'après (Ingelman-Sundberg et al., 1999).

Interactions médicamenteuses : conséquences pharmaco-toxicologiques d'une induction ou d'une inhibition de P450.

Les inhibiteurs ou inducteurs de P450 (médicament ou xénobiotique) modulent l'activité des P450 responsables du métabolisme des médicaments. Les inducteurs sont des molécules qui augmentent la synthèse des P450 en agissant soit sur la transcription soit sur la stabilisation de l'ARNm ou de la protéine. L'hydrocarbure polychloré Aroclor induit tous les P450 mais il s'agit d'une exception. En général, un inducteur est relativement spécifique : il entraîne la surexpression de quelques CYP sans affecter les autres. On distingue 5 classes d'inducteurs selon leurs caractéristiques structurales et les sous-familles de P450 induites.

P450 humains induits	Classe d'inducteurs	Exemples
CYP 1A	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	3-méthylcholanthrène, benzo(a)pyrène, dioxine
CYP 2C, 3A	Phénobarbital et barbituriques	
CYP 4A	Agents hypolipémiants	Clofibrate
CYP 3A	corticostéroïdes Antibiotiques macrolides	Dexaméthasone Triacétyloleandomycine
CYP 2E1	Ethanol, Isoniazide	

Tableau 8 : Principaux inducteurs des cytochromes P450 (Guengerich, 1992).

Les inhibiteurs de P450 peuvent être classés en deux catégories principales : les inhibiteurs réversibles ou irréversibles.

Les inhibiteurs réversibles sont qualifiés également d'inhibiteurs compétitifs. Ces molécules de bonne affinité pour le P450 occupent le site actif au même titre qu'un substrat (fixation sur le fer ou les acides aminés environnants). Elles entrent, de fait, en compétition avec les substrats et inhibent leur métabolisme.

Les inhibiteurs irréversibles sont des molécules qui se fixent de manière covalente sur le P450 après un acte catalytique, bloquant ainsi son fonctionnement de façon irréversible. Les inhibiteurs irréversibles ont deux sites de fixation possibles : l'hème ou l'apoprotéine.

• **inhibiteurs irréversibles se fixant sur l'hème :**

- certaines amines comme la troléandomycine (TAO) ou l'érythromycine sont métabolisées en nitrosoalcane, capables de se fixer de façon quasi-irréversible au fer (Delaforge et al., 1983; Mansuy et al., 1977; Watkins et al., 1986; Wrighton et al., 1985); Le complexe Fe^{II}-nitrosoalcane, très stable, a une absorption caractéristique à 455 nm.
- des composés possédant un groupement méthylènedioxyarène forment un complexe fer-carbène (Mansuy and Ullrich, 1975);
- les composés comportant une double ou triple liaison terminale, une dihydropyridine ou une dihydroquinoline sont capables de N-alkyler l'hème (Correia et al., 1981).

• **Inhibiteurs irréversibles se fixant sur l'apoprotéine :** on peut citer comme exemple d'inhibiteurs de ce type l'acide tiénilique (chap I.D.2.b) (Lopez-Garcia et al., 1994), le chloramphénicol (Halpert et al., 1983), des xanthates (Yanev et al., 1999) et des alcynes terminaux (Roberts et al., 1993).

Les inhibiteurs qui alkylent l'hème ou l'apoprotéine sont souvent appelés « **substrats suicides** » (« mechanism-based inhibitors ») car ce sont des substrats qui inactivent l'enzyme responsable de leur métabolisme, après avoir été transformés.

CYP	Exemples d'inhibiteurs
1A	<i>α</i> -naphthoflavone
2A	diéthylthiocarbamate
2B6	<i>Xanthates</i>
2C8	Quercétine
2C9	Sulfaphénazole, <i>acide tiénilique</i>
2C19	<i>Ticlopidine</i>
2D6	quinine
2E1	4-méthylpyrazole
3A	<i>TAO, gestodène</i>

Tableau 9 : Exemples d'inhibiteurs des principales familles de CYP hépatiques d'après (Lin and Lu, 1998). Les inhibiteurs irréversibles sont indiqués en italique.

L'induction ou l'inhibition de P450 a des conséquences sur la pharmacocinétique des médicaments. Les inducteurs de P450, en surexprimant l'enzyme, accélèrent l'élimination de médicaments coadministrés et diminuent leur effet thérapeutique. A l'inverse, les inhibiteurs de P450 freinent l'élimination des médicaments substrats ce qui induit en général des effets toxiques. On parle d'interactions médicamenteuses si ces inhibiteurs ou inducteurs sont eux-mêmes des médicaments. Les interactions médicamenteuses sont une cause importante de mortalité chez les patients hospitalisés.

Prenons l'exemple de deux interactions médicamenteuses avec la cyclosporine, médicament métabolisé par le CYP3A4. La cyclosporine est un immunosuppresseur administré dans le cadre de greffes, à fenêtre thérapeutique étroite. La prise de rifampicine, un inducteur de 3A4, accélère l'élimination de la cyclosporine par ce P450. Ceci conduit à une diminution de la biodisponibilité de l'immunosuppresseur et donc à un rejet de la greffe (Mallat, 1992). A l'inverse, la prise de kétoconazole (inhibiteur de CYP3A) inhibe le métabolisme de la cyclosporine. Il en résulte une augmentation de sa concentration circulante avec risques des toxicité rénale et neurologique (Gomez et al., 1995).

I.D.2.d Utilisation des P450 à des fins thérapeutiques

Dans certains cas, les phénomènes d'activation et d'interaction médicamenteuses précédemment décrits peuvent être exploités à des fins thérapeutiques.

Nous pouvons citer l'exemple de l'interaction médicamenteuse entre le ritonavir et l'indinavir, deux inhibiteurs de protéase utilisés en synergie comme traitement anti-HIV (Hsu et al., 1998). Ces deux molécules sont métabolisées *in vivo* par la même enzyme, le CYP3A4. Le ritonavir a la particularité d'être un substrat suicide de cette enzyme (Koudriakova et al., 1998). En inactivant le CYP 3A4, il inhibe le métabolisme de l'indinavir par ce P450, prolongeant ainsi la durée de vie et les effets thérapeutiques de ce médicament.

Enfin, l'activation de prodrogues par des P450 pourraient être utilisée en thérapie génique pour le traitement de certains cancers (Jounaidi, 2002; Waxman et al., 1999).

*Etant donné le rôle critique des monoxygénases à P450 dans la balance détoxification/bioactivation, l'étude de ces enzymes présente un grand intérêt. Dans l'industrie pharmaceutique, l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament impose de connaître les voies métaboliques de la molécule active ainsi que la pharmacologie et la toxicologie de ses métabolites. Dans ce cadre, l'examen du métabolisme par les P450 occupe une place importante. Les test *in vivo* réalisés sur animaux sont longs, coûteux et éthiquement controversés. Des tests *in vitro* standardisés ont donc été développés. Ils sont réalisés actuellement sur cultures primaires d'hépatocytes, sur microsomes ou sur enzymes recombinantes produites à partir de systèmes d'expression hétérologue (cf. Annexe A).*

Afin d'optimiser le processus de développement des médicaments, les industriels souhaiteraient prédire ce métabolisme bien plus tôt, à partir de la structure des molécules. Des efforts sont donc faits pour essayer de rationaliser les spécificités de substrats de ces enzymes. Au laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement à la sous-famille 2C.

I.D.3 La sous-famille 2C

I.D.3.a Les différentes isoformes et leur distribution tissulaire

Les CYP2C ont été les premières isoformes purifiées à partir du foie humain (Beaune et al., 1979; Wang et al., 1983). Quatre membres de cette sous-famille ont été identifiés chez l'homme : les CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19, de masses moléculaires respectives 50, 52, 48 et 48 kDa (Goldstein and de Morais, 1994). Ces isoformes de 490 acides aminés présentent une homologie de séquence de plus de 80% qui a rendu difficile leur purification individuelle et la détermination de leurs rôles respectifs. Elles forment une sous-famille, considérée comme une des plus complexes, impliquant 7 gènes et plusieurs variants alléliques (Ged et al., 1988). 15 variants alléliques sont connus pour le CYP2C19, 6 pour le CYP2C9 et 5 pour le CYP2C8.

Les membres de la sous-famille 2C sont des enzymes constitutives (Guengerich, 1995) qui peuvent être induites par des barbituriques et la rifampicine (Chang et al., 1997; Heinemeyer et al., 1987; Morel et al., 1990; Zhou et al., 1990).

Ils sont localisés principalement dans le foie où ils représentent 19% des P450 hépatiques (Goldstein and de Morais, 1994). Cependant, de faibles concentrations de CYP2C9 ont été détectées dans l'intestin grêle (de Waziers et al., 1990; Lapple et al., 2003), les reins (Klose et al., 1999) et le colon (Zhang et al., 1999). Le CYP2C19 est également présent dans l'intestin grêle (Zhang et al., 1999; Lapple et al. 2003). Le CYP2C8 a une expression extrahépatique dans les poumons (Mace et al., 1998 ; Ding and Kaminsky, 2003), le cerveau (Klose et al., 1999; McFayden et al., 1998) et le système cardiovasculaire (Zeldin et al., 1995; Lin et al., 1996). Enfin l'ARNm du CYP2C18 a été mis en évidence au niveau de la peau (Zaphiropoulos, 1997; Yengi et al., 2003), des reins (Klose et al., 1999) et du poumon (Mace et al., 1998).

Dans le foie, deux isoformes sont prépondérantes : le CYP2C9 et le CYP2C8 pour lequel on observe d'importantes variations interindividuelles (Romkes et al., 1991; Lapple et al., 2003). Des quantités plus faibles de CYP 2C19 sont également présentes alors que le CYP 2C18, très minoritaire, est à peine exprimé (Furuya et al., 1991; Richardson et al., 1997; Lapple et al., 2003).

I.D.3.b Importance physiologique des CYP2C

• Métabolisme des médicaments

Les CYP2C ont un rôle significatif sur le plan pharmacologique puisqu'ils métabolisent 15% des médicaments courants. Leurs polymorphismes sont la cause de variations de ce métabolisme potentiellement dangereuses. Le CYP2C9 est l'isoforme la plus abondante au niveau hépatique et celle qui métabolise le plus grand nombre de médicaments (cf. plus loin). Le CYP2C19 a été très étudié en raison de son polymorphisme génétique, cause d'accidents thérapeutiques. Jusqu'à une période récente, on pensait que le CYP2C8 avait un rôle physiologique limité. Toutefois, la découverte de nouveaux substrats suggère que le rôle du CYP2C8 dans le métabolisme des médicaments aurait été sous-estimé. D'autre part, des articles récents dans le domaine cardiovasculaire suscitent un regain d'intérêt pour cette isoforme : le CYP 2C8 est exprimé dans les vaisseaux sanguins où il interviendrait dans la régulation de la vasodilatation via le métabolisme de l'acide arachidonique.

• Implication du CYP2C8 dans la régulation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium

Pour comprendre la notion de vasodilatation, il est d'abord préférable de décrire la structure tubulaire d'un vaisseau sanguin. Un vaisseau sanguin est constitué de trois couches :

- une couche interne (côté sanguin) de cellules endothéliales
- une couche médiane composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques
- une enveloppe externe de tissu conjonctif comprenant des extrémités nerveuses.

Le tonus vasculaire est défini par l'état de contraction des cellules musculaires lisses. Il est régulé localement par plusieurs facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs: des neurotransmetteurs, les hormones vasoactives circulant dans le sang et des substances dérivées de l'endothélium.

La vasodilatation dépendante de l'endothélium

En réponse à divers stimuli hormonaux (la bradykinine, l'acétylcholine ou la substance P (Campbell and Harder, 1999)) ou physiques (torsion des vaisseaux (Fisslthaler et al., 2001)), les cellules endothéliales synthétisent et relarguent des composés vasoactifs. Ces derniers diffusent jusqu'à leur cellules cibles : les cellules musculaires lisses vasculaires.

La vasodilatation dépendante de l'endothélium est induite principalement par trois molécules : la prostacycline **PGI₂**, **NO**, et l'**EDHF**. La prostacycline (PGI₂) a été découverte en 1976. Il s'agit d'un dérivé de l'acide arachidonique produit par les cycloxygénases (Moncada et al., 1976). L'EDRF (endothelium-derived relaxing factor) mis en évidence en 1980 (Furchgott and Zawadzki, 1980), fut identifié comme étant le monoxyde d'azote NO en 1987 (Palmer et al., 1987). Il est synthétisé par des enzymes appelées NO synthases.

Enfin, il existe un troisième médiateur distinct de NO et PGI₂ dont les effets vasodilatants sont observés depuis des années. Associé à une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, il est appelé EDHF ie. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. Une vasodilatation de type EDHF a été détectée chez plusieurs espèces : le porc (Popp et al., 1996), le rat (Fulton et al., 1998), l'homme (Miura and Gutterman, 1998), ou le chien (Tanaka et al., 2003) dans les artères coronaires, ou les microvaisseaux coronariens. L'importance relative de la voie EDHF diminue avec la taille du vaisseau à l'inverse de la voie NO (Shimokawa et al., 1996). En cas de présence des deux voies, NO inhibe la voie EDHF (Bauersachs et al., 1994), qui interviendrait alors comme voie de secours en cas de dysfonctionnement de la production de NO.

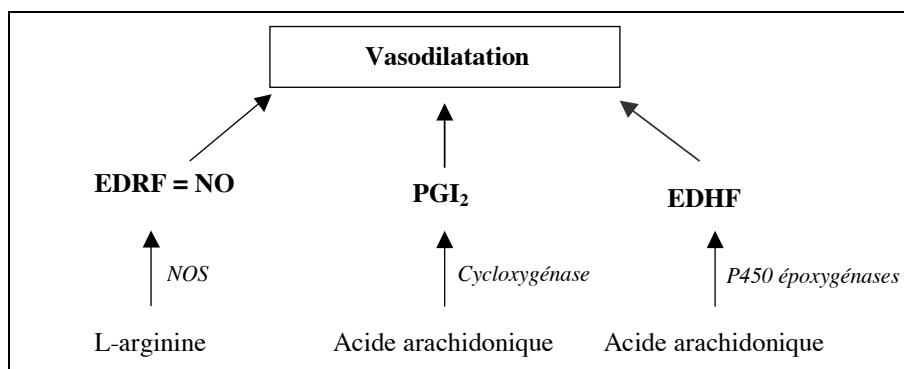


Figure 23 : Les trois voies de vasodilatation dépendante de l'endothélium.

Moins bien caractérisé que NO et PGI₂, l'EDHF a une nature chimique et un mode d'action encore imprécis. De nombreuses études lui sont consacrées à l'heure actuelle.

Nature chimique de l'EDHF : un dérivé de l'acide arachidonique

Sigle	Nom	Références
EET	acides époxyeicosatriénoïques (14,15 EET, 11,12 EET, 8,9 EET et 5,6 EET)	Campbell et al., 1996; Fulton et al.; 1998, Quilley et al., 1997; Archer et al., 2003
DiHETE	acides dihydroxyeicosatriénoïques	Henrich et al., 1990
HPETE	acides hydroperoxyeicosatriénoïques	D'Alaret et al., 1987; Van Diest et al., 1991; Campbell and Harder, 1999 ; Miller et al., 2003
THETA	acides trihydroxyeicosatriénoïques	Pfister et al., 1998; Campbell et al., 2003
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène	Thomas and Ramwell, 1986; Matoba and Shimokawa, 2003; Matoba et al., 2003

Tableau 10 : Les EDHFs identifiés à l'heure actuelle : sigle, nom, références bibliographiques.

Des expériences ont montré qu'il existait non pas un mais plusieurs EDHFs selon l'espèce et le type de vaisseau; ce sont principalement des métabolites de l'acide arachidonique (les EET et leurs produits d'hydrolyse DiHETE, les HPETE, les THETA) mais aussi le peroxyde d'hydrogène (Tableau 10). A l'heure actuelle seuls les EETs et H₂O₂ ont été identifiés comme EDHF chez l'homme.

Les cytochromes P450 cardiovasculaires : possible EDHF synthèses

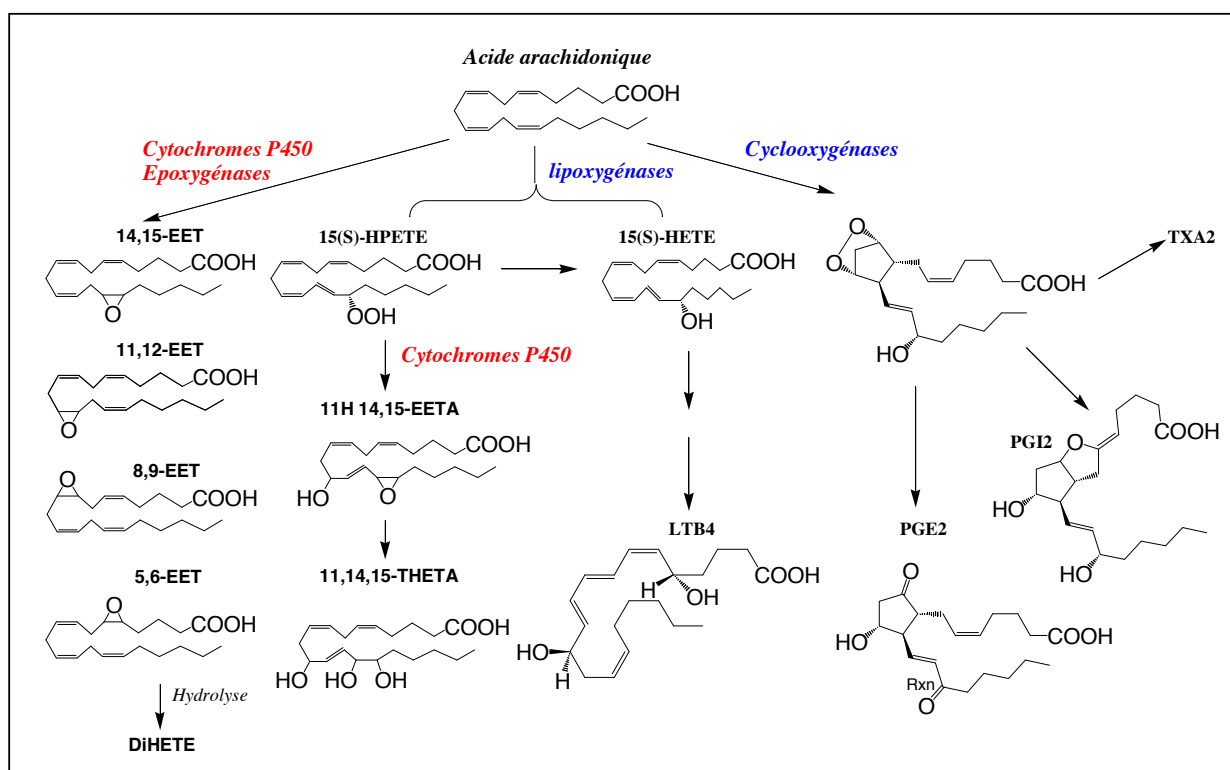


Figure 24 : La cascade de l'acide arachidonique.

L'acide arachidonique est métabolisé par différentes enzymes : les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les cytochromes P450 des familles 1 à 4 (Figure 24). La synthèse des EETs est assurée principalement par les P450 époxygénases de la famille 2. Deux isoformes, le CYP2C8 et le CYP2J2, sont exprimées par les cellules endothéliales vasculaires humaines et seraient de possibles EDHF synthèses. La contribution de chaque enzyme dépendrait de leur abondance tissulaire et de leur efficacité catalytique. Le CYP2J2 est particulièrement abondant dans le cœur où il serait la principale enzyme impliquée dans l'époxydation de l'acide arachidonique (Scarborough et al., 1999). Quant au CYP2C8, il serait prédominant dans la vascularisation rénale (Zeldin et al., 1995), les veines (Lin et al., 1996) et les artères (Fisslthaler et al., 1999). Plusieurs expériences semblent indiquer que **le CYP2C8 serait une EDHF synthase, du moins dans certains vaisseaux** (les artères coronaires de porc (Fisslthaler et al., 1999), les artères de hamster (Bolz et al., 2000) et les veines ombilicales humaines (Fisslthaler et al., 2001)).

I.D.3.c Etudes structure/activité des CYP2C

Malgré une forte homologie de séquences, les membres de la sous-famille 2C ont des spécificités de substrats différentes. Plusieurs équipes ont cherché à identifier les déterminants structuraux à l'origine de ces différences, en étudiant la topologie de leurs sites actifs.

En l'absence de structure RX, la topologie des sites actifs est étudiée par des méthodes indirectes *in silico* (pharmacophore des substrats, modélisation moléculaire des sites actifs) et *in vitro* (recherche de substrats et inhibiteurs spécifiques, sondes chimiques, construction de chimères, mutagenèse dirigée) (Szklarz and Halpert, 1997).

Les méthodes *in silico* permettent la prédiction des interactions entre l'enzyme et les molécules reconnues. La fiabilité de ces prédictions dépendent de la qualité des modèles, c'est pourquoi il est important de les relier à des données expérimentales. Les acides aminés responsables des spécificités de substrats peuvent ainsi être identifiés par différentes méthodes *in vitro*:

- **marquage par sondes chimiques** : certains acides aminés du site actif sont accessibles et suffisamment réactifs dans des conditions spécifiques pour lier un substrat radiomarqué de façon covalente (Means and Feeney, 1990).
- **construction de chimères de P450**: les chimères sont des protéines artificielles dans lesquelles une partie d'un P450 a été remplacée par une région analogue d'un P450 apparenté. Elles permettent d'identifier les zones minimales responsables des spécificités de substrats. Ces zones sont alors mutées pour identifier les résidus importants.
- **mutagenèse dirigée** : Il s'agit de la méthode la plus utilisée pour l'étude des relations structure/activité (Domanski and Halpert, 2001). La mutagenèse dirigée a par exemple permis de confirmer l'importance des différents SRS prédits par Gotoh dans la reconnaissance spécifique de molécules par différents P450 (cf Annexe C). Deux stratégies sont employées : la mutagenèse systématique des résidus qui diffèrent entre deux P450 ou la mutagenèse dirigée plus « rationnelle » des résidus identifiés à partir de modèles moléculaires ou de résultats sur des chimères (mutants de chimères).

Ces différentes approches ont été employées au laboratoire pour l'étude topologique des CYP2C. Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à deux isoformes : les CYP2C9 et CYP2C8.

I.D.4 Etudes des spécificités de substrats des CYP2C9 et 2C8 : état de l'art au début de ma thèse

I.D.4.a Substrats et inhibiteurs connus

Le CYP2C9 est le principal P450 impliqué dans le métabolisme de l'acide tiénilique (diurétique, $K_m=5-6\mu M$) (Jean et al., 1996), (Lopez-Garcia et al., 1993), du tolbutamide (antidiabétique, $K_m=130\mu M$) (Miners et al., 1988) et de la phénytoïne (antiépileptique, $K_m=45\mu M$) (Veronese et al., 1991). Il catalyse également l'hydroxylation régiosélective de la (S)-warfarine ($K_m=4\mu M$), en positions 6 et 7 (Sadeque et al., 1992).

Le CYP2C9 intervient aussi dans l'oxydation de nombreux anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que le diclofénac ($K_m=16\mu M$) (Mancy et al., 1999), des membres de la classe des oxicams (ténoxicam, péroxicam, lornoxicam) (Zhao et al., 1992; Bonnabry et al., 1996) ou des molécules de type « profène » comme l'ibuprofène (Leemann et al., 1993), le

flurbiprofène (Tracy et al., 1995) ou le suprofène (Mancy 1996) etc.... Enfin, le CYP2C9 métabolise un composé endogène : l'acide arachidonique (Daikh et al., 1994).

Deux puissants inhibiteurs compétitifs de cette isoforme ont été identifiés :

- Le sulfaphénazole ($K_i=0,3\mu\text{M}$) (Mancy et al., 1996), sulfamide utilisé comme agent antibactérien avant la découverte de la pénicilline et des antibiotiques.
- La benzbromarone ($K_i<10\text{ nM}$) (Takahashi et al., 1999), agent uricosurique également substrat de cette enzyme (résultats non publiés PM. Dansette).

Un inhibiteur spécifique de type substrat suicide est également connu : il s'agit de l'acide tiénilique (constante d'inactivation $KI=4,3\mu\text{M}$; (Lopez-Garcia et al., 1994).

Des études réalisées au laboratoire sur les CYP2C humains, ont permis de démontrer la sélectivité du CYP2C9 envers trois de ces ligands : l'acide tiénilique, le diclofénac et le sulfaphénazole (Tableau 11 , Tableau 12).

CYP	5-hydroxylation de l'acide tiénilique		4'-hydroxylation du diclofénac		5-hydroxylation du diclofénac	
	Km (μM)	kcat (min^{-1})	Km (μM)	kcat (min^{-1})	Km (μM)	kcat (min^{-1})
2C8	145 ± 15	1,7 ± 0,2	630 ± 30	1,2 ± 0,2	280 ± 30	7 ± 1
2C9	5 ± 1	1,8 ± 0,2	15 ± 8	24 ± 2	-	<0,1
2C18	150 ± 15	0,2 ± 0,1	170 ± 30	1,1 ± 0,2	125 ± 20	3 ± 0,4
2C19	<0,05	-	440 ± 30	1,4 ± 0,5	470 ± 50	1,1 ± 0,5

Tableau 11 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide tiénilique et du diclofénac par les différents CYP2C humains exprimés dans des microsomes de levure *W(R)fur* d'après (Jean et al., 1996) et (Mancy et al., 1999). L'acide tiénilique est substrat suicide spécifique du CYP2C9, de bonne affinité pour l'enzyme. Le diclofénac est hydroxylé de façon régiosélective en position 4', avec une efficacité catalytique élevée.

CYP	Ki sulfaphénazole (μM)
2C8	63 ± 4
2C9	0,3 ± 0,1
2C18	29 ± 3
2C19	-

Tableau 12 : Inhibition par le sulfaphénazole de différentes activités spécifiques des CYP2C humains exprimés dans des microsomes de levure *W(R)fur* d'après (Mancy et al., 1996). Le sulfaphénazole est un inhibiteur compétitif spécifique du CYP2C9 par rapport aux autres CYP2C humains.

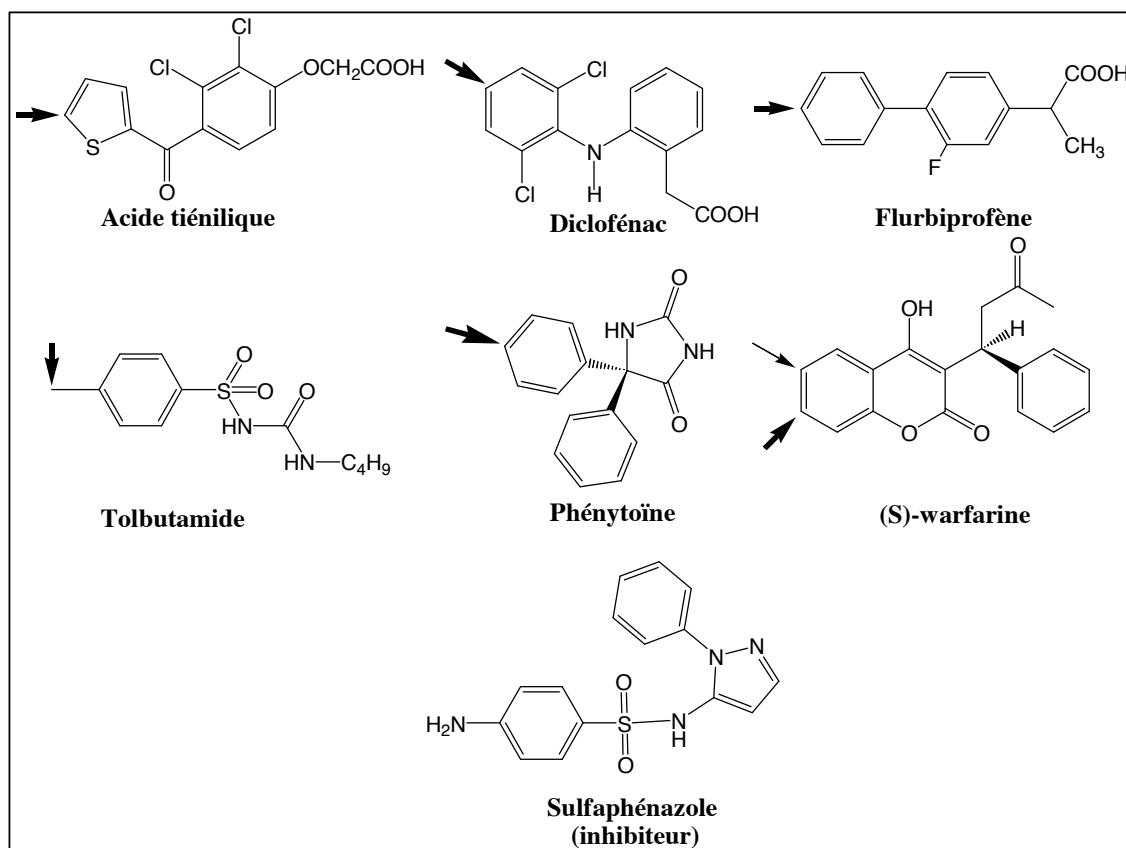


Figure 25 : Exemples de molécules reconnues par le CYP2C9. Les flèches indiquent les sites d'oxidation des substrats.

Le CYP2C8 pourtant relativement abondant au niveau hépatique, est une isoforme nettement moins connue et étudiée que le CYP2C9. Cela s'explique sans doute par la commercialisation tardive du CYP2C8 recombinant. A ce jour, peu de substrats de bonne affinité pour l'enzyme sont connus et la plupart n'ont été identifiés que récemment (depuis 1999). Cette isoforme métabolise principalement des médicaments et des composés endogènes (Tableau 13), la plupart étant également substrats du CYP3A4. Parmi les médicaments on peut citer le taxol, une molécule de grande taille (anticancéreux) (Rahman et al., 1994), le vérapamil (Busse et al., 1995; Tracy et al., 1999), la fluvastatine (Fischer et al., 1999) et la cérvastatine (Muck, 2000) (antilipémiante), la troglitazone (antidiabétique) (Yamazaki et al., 1999), l'amiodarone (antiarythmique) (Ohyama et al., 2000), l'amodiaquine (traitement contre la malaria) (Li et al., 2002) et l'acide tazaroténique (rétinoïde prescrit comme traitement local du psoriasis et de l'acné (Attar et al., 2003). En ce qui concerne les composés endogènes, le CYP 2C8 est impliqué dans le métabolisme de l'acide arachidonique (Daikh et al., 1994; Rifkind et al., 1995) de l'acide rétinoïque et du rétinol (Leo et al., 1989; Nadin and Murray, 1999). Un bon inhibiteur compétitif a aussi été mis évidence (Rahman et al., 1994) : il s'agit de la quercétine, un flavonoïde présent dans certains fruits (raisin, fraise) ($K_i=1,3 \mu\text{M}$).

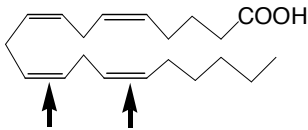
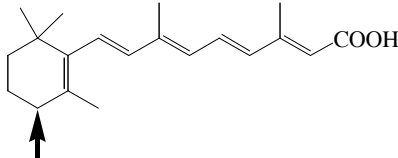
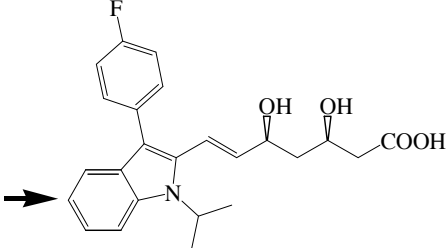
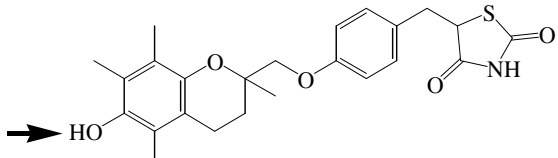
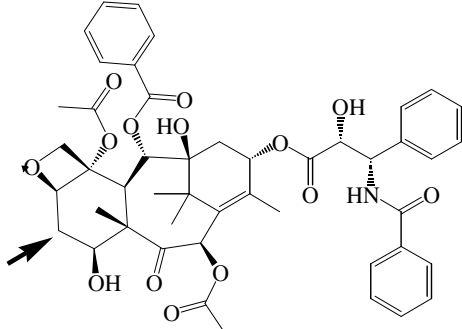
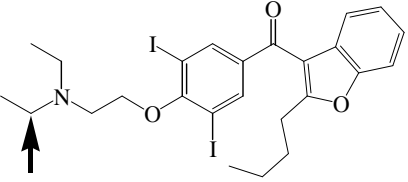
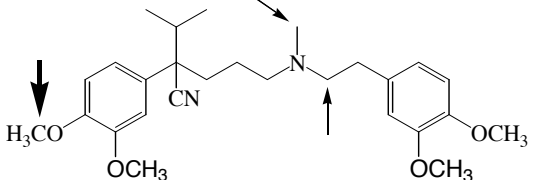
Substrat	Formule	Km et kcat <i>(ref.) et expression du CYP2C8</i>
Acide arachidonique		Non déterminées (produit 14, 15-époxy majoritaire)
Acide rétinéique		Km = 1,4 ± 0,3 µM kcat = 2,1 min ⁻¹ <i>(Nadin and Murray, 1999)</i> <i>(Lymphoblastes)</i>
Fluvastatine		Km = 2,8 µM kcat = 0,13 min ⁻¹ <i>(Fischer et al., 1999)</i> <i>(Lymphoblastes)</i>
Troglitazone		Km = 3 ± 3 µM kcat = 4,2 ± 1,0 min ⁻¹ <i>(Yamazaki et al., 1999)</i> <i>Baculavirus/cellules d'insectes</i>
Taxol		Km = 5,4 ± 1,0 µM kcat = 30 ± 2 min ⁻¹ <i>(Rahman et al., 1994)</i> <i>HepG2/ virus de la vaccine</i>
Amiodarone		Km = 8,6 ± 2,5 µM kcat = 2,3 ± 0,2 min ⁻¹ <i>(Ohyama et al., 2000)</i> <i>Baculavirus/cellules d'insectes</i>
Vérapamil		O-déméthylation majoritaire Km = 50 µM kcat = 13 pmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹ <i>(Busse et al., 1995;</i> <i>Tracy et al., 1999)</i> <i>Levure W(R)</i>

Tableau 13 : Les principaux substrats du CYP2C8 connus au début de ma thèse : nom, structure chimique et constantes cinétiques d'oxydation par le CYP2C8. La référence

CHAPITRE I : Introduction

de la publication figure entre parenthèse; le système d'expression utilisé pour produire le CYP2C8 est indiqué en italique. Les flèches désignent les sites d'oxydation.

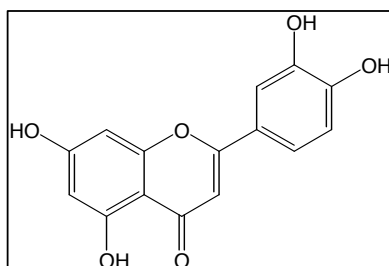


Figure 26 : Structure de la quercétine, un inhibiteur du CYP2C8.

I.D.4.b Bilan des études topologiques

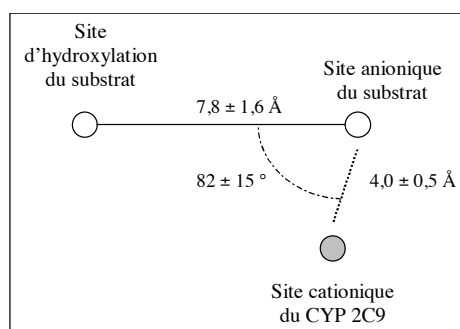
Au début de ma thèse, aucune donnée topologique sur le CYP2C8 (pharmacophore, modèles 3D ou mutagenèse) n'avait été publiée. Par contre plusieurs études portaient sur le CYP2C9.

Pharmacophore des substrats et modèle d'interaction du sulfaphénazole

Deux équipes, issus du laboratoire de Daniel Mansuy et de la société Pfizer, ont déterminé les motifs structuraux communs aux molécules reconnues par le CYP2C9 (ie. « le pharmacophore ») par modélisation moléculaire et expériences biochimiques.

En superposant 8 substrats et l'inhibiteur sulfaphénazole, l'équipe de Pfizer a proposé un premier pharmacophore des molécules reconnues par le CYP2C9 (Smith and Jones, 1992; Jones et al., 1996). Tous les composés étudiés possèdent un groupe donneur de liaisons hydrogènes situé à $6,7 \pm 0,8 \text{ \AA}$ du site d'hydroxylation et à $4 \pm 0,5 \text{ \AA}$ d'un site accepteur de liaisons hydrogènes de la protéine. La liaison hydrogène établie avec l'enzyme forme un angle de $133 \pm 21^\circ$ avec l'axe passant par le site de métabolisme et le groupe donneur de liaisons hydrogènes des substrats.

Au laboratoire, une étude sur les dérivés d'acide tiénilique (Mancy et al., 1995) a permis de souligner l'importance de la fonction acide de ce substrat dans la reconnaissance par le CYP2C9. En effet, lorsque cette fonction acide est remplacée par un groupe hydrophobe ou un donneur de liaisons hydrogènes, toute affinité pour le CYP2C9 est perdue. L'acide tiénilique formerait donc une liaison ionique avec le CYP2C9, nécessaire à sa reconnaissance. Il en serait de même pour la plupart des substrats du CYP2C9, chargés négativement à pH physiologique. Cette hypothèse est étayée par une étude sur des dérivés du diclofénac (Mancy et al., 1999). La substitution de la fonction carboxylate par un alcool supprime la 4'-hydroxylation du diclofénac spécifique du CYP2C9. Fort de ces résultats, 12 substrats du CYP2C9 (incluant des dérivés anioniques de l'acide tinélique) ont été superposés, en utilisant la (S)-warfarine et la phénytoïne comme supports. Le pharmacophore résultant indique les contraintes géométriques suivantes : la charge négative des substrats est située à $7,8 \pm 1,6 \text{ \AA}$ du site d'hydroxylation et devrait interagir avec un résidu cationique de la protéine distant de $4 \pm 0,5 \text{ \AA}$, selon un angle de $82 \pm 15^\circ$.



Ce pharmacophore a ensuite été affiné grâce à l'étude RMN de l'interaction de cinq substrats avec le CYP2C9 (Poli-Scaife et al., 1997). Des distances fer-hydrogène déduites des temps de relaxation des protons ont permis d'améliorer le positionnement relatif des substrats. Deux motifs de reconnaissance ont alors été identifiés : une zone hydrophobe aromatique et une charge négative située à environ 8 Å du site d'hydroxylation (cf. Figure 27).

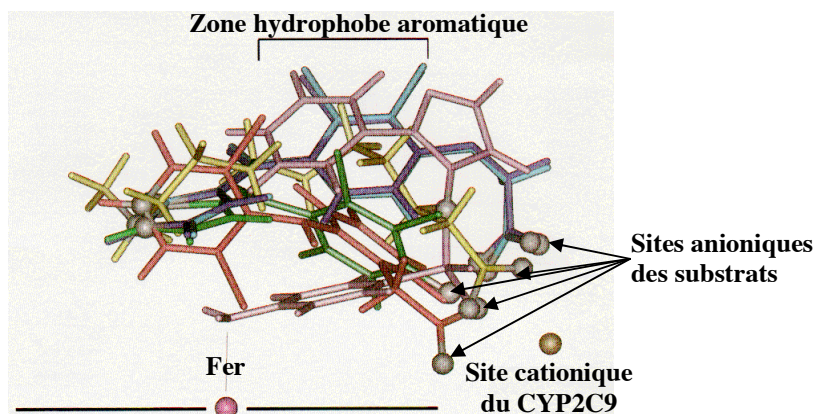


Figure 27 : Superposition de six ligands du CYP2C9 (Acide tiénilique et deux dérivés, diclofénac, acide laurique, sulfaphénazole) d'après (Poli-Scaife et al., 1997).

Le sulfaphénazole, inhibiteur compétitif spécifique du CYP2C9, établirait trois interactions avec l'enzyme:

- une interaction électrostatique entre le groupe para-amino benzène sulfonamide de pKa = 6, anionique à pH physiologique (Bell and Roblin, 1942). et une charge positive de la protéine, située à environ 4 Å (Poli-Scaife et al., 1997).
- une interaction hydrophobe du groupe pyrazole-phényle avec un résidu hydrophobe de la protéine.
- une interaction NH₂ - Fe, supplémentaire par rapport aux autres molécules reconnues

Les deux premières interactions seraient communes à tous les ligands du CYP2C9. L'interaction supplémentaire NH₂-fer été mise en évidence en spectroscopie UV-visible différentielle : l'addition de sulfaphénazole à des microsomes de levure exprimant le CYP2C9 induit l'apparition d'un spectre de type II ($\lambda_{\min} = 390$ nm, $\lambda_{\max} = 425$ nm). Ceci est caractéristique de la fixation du sulfaphénazole sur le fer par sa fonction NH₂ (cf. I.B.1). Une distance azote - fer de 2,2 Å, a été mesurée par RMN (Poli-Scaife et al., 1997).

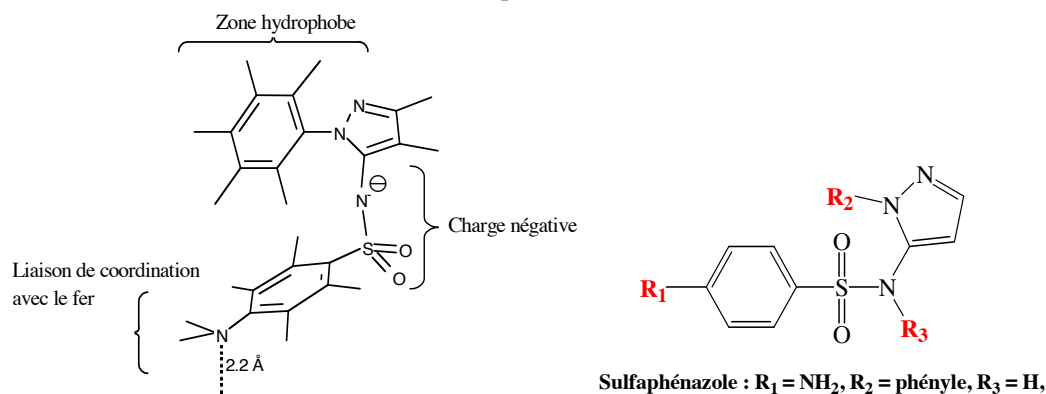


Figure 28 : Modèle d'interaction du sulfaphénazole avec le CYP2C9 d'après (Poli-Scaife et al., 1997).

Pour évaluer l'importance relative de chacune de ces trois interactions, une série de molécules dérivées du sulfaphénazole aux groupements R_1 , R_2 , R_3 modifiés, a été synthétisée au laboratoire par Sylvie Dijols. Les modes d'interaction de ces molécules et leurs pouvoirs inhibiteurs (CI50) ont été étudiés par spectroscopie UV-visible différentielle, sur le CYP2C9 et sur les autres CYP2C humains afin de déterminer la spécificité de reconnaissance de chaque enzyme (Minoletti, 1998; Ha-Duong et al., 2001a et 2001b).

D'après les résultats obtenus, la complexation NH_2 -fer n'est pas responsable de la forte affinité du sulfaphénazole pour le CYP2C9. Les molécules à groupement R_1 alkyle hydrophobe sont toujours bien reconnues par le CYP2C9 mais elles ne sont plus sélectives vis à vis cette isoforme (elles inhibent également le CYP 2C8). Par contre, deux autres interactions (liaison ionique et interaction π - π) semblent essentielles. La N-alkylation du sulfonamide par un groupement hydrophobe supprime l'interaction ionique avec le CYP2C9 et les molécules sont alors reconnues spécifiquement par le CYP 2C8 et CYP 2C18. Enfin, les dérivés à R_3 cyclohexyle sont très mal reconnus par le CYP2C9. Une interaction purement hydrophobe n'est pas suffisante pour conserver une bonne affinité pour le CYP2C9. Le sulfaphénazole établirait donc une interaction de type π - π entre son groupement phényle et un résidu aromatique du CYP2C9.

Bilan : La superposition de bons ligands du CYP2C9 par modélisation moléculaire a mis en évidence plusieurs motifs structuraux communs à ces molécules. Ce pharmacophore comprend une zone hydrophobe aromatique et un site anionique ou donneur de liaisons hydrogènes. L'importance de l'interaction ionique pour la reconnaissance de ligands anioniques a été confirmée par des expériences menées au laboratoire sur des dérivés de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole (Figure 29).

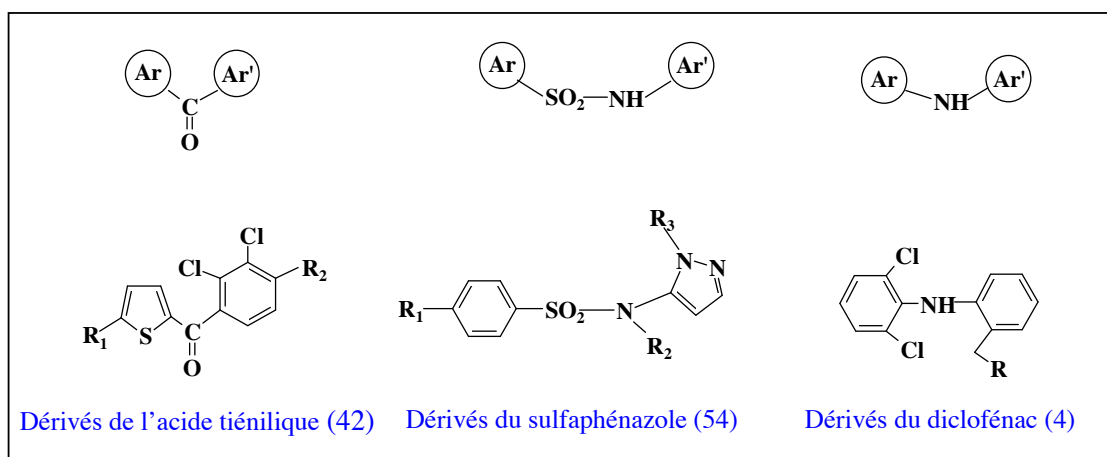


Figure 29 : Etude des motifs chimiques importants pour la reconnaissance de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole par le CYP2C9. Le nombre de dérivés synthétisés pour étudier les sélectivités relatives des CYP2C humains est indiqué entre parenthèses.

Modèles par homologie du CYP2C9

Des modèles par homologie du CYP2C9 (Jones et al., 1996; Jean et al., 1997; Jung et al., 1998; Lewis, 1998; Ha-Duong, 2001c, Payne et al., 1999a) ont été construits à partir d'alignements de séquences avec les cinq cytochromes P450 bactériens cristallisés à l'époque (P450_{cam}, P450_{BM3}, P450_{terp}, P450_{eryF} et P450_{nor}). L'homologie de séquence entre CYP2C9 humains et P450 bactériens étant faible, ces modèles sont peu fiables : ils offrent une assez bonne représentation des blocs structuraux conservés, mais l'imprécision est forte sur les boucles très flexibles de la protéine.

Mutants et chimères du CYP2C9 (cf. alignement page suivante)

Plusieurs publications sur des mutants ou chimères du CYP2C9 figurent dans la littérature. Elles nous éclairent sur le rôle fonctionnel de certains résidus de l'hémoprotéine.

Il existe ainsi des « mutants naturels » du CYP2C9, correspondant à différents variants alléliques de l'enzyme: par exemple R144C (CYP2C9*2), I359L (CYP2C9*3) et D360G (CYP2C9*5). Ces mutations sont toutes caractérisées par une diminution d'efficacité catalytique: R144C induit une diminution des *k_{cat}* alors que I359L et D360G provoquent une augmentation des *K_m* du CYP2C9 pour différents substrats (Von Wachenfeldt and Johnson, 1995). Crespi et al. ont montré que le polymorphisme R144C affectait l'interaction avec la réductase, ce qui expliquerait les diminutions de *k_{cat}* (Crespi and Miller, 1997). Dans les modèles de CYP2C9, les résidus Ile359 et Asp360 du SRS5 semblent trop éloignés de l'hème pour former une interaction directe avec les ligands. C. Von Wachenfeldt et EF. Johnson suggèrent l'implication de Ile359 dans le positionnement de la boucle 362-368 par rapport à l'hélice I (Von Wachenfeldt and Johnson, 1995). Sa mutation modifierait la conformation du site actif et donc la reconnaissance des substrats par le CYP2C9.

Des mutants de CYP2C9 ont également été créés *in vitro* pour explorer la topologie du site actif de l'enzyme. Le positionnement de substrats dans les sites actifs modèles du CYP2C9 permet d'identifier plusieurs acides aminés en interaction potentielle avec ces molécules. Ces prédictions doivent être vérifiées par des expériences de mutagenèse dirigée. Haining et al. ont ainsi montré l'implication de Phe114 et Val 113 dans des interactions hydrophobes avec la (S)-warfarine et le diclofénac (Haining et al., 1999). Phe114 serait l'acide aminé supposé interagir avec la zone hydrophobe aromatique du pharmacophore du CYP2C9. Enfin, malgré une forte homologie de séquence de 95,7%, les CYP2C9 et 2C19 ont chacun des substrats et des inhibiteurs très spécifiques. Afin d'identifier les séquences responsables de ces différences de comportement, deux équipes américaines dirigées par JA. Goldstein et EF. Johnson ont choisi une stratégie indépendante des modèles de sites actifs, en construisant une série de chimères 2C9/2C19 (Jung et al., 1998; Klose et al., 1998). Ces études ont souligné l'importance de la région 227-283 incluant le SRS4 (région centrale de l'hélice I) dans la sélectivité du CYP2C9 envers le sulfaphénazole, le diclofénac et l'ibuprofène. Les acides aminés de cette zone, distincts chez les deux enzymes, ont été mutés. Les mutations de plusieurs chimères ont ainsi montré le rôle clé de deux résidus polaires du SRS4 : Ser286 et Asn289. D'après les modèles de CYP2C9, ces résidus ne seraient pas directement en contact avec les ligands du CYP2C9 mais auraient une influence sur le repliement du site actif et la sélection des substrats au niveau du canal d'accès de l'enzyme.

I.D.5 Intérêt de la structure RX du CYP2C5 de lapin pour l'étude topologique des CYP2C humains

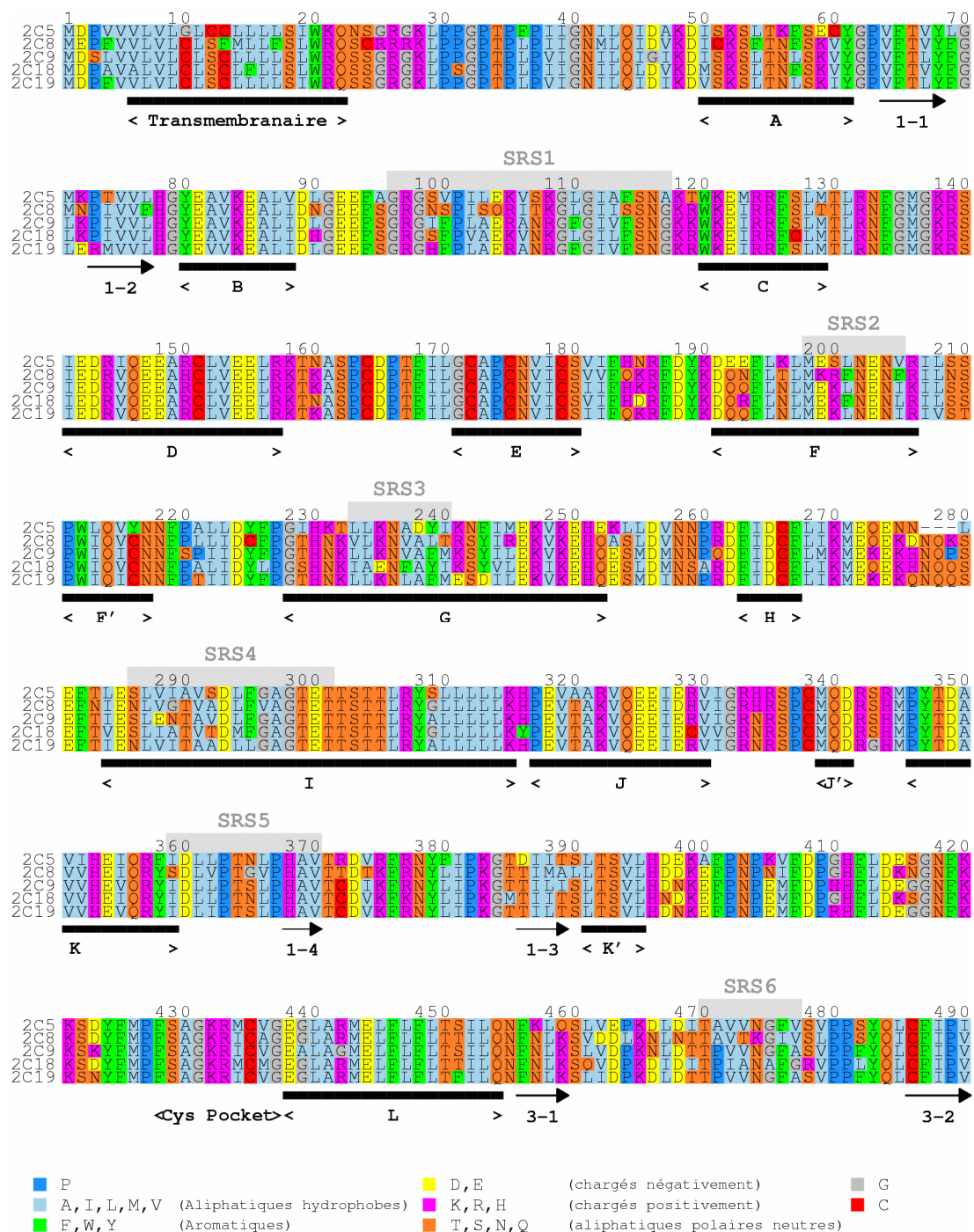


Figure 30 : Alignement de séquences entre les CYP2C humains et le CYP2C5 de lapin. Les résidus correspondants des CYP2C humains et du CYP2C5 ont une numérotation décalée à partir du 277^{ème} acide aminé (+3 pour les CYP2C humains). Les SRS définis par Gotoh sont indiqués par les régions grisées. Les éléments de structures secondaires définis dans la structure RX du CYP2C5 figurent en dessous de l'alignement.

La séquence du CYP2C5 de lapin a été alignée avec celles des CYP2C humains. D'après cet alignement, le CYP2C5 présente une forte identité de séquence avec les isoformes humains (environ 80%, Tableau 14), et une similarité de séquence d'environ 93% (Ridderstrom et al., 2001).

	CYP2C5	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C18	CYP2C19
CYP2C5	100%	79%	83%	77%	83%
CYP2C8	79%	100%	82%	77%	83%
CYP2C9	83%	82%	100%	82%	93%
CYP2C18	83%	82%	87%	100%	81%
CYP2C19	83%	83%	93%	87%	100%

Tableau 14 : Identités de séquence entre le CYP2C5 de lapin et les CYP2C humains (Ridderstrom et al., 2001).

La structure RX du CYP2C5/3LVdH est donc une très bonne structure de référence pour la construction de modèles par homologie des CYP2C humains et plus particulièrement des CYP2C9 et 2C8. Elle devrait permettre d'obtenir des modèles beaucoup plus fiables que ceux construits à partir des structures RX de P450 bactériens (surtout au niveau des régions variables).

Cette structure RX a permis de vérifier que les P450 procaryotes et eucaryotes ont bien un repliement commun (« fold ») (cf. partie I.C.2). A priori, la topologie globale du site actif des CYP2C humains devrait donc être assez proche de celle du CYP2C5 de lapin. Les CYP2C humains ont trois résidus en plus par rapport au CYP2C5. Ces résidus supplémentaires sont insérés au niveau d'une boucle externe très flexible entre les hélices H et I. Ils ne devraient donc pas avoir d'incidence sur la structure des sites actifs modèles.

La progestérone, substrat spécifique au CYP2C5, a été « dockée » dans le site actif de l'enzyme. Plusieurs résidus sont potentiellement en contact: Ala113, Val205, Leu208, Asp290, Leu359, Leu363 et Phe473 (Williams et al., 2000a). Ils correspondent à des positions clés déjà identifiées par mutagenèse dirigée des P450 de la famille 2 (cf. Annexe C). Les acides aminés correspondants des CYP2C humains sont donc susceptibles d'être importants pour la reconnaissance de substrats par certaines isoformes.

Enfin, le CYP2C5 été cocristallisé à la fin de ma thèse en présence du DMZ et du diclofénac, deux substrats communs au CYP2C5 et aux CYP2C humains (Tableau 15). Les structures des complexes correspondants serviront de base à la discussion de nos résultats de mutagenèse sur les CYP2C9 et 2C8 humains.

CYP	Hydroxylation du DMZ		4'-hydroxylation du diclofénac		5-hydroxylation du diclofénac	
	Km (μM)	kcat (min^{-1})	Km (μM)	kcat (min^{-1})	Km (μM)	kcat (min^{-1})
CYP2C5dH	13 ± 8	90 ± 20	57 ± 8	16 ± 1	-	<0,1
CYP2C5/3LVdH	10 ± 2	40 ± 5	80 ± 10	13 ± 1	-	<0,1
CYP2C9	12 ± 1	35 ± 5	15 ± 8	24 ± 1	-	<0,1
CYP2C8	40 ± 5	4 ± 1	630 ± 30	1,2 ± 0,2	280 ± 30	7 ± 1

Tableau 15 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du DMZ et du diclofénac par le CYP2C5 (Marques-Soares et al., 2003; Wester et al., 2003b) et les CYP2C9 et 2C8 humains (Mancy et al., 1999).

I.E OBJECTIFS DE LA THESE

L'industrie pharmaceutique s'intéresse aux structures 3D de cytochromes P450 humains pour la prédiction *in silico* du métabolisme des médicaments chez l'homme et des effets secondaires associés (interactions médicamenteuses, toxicités). Il s'agit de relier la structure à l'activité spécifique de chaque isoforme.

Deux familles majeures, les CYP3A et 2C, représentent plus de la moitié des P450 du foie humain. Ces P450 sont membranaires et aucune structure RX de ces protéines n'était publiée au début de ma thèse. En l'absence de structure RX, l'étude de leur site actif fait appel à des méthodes indirectes. **Le laboratoire travaille ainsi depuis quelques années sur l'élaboration de modèles de complexes CYP2C de foie humain-médicaments**, à partir de structures RX de P450 bactériens cristallisés, d'études de spectroscopie UV-visible, RPE et RMN, et de mutagenèse dirigée. Au cours de mon DEA, le groupe d' Eric JOHNSON (Scripps Inst., USA) a publié la première structure RX d'un P450 membranaire, le P450 2C5 de lapin (Williams et al., 2000a). **Le but du laboratoire est de partir de la structure RX du CYP2C5 de lapin pour aboutir aux meilleurs modèles 3D possibles des P450 2C humains, modèles permettant d'expliquer le métabolisme des médicaments par ces isoformes. Des modèles des CYP2C9 et 2C8 ont été construits au laboratoire par C. Marques à partir de la structure RX du CYP2C5. Afin de confirmer ou d'infirmer ces modèles, une approche de mutagenèse dirigée a été adoptée dans le cadre de ma thèse. La finalité du projet est de déterminer les résidus et les facteurs structuraux responsables des spécificités de substrats de ces deux isoformes et d'estimer la qualité prédictive de nos modèles.**

Historiquement, le CYP2C9 a été le premier CYP2C purifié à partir du foie humain. Depuis de nombreuses publications lui ont été consacrées mais peu d'études de mutagenèse avaient été réalisées au début de mon DEA. La première partie de ma thèse a donc été consacrée à l'étude topologique de cette isoforme. Nous avons entrepris la mutagenèse de cette enzyme afin d'identifier deux types de résidus :

- le résidu nucléophile responsable de l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique.
- le ou les résidus aromatiques interagissant avec les noyaux aromatiques des substrats du CYP2C9 (constituant le motif hydrophobe du pharmacophore).

Les mutants construits ont été exprimés dans la levure W(R). Le choix de ce système d'expression et le génotype de la souche sont détaillés respectivement en Annexe A et dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les propriétés de ces mutants ont alors été comparées à celle du CYP2C9 sauvage à l'aide de trois ligands classiques du CYP2C9 : acide tiénilique, diclofénac et sulfaphénazole. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre II.

Le deuxième axe de ma thèse, consacrée au CYP2C8, a été développé par la suite. Le P450 2C8 est une isoforme peu connue de la sous-famille 2C mais des articles récents ont suscité un regain d'intérêt pour cette enzyme. Son rôle dans le métabolisme des médicaments aurait été sous-estimé. D'autre part, le CYP 2C8 est exprimé dans les vaisseaux sanguins (Zeldin et al., 1995, Lin et al., 1996) où il interviendrait dans la régulation de la vasodilatation (Fisslthaler et al., 1999; Fleming, 2000). Les connaissances acquises sur le CYP2C9 et sur la structure RX du P450 2C5 ont été mises à profit pour l'étude topologique du CYP2C8. Afin d'identifier les résidus impliqués dans la reconnaissance des substrats par cette enzyme, j'ai utilisé deux stratégies :

- La première stratégie, indépendante des modèles, consiste à construire des chimères CYP2C8/CYP2C9. Cette stratégie a finalement été abandonnée pour des raisons expliquées en Annexe F.

- La deuxième stratégie est une approche de mutagenèse « rationnelle » qui s'appuie sur le modèle de site actif et le pharmacophore des substrats construits au laboratoire à partir de la structure RX du CYP2C5. Le docking du pharmacophore dans le site actif modèle du P450C8 a mis en évidence plusieurs acides aminés en interaction potentielle avec les substrats. Afin de vérifier ces prédictions et les prédictions d'autres modèles publiés, j'ai construit une vingtaine de mutants du P450 2C8. Après expression dans la levure, leurs propriétés catalytiques ont été comparées à celle de l'enzyme sauvage à l'aide de cinq substrats. Les résultats de cette étude figurent dans le chapitre III de cette thèse.

CHAPITRE II :
Etude de la topologie du site actif du
CYP2C9 par mutagenèse dirigée

II.A PRESENTATION DE L'ARTICLE

Ce travail a été réalisé dans la continuité des recherches menées au laboratoire sur la topologie du site actif du CYP2C9 (cf. Introduction I.D.4.b). Le CYP2C9 a trois particularités par rapport aux autres CYP2C humains :

- Il est inactivé par l'acide tiénilique (Lopez-Garcia et al., 1994)
- Il hydroxyle régiosélectivement le diclofénac en position 4' (Mancy et al., 1999)
- Il a une forte affinité pour l'inhibiteur spécifique sulfaphénazole ($K_i=0,3\mu\text{M}$) (Mancy et al., 1996)

L'acide tiénilique, le diclofénac et le sulfaphénazole sont des molécules à cycles aromatiques et anioniques à pH physiologique, comme la plupart des substrats et inhibiteurs du CYP2C9. L'étude de leur mode de fixation dans le site actif du CYP2C9 devrait donc nous fournir des informations représentatives de la spécificité de reconnaissance de ligands par cette enzyme. Dans cette optique, nous avons réalisé six mutations du CYP2C9 et étudié leurs effets sur l'hydroxylation de ces trois molécules. Le choix des mutations, orienté par la modélisation moléculaire, est détaillé dans les paragraphes suivants.

II.A.1 Topologie du site actif modèle du CYP2C9

Un modèle 3D du CYP2C9 humain a été construit au laboratoire par Cristina Marques (Marques-Soares, 2002) par mutagenèse virtuelle à partir de la structure RX du CYP2C5 de lapin (Williams et al., 2000a) (cf. partie V.G du Matériel et Méthodes). Après alignement de séquences, les acides aminés qui diffèrent ont été remplacés dans la structure 3D du CYP2C5 par ceux du CYP2C9 à modéliser (module Biopolymer_3, InsightII). Puis l'énergie de la structure a été minimisée (module Discover_3).

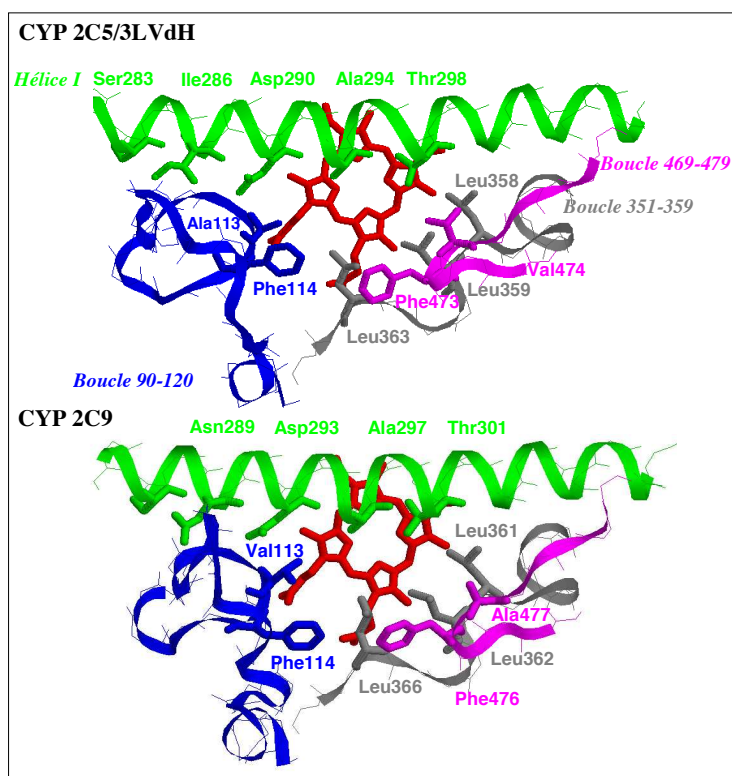


Figure 31: Comparaison des sites actifs du CYP2C5/3LVdH et du modèle de CYP2C9 (vue de dessus) (Illustration de Marques-Soares, 2002).

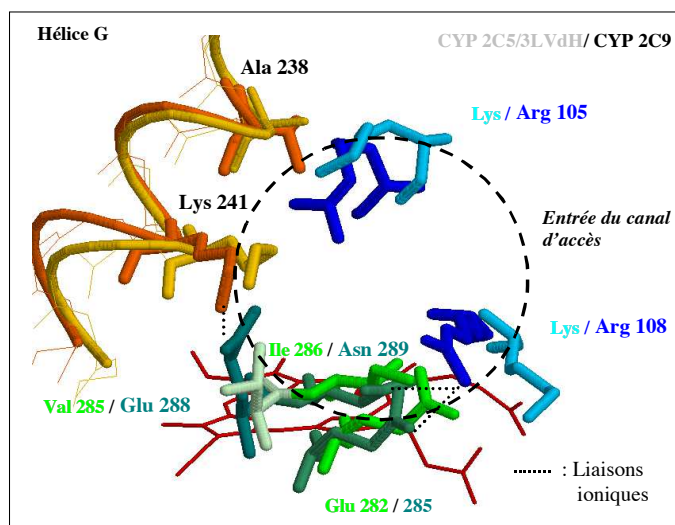


Figure 32 : Comparaison de l'entrée du canal d'accès des substrats entre le CYP2C5/3LVdH (couleurs claires) et le CYP2C9 modélisé (couleurs foncées). L'entrée du canal d'accès est indiquée en pointillés (Illustration de Marques-Soares, 2002).

La comparaison du modèle résultant à la structure RX du CYP2C5 met en évidence les similitudes et différences topologiques du CYP2C9 :

- **Son site actif hydrophobe est très proche de celui du CYP2C5 en volume et composition en acides aminés.** Il est bordé par pratiquement les mêmes résidus, en particulier par deux phénylalanines Phe114 et Phe476 (correspondant à Phe 114 et Phe 473 du CYP2C5) (Figure 31). Seulement trois acides aminés du site actif diffèrent de ceux du CYP2C5 : Ser365 de la boucle 362-368, Val113 de la boucle B-C et Ile205 de l'hélice F. Ces trois résidus sont plus encombrants que les résidus correspondants du CYP2C5.

n° des résidus des CYP2C humains	CYP					n° des résidus correspondants du CYP 2C5
	2C8	2C9	2C18	2C19	2C5	
113	I	V	L	V	A	113
114	S	F	F	F	F	114
205	F	I	L	I	V	205
293	D	D	D	D	D	290
297	A	A	A	A	A	294
301	T	T	T	S	T	298
361	L	L	L	L	L	358
362	V	L	L	L	L	359
365	G	S	N	S	N	362
366	V	L	L	L	L	363
476	I	F	L	F	F	473

Tableau 16: Les principaux résidus du site actif du CYP2C9 et les acides aminés correspondants du CYP2C5 et des autres CYP2C humains.

- L'entrée du canal d'accès des substrats (Figure 32) du CYP2C9 semble globalement plus polaire que celle du CYP2C5 et des autres CYP2C humains, avec la présence de Glu288 et Asn289 spécifiques du CYP2C9. Le glutamate 288 de l'hélice I (remplacé par des résidus hydrophobes dans les autres CYP2C) établit une liaison ionique avec l'arginine 241 de l'hélice G. Cette liaison rabat Arg105 et Arg108 vers l'entrée du canal. Le présence de ces résidus chargés positivement à cette position pourrait expliquer la sélectivité du CYP2C9 pour des molécules anioniques.

n° des résidus des CYP2C humains	CYP					n° des résidus correspondants du CYP 2C5
	2C8	2C9	2C18	2C19	2C5	
105	R	R	K	R	K	105
108	K	R	K	K	K	108
241	R	K	K	E	K	241
285	E	E	E	E	E	282
288	V	E	I	V	V	285
289	G	N	A	I	I	286

Tableau 17 : Les principaux résidus polaires à l'entrée du canal d'accès des substrats du CYP2C9 et les acide aminés correspondants chez le CYP2C5 et les autres CYP2C humains.

Le CYP2C9 et le CYP2C5 sont donc deux hémoprotéines très similaires au niveau de leurs sites actifs qui se différencient surtout au niveau de leurs canaux d'accès des substrats.

II.A.2 Positionnement de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole dans le site actif modèle du CYP2C9 et choix des acides aminés à muter.

L'acide tiénilique, le diclofénac, et le sulfaphénazole ont été insérés dans le site actif modèle du CYP2C9 entre l'hème et le canal d'accès des substrats (Marques-Soares, 2002). En accord avec des mesures effectuées par RMN, les sites d'hydroxylation de l'acide tiénilique et du diclofénac ont été positionnés à environ 6Å du fer et le groupe NH₂ du sulfaphénazole à environ 2Å (Poli-Scaife et al., 1997). L'énergie des complexes correspondants a ensuite été minimisée (module BioBiopolymer_3, InsightII) afin de trouver la position optimale de ces molécules dans le site actif. Ces modèles de complexes permettent de visualiser les interactions potentielles des ligands avec le CYP2C9 (Figure 33). Une étude de mutagenèse dirigée a été alors entreprise dans le cadre de cette thèse afin de préciser la nature des résidus responsables de la spécificité de reconnaissance par cette isoforme. Je me suis intéressée plus particulièrement à deux types de résidus :

- le résidu nucléophile responsable de l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique
- les résidus aromatiques en interaction potentielle avec les cycles aromatiques des substrats et inhibiteurs du CYP2C9.

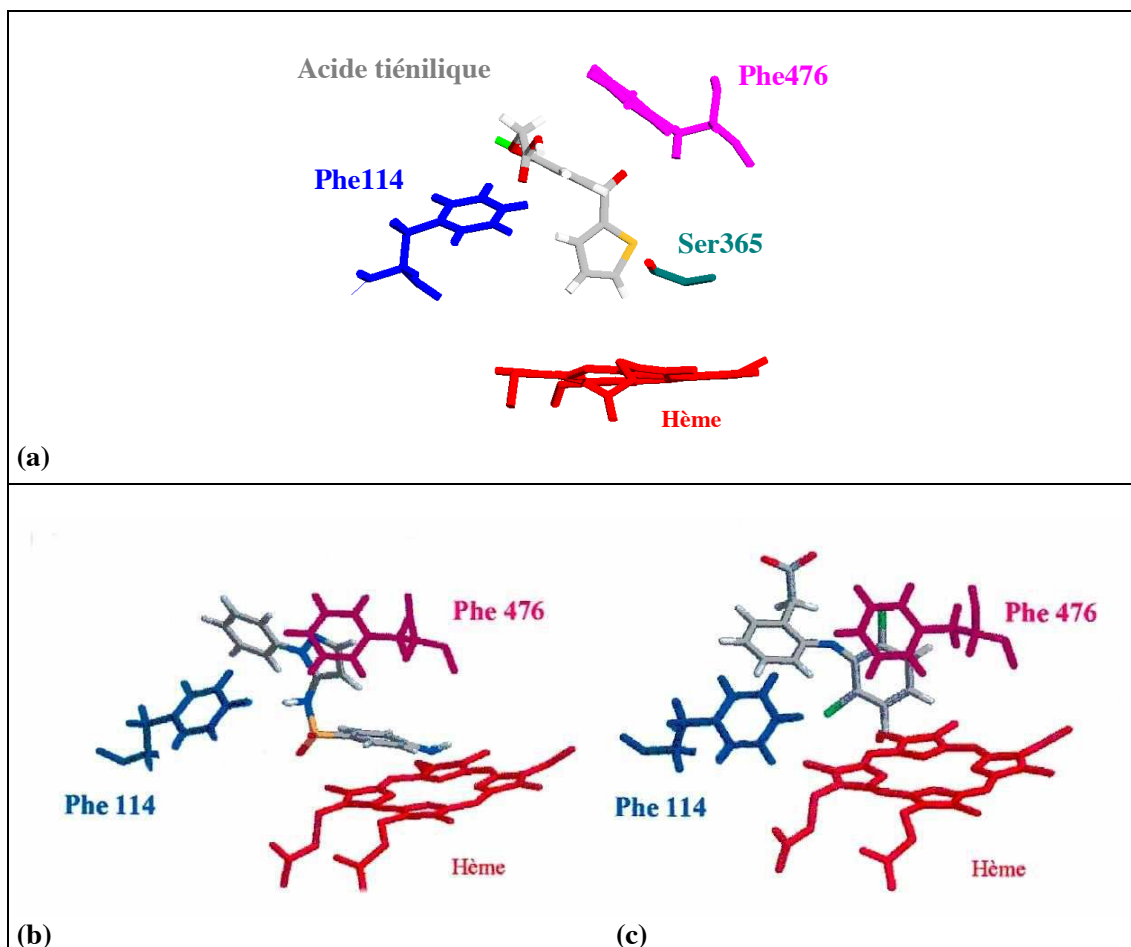


Figure 33 : Modèles d'interaction de l'acide tiénilique (a), du sulfaphénazole (b) et du diclofénac (c) avec le CYP2C9 (obtenus par minimisation d'énergie des complexes enzyme/ligand). Localisation des résidus Phe114, Phe476 et Ser365. Phe114 semble former une interaction π - π avec les groupes phényles des trois molécules. Phe476 interagit avec le groupe phényle de l'acide tiénilique, le dichlorophényle du diclofénac et le noyau pyrazole du sulfaphénazole.

L'acide tiénilique est métabolisé par trois membres de la sous-famille 2C : les CYP2C9, 2C8 et 2C18. Parmi ces trois isoformes, seul le CYP2C9 subit une inactivation suicide. Ce phénomène a été directement corrélé à la fixation covalente d'un métabolite électrophile sur l'apoprotéine du CYP2C9 mais le résidu nucléophile impliqué dans cette fixation covalente n'a pas été identifié. Les CYP2C8 et CYP2C18 n'étant pas inactivés, ce résidu nucléophile serait spécifique du CYP2C9 par rapport à ces deux autres isoformes (Lopez-Garcia et al., 1994). De plus, il devrait se situer à proximité du substrat pour pouvoir réaliser une attaque nucléophile. La sérine 365 du SRS5 est le seul acide aminé à la fois proche de l'acide tiénilique dans notre modèle (Figure 33 (a)) et substitué par des résidus non-nucléophiles, une glycine dans le CYP2C8, et une asparagine dans le CYP2C18.

Par ailleurs, les pharmacophores des ligands du CYP2C9 construits au laboratoire ou par d'autres équipes, comportent deux motifs structuraux communs : une zone hydrophobe aromatique et un site anionique ou polaire. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'interaction entre le CYP2C9 et la zone hydrophobe aromatique des pharmacophores. Les insertions de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole dans le site actif modèle du CYP2C9 positionnent les noyaux aromatiques de ces molécules à proximité de deux résidus phénylalanines : Phe114 (SRS1, boucle B-C) et Phe476 (SRS6, boucle C-terminale) (Figure 33). Selon les règles de Hunter et Sanders (Hunter and Sanders, 1990; Hunter et al., 1991), deux cycles aromatiques sont en interaction π - π lorsque la plus petite distance entre deux de leurs carbones est comprise entre 3,5 et 6 Å, et s'ils sont parallèles avec leurs centres décalés, ou s'ils forment un angle dièdre de 50 à 90°. Selon ces critères géométriques, Phe114 et Phe476 forment des interactions π - π avec les cycles aromatiques de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole (Figure 33).

Ces prédictions d'interaction sont confortées par plusieurs études de mutagenèse. Haining et al. ont muté la phénylalanine 114 en leucine et ont montré l'importance de cet aminé pour l'hydroxylation de la (S)-warfarine et du diclofénac et pour l'inhibition par le sulfaphénazole (Haining et al., 1999). Par ailleurs, une étude de mutagenèse sur le CYP2D6 suggère l'implication d'une phénylalanine du SRS6 (Phe471) dans un π -stacking avec certains substrats de l'enzyme (Hayhurst et al., 2001). Enfin, la structure RX du CYP2C5/3LVdH, localise les deux phénylalanines 114 et 473, équivalentes à Phe114 et Phe476 du CYP2C9, dans le site actif du CYP2C5. Ces arguments sont donc en faveur du rôle de Phe114 (SRS1) et de Phe476 (SRS6) dans une interaction de type π - π avec les substrats et inhibiteurs aromatiques du CYP2C9.

Pour les raisons qui viennent d'être exposées, nous avons décidé de muter les acides aminés en position 365, 114 et 476. Etant donné l'imperfection de nos modèles et la flexibilité de la boucle B-C, deux autres phénylalanines du SRS1, Phe94 et Phe110, situées à proximité de Phe114, ont été mutées à titre de comparaison.

La sérine 365 a été substituée par une alanine, pour supprimer la nucléophilie, sans trop perturber la structure locale de la protéine. Ce résidu a également été muté en glycine, acide aminé présent en position 365 dans le CYP2C8. Les phénylalanines 94, 110, 114 et 476 ont été remplacées par une isoleucine ou une leucine pour supprimer l'aromaticité, tout en conservant l'hydrophobicité et un certain encombrement stérique.

Ces différents mutants ont été construits par double PCR et recombinaison homologue dans la levure puis exprimés dans la souche de levure W(R). Ils ont ensuite été comparés au CYP2C9 sauvage selon les trois spécificités du CYP2C9 précédemment évoquées :

- l'inactivation suicide par l'acide tiénilique
- la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac
- l'affinité pour l'inhibiteur sulfaphénazole.

Pour supprimer un éventuel π -stacking, nous pouvons soit muter les acides aminés aromatiques du CYP2C9 en acides aminés hydrophobes, soit remplacer les groupements aromatiques des ligands du CYP2C9 par des chaînes alkyles purement hydrophobes. Des dérivés de l'inhibiteur spécifique sulfaphénazole à groupements cyclohexyle-pyrazole ont ainsi été préparés et utilisés afin de compléter l'étude du mutant F114I (Figure 34).

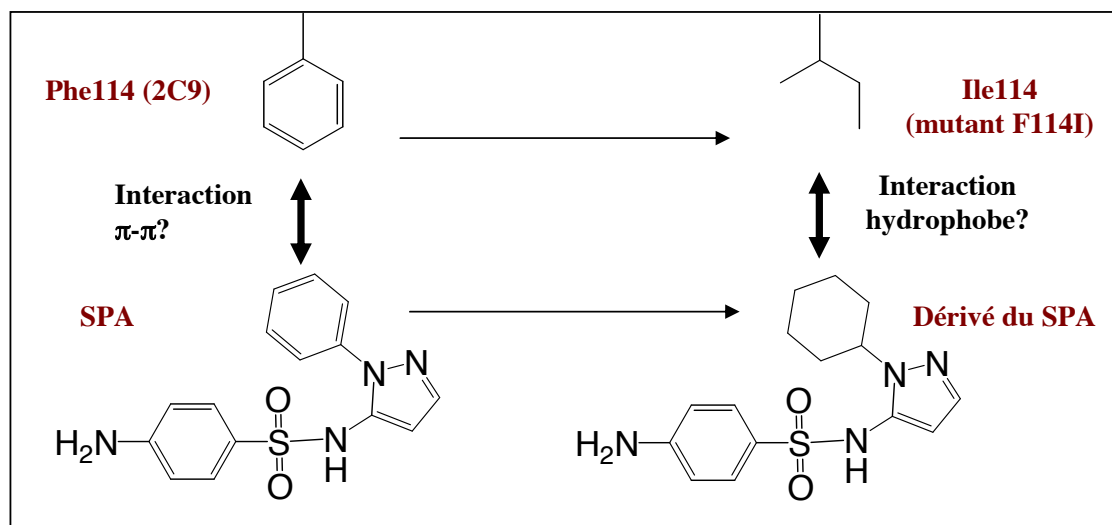


Figure 34 : Stratégie d'étude de l'interaction Phe114-ligand. La phénylalanine 114 est supposée interagir avec le groupement phényle-pyrazole du sulfaphénazole (SPA). Le mutant F114I et des dérivés du sulfaphénazole à groupement cyclohexyle-pyrazole sont utilisés pour vérifier cette hypothèse. (\longleftrightarrow interaction probable).

II.B ARTICLE

A. Melet, N. Assrir, P. Jean, MP. Lopez-Garcia, C. Marques-Soares, M. Jaouen, PM. Dansette, MA. Sari and D. Mansuy, « **Substrate selectivity of human cytochrome P450 2C9 : importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac and sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid** », ABB, 2003, 409(1), p80-91

Nadine Assrir, Pascale Jean et Maria-Pilar Lopez-Garcia avaient commencé ce projet de mutagenèse avant mon arrivée au laboratoire. En particulier les mutants S365A et S365G avaient été construits et caractérisés. Mon travail sur ce point s'est limité à la production de nouveaux lots d'enzymes et à la vérification des principaux résultats.

Seul le modèle 3D du complexe CYP2C9-diclofénac est présenté en illustration dans cet article.



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Archives of Biochemistry and Biophysics 409 (2003) 80–91

ABB

www.elsevier.com/locate/yabbi

Substrate selectivity of human cytochrome P450 2C9: importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac and sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid

Armelle Melet, Nadine Assrir, Pascale Jean, Maria Pilar Lopez-Garcia,¹
Cristina Marques-Soares, Maryse Jaouen, Patrick M. Dansette,
Marie-Agnès Sari, and Daniel Mansuy*

*Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 CNRS, Université Paris V,
45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France*

Received 29 May 2002, and in revised form 11 September 2002

Abstract

A series of six site-directed mutants of CYP 2C9 were constructed with the aim to better define the amino acid residues that play a critical role in substrate selectivity of CYP 2C9, particularly in three distinctive properties of this enzyme: (i) its selective mechanism-based inactivation by tienilic acid (TA), (ii) its high affinity and hydroxylation regioselectivity toward diclofenac, and (iii) its high affinity for the competitive inhibitor sulfaphenazole (SPA). The S365A mutant exhibited kinetic characteristics for the 5-hydroxylation of TA very similar to those of CYP 2C9; however, this mutant did not undergo any detectable mechanism-based inactivation by TA, which indicates that the OH group of Ser 365 could be the nucleophile forming a covalent bond with an electrophilic metabolite of TA in TA-dependent inactivation of CYP 2C9. The F114I mutant was inactive toward the hydroxylation of diclofenac; moreover, detailed analyses of its interaction with a series of SPA derivatives by difference visible spectroscopy showed that the high affinity of SPA to CYP 2C9 ($K_s = 0.4 \mu\text{M}$) was completely lost when the phenyl substituent of Phe 114 was replaced with the alkyl group of Ile ($K_s = 190 \pm 20 \mu\text{M}$), or when the phenyl substituent of SPA was replaced with a cyclohexyl group ($K_s = 120 \pm 30 \mu\text{M}$). However, this cyclohexyl derivative of SPA interacted well with the F114I mutant ($K_s = 1.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$). At the opposite end, the F94L and F110I mutants showed properties very similar to those of CYP 2C9 toward TA and diclofenac. Finally, the F476I mutant exhibited at least three main differences compared to CYP 2C9: (i) big changes in the k_{cat} and K_m values for TA and diclofenac hydroxylation, (ii) a 37-fold increase of the K_i value found for the inhibition of CYP 2C9 by SPA, and (iii) a great change in the regioselectivity of diclofenac hydroxylation, the 5-hydroxylation of this substrate by CYP 2C9 F476I exhibiting a k_{cat} of 28 min^{-1} . These data indicate that Phe 114 plays an important role in recognition of aromatic substrates of CYP 2C9, presumably via Π -stacking interactions. They also provide the first experimental evidence showing that Phe 476 plays a crucial role in substrate recognition and hydroxylation by CYP 2C9.

© 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Yeast-expressed CYP 2Cs; Site-directed mutagenesis; Drug metabolism; Hydroxylation; Difference visible spectroscopy; Active-site topology; Π - Π interactions

Cytochromes P450 constitute a superfamily of hemoproteins that play important roles in the oxidative

metabolism of a large variety of xenobiotics and endogenous compounds [1]. In order to interpret or to predict various problems that may occur with some drugs in relation to genetic polymorphism and drug–drug interactions, it is very important to determine which human liver cytochrome P450 is mainly involved in the metabolism of a drug of interest and what are the structural determinants that are crucial for recognition of this drug by the protein.

* Corresponding author. Fax: +33-1-42-86-83-87.

E-mail address: Daniel.Mansuy@biomedicale.univ-paris5.fr (D. Mansuy).

¹ Present address: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia, Burjassot, 46100 Valencia, Spain.

Cytochromes P450 of the 3A and 2C subfamilies are the major isoforms in human liver [1]. Of the four members of the human 2C subfamily, CYP² 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19, CYP 2C9 is the protein expressed at the highest level in human liver [2,3]. It is involved in the metabolism of a great number of drugs [4], such as diclofenac [5] and (*S*)-warfarin [6].

Several models describing the structural characteristics of the substrates and inhibitors that are required for strong interaction with CYP 2C9 have been proposed on the basis of biochemical, UV–visible [7–12], and ¹H NMR results [10]. All these models proposed that at least two major interactions are involved in the binding of substrates to CYP 2C9. Most of the high-affinity substrates or inhibitors of CYP 2C9 involve an anionic or polar site, and the first major interaction with CYP 2C9 would imply either an ionic or a hydrogen bond between this site and a CYP 2C9 amino acid residue. The second major interaction would involve an aromatic region of the CYP 2C9 active site establishing a Π -stacking bond with the aromatic rings that are very often present in the CYP 2C9 substrates and inhibitors. Moreover, several 3D models based on homology molecular modeling have been proposed for CYP 2C9 [11–18]. However, limited data are currently available about the precise nature of the amino acids of the CYP 2C9 active site that are mainly involved in the specific recognition and binding of CYP 2C9 substrates and inhibitors.

A large number of mutants and chimeras have been constructed in order to understand why CYP 2C9 and CYP 2C19 exhibit very different substrate selectivities, despite the fact that only 43 of 490 amino acids differ between these two closely related hemoproteins [18–21]. For instance, CYP 2C19 efficiently catalyzes the 4'-hydroxylation of (*S*)-mephenytoin [22,23] and the 5-hydroxylation of omeprazole [24,19], while CYP 2C9 exhibits very little activity toward either of these substrates. Studies of the CYP 2C9 and 2C19 mutants and chimeras showed that residues 99, 220, and 221 as well as residues 286, 289, 292, and 295 play a key role in these differences in behavior between CYP 2C9 and 2C19 [18–21]. On the basis of the structure of the closely related enzyme CYP 2C5 [25], it was proposed that these residues are unlikely to directly contact the substrate during catalysis but are positioned to influence the packing of substrate binding site and likely substrate access channels in the enzyme [18].

Returning to CYP 2C9 itself, several site-directed mutants have been constructed to investigate the importance of some residues of the 95–114 region, the substrate recognition site 1 (SRS1) according to Gotoh

[26], in the binding of CYP 2C9 substrates [19,27,28]. Mutation of Arg 97 led to a marked increase in the K_m of diclofenac 4'-hydroxylation; however, the most spectacular result was observed after mutation of Arg 108 to Ala, which led to a dramatic decrease in the diclofenac 4'-hydroxylation activity [28]. A recent combined protein and pharmacophore model for CYP 2C9 suggests that Arg 108 is a key residue in binding anionic and polar CYP 2C9 substrates [12], in agreement with mutagenesis results [28]. Arg 108 could thus be the protein residue responsible for the ionic or hydrogen bond interaction with the anionic or polar site of substrates. Mutation of Val 113 and Phe 114 showed that these residues should be involved in the hydrophobic binding of warfarin to CYP 2C9 [27]. Moreover, the corresponding results are consistent with Π -stacking of Phe 114 with aromatic substrates or inhibitors such as SPA.

The objective of the present study was to determine the residues of the CYP 2C9 active site that play a central role in three specific characteristics of CYP 2C9: (i) its inactivation by the selective mechanism-based inhibitor tienilic acid (TA) [29], (ii) its ability to hydroxylate diclofenac in a highly regioselective manner, at position 4' [5], and (iii) its particularly high affinity for its selective competitive inhibitor, SPA [30–35]. For that purpose, we have constructed some site-directed mutants of CYP 2C9 on the basis of previous mechanisms tentatively proposed to explain these characteristics of CYP 2C9 and of 3D homology models of CYP 2C9 deduced from the X-ray structure of CYP 2C5 [25].

Materials and methods

Chemicals

All chemicals used were of the highest quality commercially available. TA was provided by Anphar-Rolland (Chilly-Mazarin, France), diclofenac and SPA by Sigma (St. Quentin, Fallaviers, France).

Physical measurements

UV–visible spectra were recorded on a Kontron Uvikon 860 spectrophotometer equipped with a turbid sample accessory or on an Aminco DW-2 apparatus modified by Olis, Inc. ¹H NMR spectra were recorded at 27 °C on a Bruker ARX-250 instrument; chemical shifts are reported downfield from (CH₃)₄Si and coupling constants are in Hz. The abbreviations s, d, t, q, m, bs, and dd are used for singlet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, broad singlet, and doublet of doublet, respectively. Mass spectra (MS) were performed with chemical ionization (CI) using NH₃ on a Nermag R1010 apparatus.

² Abbreviations used: CI, chemical ionization; CYP, cytochrome P450; DMF, dimethylformamide; Et₂O, diethylether; SPA, sulfaphe-nazole; TA, tienilic acid; 3D, three-dimensional; SRS1, substrate recognition site 1.

Synthesis of SPA derivatives

SPA derivatives **1** and **2** (see formula in Table 4) were synthesized according to previously described procedures [34]. Compound **3** (4-allyl-*N*-(2-cyclohexyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-benzenesulfonamide) was prepared and characterized as follows.

2-Cyclohexyl-2*H*-pyrazol-3-ylamine was prepared as previously described [36]. 4-Bromobenzenesulfonyl chloride (400 mg, 1.56 mmol) was added to a solution of 2-cyclohexyl-2*H*-pyrazol-3-ylamine (250 mg, 1.51 mmol) in 2.5 ml of anhydrous pyridine. After 10 min at room temperature, the reaction mixture was heated for 75 min at 95 °C. The solvent was evaporated and the residue dissolved in 1 N NaOH. The aqueous phase was washed with CH₂Cl₂, acidified with 1 N HCl, and extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated. Three hundred and ten milligrams of 4-bromo-*N*-(2-cyclohexyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-benzenesulfonamide was obtained by crystallization and an additional 70 mg after purification of the mother liquor by column chromatography (SiO₂/CH₂Cl₂ and then +4% Et₂O) (65% yield); mp 234–235 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.63 (s, 4H), 7.37 (s, 1H), 6.29 (bs, 1H, NH), 5.63 (s, 1H), 4.20 (m, 1H), 1.85–1.67 (m, 7H), 1.40–1.18 (m, 3H). Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) was prepared a day before as previously described [37]. 4-Bromo-*N*-(2-cyclohexyl-2*H*-pyrazol-3-yl)-benzenesulfonamide (210 mg, 0.55 mmol) and the palladium(0) catalyst (36 mg) were introduced in a dry schlenck with septum and magnetic stirring. All the experiments were performed under argon. Five milliliters of anhydrous and deoxygenated DMF and 0.19 ml of allyltributyltin were introduced successively with a syringe. The solution was kept 0.5 h at room temperature, then heated at 110 °C for 15 h. DMF was evaporated. After purification by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ + 5%Et₂O) 140 mg of **3** were obtained and recrystallized from Et₂O; mp 164–165 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.67 (d, 2H, *J*=8.2), 7.35 (d, 1H, *J*=1.5), 7.31 (d, 2H, *J*=8.2), 6.19 (bs, 1H, NH), 5.91 (m, 1H), 5.66 (d, 1H, *J*=1.5), 5.10 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.44 (d, 2H, *J*=6.6), 1.9–1.66 (m, 7H), 1.33–1.16 (m, 3H); MS (CI, NH₃) *m/z* = 346 ([M + H]⁺, 78%); 166 (100%).

Biological materials

The TG1 *Escherichia coli* strain [*D(lac pro) supE thi hsdD5 F traD35 proAB LacIq LacZDM15*] was used for plasmid amplification. *Saccharomyces cerevisiae* strains W(N), W(R), and W(hR) and the yeast expression vector pYeDP60 were a gift from Pompon (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). W303-1B (MAT a; *ade2-1; his3-11, -15; leu2-3,-112; ura3-1; trp1-1*), designated as W(N), was described previously [38]. Yeast strain W(R) was constructed by substitution of the natural promoter of

the W303-1B gene encoding cytochrome P450 reductase by the galactose-inducible *GAL10-CYCI* hybrid promoter [39]. Yeast strain W(hR) was obtained from W(R) by replacing the gene of yeast cytochrome P450 reductase with that coding for human cytochrome P450 reductase [40]. CYP 2C9 expression vector (2C9V60) was constructed by insertion of CYP 2C9 cDNA in the pYeDP60 polylinker as reported previously [41]. Growth media for *E. coli* and *S. cerevisiae* were obtained from Difco (COGER, France) or Gibco-BRL (Cergy-Pontoise, France). Oligonucleotides were synthesized by Genome Express (Montreuil, France). Restriction endonucleases and DNA modification enzymes were of the best grade available. Plasmid DNA was isolated with the plasmid miniprep kit from Bio-Rad (Marnes la Coquette, France). NADPH, NADP, glucose 6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase were purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France).

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis of CYP 2C9 was performed by two successive PCRs followed by homologous recombination in yeast [42,43]. The primers used for mutagenesis are listed in Table 1. Two other primers were used for PCR, Pro (5'-ACGACACATGATCATATGGCATGCATGTGCTCTGTATGTATATAA-3') and Ter (5'-TCACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTTCGA-3'), annealing with either the promoter region or the terminator region of the CYP 2C9 expression vector pYeDP60. The first PCR was achieved with the mutagenic primer and either the promoter primer Pro (F94L, F110I, F114I) or the terminator primer Ter (F476I, S365A, S365G). The PCR conditions on a Minicycler (MJ Research) were an initial denaturation step for 2 min at 94 °C, 26 cycles of 40 s denaturation at 92 °C followed by 2 min annealing at 50 °C and 1.5 min extension at 72 °C and a final step of 5 min at 72 °C. The amplification product was then used in a second PCR with the terminator primer Ter (F94L, F110I, F114I) or the promoter primer Pro (F476I, S365A, S365G) in order to amplify the whole gene. The PCR conditions were 2 min pre-denaturation at 95 °C, followed by 24 cycles of 30 s at

Table 1
Oligonucleotides used in the mutagenesis of CYP 2C9

Codon change	Primer sequence
F94L	5'-GCCTCTTCCAGATA <u>ACT</u> CCTCTCTCCAAG-3'
F110I	5'-GAAAACAATTCCA <u>AAT</u> TCTCTGTAG-3'
F114I	5'-CTTTCATGCTGATAACAATCCAAATCC-3'
F476I	5'-AGTTGTCAATGG <u>ATT</u> GCCTCTGTGC-3'
S365A	5'-CTTCTCCCACCG <u>CC</u> CTGCCCATGCA-3'
S365G	5'-CTTCTCCCACCG <u>GC</u> CTGCCCATGCA-3'

Changed oligonucleotides are in bold. Codons for the changed amino acids are underlined. The first three primers are reverse oligonucleotides.

94 °C, 3 min at 68 °C, and 5 min at 72 °C. The final PCR product was cotransformed into yeast strain W(N) with the double-digested *Bam*HI/*Eco*RI plasmid expression vector pYeDP60. The DNA of the gap repair clones was extracted according to a method described previously [44] and electroporated into TG1 *E. coli*. All the selected plasmids were sequenced by Genome Express (Montreuil, France) to confirm incorporation of the desired mutation.

Yeast transformation, cell culture, and preparation of the yeast microsomal fraction

The expression system used for human liver P450s was based on a yeast strain, W(R), previously described [39], in which yeast cytochrome P450 reductase was over-expressed. Yeast transformation by the pYeDP60 vector containing *CYP 2C9* or mutated cDNAs was performed as described previously [39,44]. Yeast culture and microsome preparation were described elsewhere [45]. Microsomes were homogenized in 50 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA and 20% glycerol (v/v), aliquoted, frozen under liquid N₂, and stored at –80 °C until use. Microsomal P450 content was determined according to the method of Omura and Sato [46]. The NADPH–cytochrome P450 reductase activity was measured spectroscopically by the method of Vermilion and Coon [47], monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550 nm ($\epsilon_{550} = 21,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The protein content in microsomal suspensions was measured by the Lowry procedure [48] using bovine serum albumin as the standard.

Immunoblotting

Electrophoresis was carried out using a Bio-Rad Mini Protean II device. Proteins were separated on a 10% SDS–PAGE gel [49] and transferred to a nitrocellulose membrane using a Transblot semidry transfer cell from Bio-Rad. The membrane was blocked and probed as previously described [50] with a rabbit polyclonal anti-P450 2C antibody provided by P. Beaune (Inserm U490, Paris).

Study of substrate binding to yeast-expressed CYP 2C9 by difference visible spectroscopy

Difference visible spectra produced by SPA derivatives were recorded at room temperature with an Aminco DW-2 spectrophotometer, modified by Olis, Inc. Yeast microsomes were suspended in a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA, to obtain a P450 concentration of 0.1–0.15 μM . The solution was equally divided between two 500 μl quartz cuvettes (1-cm pathlength) and a baseline was recorded. Aliquots (1–5 μl) of Me₂SO solutions containing the studied compound were added to the sample cuvette, the same

volume of Me₂SO being added to the reference cuvette. The difference spectra were recorded between 380 and 520 nm [51].

Molecular modeling

A 3D model of CYP 2C9 was constructed using a procedure very similar to that recently reported [16–18] for 3D models of CYP 2C9 based on the structure of CYP 2C5 [25]. These enzymes have a sequence identity of 77% and a similarity of 83%, which makes CYP 2C5 a good template for the modeling of CYP 2C9. The Insight II software package (Biopolymer, Discover_3) from Molecular Simulations Inc. (San Diego, CA, USA) was used following a previously described protocol [52]. The coordinates of CYP 2C9 residues were assigned on the basis of the corresponding residues of CYP 2C5. The heme group was transferred from CYP 2C5 and fixed. The other part of the protein was energy minimized, using the module Discover_3 and the esff force field. The substrate was then placed in the distal binding pocket, in an orientation favorable to the experimentally observed product. A minimization was finally performed using the Discover_3 module. The quality of the model was assessed using the program Procheck [53], which calculates an overall score of the structure. The authors of this program consider that a protein model is of high quality when the normalized score is lower than 0.5. The score found for our CYP 2C9 model was 0.07 (to be compared with the score calculated for the CYP 2C5 X-ray structure: 0.01). Two other parameters calculated by this program confirmed the quality of the model: (i) the percentage backbone ϕ – ψ angles within the allowed Ramachandran region was 73% for the CYP 2C9 model, to be compared with 71.3% for the CYP 2C5 structure, and (ii) the numbers of structural features that differ from average values in known proteins were only 1 for bond angles, 1 for dihedral angles, and 0 for bond distances in our CYP 2C9 model.

Enzyme activity assays

General enzyme assay conditions. Incubations for metabolic activity with yeast microsomes were carried out at 28 °C, using glass tubes in a shaking bath. The incubation mixtures contained yeast microsomes, the substrate, and an NADPH-generating system (1 mM NADP⁺, 10 mM glucose 6-phosphate, and 2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase/ml) diluted in a 50 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA and 8% glycerol (final concentrations). In the particular cases of the S365A and S365G mutants, a 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.5 mM EDTA and 8% glycerol was used. Activity assays were routinely initiated ($t_0 = 0$ min) by addition of the NADPH-generating system to the incubation mixture

after 3 min of separate preincubation at 28 °C for temperature equilibration.

5-Hydroxylation of TA. Quantitation of 5-hydroxy TA was based on a spectrophotometric method [54] adapted to yeast microsomes expressing CYP 2C9 [55]. Incubations were carried out under the general conditions described above, with 0.1–0.2 μ M P450. At t_0 and regularly thereafter, aliquots (140 μ l) were taken and the reaction was quickly stopped by treatment with 70 μ l of a cold $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (10/1) mixture.

Inhibition studies of CYP 2C9 were performed at various concentrations of inhibitors (1–100 μ M) and five concentrations of TA in the range 5–400 μ M. The inhibitor dissolved in Me_2SO (final concentration 0.5%) and the substrate TA were added simultaneously to the incubation mixture. K_i values were derived from analyses of Lineweaver–Burk plots corresponding to the various enzymatic activities in the presence of increasing concentrations of inhibitor.

Diclofenac hydroxylation assay. Diclofenac (sodium salt) was incubated as described above at 28 °C in the presence of yeast microsomes, containing 0.05 μ M P450. At t_0 and regularly thereafter, aliquots (120 μ l) were taken and the reaction was quickly stopped by treatment with 60 μ l of a cold $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (10/1) mixture containing TA as internal standard (final concentration 5 μ M). Proteins were precipitated by centrifugation for 5 min at 10,000 rpm and the supernatant was stored at –40 °C until analysis. Formation of the metabolites was followed by reverse-phase HPLC (Spectra System AS 3000 autosampler). Supernatant aliquots were injected onto an X-Terra MS C18 column (Waters, France) (250 \times 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase (A, 25 mM NH_4HCO_3 buffer, pH 7.8/B, CH_3CN) was delivered at a rate of 1 ml per minute with the following gradient: $t = 0$ A/B (80/20), $t = 2$ min A/B (80/20), $t = 18$ min A/B (72/28), $t = 21$ min A/B (50/50), $t = 25$ min A/B (50/50), $t = 26$ min A/B (80/20), $t = 30$ min A/B (80/20). Monitoring of the column effluent was performed with a scanning Spectra Focus UV detector between 250 and 320 nm. In that system, retention times for 4'-hydroxydiclofenac, 5-hydroxydiclofenac, the internal standard TA and the substrate diclofenac were $R_t = 15, 19, 21,$ and 24 min, respectively.

Study of CYP 2C9 inactivation by TA

The experimental design to follow enzyme inactivation was based on general procedures previously described [56,57] that have been applied to demonstrate CYP 2C9 inactivation by TA [29]. Basically, microsomes (equivalent to 0.2 μ M P450) were preincubated under the general conditions already outlined with 10 μ M TA and an NADPH-generating system. At t_0 and regularly thereafter (from 0 to 45 min), parallel aliquots were removed from the incubation medium and were immedi-

ately processed to determine TA metabolite formation (140 μ l) and residual enzymatic activity (300 μ l).

Results

Choice, construction, and expression of CYP 2C9 mutants

Homology models of CYP 2C9 and CYP 2C19 have been constructed recently [16–18], on the basis of the X-ray structure of CYP 2C5 [25]. We also constructed such a tentative 3D model of CYP 2C9 by using almost identical procedures (see Materials and methods). The main structural characteristics of the active site of our model were very similar to those of the previously reported models [16–18]. An energy minimization was performed to place a diclofenac molecule into the active site of our CYP 2C9 model. This led to a complex in which the 4'-hydrogen of diclofenac was located approximately 5 Å from the heme iron (Fig. 1), a value in agreement with previous estimates for the iron-hydroxylation site distances in CYP 2C9–substrate complexes [10]. Moreover the positioning of diclofenac in close proximity to the two phenylalanine residues 114 and 476 was similar to the positioning of (*S*)-mephenytoin in the recently published model of the CYP 2C19–mephenytoin complex [18]. Since previous results have suggested the great importance of Π – Π interactions between substrate aromatic rings and CYP 2C9 aromatic residues in substrate recognition by CYP 2C9 [27,34], Phe 114 and 476 appeared as good candidates for such interactions (Fig. 1).

Mechanism-based inactivation of CYP 2C9 by TA is directly related to the covalent binding of an electrophilic metabolite of TA to the protein [29]. The nature of the nucleophilic residue of the protein involved in this covalent binding has never been determined. Since other closely related members of the CYP 2C subfamily, CYP 2C8 and CYP 2C18, hydroxylate TA without any inactivation [58], it was tempting to speculate that this different behavior is due to the lack of the protein nucleophilic residue responsible for covalent binding of CYP 2C9 to TA metabolites in CYP 2C8 and CYP 2C18. The only nucleophilic residue that is in good proximity to the substrate in the model of CYP 2C9 (Fig. 1), and that is replaced by nonnucleophilic residues in CYP 2C8 and CYP 2C18, is Ser 365.

For the aforementioned reasons, we decided to construct CYP 2C9 mutants at the level of Phe 476, Phe 114, and Ser 365. As two other phenylalanines (Phe 94 and 110) are present in the same region as Phe 114 (B–C loop), we also mutated the two former residues to more clearly establish the key role of Phe 114.

The six single-amino-acid mutants F94L, F110I, F114I, F476I, S365A, and S365G were constructed using a double PCR approach followed by homologous

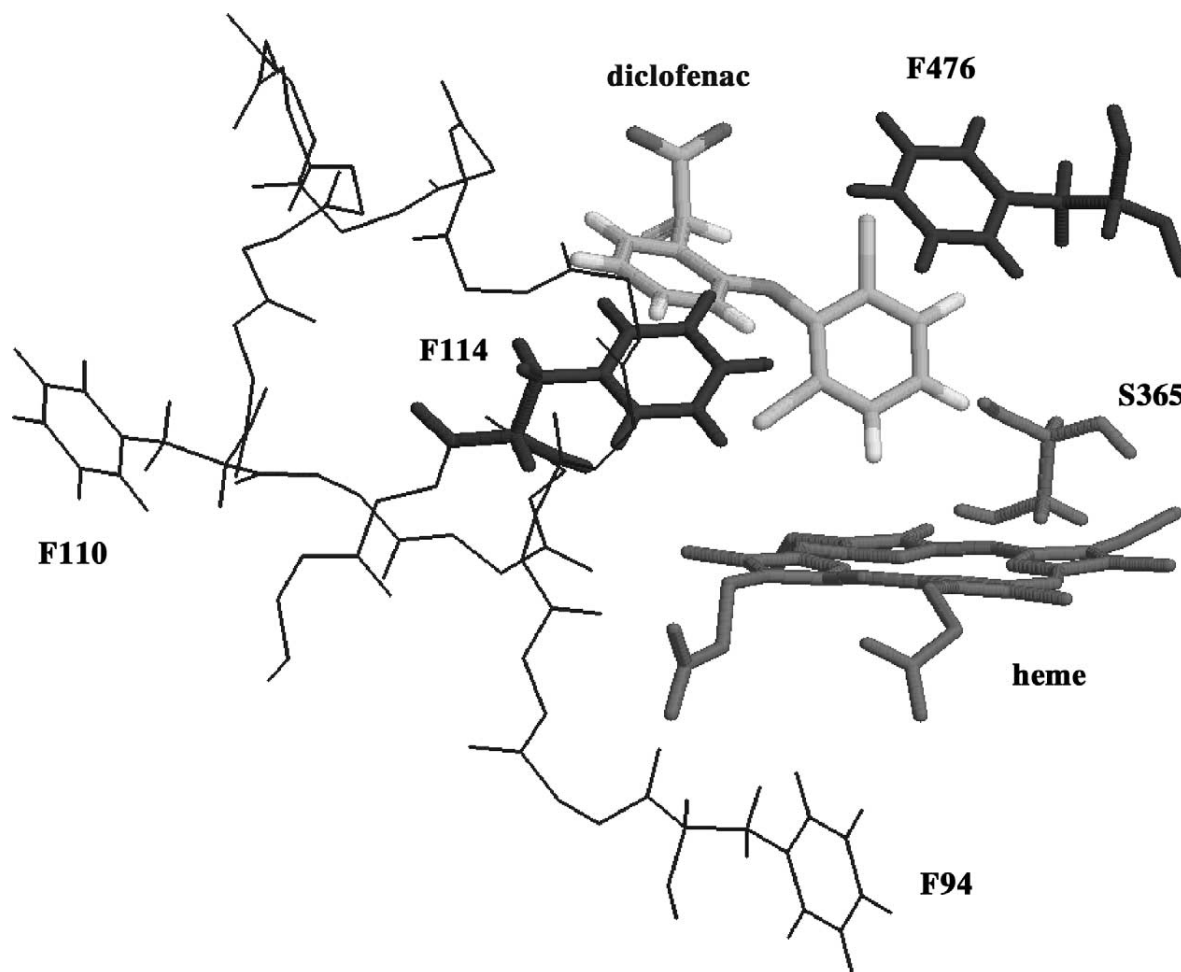


Fig. 1. Possible 3D model for the active site of the CYP 2C9–diclofenac complex. The indicated structure was proposed on the basis of a model deduced from the X-ray structure of CYP 2C5 [25], as described under Materials and methods. The phenyl groups of residues F114 and F476 appeared in close proximity to diclofenac (distances between their centers and those of the closest aryl ring of diclofenac between 5 and 7.5 Å), whereas those of F94 and F110 seemed to be outside the substrate binding site. The CH₂OH group of S365 appeared to be located just above the heme, at less than 8 Å from the site of hydroxylation of diclofenac.

recombination in yeast [42,43]. The F to L or I substitutions were chosen to preserve the hydrophobic nature of the region while eliminating the possibility of Π -stacking interaction. For residue 365, the S to A mutation was achieved to suppress the nucleophilic group with the least possible change in the corresponding region. Substitution of Ser 365 with a Gly residue was done because Gly 365 is present in CYP 2C8. All these mutants were expressed in the previously described yeast strain W(R), in which yeast cytochrome P450 reductase was overexpressed [39]. Immunoblot experiments showed that all the CYP 2C9 mutants were expressed in yeast W(R) (data not shown). In their Fe(II) state, all of them bound CO with the appearance of a 450-nm peak in difference visible spectroscopy. The levels of expression of those cytochromes P450 were similar (30–40 pmol/mg of microsomal protein) if one excepts F114I and S365G, which were expressed at significantly lower levels (Table 2).

Role of Ser 365 in CYP 2C9 catalytic activity and inactivation of TA

Both S365A and S365G mutants catalyzed the 5-hydroxylation of TA with K_m values that were very similar to that of CYP 2C9 (Table 3). The k_{cat} determined for TA 5-hydroxylation by S365A was slightly lower than that found for CYP 2C9, whereas it was sixfold lower in the case of S365G (Table 3). The most striking result was obtained by comparing the time courses of TA 5-hydroxylation by CYP 2C9 and its two mutants (Fig. 2). As previously described [29], formation of 5-hydroxy TA by CYP 2C9 was linear only for about 5 min as expected for mechanism-based inactivation (Fig. 2A). At the opposite end, formation of 5-hydroxy TA catalyzed by the S365A and S365G mutants was linear for at least 60 min (Figs. 2B and C), suggesting that mechanism-based inactivation did not occur to a significant extent in the case of these mutants. In order

Table 2
Levels of expression of cytochrome P450 and P450 reductase in W(R) yeast microsomes^a

CYP	P450 (pmol/mg)	Reductase activity ^b
2C9	40 ± 15	510 ± 130
F94L	37 ± 7	730 ± 90
F110I	38 ± 9	650 ± 40
F114I	13 ± 2	415 ± 15
F476I	30 ± 15	505 ± 100
S365A	40 ± 5	500 ± 60
S365G	15 ± 5 ^c	560 ± 30

^a Mean values ± SD from three microsomal preparations.

^b In nmol reduced cytochrome *c* min⁻¹ mg protein⁻¹.

^c In this case, the Soret peak of the Fe(II)–CO complex at 450 nm was accompanied by an intense peak at 420 nm (about 85% of the total cytochrome).

to confirm this result, the remaining activity of the S365A mutant was measured as a function of the time of preincubation with TA and NADPH, as previously described for demonstrating the mechanism-based inactivation of CYP 2C9 by TA [29]. Fig. 3A shows that the activity of CYP 2C9 remained constant after preincubation with NADPH alone (without TA), whereas it rapidly decreased after preincubation with TA and NADPH, 50% of the activity being lost after 6 min preincubation. At the opposite end, the catalytic activity of microsomes of the W(R) yeast expressing the S365A mutant did not significantly decrease after preincubation, neither with NADPH alone nor with TA and NADPH, even after 45 min preincubation (Fig. 3B).

Effects of Phe 94, 110, and 114 on the recognition of substrates and inhibitors by CYP 2C9

Replacement of Phe 94 and 110 with nonaromatic amino acid residues (Leu and Ile, respectively) did not change very much the catalytic properties of the protein toward TA and diclofenac, except for a moderate increase in the K_m values found for F110I (Table 3). Both the F94L and F110I mutants hydroxylated TA and diclofenac with regioselectivities identical to those of CYP 2C9. Replacement of Phe 114 with Ile led to much more dramatic effects, as the F114I mutant was unable to catalyze the hydroxylation of diclofenac (no detection

to catalyze the hydroxylation of diclofenac (no detection

Table 3
Kinetic characteristics for 5-hydroxylation of TA and 4'-hydroxylation of diclofenac by CYP2C9 and its mutants^a

CYP	5-Hydroxylation of TA			4'-Hydroxylation of diclofenac		
	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m
2C9	5 ± 1	4 ± 2	0.8	15 ± 5	53 ± 10	3.5
F94L	4.8 ± 1	5.2 ± 1	1.1	16 ± 5	33 ± 7	2.1
F110I	8.2 ± 2	4.8 ± 1	0.6	30 ± 4	72 ± 4	2.4
F114I	—	0.2 ± 0.2 ^b	—	—	<0.2 ^c	—
F476I	46 ± 9	36 ± 2	0.8	55 ± 8	93 ± 2	1.7
S365A	5.6 ± 0.6	1.7 ± 1	0.3	18 ± 4	50 ± 7	2.8
S365G	3.6 ± 0.5	0.65 ± 0.5	0.2	nd ^d	nd	nd

^a k_{cat} and K_m were estimated by nonlinear regression and analysis of the rate versus concentration; plots were obtained from activities of the microsomes of the W(R) yeast expressing CYP 2C9 and its mutants, as described under Materials and methods. K_m and k_{cat} are mean values ± SD, in μM and min⁻¹ respectively, from three experiments.

^b Activity in nmol 5-hydroxy TA (nmol P450)⁻¹ min⁻¹ observed for 100 μM TA. This activity level was too low to permit determination of K_m and k_{cat} .

^c No hydroxylation of diclofenac detected even at 500 μM substrate.

^d Not determined.

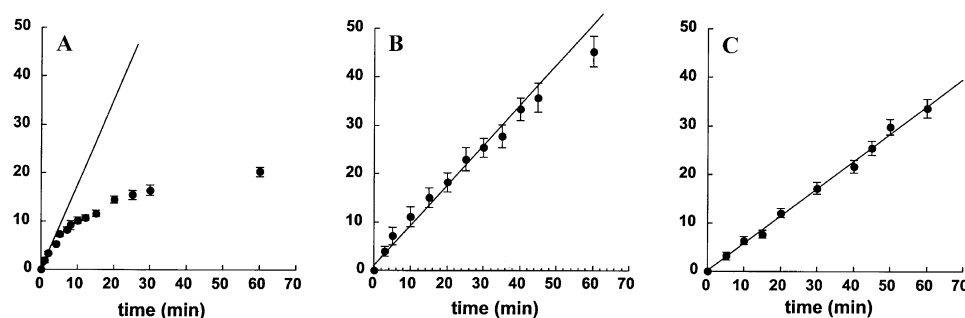


Fig. 2. Time course of 5-hydroxylation of TA by W(R) yeast strain expressing CYP 2C9 (A) or its S365A (B) and S365G (C) mutants. TA 5-hydroxylation was followed under standard conditions, using 100 μM TA, as described under Materials and methods. Values are means ± SD from three to five independent experiments. Ordinates in nmol 5-hydroxy TA (nmol P450)⁻¹.

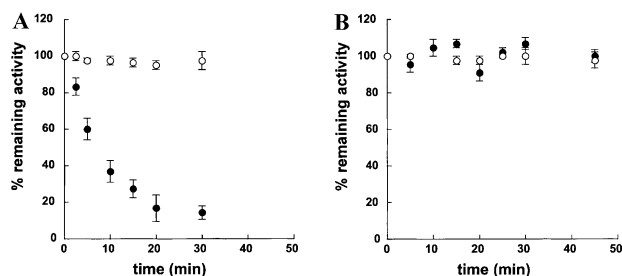


Fig. 3. Kinetics of inactivation of CYP 2C9 (A) and its S365A mutant (B) after preincubation with TA and NADPH. Microsomes from W(R) yeast expressing CYP 2C9 or its mutant were preincubated in the presence of NADPH alone (○) or of NADPH and 10 μ M TA (●). Their remaining activity after a given time of preincubation was measured as described in Materials and methods. These experiments were not done with microsomes of W(R) yeast expressing the S365G mutant, because of the much lower level of expression of the protein in this case.

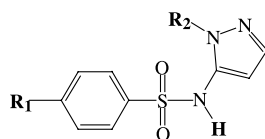
of 4'-hydroxydiclofenac even when using 500 μ M diclofenac). Moreover, this mutant led to only a low activity of 5-hydroxylation of TA, which did not allow us to determine the K_m and k_{cat} values.

The relatively low level of expression of the F114I mutant in the W(R) yeast (Table 2) was not sufficient to perform difference visible spectroscopic studies of its interaction with substrates and inhibitors. However, the level of expression of this CYP 2C9 mutant was high enough in another yeast strain, W(hR), which expresses human liver cytochrome P450 reductase instead of yeast cytochrome P450 reductase [40], for reasonable studies in visible spectroscopy. Table 4 compares the data obtained in a study of the interaction of a series of SPA derivatives with yeast microsomes containing either

CYP 2C9 or its F114I mutant, by difference visible spectroscopy. Previous studies [34,35] have shown that high affinity for CYP 2C9 was observed only with SPA and its derivatives in which the phenyl substituent (R_2 in Table 4) was replaced with a freely rotating and sufficiently electron-rich aryl group that could easily bind (Π -stacking interaction) to an aromatic amino acid residue of the protein [34]. Thus, the apparent spectral dissociation constant, K_s , of SPA toward CYP 2C9 was 0.4 μ M, whereas compound **1** exhibited a much lower affinity ($K_s = 120 \mu$ M) (Table 4) [34]. Interaction of these two compounds with CYP 2C9 led to typical "type II" difference spectra characterized by a peak at 425 nm, because of the binding of their NH_2 group (R_1 in Table 4) to the CYP 2C9 iron. The analogue of SPA in which the R_1 NH_2 group has been replaced by an allyl substituent, compound **2**, also bound to CYP 2C9 with a high affinity and led to a type I difference spectrum characterized by a peak at 390 nm. Its K_s value (0.5 μ M) was not significantly different from that of SPA, showing that the binding of the NH_2 group of SPA to CYP 2C9 iron is not an important determinant in the high affinity of SPA [34]. Interaction of SPA and its derivative **1** with microsomes of yeast expressing the F114I mutant also led to type II difference spectra, which should derive from coordination of their NH_2 group to P450 iron (Table 4). However, their affinities for this mutant and CYP 2C9 were completely different. The K_s value of SPA was about 500-fold higher for CYP 2C9 F114I than for CYP 2C9. Interestingly, at the opposite end, the K_s value of the cyclohexyl derivative **1** was about 100-fold lower for the mutant than for CYP 2C9 itself (Table 4). Thus, SPA strongly interacted with CYP

Table 4

Effects of SPA derivatives on the visible spectrum of microsomes from yeast expressing CYP 2C9 or its F114I mutant



(for SPA: $R_1 = NH_2$, $R_2 = \text{phenyl}$)

	R_1	R_2	2C9		F114I	
			$\lambda_{min}-\lambda_{max}^a$ (type) ^b	K_s^c (μ M)	$\lambda_{min}-\lambda_{max}^a$ (type) ^b	K_s (μ M) ^c
SPA	$-NH_2$	Phenyl	390–425 (II)	0.4 ± 0.1	395–425 (II)	190 ± 20
1	$-NH_2$	Cyclohexyl	395–425 (II)	120 ± 30	395–425 (II)	1.6 ± 0.5
2	$-CH_2-CH=CH_2$	Phenyl	420–390 (I)	0.5 ± 0.2	390–416 (RI)	>150
3	$-CH_2-CH=CH_2$	Cyclohexyl	390–418 (RI)	14 ± 5	385–417 (RI)	5 ± 1

^a Positions of the trough (λ_{min}) and peak (λ_{max}) of the different visible spectrum appearing after addition of each compound to a suspension of microsomes (0.1 μ M P450) from W(hR) yeast expressing CYP 2C9 (207 pmol/mg prot) or its mutant (124 pmol/mg prot) in a 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA.

^b I, II, and RI indicate type I, type II, and reverse type I difference spectra.

^c Spectral dissociation constants (K_s) were obtained by nonlinear regression analysis (Kaleidagraph 3.0). Values are means \pm SD from three experiments.

Table 5
Comparison of CYP 2C9 and its F476I mutant towards diclofenac 5-hydroxylation and their interaction with SPA

CYP	Diclofenac 5-hydroxylation ^a				Effects of SPA	
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	Ratio ($k_{\text{cat}} 4'\text{OH}/k_{\text{cat}} 5\text{OH}$) ^b	K_i (μM) ^c	K_s (μM) ^d
2C9	–	<0.1	–	>530	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
F476I	72 ± 13	28 ± 3	0.39	3.3	11 ± 1	20 ± 4
2C8 ^e	280 ± 30	7 ± 1	0.025	0.2	63 ± 9	nd ^f

^a Activity measured on microsomes of W(R) yeast expressing either CYP 2C9 or its mutant, as described under Materials and methods. Mean values \pm SD from three experiments.

^b k_{cat} values for 4'-hydroxylation of diclofenac were drawn from Table 3 for CYP 2C9 and its mutant, and from [5] for CYP 2C8.

^c K_i values for the inhibitory effects of SPA towards 5-hydroxylation of TA by CYP 2C9 and its mutant were determined as described in Materials and methods, mean values \pm SD from three experiments.

^d Spectral dissociation constants, K_s , were calculated from the difference spectra ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{min}} = 395 \text{ nm}$) observed upon titration of microsomes from W(R) yeast expressing either CYP 2C9 or its mutant; mean values \pm SD from three experiments.

^e Literature data from [5] and [33] for diclofenac 5-hydroxylation and K_i , respectively.

^f Not determined.

2C9, presumably because of a Π interaction between its phenyl substituent and the phenyl group of Phe 114, whereas it had a very low affinity for the F114I mutant. However, the Ile residue of this mutant seemed to better accommodate compound **1** which also bears a hydrophobic alkyl substituent. The opposite behaviors of SPA and its cyclohexyl derivative **1** toward CYP 2C9 and its mutant were also observed for compound **2** and its analogue **3**, in which the phenyl group has been replaced by a cyclohexyl substituent (synthesis of **3** is described under Materials and methods).

Effects of Phe 476 on the recognition of substrates and inhibitors by CYP 2C9

The F476I mutant exhibited a distinct behavior in TA and diclofenac hydroxylation compared to CYP 2C9 and the other mutants. It was as efficient as CYP 2C9 as a catalyst for TA 5-hydroxylation and only two times less efficient than CYP 2C9 for diclofenac 4'-hydroxylation (see the k_{cat}/K_m values of Table 3). However, for both substrates these high catalytic efficiencies, similar to those of CYP 2C9, resulted from a large increase in the K_m values (9- and 3.7-fold increase for TA and diclofenac hydroxylation, respectively) as well as from a large increase in the k_{cat} values (9- and 2-fold respectively; Table 3). The k_{cat} values observed for this mutant were remarkably high, particularly in the case of TA 5-hydroxylation for which the k_{cat} value of $36 \pm 2 \text{ min}^{-1}$ was the highest reported so far for such thiophene hydroxylations [54,58]. The F476I mutant also exhibited two other characteristics very different from those of CYP 2C9:

(1) It was much less regioselective for the hydroxylation of diclofenac, as it also hydroxylated this substrate at position 5 with a catalytic efficiency comparable to that of 4'-hydroxylation (similar K_m values and only three times lower k_{cat} for 5-hydroxylation; Tables 3 and 5). In fact, this ability of the CYP 2C9 F476I mutant to

5-hydroxylate diclofenac recalls the behavior of CYP2C8, which preferentially hydroxylates diclofenac at position 5 [5] (Table 5) and which also has an isoleucine residue at position 476. CYP 2C9 is highly regioselective for 4'-hydroxylation with a $k_{\text{cat}} 4'\text{OH}/k_{\text{cat}} 5\text{OH}$ ratio higher than 500, whereas the F476I mutant shows only a slight preference for 4'-hydroxylation with a ratio of 3.3, and CYP 2C8 prefers 5-hydroxylation, with a ratio of 0.2 (Table 5).

(2) SPA acted as a competitive inhibitor of the F476I mutant with a K_i value of $11 \pm 1 \mu\text{M}$ (Table 5), which is about 40 times larger than the K_i previously reported for CYP 2C9 [33]. The great decrease in affinity of SPA for CYP 2C9 upon replacement of Phe 476 with Ile, which is indicated by the above comparison of the K_i values, was completely confirmed by the determination of the K_s values of the complexes between SPA and either CYP 2C9 or its mutant. SPA led to type II difference spectra both with CYP 2C9 and with its mutant and the K_s value calculated for the F476I mutant was 50 times higher than that of CYP 2C9 (Table 5).

Discussion

Previously reported site-directed mutagenesis experiments performed either on CYP 2C9 or on CYP 2C19 have indicated that several residues of SRS1, namely Arg 97 [28], Ile 99 [19], Arg 108 [28], and Val 113 and Phe 114 [27], and of a region between SRS2 and SRS3, such as Ser 220 and Pro 221 [18,19], play important roles in the recognition, binding, and/or hydroxylation of substrates. Residues of helix I, Ser 286, Asn 289, Val 292, and Phe 295, also appear to play important roles in determining the substrate selectivities of CYP 2C9 and CYP 2C19 [18,20,21]. A recent homology model for CYP 2C9 based on the crystal structure of CYP 2C5 has suggested a role for Val 113, Phe 114, Leu 201, Asp 204, Ile 205, Asp 293, Ala 297, Leu 362, Leu 366, and Phe

476 in the interactions between CYP 2C9 and its substrates and inhibitors [16,17]. Even more recently, a combined protein and pharmacophore model for CYP 2C9 has proposed Arg 108, Phe 114 and Phe 476 as key residues responsible for substrate binding and selectivity [12]. According to this model, Arg 108 and Phe 476 would be involved in binding interactions with substrates through polar and hydrophobic interactions, respectively. Phe 114 was suggested to influence the orientation of Arg 108, thereby influencing the binding of substrates such as warfarin, although a direct interaction could be formed with certain substrates [12].

The results described in this article allowed us (i) to show that Ser 365 plays a key role in the mechanism-based inactivation of CYP 2C9 by TA; (ii) to demonstrate that Phe 114, a previously reported determinant of substrate selectivity of CYP 2C9 [27], strongly binds SPA, and presumably other CYP 2C9 substrates, via a Π -stacking interaction; and (iii) to provide the first experimental evidence that Phe 476 is a crucial residue in the binding of diclofenac, TA, and SPA to CYP 2C9 and for the regioselectivity of diclofenac hydroxylation.

The results concerning the S365A and S365G mutants (Table 3, Figs. 2 and 3) indicate that the Ser 365 residue of SRS5 is not directly involved in the binding of TA to CYP 2C9 (almost identical K_m values to that of CYP 2C9 for TA hydroxylation). However, removal of its nucleophilic OH function, as in S365A and S365G, suppresses the mechanism-based inactivation of CYP 2C9 by TA (Figs. 2 and 3). This result strongly suggests that the OH group of Ser 365 is the CYP 2C9 nucleophilic residue that reacts with the electrophilic metabolite derived from CYP 2C9 catalyzed oxidation of TA and leads to the inactivation of CYP 2C9 [29]. This would be in agreement with the lack of inactivation of CYP 2C8 and 2C18 during their catalysis of TA hydroxylation [58], as those two enzymes do not have a nucleophilic residue at position 365 (Ser 365 is replaced with Gly and Asn, respectively). Moreover, literature data from several studies concerning mutation of residues of the SRS5 region, such as Thr 364 in CYP 2C3 [59,60], Leu 373 in CYP 3A4 [61], and Val 367 in CYP 2B1 [62,63], and recent homology models [13,17] suggest that CYP 2C9 Ser 365 would be located in close proximity to the active site of CYP 2C9.

As far as the role of Phe residues of the SRS1 region in substrate recognition by CYP 2C9 is concerned, our data show that mutation of Phe 114 leads to by far the most dramatic effects. In fact, the F114I mutation results in a complete loss of the diclofenac hydroxylation activity (Table 3). This should be related with a dramatic increase in the K_s value of the diclofenac–F114I mutant complex, calculated from visible difference spectroscopy experiments ($K_s = 900$ instead of $3 \mu\text{M}$; data not shown). This spectacular decrease in the affinity of diclofenac, by two to three orders of magnitude, is comparable to that

found in the case of SPA ($K_s = 190$ instead of $0.4 \mu\text{M}$, Table 4). The much lower affinity of CYP 2C9 for the SPA derivative **1**, in which the R_2 phenyl group was replaced with a cyclohexyl group, than for SPA itself ($K_s = 120$ instead of $0.4 \mu\text{M}$), and the much higher affinity of the F114I mutant for **1** than for SPA ($K_s = 1.6$ instead of $190 \mu\text{M}$, Table 4) suggest that the interaction between the chain of residue 114 and the R_2 substituent of SPA plays a key role in the binding of SPA derivatives to CYP 2C9. Binding appears to be optimal when R_2 and the 114 chain are either both phenyl groups that may lead to a Π -stacking interaction (as in the CYP 2C9/SPA complex) or both alkyl groups that may lead to a hydrophobic interaction (as in the F114I/SPA derivative **1** complex). It is likely that this Π -stacking interaction involving Phe 114 also plays a key role in the binding of many aromatic substrates of CYP 2C9, in agreement with the much higher affinity of diclofenac for CYP 2C9 than for its F114I mutant and with the model of Fig. 1.

The results of Table 3 show that two other phenylalanines of SRS1, F94 and F110, are much less important in substrate binding and hydroxylation. The F94L mutation has no effect on the regioselectivity, K_m , or k_{cat} of the hydroxylations of TA and diclofenac. The F110I mutation leads only to a moderate increase in the K_m values. These results are in agreement with those previously reported for the F110L and F114L mutants of CYP 2C9 [27], as the former exhibited only small changes in its characteristics of (*S*)- and (*R*)-warfarin and diclofenac hydroxylation, whereas the latter showed big changes in the regioselectivity and kinetic parameters of (*S*)- and (*R*)-warfarin hydroxylation. Moreover, the F114L mutation led to a 50-fold decrease of the k_{cat}/K_m value for diclofenac hydroxylation and a 100-fold increase in the K_i for inhibition of CYP 2C9 activity by SPA [27]. In fact, the effects of the F114I mutation are even more dramatic, as it leads to a hemoprotein unable to hydroxylate diclofenac (Table 3) and to a 500-fold decrease in the affinity for SPA (Table 4). This could be due to the greater steric hindrance of the Ile chain compared to that of Leu.

Finally, our data provide the first experimental evidence that the F476 residue plays an important role in substrate recognition by CYP 2C9, as shown by (i) the great changes in the k_{cat} and K_m values for TA and diclofenac hydroxylation, (ii) the 37-fold increase in the K_i value for inhibition of CYP 2C9 by SPA, and (iii) the spectacular change in the regioselectivity of diclofenac hydroxylation that was observed after the F476I mutation (Tables 3 and 5). In fact, of all the mutants studied in this work, only F476I led to such a significant increase in diclofenac 5-hydroxylation. The importance of F476 in substrate recognition by CYP 2C9 was previously proposed on the basis of homology models of the protein [12]. A possible explanation of our data would be

that its phenyl residue is involved in Π -stacking interactions with the aromatic rings of TA, diclofenac (Fig. 1), and SPA, as suggested by the increase in the K_m values for hydroxylation of the two former compounds and in the K_i value of the latter.

The spectacular increase in the k_{cat} values for hydroxylation of TA is more difficult to understand. The hypothesis of an important role for SRS6 in the control of the rates of CYP 2C9-catalyzed hydroxylations is currently under study.

References

- [1] F.P. Guengerich, in: P.R.O. de Montellano (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, Plenum Press, New York, 1995, pp. 534–574.
- [2] C. Ged, D.R. Umbenhauer, T.M. Bellew, R.W. Bork, P.K. Srisvastava, N. Shinriki, R.S. Lloyd, F.P. Guengerich, *Biochemistry* 27 (1988) 6929–6940.
- [3] M. Romkes, M.B. Faleto, J.A. Blaisdell, J.L. Raucy, J.A. Goldstein, *Biochemistry* 30 (1991) 3247–3255.
- [4] J.O. Miners, D.J. Birkett, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45 (1998) 525–538.
- [5] A. Mancy, M. Antignac, C. Minoletti, S. Dijols, V. Mouries, N.T.H. Duong, P. Battioni, P.M. Dansette, D. Mansuy, *Biochemistry* 38 (1999) 14264–14270.
- [6] L.S. Kaminsky, S.M.F. de Morais, M.B. Faleto, D.A. Dunbar, J.A. Goldstein, *Mol. Pharmacol.* 43 (1993) 234–239.
- [7] A.D. Smith, B.C. Jones, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 2089–2098.
- [8] A. Mancy, P. Broto, S. Dijols, P.M. Dansette, D. Mansuy, *Biochemistry* 34 (1995) 10365–10375.
- [9] J.P. Jones, M. He, W.F. Trager, A.E. Rettie, *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996) 1–6.
- [10] S. Poli-Scaife, R. Attias, P.M. Dansette, D. Mansuy, *Biochemistry* 36 (1997) 12672–12682.
- [11] M. He, K.R. Korzekwa, J.P. Jones, A.E. Rettie, W.F. Trager, *Arch. Biochem. Biophys.* 372 (1999) 16–28.
- [12] M.J. De Groot, A.A. Alex, B.C. Jones, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 1983–1993.
- [13] D.F.V. Lewis, M. Dickens, R.J. Weaver, P.J. Eddershaw, P.S. Goldfarb, M.H. Tarbit, *Xenobiotica* 28 (1998) 235–268.
- [14] V.A. Payne, Y.T. Chang, G.H. Loew, *Protein Struct. Funct. Genet.* 37 (1999) 176–190.
- [15] S. Rao, R. Aoyama, M. Schrag, W.F. Trager, A. Rettie, J.P. Jones, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2789–2796.
- [16] L. Afzelius, I. Zamora, M. Ridderstrom, T.B. Andersson, A. Karlen, C.M. Masimirembwa, *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 909–919.
- [17] M. Ridderstrom, I. Zamora, O. Fjellstrom, T.B. Andersson, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4072–4081.
- [18] C.C. Tsao, M.R. Wester, B. Ghanayem, S.J. Coulter, B. Chanas, E.F. Johnson, J.A. Goldstein, *Biochemistry* 40 (2001) 1937–1944.
- [19] G.C. Ibeanu, B.I. Ghanayem, P. Linko, L.P. Li, L.G. Pedersen, J.A. Goldstein, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12496–12501.
- [20] T.S. Klose, G.C. Ibeanu, B.I. Ghanayem, L.G. Pedersen, L.P. Li, S.D. Hall, J.A. Goldstein, *Arch. Biochem. Biophys.* 357 (1998) 240–248.
- [21] F. Jung, K.J. Griffin, W. Song, T.H. Richardson, M. Yang, E.F. Johnson, *Biochemistry* 37 (1998) 16270–16279.
- [22] S.M. de Morais, G.R. Wilkinson, J. Blaisdell, K. Nakamura, U.A. Meyer, J.A. Goldstein, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15419–15422.
- [23] J.A. Goldstein, M.B. Faleto, M. Romkes-Sparks, T. Sullivan, S. Kitareewan, J.L. Raucy, J.M. Lasker, B.I. Ghanayem, *Biochemistry* 33 (1994) 1743–1752.
- [24] W.G. Karam, J.A. Goldstein, J.M. Lasker, B.I. Ghanayem, *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996) 1081–1087.
- [25] P.A. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E.F. Johnson, D.E. McRee, *Mol. Cell.* 5 (2000) 121–131.
- [26] O. Gotoh, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 83–90.
- [27] R.L. Haining, J.P. Jones, K.R. Henne, M.B. Fisher, D.R. Koop, W.F. Trager, A.E. Rettie, *Biochemistry* 38 (1999) 3285–3292.
- [28] M. Ridderstrom, C. Masimirembwa, S. Trump-Kallmeyer, M. Ahlefeldt, C. Otter, T.B. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (2000) 983–987.
- [29] M.P. Lopez-Garcia, P.M. Dansette, D. Mansuy, *Biochemistry* 33 (1994) 166–175.
- [30] J.O. Miners, K.J. Smith, R.A. Robson, M.E. McManus, M.E. Veronese, D.J. Birkett, *Biochem. Pharmacol.* 37 (1988) 1137–1144.
- [31] M.E. Veronese, J.O. Miners, D. Randles, D. Gregov, D.J. Birkett, *Clin. Pharmacol. Ther.* 47 (1990) 403–411.
- [32] S.J. Baldwin, J.C. Bloomer, G.J. Smith, A.D. Ayrton, S.E. Clarke, R.J. Chenery, *Xenobiotica* 25 (1995) 261–270.
- [33] A. Mancy, S. Dijols, S. Poli, F.P. Guengerich, D. Mansuy, *Biochemistry* 35 (1996) 16205–16212.
- [34] N.T. Ha-Duong, C. Marques-Soares, S. Dijols, M.A. Sari, P.M. Dansette, D. Mansuy, *Arch. Biochem. Biophys.* 394 (2001) 189–200.
- [35] N.T. Ha-Duong, S. Dijols, C. Marques-Soares, C. Minoletti, P.M. Dansette, D. Mansuy, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3622–3631.
- [36] L. Salazar, M. Espada, C. Avendano, R.M. Claramunt, D. Sanz, J. Elguero, *J. Org. Chem.* 57 (1992) 1563–1567.
- [37] D.R. Coulson, *Inorg. Synth.* 28 (1990) 107.
- [38] B.J. Thomas, R. Rothstein, *Cell* 56 (1989) 619–630.
- [39] G. Truan, C. Cullin, P. Reisdorf, P. Urban, D. Pompon, *Gene* 125 (1993) 49–55.
- [40] P. Urban, G. Truan, J.C. Gautier, D. Pompon, *Biochem. Soc. Trans.* 21 (1993) 1028–1034.
- [41] P. Urban, C. Cullin, D. Pompon, *Biochimie* 72 (1990) 463–472.
- [42] H. Ma, S. Kunes, P.J. Schatz, D. Botstein, *Gene* 58 (1987) 201–216.
- [43] D. Pompon, A. Nicolas, *Gene* 83 (1989) 15–24.
- [44] D. Gietz, A. St. Jean, R.A. Woods, R.H. Schiestl, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 1425.
- [45] A. Bellamine, J.C. Gautier, P. Urban, D. Pompon, *Eur. J. Biochem.* 225 (1994) 1005–1013.
- [46] T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* 237 (1964) 1375–1376.
- [47] J.L. Vermilion, M.J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60 (1974) 1315–1322.
- [48] O.H. Lowry, N.J. Rosebrought, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [49] U. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [50] J.P. Renaud, C. Cullin, D. Pompon, P. Beaune, D. Mansuy, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 889–896.
- [51] C.R. Jefcoate, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 258–279.
- [52] M. Spatzenegger, Q. Wang, Y.Q. He, M.R. Wester, E.F. Johnson, J.R. Halpert, *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 475–484.
- [53] R.A. Laskowski, M.W. Mac Arthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [54] E. Neau, P.M. Dansette, V. Andronik, D. Mansuy, *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990) 1101–1107.
- [55] M.P. Lopez-Garcia, P.M. Dansette, P. Valadon, C. Amar, P.H. Beaune, F.P. Guengerich, D. Mansuy, *Eur. J. Biochem.* 213 (1993) 223–232.
- [56] R.B. Silverman, *Methods Enzymol.* 249 (1995) 240–283.
- [57] U.M. Kent, S. Yanev, P.F. Hollenberg, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 317–322.

- [58] P. Jean, P. Lopez-Garcia, P. Dansette, D. Mansuy, J.L. Goldstein, *Eur. J. Biochem.* 241 (1996) 797–804.
- [59] T.H. Richardson, E.F. Johnson, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23937–23943.
- [60] M.H. Hsu, K.J. Griffin, Y. Wang, B. Kemper, E.F. Johnson, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 6939–6944.
- [61] K.K. Khan, J.R. Halpert, *Arch. Biochem. Biophys.* 373 (2000) 335–345.
- [62] Y.A. He, Z.S. Luo, P.A. Klekotka, V.L. Burnett, J.R. Halpert, *Biochemistry* 33 (1994) 4419–4424.
- [63] Y.Q. He, Y.A. He, J.R. Halpert, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 574–579.

II.C RESULTATS ET DISCUSSION

II.C.1 Construction et expression des mutants du CYP2C9

Au laboratoire, nous utilisons le vecteur d'expression dans la levure pYeDP60, pour produire les CYP2C recombinants (cf. Matériel et Méthodes). Trois stratégies de mutagenèse ont été envisagées pour ce travail :

- A) PCR d'un fragment de l'ORF contenant le résidu à muter et clonage par ligation dans notre vecteur d'expression p2C9DP60.
- B) Utilisation du kit de mutagenèse Quickchange (Stratagene) qui permet d'amplifier par PCR la totalité du plasmide muté (cf. V.B.1.a).
- C) Double PCR et clonage par recombinaison homologue dans la levure (cf. V.B.1.b).

Stratégie	Mutagenèse par PCR		clonage	Région séquencée
	Nombre de PCR	Région amplifiée		
A	1	Fragment de l'ORF contenant le résidu à muter	Par ligation du fragment de PCR dans le vecteur	Le fragment d'ORF amplifié par PCR
B	1	La totalité du vecteur d'expression p2C9DP60	-	La totalité de l'ORF
C	2	L'ORF + une partie du promoteur et du terminateur pour la recombinaison	Par recombinaison homologue dans la levure	La totalité de l'ORF

Tableau 18 : Les trois stratégies envisagées pour la construction des mutants du CYP2C9. Une fois construit, le plasmide muté est transformé dans la souche TG1 d' *E. coli*. L'ADN des transformants est ensuite analysé par séquençage pour vérifier l'incorporation de la mutation.

Les deux premières stratégies semblaient a priori les plus rapides; la méthode B ne nécessite aucun clonage puisque la totalité du plasmide muté est amplifiée par PCR, par contre il faut séquencer la totalité de l'ORF pour vérifier qu'aucune mutation indésirable n'a été introduite pendant cette PCR; La méthode A nécessite deux étapes (PCR + clonage) mais elle permet de réduire la taille du fragment d'ADN à analyser par séquençage. Enfin, la méthode C est a priori la plus longue : elle nécessite deux PCR plus une étape de recombinaison homologue dans la levure et le séquençage de l'ORF. Pourtant, c'est cette méthode qui en pratique a abouti le plus rapidement.

Malgré plusieurs tentatives, les deux premières stratégies n'ont pas permis d'obtenir un plasmide muté. Dans les deux cas, le facteur limitant était la taille de notre vecteur d'expression (11kb) :

- L'efficacité de ligation d'un petit insert dans un vecteur chute avec la taille du vecteur.
- Le kit Quickchange était conçu pour des plasmides de taille inférieure à 10kb (le kit Quickchange pour plasmides de grande taille n'était pas encore en vente). Nous n'avons pas réussi à amplifier sans erreur la totalité du vecteur, sur un nombre d'expériences limité*.

Pour réussir à muter le CYP2C9 par ces deux premières méthodes, nous aurions pu sous-cloner l'ORF du CYP2C9 dans un plus petit plasmide comme pUC19 et le réinsérer après mutagenèse dans notre vecteur d'expression. Nous n'avons pas eu recours au sous-clonage et n'avons pas cherché à optimiser la méthode B car la méthode C a donné des résultats rapidement.

* Schloch et al. ont réussi à muter le P450 de plante CYP73A1 cloné dans le vecteur pYeDP60 avec le kit Quickchange. Les conditions expérimentales sont détaillées dans l'article correspondant Schloch et al., 2003.

Nous avons finalement choisi la stratégie C qui s'est avérée bien adaptée à notre système d'expression (vecteur de grande taille 11 kb et aptitude au gap repair de la levure, cf. partie V.B.1 du Matériel et Méthodes).

Les mutants du CYP2C9, une fois construits, ont été exprimés dans la levure W(R) (cf. partie V.C du Matériel et Méthodes). Toutes les préparations expriment du P450 détectable en immunoblot (Figure 35) et par spectroscopie à 450 nm en présence de CO et de dithionite.

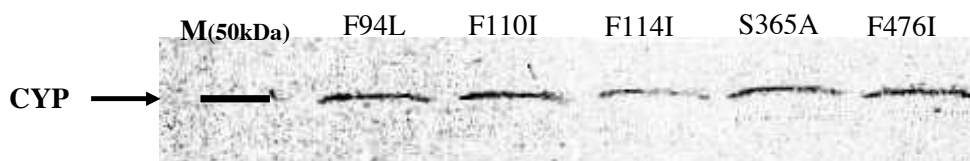


Figure 35 : Immunodétection des CYP microsomaux en présence d'anticorps polyclonaux anti-2C. 50 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits. M : marqueur de taille.

Les mutants F94L, F110I et F476I ont des taux d'expression en P450 comparables à ceux du CYP2C9 alors que F114I et S365G sont plus faiblement exprimés (cf. Tableau 2 de l'article). La mutation S365G conduit à une hémoprotéine très instable comme en témoigne l'absorption intense à 420 nm en présence de CO et de dithionite.

Les rapports de la quantité de réductase sur la quantité de P450 des mutants F94L, F110I, et S365A sont comparables à celui du CYP2C9 (environ 2 :1) et 2,5 plus importants pour les mutants F114I et S365G. La quantité de réductase est donc suffisante pour le fonctionnement catalytique des différents P450. Ces résultats nous assurent de ne pas introduire de biais dans l'analyse des différences d'activité entre le CYP2C9 et ses mutants.

CYP	2C9	F94L	F110I	F114I	F476I	S365A	S365G
[réductase]/[P450]	1,7	2,6	2,3	4,3	2,2	1,7	5

Tableau 19 : Rapports molaires réductase/P450 des microsomes de levure contenant le CYP2C9 et ses différents mutants. La quantité de réductase a été calculée à partir de l'activité réductase en utilisant l'activité spécifique de la P450 réductase de levure dans nos conditions d'incubation (7500 nmol/min/nmol de réductase; Louerat-Oriou et al., 1998).

L'étude de ces mutants nous permet d'énoncer les conclusions suivantes :

- i) Le résidu nucléophile S365 du SRS5 est impliqué dans l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique.
- ii) La phénylalanine 114 du SRS1 forme une interaction de type π - π avec un noyau aromatique du sulfaphénazole, du diclofénac et vraisemblablement d'autres substrats du CYP2C9 (acide tiénilique, warfarine : Haining et al. 1999).
- iii) Enfin, nous apportons la première preuve expérimentale du rôle clé de la phénylalanine 476 du SRS6 dans la reconnaissance du diclofénac, de l'acide tiénilique et du sulfaphénazole et la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac.

Nous allons discuter successivement ces différents points.

II.C.2 Rôle de la sérine 365 dans l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique

Jusqu'à présent peu de sites de fixation de substrats suicides de P450 ont été identifiés (Kedzie et al., 1991; Von Wachenfeldt and Johnson, 1995; He et al. 1995; Roberts et al., 1996) car les techniques de marquage du site actif posent souvent problème (par exemple la dégradation des adduits au cours des purifications par HPLC) (Kent et al., 2001). Dans cette étude, nous avons pu identifier le résidu responsable de l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique, par mutagenèse dirigée.

Nos résultats montrent que la sérine 365 n'est pas impliquée dans la fixation de l'acide tiénilique ou du diclofénac dans le site actif du CYP2C9. En effet, les mutants S365A et S365G ont des constantes K_m similaires à celles de l'enzyme sauvage avec ces deux substrats. En revanche, ce résidu semble important pour l'inactivation suicide du CYP2C9 observée au cours de la métabolisation de l'acide tiénilique. La mutation de la sérine 365 en acides aminés non-nucléophiles (alanine ou glycine) supprime cette inactivation suicide. Les mutants S365A et S365G ont alors des cinétiques de 5-hydroxylation de l'acide tiénilique linéaires sur 40 min (au lieu de 5 minutes dans le cas du CYP2C9) et ne sont pas inhibés par une préincubation en présence d'acide tiénilique 10 μ M et de NADPH (contrairement au 2C9 qui a un temps de demi-vie de 6 minutes seulement dans des conditions opératoires similaires). **La sérine 365 serait donc le résidu nucléophile du site actif du CYP2C9 impliqué dans la fixation covalente du métabolite électrophile de l'acide tiénilique et l'inactivation consécutive de l'enzyme** (Figure 36).

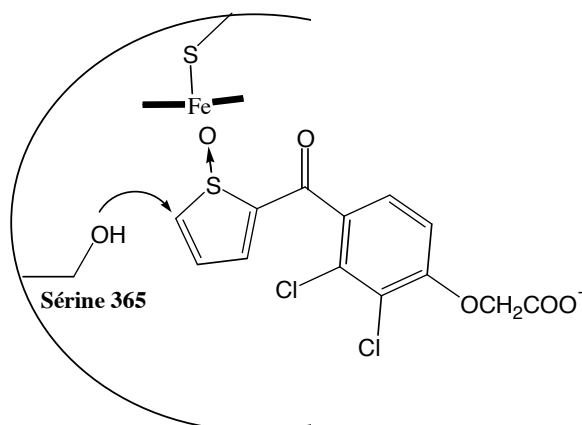


Figure 36 : Proposition de mécanisme d'inactivation suicide du CYP2C9 au cours de la métabolisation de l'acide tiénilique : la sérine 365 se fixe de manière covalente sur le métabolite électrophile de l'acide tiénilique, inactivant ainsi l'enzyme irréversiblement.

La nature de ce résidu 365 pourrait expliquer les différences de comportement des CYP2C vis-à-vis de l'acide tiénilique. Une sérine 365 est également présente dans le CYP2C19 mais elle est remplacée par une glycine dans le CYP2C8 ou une asparagine dans le CYP2C18. Dans le cas du CYP2C19, la faible activité d'hydroxylation de l'acide tiénilique peut s'interpréter de deux manières : son incapacité à reconnaître et métaboliser ce substrat ou, au contraire, une métabolisation très rapide de l'acide tiénilique avec inactivation immédiate de l'enzyme (via la sérine 365). Quant aux CYP2C8 et 2C18, ils ne possèdent pas de résidu nucléophile en position 365, ce qui expliquerait qu'ils ne soient pas inactivés par ce substrat.

Nos résultats de mutagenèse de la sérine 365 sont en accord avec des expériences antérieures de marquage du site actif à partir d'acide tiénilique radioactif (C^{14}). Cette étude effectuée au laboratoire avait permis d'identifier un peptide marqué (résidu 289 à 480) qui contient la sérine 365. Des études récentes de modélisation moléculaire placent ce résidu dans le site actif de l'enzyme (Lewis, 1998; Ridderstrom et al., 2001). Par ailleurs, des données de mutagenèse montrent le rôle important des résidus alignés avec la sérine 365 dans la spécificité de substrats d'autres P450 (Thr365 dans le CYP2C3 (Richardson and Johnson, 1994), et Leu373 dans le CYP3A4 (Khan and Halpert, 2000)). Ces données sont un argument supplémentaire pour situer la sérine 365 dans le site actif du CYP2C9 ce qui conforte nos résultats.

II.C.3 Effets des mutations des phénylalanines 94, 110, 114 et 476 sur la reconnaissance des substrats et inhibiteurs par le CYP2C9 : importance des résidus 114 et 476

Afin d'étudier l'interaction hydrophobe aromatique du CYP2C9 avec ses ligands, nous avons muté trois phénylalanines du SRS1 (Phe94, Phe110, Phe114) et une phénylalanine du SRS6 (Phe476).

Les résidus 94 et 110 ne semblent pas importants pour la fixation et l'hydroxylation des substrats du CYP2C9. En effet, les mutations F94L et F110I ne modifient pas les régiosélectivités d'hydroxylation de l'acide tiénilique et du diclofénac. Elles n'ont pas (F94L) ou peu d'effet (F110I) sur les constantes cinétiques de l'enzyme envers ces deux substrats.

Par contre, la mutation F114I a des conséquences beaucoup plus spectaculaires. Le mutant F114I a une très faible activité d'hydroxylation de l'acide tiénilique et ne semble pas métaboliser le diclofénac même lorsque la concentration en substrat est de $500\mu\text{M}$. Cette perte d'activité d'hydroxylation du diclofénac est due à une diminution considérable d'affinité pour ce substrat : la constante de dissociation, K_s , du complexe F114I-diclofénac mesurée par spectroscopie différentielle UV-visible est de $900\mu\text{M}$ au lieu de $3\mu\text{M}$ pour l'enzyme sauvage.

Une perte d'affinité comparable est observée avec l'inhibiteur sulfaphénazole ($K_s=190\mu\text{M}$ au lieu de $0,4\mu\text{M}$). Le sulfaphénazole à groupement R_2 =phényle est bien mieux reconnu par le CYP2C9 sauvage que par le mutant F114I. A l'inverse, le dérivé **1** du sulfaphénazole à groupement R_2 =cyclohexyle, a une bien meilleure affinité pour le mutant F114I que pour le CYP2C9 ($K_s=1,6\mu\text{M}$ au lieu de $120\mu\text{M}$). Cette différence d'affinité entre dérivés à groupement R_2 =phényle ou R_2 =cyclohexyle est confirmée avec la molécule **2** et son analogue **3**.

Ces résultats soulignent l'importance de l'acide aminé 114 dans l'interaction avec le groupement R_2 du sulfaphénazole. Cette interaction est optimale lorsque la chaîne latérale du résidu 114 et le groupement R_2 sont deux noyaux aromatiques formant une interaction π - π , ou deux groupements alkyles formant une interaction hydrophobe entre chaînes. **Le résidu 114 joue donc un rôle clé dans une interaction de type π - π avec l'inhibiteur sulfaphénazole et le substrat aromatique diclofénac**, en accord avec la perte d'affinité du mutant F114I pour ces molécules.

Ces conclusions corroborent des données antérieures de la littérature concernant les mutants F110L et F114L. Haining et al. ont montré que la mutation F110L a peu d'effets sur le métabolisme du diclofénac et de la (R) et (S)-warfarine (Haining et al., 1999). La mutation F114L ne modifie pas le métabolisme de l'acide laurique, un substrat aliphatique, par contre, elle affecte de façon importante la régiosélectivité et les constantes cinétiques d'hydroxylation de la warfarine, un substrat aromatique. L'efficacité catalytique d'hydroxylation du diclofénac est divisée par 50 par rapport à l'enzyme sauvage et la constante d'inhibition K_i du sulfaphénazole est augmentée d'un facteur 100. Dans notre cas, la mutation F114I a des effets encore plus marqués puisque le mutant ne métabolise plus le diclofénac et a une affinité pour le sulfaphénazole diminuée d'un facteur 500. Ces différences seraient dues à l'encombrement stérique plus important de Ile par rapport à Leu.

Enfin, la mutation F476I apporte trois modifications majeures par rapport au CYP2C9 sauvage :

- i) une augmentation nette des K_m et k_{cat} d'hydroxylation de l'acide tiénilique (K_m et k_{cat} multipliées par 9) et du diclofénac (K_m multipliée par 4 et k_{cat} par 2)
- ii) une perte d'affinité pour le sulfaphénazole (K_i multipliée par 40 et K_s par 50)
- iii) une diminution de régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac.

Le mutant F476I est beaucoup moins régiosélectif que le CYP2C9 pour l'hydroxylation du diclofénac puisqu'il hydroxyle également ce substrat en position 5 avec une K_m comparable à celle de la 4'-hydroxylation. La capacité de 5-hydroxylation du diclofénac par le mutant F476I se rapproche de celle du CYP2C8 qui comporte un résidu isoleucine en position 476. En effet, le CYP2C9 est très régiosélectif pour la 4'-hydroxylation avec un rapport $k_{cat}_{4'OH}/k_{cat}_{5OH}$ supérieur à 530 ; par contre, le mutant F114I n'a qu'une légère préférence pour la 4'-hydroxylation et le CYP2C8 une légère préférence pour la 5-hydroxylation avec des rapports $k_{cat}_{4'OH}/k_{cat}_{5OH}$ de 3,3 et 0,2 respectivement.

D'après ces résultats et en tenant compte de nos modèles, **Phe476 serait impliqué dans un π -stacking avec les noyaux aromatiques de substrats** tels que l'acide tiénilique, le diclofénac et de l'inhibiteur sulfaphénazole. La mutation de ce résidu en isoleucine supprimerait cette interaction ce qui expliquerait l'augmentation des K_m constatée avec les différentes molécules aromatiques testées. L'étude complémentaire d'une série de mutants F476X (X=A, E, R, H, W) a confirmé le rôle clé de Phe476 dans la reconnaissance de l'acide tiénilique et du diclofénac (cf. Annexe D). Cependant, l'augmentation très importante des k_{cat} d'hydroxylation de l'acide tiénilique, que l'on observe avec les mutants F476I et F476A, reste difficile à expliquer à l'heure actuelle (cf. Annexe D).

Pour conclure, des modèles récents du CYP2C9 construits à partir de la structure RX du CYP2C5 de lapin, (au laboratoire ou par d'autres équipes), ont suggéré l'importance des deux phénylalanines, Phe114 et Phe476, dans la reconnaissance spécifique de molécules par le CYP2C9 (Ridderstrom et al., 2001; De Groot et al., 2002). Nos résultats de mutagenèse confortent ces modèles puisque la mutation de ces résidus affecte le métabolisme de l'acide tiénilique et du diclofénac (augmentations de K_m) et entraîne une perte de reconnaissance de l'inhibiteur sulfaphénazole. Dans leur article de modélisation, De Groot et al. ont proposé l'implication de trois résidus Arg108, Phe114 et Phe476 dans une interaction électrostatique ou hydrophobe avec les substrats ou inhibiteurs du CYP2C9. Selon les auteurs, Arg108 et Phe 476 seraient en interaction directe avec les substrats (ex : le diclofénac) mais pas Phe 114 qui aurait plutôt une influence indirecte via l'orientation de Arg108. Une interaction directe pourrait cependant exister entre Phe114 et certains substrats de plus grande taille comme la warfarine (De Groot et al., 2002). Dans notre étude, nous apportons la preuve d'une interaction directe entre le sulfaphénazole et Phe 114. Contrairement à De Groot et al., notre modèle suggère que le diclofénac formerait également une interaction directe, de type π - π , avec le CYP2C9. Notre hypothèse est renforcée par la publication récente de la structure RX du complexe CYP2C5/3LVdH-diclofénac (Wester et al., 2003b)(Figure 37). En effet, dans cette structure, le CYP2C5 établit deux interactions aromatiques de type π - π :

- entre Phe473 et le cycle du diclofénac portant les deux chlores
- entre Phe114 et le second cycle du diclofénac

Le CYP2C9 et le CYP2C5 hydroxylent tous deux le diclofénac en position 4' (cf. Tableau 15) et possèdent dans leur site actif deux résidus Phe équivalents (Phe114 et Phe476 du CYP2C9 correspondant à Phe114 et Phe473 du CYP2C5). L'existence d'interactions π - π entre Phe114 et Phe473 du CYP2C5 et les cycles aromatiques du diclofénac conforte notre modèle d'interaction du CYP2C9 avec ce substrat : de façon comparable les résidus 114 et 476 du CYP2C9 formeraient des interactions de type π - π avec les cycles aromatiques du diclofénac.

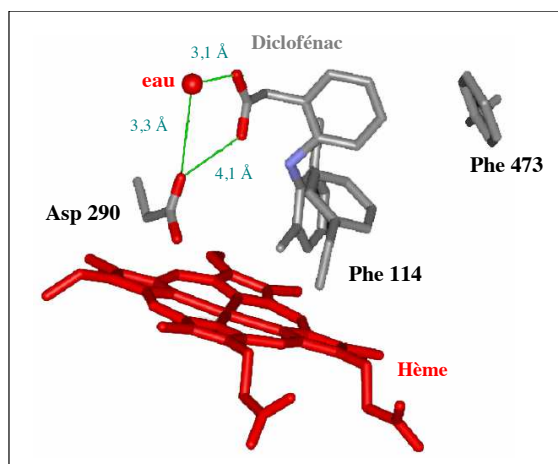


Figure 37 : Interaction du diclofénac avec le CYP2C5/3LVdH observée par diffraction aux rayons X d'après (Wester et al., 2003b). Phe114 et 473 forment des interactions π - π avec les cycles aromatiques du diclofénac. Asp290 interagit par liaisons hydrogènes (en vert) avec une molécule d'eau et le groupe carboxylate du diclofénac.

II.C.4 Autres mutations du CYP2C9 publiées au cours de ma thèse : importance du canal d'accès des substrats

Le CYP2C9 et le CYP2C5 présentent une différence majeure : le CYP2C9 reconnaît le diclofénac sous forme carboxylate (Mancy et al., 1999) alors que le CYP2C5 interagit préférentiellement avec la forme neutre COOH de ce substrat (Wester et al., 2003b). Des études menées au laboratoire ont montré l'importance des groupements carboxylates du diclofénac (Mancy et al., 1999), de l'acide tiénilique (Mancy et al., 1995) et du sulfaphénazole (Mancy et al., 1996) dans la spécificité de substrats du CYP2C9 (cf. I.D.4.b). Selon un article récent, le caractère anionique du puissant inhibiteur benzbromarone ($K_i < 10\text{nM}$) serait un élément clé de sa reconnaissance (Locuson et al., 2003). Plusieurs équipes ont donc cherché à identifier les résidus du site actif impliqués dans une interaction de type électrostatique avec les sites anioniques ou polaires des ligands du CYP2C9.

Notre modèle du CYP2C9 révèle l'existence de résidus chargés positivement, Arg105 et Arg108, à l'entrée du canal d'accès des substrats mais aucune interaction évidente n'est observée entre ces résidus et l'acide tiénilique, le diclofénac ou le sulfaphénazole. Différents modèles publiés ont permis de proposer Arg97 (Ridderstrom et al., 2000), Arg105 (Payne et al., 1999; Rao et al., 2000), Arg108 de la boucle B-C (De Groot et al., 2002) et Asp293 de l'hélice I (Rao et al., 2000; Afzelius et al., 2001) comme candidats potentiels pour une interaction ionique ou polaire avec les substrats du CYP2C9. Compte tenu de la flexibilité de la boucle B-C, ces prédictions demeurent très incertaines. Afin de déterminer l'importance fonctionnelle de ces résidus, Ridderstrom et al. et Flanagan et al. ont muté respectivement les trois arginines de la boucle B-C (Ridderstrom et al., 2000), et Asp293 de hélice I (Flanagan et al., 2003) en alanine. La mutation en position 105 n'a aucun effet sur la 4'-hydroxylation du diclofénac. Par contre, le mutant R97A a une K_m 13 fois plus élevée pour ce substrat et R108A perd quasiment toute activité. De même, la mutation D293A induit une diminution des k_{cat} et une augmentation des K_m d'hydroxylation de trois substrats : diclofénac, tolbutamide et dextrometorphan. Ces résultats montrent **l'importance de Arg97, Arg108 et**

Asp293 pour la fonction catalytique du CYP2C9 mais ne permettent pas de dire si ces résidus sont nécessaires à la stabilité structurale de l'enzyme ou à l'interaction avec les substrats. Une étude récente de Dickmann et al. a permis de lever cette ambiguïté (Dickmann et al., 2003). Les mutants R97F et D293F ont une activité catalytique fortement réduite, indépendamment du substrat testé (diclofénac chargé négativement, warfarine polaire ou pyrène substrat apolaire). De plus ces mutants sont instables thermiquement et donnent des spectres en dichroïsme circulaire caractéristiques d'une modification structurale de l'enzyme. **Arg97 étant un résidu très conservé** chez tous les membres des CYP1, CYP2, CYP17 et CYP21 humains, il **serait impliqué dans le maintien de la stabilité structurale du CYP2C9** et de nombreux P450. **Asp293, résidu de l'hélice I très conservé parmi les CYP2, aurait également un rôle structural important** d'après ces résultats. La structure RX du complexe CYP2C5-diclofénac montre que le résidu équivalent, Asp290, forme des liaisons hydrogènes avec le groupement carboxylate du diclofénac et avec des résidus de la boucle B-C (Wester et al., 2003b). De façon analogue, Asp293 du CYP2C9 pourrait avoir un rôle de stabilisation des fonctions polaires des substrats et un rôle structural important dans le positionnement de la boucle B-C; enfin, la mutation R108F qui supprime la charge et la polarité à cette position, a des effets catalytiques dépendants du substrat oxydé : elle provoque une chute de l'activité d'hydroxylation du diclofénac et de la (S)-warfarine alors que le métabolisme du pyrène, substrat apolaire, est peu affecté. De plus, le mutant R108H est caractérisé par un spectre d'absorption inhabituel avec un déplacement de la bande de Soret caractéristique d'une coordination d'un azote sur le fer de l'hème (vraisemblablement un azote de l'histidine). Ces données permettent de positionner le résidu 108 dans le site actif à proximité de l'hème et suggèrent que ce résidu aurait un rôle clé dans la reconnaissance des substrats par CYP2C9.

Cet acide aminé 108 est chargé positivement dans tous les CYP2C humains. Arg108 ne peut donc pas expliquer à elle seule la sélectivité du CYP2C9 pour des molécules anioniques. D'autres résidus du canal d'accès des substrats contribueraient à la sélection de ces molécules (Marques-Soares, 2002). En effet, contrairement au CYP2C9, le CYP2C19 n'a aucune préférence pour les substrats anioniques. Une collaboration entre l'UMR8601 et JA. Goldstein aux Etats-Unis a permis d'étudier les résidus responsables des différences fonctionnelles entre ces deux isoformes (Marques-Soares, 2002). Cette étude a, en particulier, confirmé l'importance de deux résidus polaires du canal d'accès des substrats, Ser286 et Asn289, dans la sélectivité du CYP2C9. Leur substitution par les acides aminés hydrophobes du CYP2C19 diminue fortement les Km et l'efficacité catalytique de l'enzyme vis-à-vis de l'acide tiénilique et du diclofénac, deux substrats anioniques. Couplé à ces deux résidus, Glu288 aurait une influence sur les kcat. Ainsi, le triple mutant (S286N, E288V, N289L) a des propriétés catalytiques très proches de celles du CYP2C19 pour ces deux substrats. **L'association de trois résidus polaires Ser286, Glu288 et Asn289 jouerait donc un rôle de sélection des substrats au niveau du canal d'accès à l'enzyme.** Ils pourraient également intervenir dans le positionnement de Arg108. Enfin, un autre résidu du canal d'accès des substrats, Arg241, est substitué par un acide glutamique dans le CYP2C19. La mutation R241E diminue l'affinité du CYP2C9 de façon dépendante de la nature du substrat (Km multipliée par 4 pour le diclofénac et par 30 pour l'acide tiénilique) (Marques-Soares, 2002). Elle affecte également la kcat d'hydroxylation du diclofénac. **Arg241 jouerait donc un rôle important dans la reconnaissance de molécules et l'activité du CYP2C9.** La structure RX du complexe CYP2C5/3LVdH-diclofénac montre que ce résidu sert de point d'ancrage à un réseau de molécules d'eau stabilisant la fonction carboxylate du substrat. Arg241 pourrait avoir un rôle similaire dans le CYP2C9.

II.C.5 Les structures RX du CYP2C9 seul ou en présence de substrat

Au cours des derniers mois de ma thèse, les structures RX du CYP2C9 avec ou sans substrat ont été résolues par la société Astex Technology (Cambridge, UK) et par une équipe académique (EF. Johnson et al., Scripps Institute, La Jolla, USA).

La société Astex vient de publier (juillet 2003) les données structurales concernant le CYP2C9 et son complexe avec la (S)-warfarine (Williams et al., 2003). Eric Johnson a évoqué la co-cristallisation de cette isoforme avec le flurbiprofène au congrès de l'ISSX (Dijon, fin avril 2003) et à la 13^{ème} conférence internationale sur les cytochromes P450 (Prague, juillet 2003) (Johnson et al., 2003). Ces données structurales permettent :

- d'évaluer la qualité du modèle de CYP2C9 construit au laboratoire à partir de la structure RX du CYP2C5 de lapin
- d'appuyer certains résultats de mutagenèse obtenus au laboratoire et par d'autres équipes
- de révéler un mode de fixation imprévu de la (S)-warfarine dans le site actif de l'enzyme

II.C.5.a *La structure RX du CYP2C9 sans substrat (Williams et al., 2003) : comparaison avec la structure RX du CYP2C5 et notre modèle 3D du CYP2C9.*

Contrairement au CYP2C5, le CYP2C9 a été co-cristallisé sous forme dimère. Les caractéristiques structurales de chaque monomère sont détaillées ci-dessous.

Repliement général

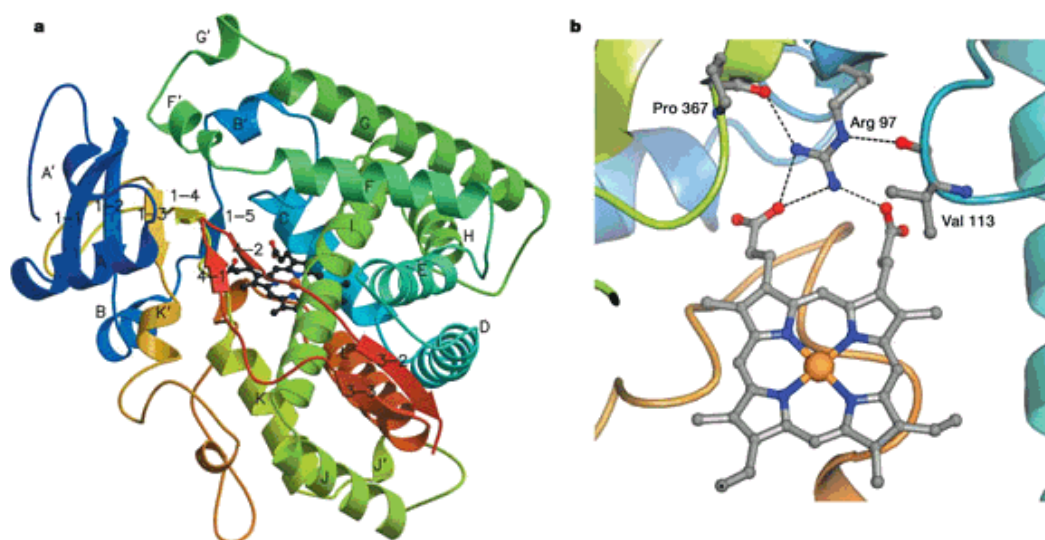


Figure 38 : Structure du CYP2C9 (a) repliement général (b) rôle structural de Arg97 (Williams et al., 2003) : interaction avec les propionates de l'hème et formation de liaisons hydrogènes avec les groupes carbonyles de Val113 et Pro367.

Le CYP2C9 adopte le repliement général caractéristique des cytochromes P450 (Figure 38). Il a **deux éléments de structure secondaire supplémentaires** par rapport au CYP2C5 : les résidus 212-222 de la boucle F-G forment des hélices F' et G'. Cette particularité structurale n'a pas été observée dans les autres P450 cristallisés et donc n'était pas présente dans notre modèle du CYP2C9 construit à partir du CYP2C5.

Le mode de fixation de l'hème est globalement conservé. Comme dans les autres P450, l'hème est pris en sandwich entre les hélices I et L et le fer est pentacoordiné avec la protoporphyrine et la cystéine axiale 435 comme 5^{ème} ligand. Il est fixé au cœur de la protéine par des liaisons hydrogènes entre ses propionates et les chaînes latérales des résidus Trp120, Arg124, His368, Arg433 et Arg97.

Ces données confortent les résultats de mutagenèse de Dickman et al. (Dickmann et al., 2003) et leurs conclusions sur le rôle structural de Arg97 (Figure 38 (b)). Cet acide aminé est correctement positionné à proximité des propionates de l'hème dans notre modèle du CYP2C9 sans substrat alors qu'il ne pointe pas vers l'hème dans le CYP2C5 sans substrat (Williams et al., 2000a).

Le site actif (Figure 39)

Le site actif du CYP2C9 a une allure générale comparable à celle observée dans le CYP2C5 et notre modèle du CYP2C9. Il est constitué par les mêmes éléments de structure secondaire et **les résidus qui pointent vers le site actif sont les mêmes que ceux prédits par notre modèle**. Le résidu conservé Thr301 forme une liaison hydrogène avec une molécule d'eau située à 7 Å de l'hème, en accord avec un rôle dans le transfert de protons. Par contre, la boucle B-C a une conformation qui diffère de notre modèle et la boucle C-terminale forme un angle plus ouvert avec l'hélice I. En conséquence, **le site actif a un volume plus large que dans notre modélisation** (470 Å³ au lieu de 360 Å³ dans le CYP2C5 ou notre modèle de CYP2C9).

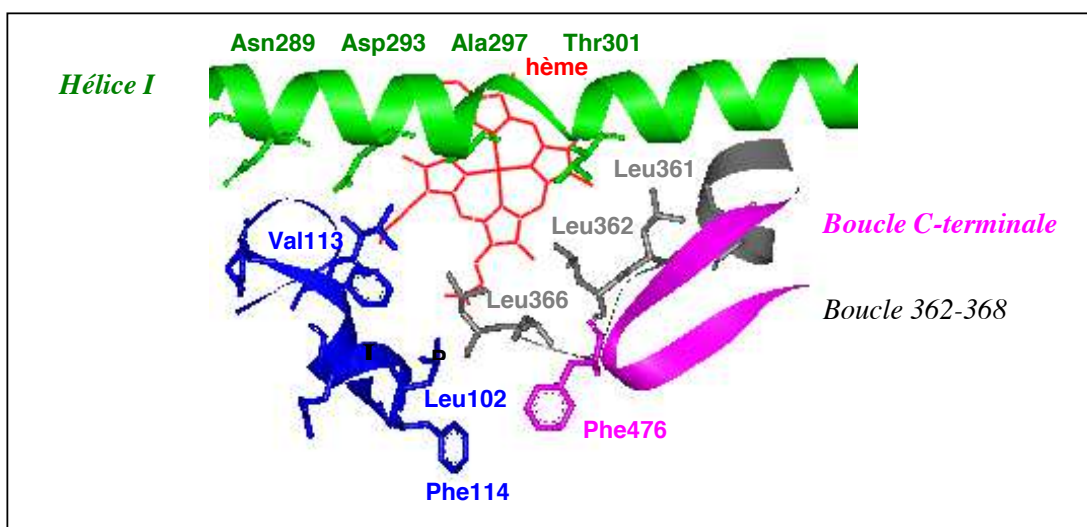


Figure 39 : Le site actif du CYP2C9 (vue de dessus).

Le canal d'accès des substrat (Figure 40)

Des différences notables sont observées à l'entrée du canal d'accès des substrats par rapport à notre modèle. Dans notre modèle, Lys241 est maintenue en périphérie du canal par une liaison ionique avec Glu288. Arg105 et Arg108 pointent au contraire vers l'intérieur du canal et Arg108 forme une liaison ionique avec Glu285.

Dans la structure RX du CYP2C9, le positionnement des acides aminés de la boucle B-C est très différent. Lys241 s'étend en plein milieu du canal d'accès des substrats et forme des liaisons hydrogènes avec Glu288, Glu285 et Asn289. Arg105 est située très à l'extérieur du canal et sa chaîne latérale est dirigée vers l'extérieur du site actif. La chaîne latérale de Arg108 est elle aussi orientée vers l'extérieur du canal et n'interagit pas avec Glu285. Par contre le carbonyle de Glu285 forme deux liaisons hydrogènes avec les groupes amides de Glu288 et Asn289.

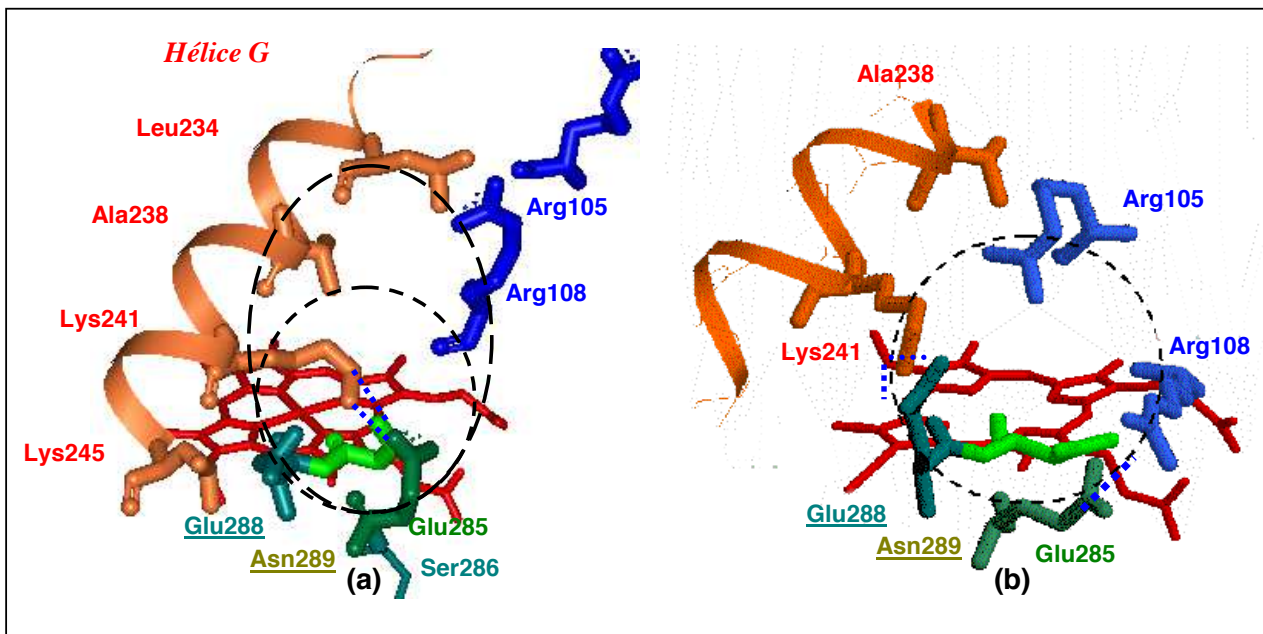


Figure 40 : L'entrée du canal d'accès des substrats (a) du CYP2C9 cristallisé (b) du CYP2C9 modèle (cercle en pointillés).

II.C.5.b Les structures RX du CYP2C9 avec substrat : confirmation de certains résultats de mutagenèse et découverte d'un nouveau mode de fixation dans le site actif du CYP2C9

Complexe CYP2C9/flurbiprofène (Johnson et al., 2003)

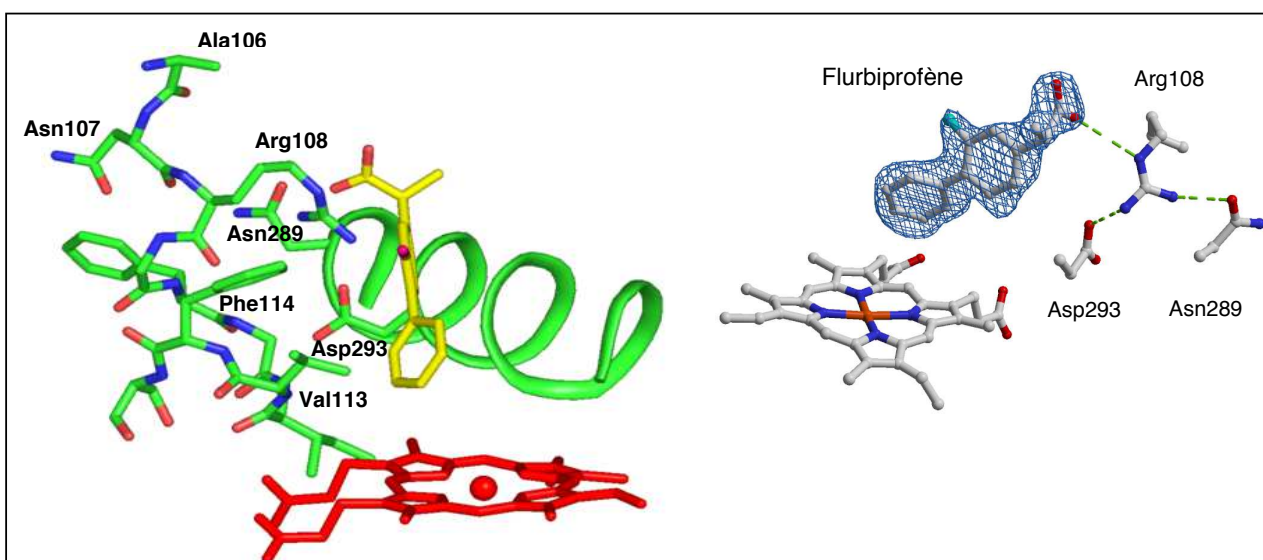


Figure 41 : Mode de fixation du flurbiprofène dans le site actif du CYP2C9 d'après (Johnson et al., 2003). Figure publiée avec l'accord de E.F. Johnson.

Nous disposons de peu d'informations sur la structure de ce complexe (résultats non publiés). Le flurbiprofène a son site d'hydroxylation à proximité du fer de l'hème et son groupe carboxylate orienté vers le canal d'accès des substrats. Phe114 établit une interaction π - π avec le noyau fluoro-phényle du flurbiprofène et Arg108 interagit avec le groupe carboxylate de ce substrat par liaison hydrogène, sans interaction ionique. Asp293 ne semble pas interagir avec le substrat mais il contribue avec Asn289 à la stabilisation du positionnement de Arg108 par liaisons hydrogènes. Enfin, dans la structure du CYP2C9 sans ligand, Arg108 pointe vers l'extérieur du canal d'accès des substrats. L'interaction de Arg108 avec le flurbiprofène implique donc un changement conformationnel du CYP2C9 en présence de cette molécule.

II.C.6 Complexe CYP2C9/(S)-warfarine (Williams et al., 2003)

- La structure RX du complexe CYP2C9-warfarine apporte des résultats bien différents :
- La présence de (S)-warfarine dans le site actif du CYP2C9 n'induit aucun changement conformationnel majeur excepté quelques réarrangements locaux (léger déplacement de la boucle C-terminale et formation d'une liaison hydrogène entre Arg241 et le carbonyle de Arg108 au niveau du canal d'accès des substrats).
 - La (S)-warfarine adopte un mode de fixation inhabituel. Contrairement au flurbiprofène, elle n'est pas placée à proximité de l'hème et ne s'étend pas vers le canal d'accès des substrats. Ce substrat est fixé à bonne distance de l'hème (site d'hydroxylation à environ 10Å du fer) dans une poche hydrophobe bordée par la boucle B-C, la boucle 362-368 et la boucle C-terminale (Figure 42) . Son groupe phényle forme une interaction π - π avec Phe476 et son groupe bicyclique des contacts de Van der Waals avec Phe114 et Pro367 (Figure 43). Des liaisons hydrogènes sont également observées entre la (S)-warfarine et les groupes amides de Phe100 et Ala103.
- Fixée dans cette orientation, la (S)-warfarine serait trop éloignée pour subir une hydroxylation. Selon Williams et al., ce composé pourrait se déplacer de son premier site de fixation jusqu'à l'hème pour la catalyse (Williams et al., 2003). Le volume du site actif et l'absence de changement conformationnel laisse suffisamment de place pour la fixation simultanée d'une autre molécule. La découverte de ce deuxième site de fixation pourrait ainsi expliquer les cinétiques atypiques du CYP2C9 en présence de certains ligands (activation par la dapsone, inhibition par excès de substrat du piroxicam, cinétique biphasique du naproxen etc...) (Hutzler et al., 2001; Hutzler et al., 2002).

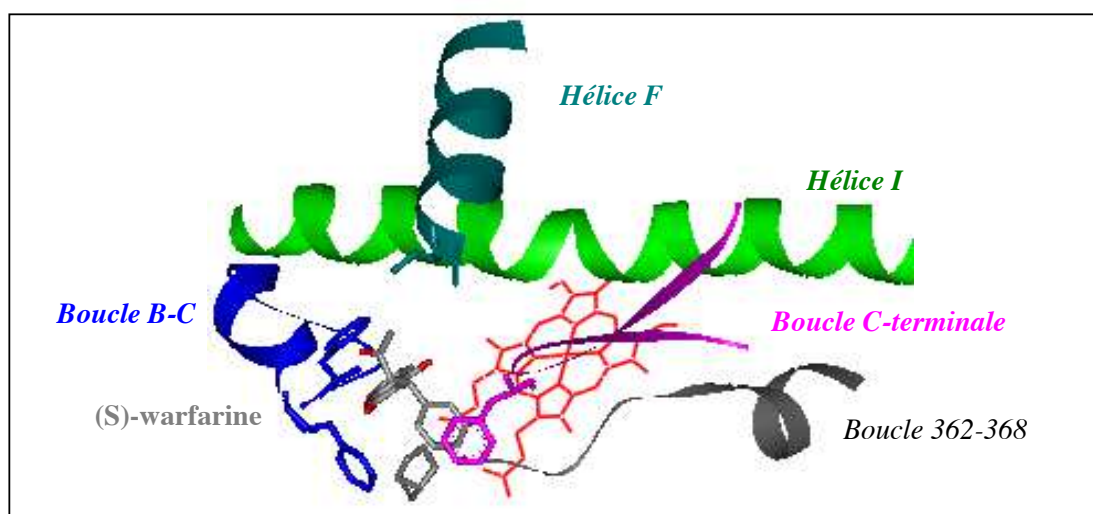


Figure 42 : Position de la (S)-warfarine dans le site actif du CYP2C9.

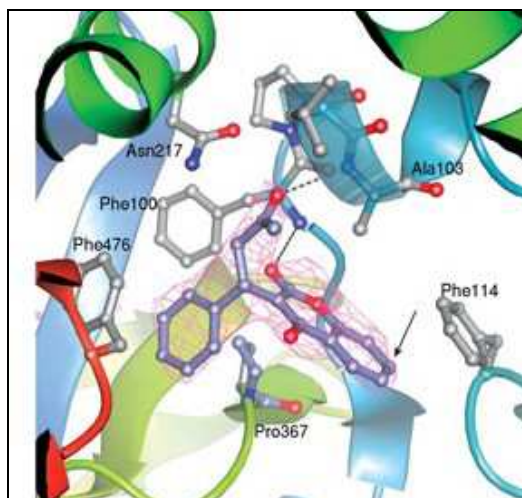


Figure 43 : Mode de fixation de la (S)-warfarine dans le site actif du CYP2C9 d'après (Williams et al., 2003). La (S)-warfarine interagit par π -stacking avec Phe476 ; elle forme des contacts de Van der Waals avec Ala103, Phe114 et Pro367 et des liaisons hydrogènes avec les fonctions amides de Phe100 et Ala 103 (visualisées par des pointillés). Le site d'hydroxylation de la (S)-warfarine est indiqué par une flèche.

En conclusion, les structures RX du CYP2C9 en présence de substrats révèlent l'existence de deux sites de fixation dans le site actif du CYP2C9:

- un site « productif » qui place la molécule à proximité de l'hème pour la catalyse (site du flurbiprofène)
- un deuxième site éloigné de l'hème qui pourrait jouer un rôle allostérique (site de la warfarine)

La structure RX du complexe CYP2C9-flurbiprofène confirme l'importance des résidus 114 et 108 pour la reconnaissance de molécules par le CYP2C9. Elle conforte également nos conclusions sur l'existence d'une interaction π - π entre le résidu 114 et les noyaux aromatiques des ligands.

La structure RX du complexe CYP2C9-warfarine met en évidence un mode de fixation inhabituel. Dans ce deuxième site de fixation, la (S)-warfarine établit une interaction π - π avec Phe476 et des contacts de Van der Waals avec Phe114.

Phe114 est donc un résidu important pour la reconnaissance de molécules par le CYP2C9 quel que soit le site de fixation. L'interaction de Phe476 avec ses substrats serait davantage dépendante de la nature du ligand.

II.D CONCLUSION SUR CE CHAPITRE

Notre étude de mutagenèse, a permis d'identifier trois résidus clés du site actif du CYP2C9 :

- **Ser365**, responsable de l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique.
- **Phe114 et Phe476**, deux résidus aromatiques importants pour la reconnaissance de l'acide tiénilique, du diclofénac et du sulfaphénazole.

Les structures RX des complexes CYP2C9-flurbiprofène (Johnson et al., 2003) et CYP2C9-warfarine (Williams et al., 2003) confirment la localisation de Ser365 dans le site actif et l'implication de Phe114 ou Phe476 dans des interactions de type π - π avec ces substrats.

Ces résultats confortent donc les prédictions d'interactions proposées par notre modèle 3D du CYP2C9. Ce modèle semble assez prédictif des interactions avec les résidus du site actif (Ser365, Phe114 et Phe476) mais il l'est beaucoup moins lorsque l'on considère les résidus polaires du canal d'accès des substrats. En effet, la comparaison de notre modèle à la structure RX du CYP2C9 (Williams et al., 2003) indique des différences importantes d'orientation des résidus de la boucle B-C à l'entrée du canal, région particulièrement mobile dans les cytochromes P450. De plus, l'absence de molécules d'eau dans notre modèle limite la qualité des prédictions d'interactions polaires au sein de l'enzyme et ne permet pas de tenir compte des réseaux de molécules d'eau au sein du site actif.

La prédiction du positionnement des boucles flexibles des protéines et des réseaux de molécules d'eau est une difficulté générale à la modélisation des cytochromes P450 à l'heure actuelle. Malgré certains progrès, il n'existe pas encore de méthode suffisamment robuste pour modéliser avec exactitude ces structures au sein des sites actifs.

D'autres études de mutagenèse ont montré l'importance de deux résidus polaires, Arg108 (Ridderstrom et al., 2000; Dickmann et al., 2003) et Lys241 (Marques-Soares, 2002) dans l'hydroxylation spécifique de certains substrats. Ces deux acides aminés se situent à l'entrée du canal d'accès des substrats, d'après la structure RX du CYP2C9 (Williams et al., 2003). Dans le complexe CYP2C9-flurbiprofène, Arg108 interagit par liaisons hydrogènes avec le carboxylate du substrat (cf. Figure 41). Par contre, le rôle de Lys241 reste plus ambiguë. Dans la structure RX du complexe CYP2C9-warfarine (Williams et al., 2003), ce résidu établit des liaisons hydrogènes entre sa fonction guanidinium et le carbonyle de Arg108. Il referme de fait le canal d'accès au site actif, empêchant ainsi l'entrée d'autres molécules de substrats. Ce résidu semble donc jouer un rôle dans le contrôle de l'accès des substrats au site actif. En revanche, aucune interaction directe ou indirecte n'est visible avec la warfarine. Sa mutation en acide glutamique (le résidu correspondant du CYP2C19) diminue l'affinité du CYP2C9 envers deux substrats spécifiques, l'acide tiénilique et du diclofénac (Marques-Soares, 2002), ce qui suggère un rôle de Lys241 dans des interactions directe ou indirecte avec ces molécules. En supposant l'existence d'une interaction directe, nous pouvons imaginer qu'en fonction des substrats, soit Arg108 soit Lys241 plonge dans le site actif pour interagir avec les fonctions anioniques ou polaires de ces ligands. Dans le cas d'une interaction indirecte, ce résidu pourrait contribuer à accommoder les fonctions polaires des ligands via des réseaux de molécules d'eau, comme dans le complexe CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b), ou influencer indirectement la reconnaissance de ces molécules en jouant sur l'orientation de Arg108. Seules d'autres structures RX de complexes CYP2C9-substrats pourrait permettre de trancher entre ces différentes interprétations.

Avec l'ensemble des résultats de mutagenèse sur le CYP2C9 (cf. Annexe E), dont notre étude, et les structures RX résolues de l'enzyme, nous pouvons proposer un modèle partiel d'interaction du CYP2C9 avec le pharmacophore des ligands :

- **Phe 114** (SRS1) et **Phe476** (SRS6) forment des interactions π - π avec les cycles aromatiques de molécules reconnues par le CYP2C9
- **Arg108** (SRS1) et éventuellement **Arg241**, interagissent avec les groupements anioniques ou polaires de certaines molécules

Les trois premiers résidus, appartenant à des boucles de la protéine, interagissent avec des motifs structuraux identifiés dans le pharmacophore des ligands du CYP2C9. Ils sont à l'évidence d'importants déterminants de la reconnaissance de molécules par le CYP2C9 mais

ils ne sont pas suffisants à eux seuls pour fixer un substrat. En effet, les structures RX des CYP2C5 et CYP2C9 en présence de substrats montrent que d'autres résidus interagissent avec les ligands du CYP2C9. L'existence de ces interactions et leur importance relative varient en fonction du type de substrat complexé à l'enzyme.

Enfin, les structures des complexes CYP2C9-flurbiprofène et CYP2C9-warfarine révèlent l'existence de deux sites de fixation des substrats au sein du site actif :

- un site « productif » qui place la molécule à proximité de l'hème pour la catalyse
- un deuxième site éloigné de l'hème qui pourrait jouer un rôle allostérique

L'existence de ces deux sites offre une possibilité pour la fixation simultanée de plusieurs molécules dans le site actif de l'enzyme. Cette complexité supplémentaire devra être prise en compte dans les études futures de cette isoforme.

CHAPITRE III : Etude de la topologie du site actif du CYP2C8 par analyse « in silico » des résidus responsables des spécificités de substrats de cette isoforme et mutagenèse dirigée de ces résidus

Le CYP2C8 a été très peu étudié jusqu'à la découverte récente de nouveaux substrats et de son rôle dans le domaine cardiovasculaire (cf. I.D.3.b). Les connaissances acquises sur le CYP2C9 et le CYP2C5 ont été mises à profit pour l'étude de cette isoforme. Aucun pharmacophore des substrats et aucun modèle 3D du CYP2C8 n'avait été publié au début de ma thèse. En l'absence de ces éléments, j'ai commencé à étudier la spécificité de substrats du CYP2C8 en construisant des chimères CYP2C8/CYP2C9. Ce travail a été abandonné pour des raisons expliquées en Annexe F.

En parallèle, au laboratoire, C. Marques a construit « *in silico* », un modèle d'interaction de la protéine avec ses substrats. L'analyse de ce modèle, une fois construit, m'a permis d'envisager plusieurs mutations pour vérifier « *in vitro* » l'importance fonctionnelle de certains résidus du site actif.

III.A ANALYSE DU MODELE D'INTERACTION DU CYP2C8 AVEC SES SUBSTRATS

III.A.1 Présentation du pharmacophore des substrats

III.A.1.a *Substrats utilisés*

Un pharmacophore des substrats du CYP2C8 a été construit au laboratoire afin de mettre en évidence les motifs structuraux communs reconnus par l'enzyme (Marques-Soares, 2002). Les molécules sélectionnées pour cette étude sont les **substrats connus en 2001 de très bonne affinité pour le CYP2C8** ($K_m=2$ à $10 \mu\text{M}$ d'après la littérature) **et ne possédant qu'un site majeur d'oxydation**. Au départ de ce travail, seules 5 molécules remplissaient ces critères. L'amodiaquine ($K_m=1,2 \mu\text{M}$) (Li et al., 2002) et l'acide tazaroténique (Attar et al., 2003) n'ont pas été pris en compte car ces substrats n'étaient pas connus au moment de la construction du pharmacophore. Les conformations des substrats sélectionnés (Figure 44) ont été déduites de leur structure RX disponible à la Cambridge Structural Database ou par modélisation à l'aide du logiciel InsightII (cf. Matériel et Méthodes).

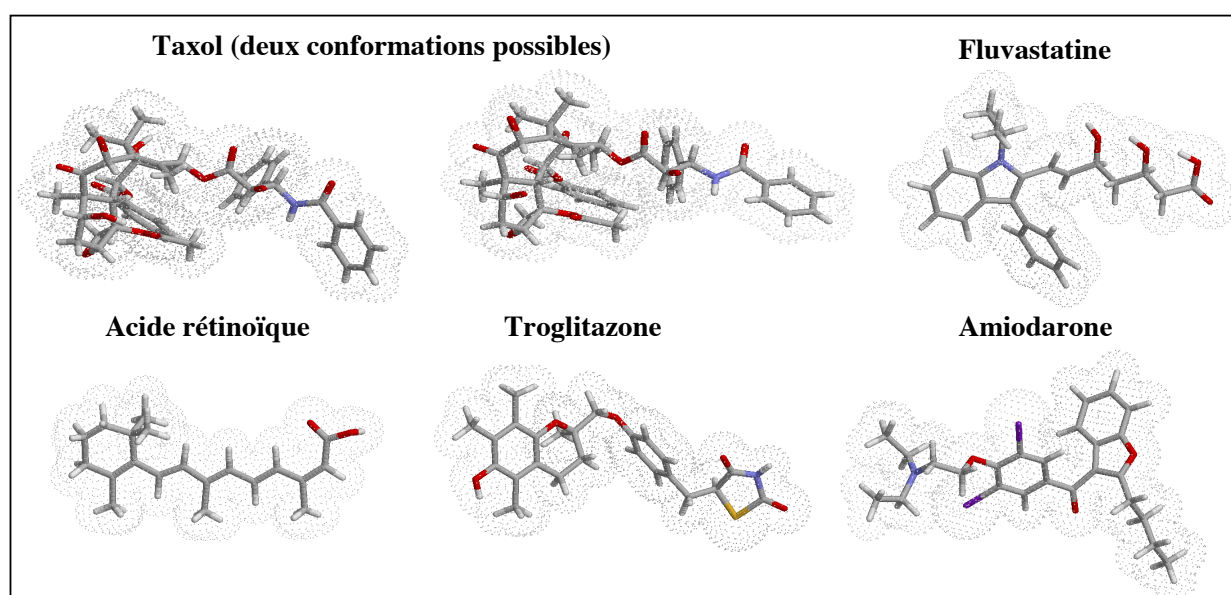


Figure 44 : Conformations des substrats utilisés pour la construction du pharmacophore. La structure 3D de la fluvastatine a été modélisée. Les conformations des autres molécules ont été déduites des structures RX de la PDB.

III.A.1.b Construction du pharmacophore

Le pharmacophore a ensuite été construit par superposition successive des différents substrats, en s'appuyant au départ sur la molécule la plus rigide, l'acide rétinoïque. Les sites d'oxydation des substrats par le CYP2C8 et deux autres points de superposition (le carbone des fonctions carboxyliques par exemple) servent de point d'ancrage pour superposer les chaînes carbonées (module Transform-Superimpose, InsightII). Des motifs structuraux communs sont alors mis en évidence (Figure 45).

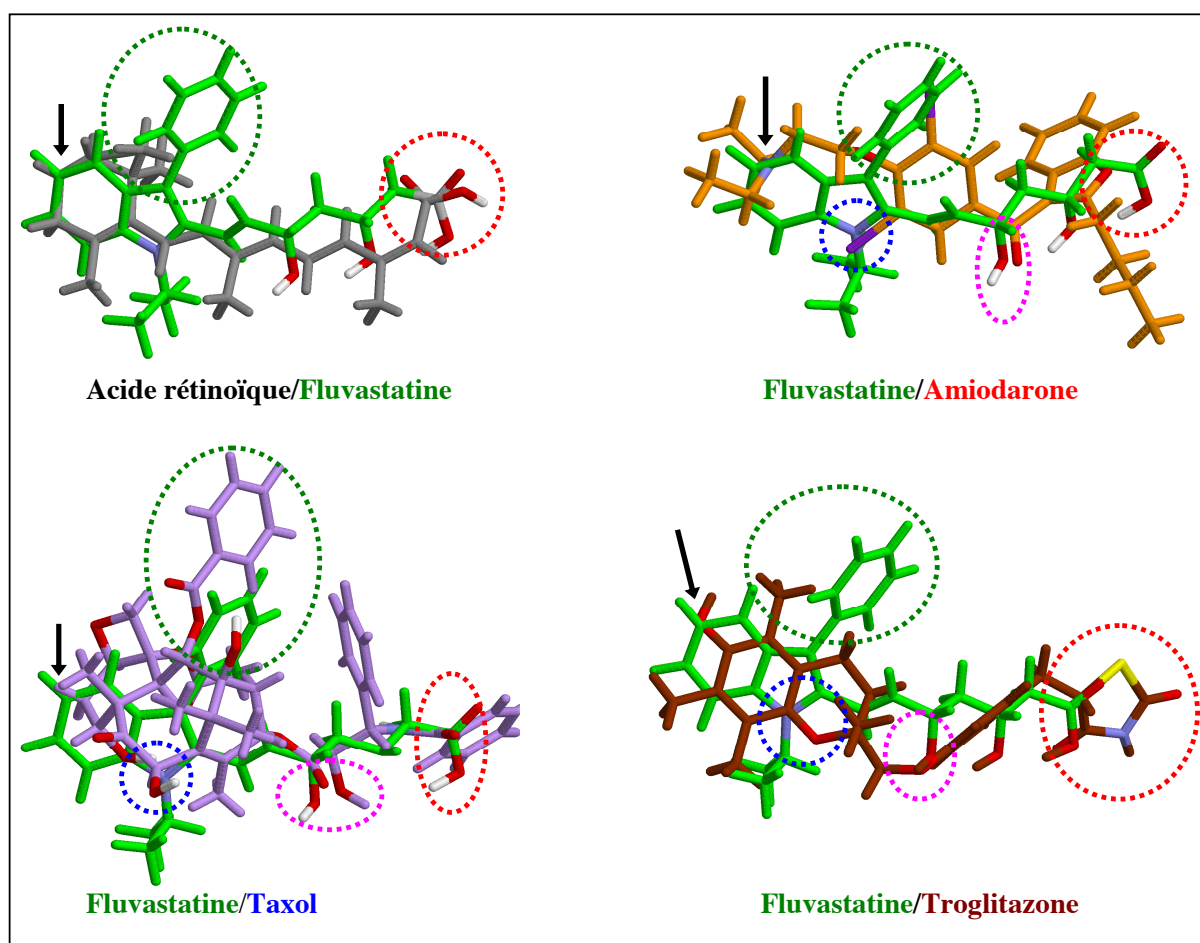


Figure 45: Construction du pharmacophore par superposition successive des différents substrats du CYP2C8. L'acide rétinoïque, substrat le plus rigide, est choisi comme molécule de départ pour la superposition, puis la fluvastatine qui comporte davantage de motifs structuraux, sert de base aux superpositions suivantes. Les motifs structuraux communs sont entourés (vert : motif hydrophobe, bleu : site polaire (a), magenta : site polaire (b), rouge : site acide ou polaire 1). Les sites d'oxydation superposés sont indiqués par des flèches.

Les distances de ces motifs au site d'oxydation sont récapitulées dans le Tableau 20.

Substrat	Longueur totale	Motif hydrophobe	Site acide ou polaire 1	Site polaire (a)	Site polaire (b)
Acide rétinolique	13,9	3,9	13,9	Non existant	Non existant
Fluvastatine	13,9	3,8	13,6	4,2	8,9
Troglitazone	15,5	2,5	13,3	4,2	7,6
Taxol					
Structure 1 :	13,9	4,5	12,3	4,8	8,9
Structure 2 :	14,6	4,4	12,3	4,7	8,5
Amiodarone	15,7	4,2	12,1	4,2	8,9
moyennes	$14,6 \pm 0,9$	$3,9 \pm 0,7$	$12,9 \pm 0,8$	$4,4 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,6$

Tableau 20 : Caractéristiques structurales des substrats du CYP2C8 : longueur des molécules et distances au site d'oxydation des différents motifs structuraux (en Å). Les distances ont été mesurées entre le site d'oxydation et le point d'attache sur la chaîne principale du motif hydrophobe, entre le site d'oxydation et l'hétéroatome des fonctions acides ou polaires superposables aux sites polaires des autres molécules du pharmacophore.

III.A.1.c Bilan : Modèle de pharmacophore des substrats du CYP2C8

Un modèle de pharmacophore des substrats a ainsi pu être proposé (Figure 46) :

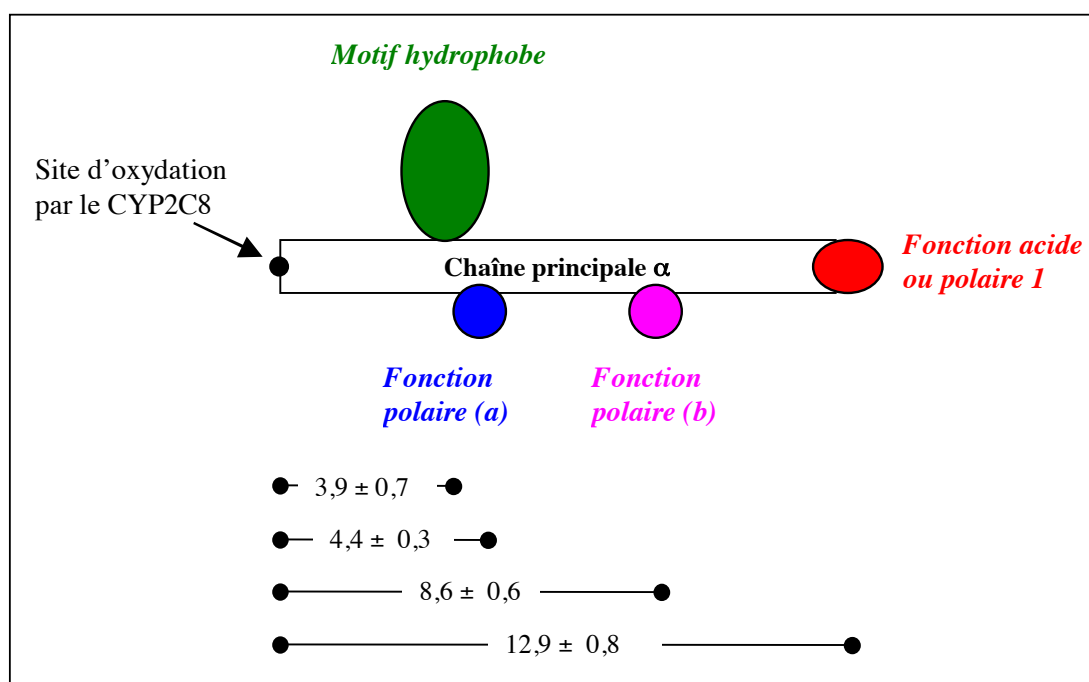


Figure 46: Modèle de pharmacophore pour les substrats du CYP2C8 d'après (Marques-Soares, 2002). Les substrats très affins du CYP2C8 ont au moins trois motifs structuraux communs : une longue chaîne principale, un motif hydrophobe et une fonction acide ou polaire terminale. Tous ces substrats, excepté l'acide rétinolique, comportent également deux fonctions polaires secondaires (a) et (b). Les distances moyennes entre le site d'oxydation et les différents motifs structuraux sont indiquées en Å.

Les substrats très affins du CYP2C8 ont au moins trois motifs structuraux communs :

- **Une longue chaîne principale α** d'environ 15 Å de long.
- **Un groupe acide ou polaire 1** à $12,9 \pm 0,8$ Å du site d'oxydation.
- **Une zone hydrophobe plus ou moins large**, localisée à $3,9 \pm 0,7$ Å du site d'hydroxylation : un groupe alkyle (dans l'acide rétinoïque, la troglitazone et le vérapamil) ou aromatique (dans la fluvastatine et le taxol) ou un atome d'iode dans l'amiodarone.

Enfin, tous ces substrats excepté l'acide rétinoïque possèdent également **deux fonctions polaires secondaires (a) et (b)**, susceptibles de donner ou d'accepter des liaisons hydrogènes et situées à $4,4 \pm 0,3$ Å et $8,6 \pm 0,6$ Å du site d'oxydation.

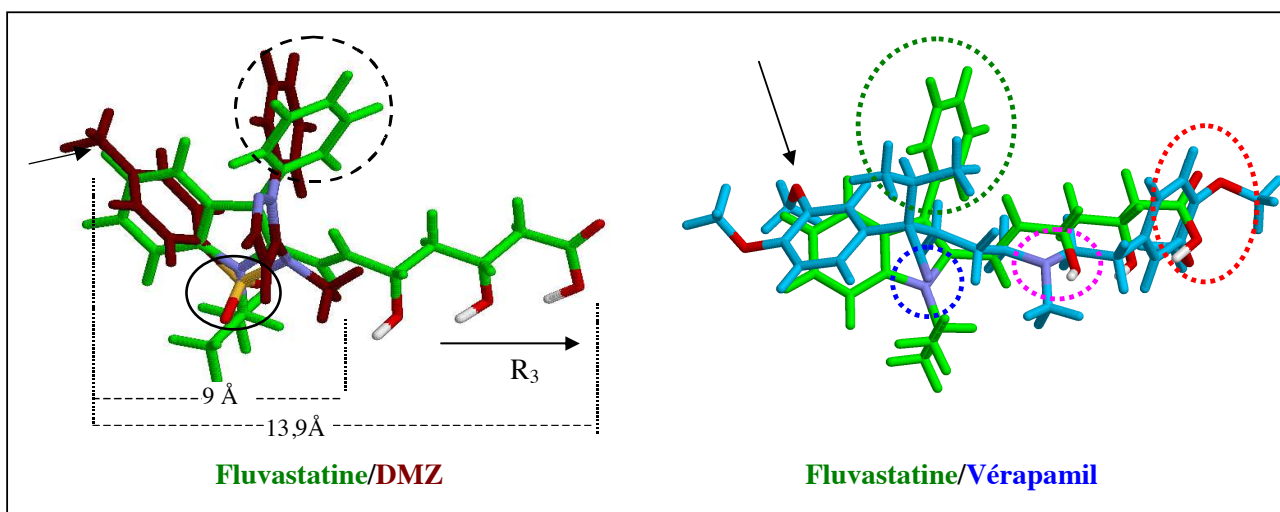


Figure 47 : Superpositions du DMZ et du vérapamil avec la fluvastatine. Les sites d'oxydation du DMZ et du vérapamil sont indiqués par des flèches.

Le vérapamil (O-déméthylation, $K_m=50 \mu\text{M}$) (Busse et al., 1995) et le DMZ, un dérivé du sulfaphénazole ($K_m=40\mu\text{M}$) (Marques-Soares et al., 2003) sont deux substrats, un peu moins affins pour le CYP2C8. Ils ont été confrontés au pharmacophore pour tenter d'expliquer leur moindre reconnaissance par cette enzyme (Figure 47).

Le vérapamil possède tous les motifs structuraux décrits dans le pharmacophore et se superpose assez bien à la fluvastatine. Toutefois, cette molécule est plus longue que les substrats les plus affins du CYP2C8 ($18,9$ Å au lieu de $14,6 \pm 0,9$ Å) ce qui pourrait expliquer sa moins bonne reconnaissance par le CYP2C8 ($K_m = 60\text{-}130 \mu\text{M}$).

Le DMZ est une molécule plus courte (9 Å au lieu de 15 Å) qui ne recouvre qu'une partie du pharmacophore (Figure 47). Son groupe phényle-pyrazole correspond au motif hydrophobe du pharmacophore des substrats et sa fonction SO_2NH se superpose au site polaire (a). Par contre, sa chaîne principale, plus courte, ne porte ni fonction acide ni fonction polaire (b). Ceci expliquerait la moins bonne affinité de ce substrat par rapport aux autres molécules ($K_m = 40\mu\text{M}$).

Enfin, le modèle de pharmacophore permet de proposer une interprétation des différences d'inhibition du CYP2C8 par le sulfaphénazole et ses dérivés. Lorsque le sulfaphénazole est alkylé en R_3 (Figure 48), son pouvoir inhibiteur augmente avec la longueur de R_3 (Ha-Duong, 2001b). En examinant la superposition du DMZ au pharmacophore, on s'aperçoit que si l'on substitue le méthyle en R_3 par une chaîne latérale plus longue, celle-ci se superpose avec la chaîne α du pharmacophore (Figure 47). Ceci est donc cohérent avec l'augmentation du pouvoir inhibiteur en fonction de la longueur de la chaîne alkyle en R_3 .

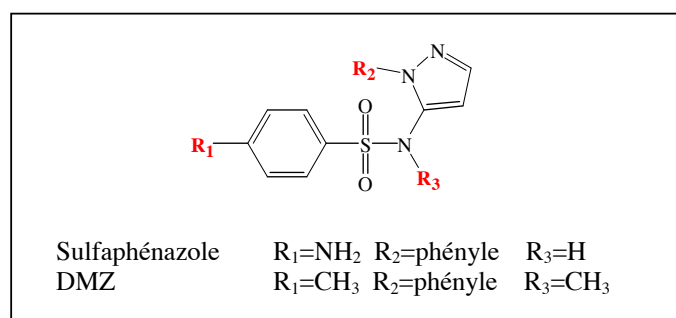


Figure 48 : Structure chimique du sulfaphénazole, du DMZ et autres dérivés

En conclusion, les substrats moyennement affins du CYP2C8 et les inhibiteurs dérivés du sulfaphénazole ont une structure en adéquation avec le pharmacophore des substrats, ce qui conforte ce modèle.

III.A.2 Topologie du site actif modèle du CYP2C8

Pour préciser la topologie du CYP2C8, un modèle 3D de l'enzyme a été construit au laboratoire par mutagenèse virtuelle du CYP2C5 de lapin (Marques-Soares, 2002). Il peut être comparé à la structure RX du CYP2C5/3LVdH et au modèle du CYP2C9 précédemment décrit (cf. chapitre II).

Son allure générale est similaire à celles des deux autres isoformes. Seule la boucle B-C et l'hélice G ont des positions légèrement modifiées : la boucle B-C semble plus compacte et l'hélice G est plus proche de l'hélice I. Examinons plus en détail deux éléments topologiques importants pour notre étude : le site actif et le canal d'accès des substrats

III.A.2.a Le site actif modèle du CYP2C8 (Figure 49)

Le site actif modèle est délimité par les mêmes éléments de structures secondaires que les sites actifs du CYP2C5 et du CYP2C9: l'hélice I, la boucle B-C, la boucle 359-366 et la boucle C-terminale forment les côtés du site actif tandis que l'hélice F et une partie de la boucle F-G constituent son toit. Les résidus qui pointent dans le site actif et qui sont donc susceptibles d'interagir avec les substrats (Tableau 21), correspondent aux positions déjà décrites pour le CYP2C5 et dans les multiples modèles du CYP2C9 (cf. chapitre II). Les résidus 293-300 de l'hélice I, qui forment un côté du site actif, sont très conservés chez tous les CYP2C. D'autres résidus sont spécifiques au CYP2C8 par rapport aux autres CYP2C et pourraient être à l'origine de la spécificité de substrats de cette isoforme ; il s'agit des résidus Ile113, Ser114, Phe205, Val362, Val366 et Ile476.

Les résidus latéraux du site actif sont moins volumineux que dans le CYP2C9 et le CYP2C5; Ile 113 pointe vers le site actif au lieu de Phe114 dans le CYP2C9 ou le CYP2C5 ; Val362, Val366, Ile476 remplacent respectivement deux leucines et une phénylalanine. Ces résidus moins encombrants contribuent à faire apparaître **le site actif plus large que celui des autres CYP2C**. Ceci est en accord avec l'aptitude du CYP2C8 à métaboliser des substrats de plus grande taille comme le taxol (de volume 672 Å³ au lieu de 223Å³ ou 258Å³ pour le diclofénac et le sulfaphénazole, reconnus par le CYP2C9).

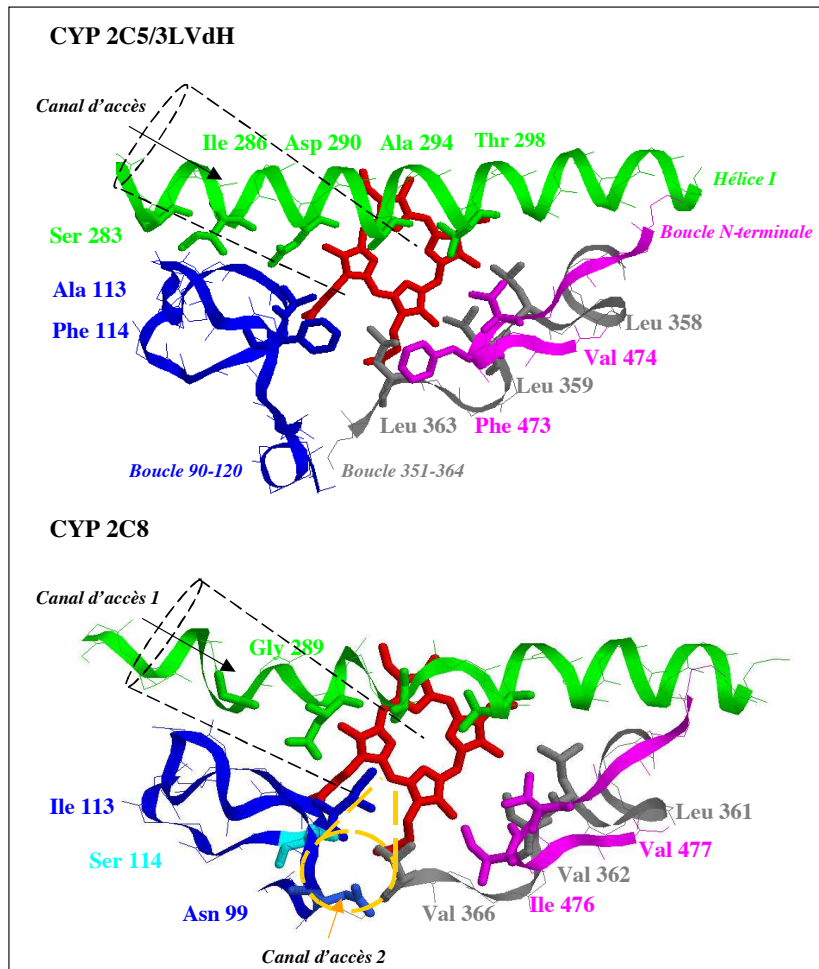


Figure 49 : Comparaison des sites actifs du modèle du CYP2C8 et de la structure RX du CYP2C5/3LVdH (Williams et al., 2000a) (Vues de dessus).

n° des résidus des CYP 2C humains	CYP					n° des résidus correspondants du CYP 2C5
	2C8	2C9	2C18	2C19	2C5	
113	I	V	L	V	A	113
114	S	F	F	F	F	114
205	F	I	L	I	V	205
293	D	D	D	D	D	290
297	A	A	A	A	A	294
301	T	T	T	S	T	298
361	L	L	L	L	L	358
362	V	L	L	L	L	359
366	V	L	L	L	L	363
476	I	F	L	F	F	473

Tableau 21 : Principaux résidus du site actif des CYP2C humains et du CYP2C5 de lapin, susceptibles d'interagir avec les substrats.

En revanche, un résidu spécifique du CYP2C8, limite la hauteur du site actif : **Phe205**, au niveau du toit, est plus encombrant qu'une isoleucine dans le CYP2C9 ou une valine dans le CYP2C5. Il s'agit du seul acide aminé aromatique du site actif du CYP2C8. Les phénylalanines 114 et 476, interagissant avec les substrats du CYP2C9 et du CYP2C5 (cf. chapitre II), sont remplacées dans le CYP2C8 par des résidus non aromatiques : Ser114 et Ile476.

Le site actif, globalement hydrophobe, possède **néanmoins deux résidus polaires, Ser114 et Asn99**, situés sur la boucle B-C.

- **Ser114**, spécifique du CYP2C8, est remplacée par des résidus hydrophobes dans les autres CYP2C. Elle se situe à l'entrée du site actif, sa fonction OH étant à 13,4 Å du fer.
- **Asn99** est un peu plus haut dans le site actif, l'atome N de sa fonction CONH₂ se situant à 16,6 Å du fer. Cette asparagine plus longue que les sérines des CYP2C5 et 2C18 et plus flexible pourrait plonger dans le site actif du CYP2C8 pour interagir avec les substrats.

Le CYP2C8 possède trois autres résidus polaires qui lui sont spécifiques : Ser100, Ser103 et Ser359. Dans notre modèle, la chaîne latérale de la sérine 100 ne pointe ni vers le site actif ni vers le canal d'accès des substrats. La sérine 103 forme une liaison hydrogène interne avec le CO de Arg108. Enfin, la sérine 359 semble trop éloignée de l'hème pour pouvoir interagir avec les substrats. Le rôle de ces trois sérines n'est pas évident a priori mais il faut garder en mémoire la grande flexibilité de la boucle B-C et les imperfections inhérentes au modèle.

Résidus	CYP				
	2C8	2C9	2C18	2C19	2C5
99	N	I	S	H	S
100	S	F	F	F	V
103	S	A	A	A	L
114	S	F	F	F	F
359	S	I	I	I	I

Tableau 22 : Quelques résidus polaires spécifiques du CYP2C8, comparés aux résidus correspondants dans les CYP2C humains et le CYP2C5

III.A.2.b Le canal d'accès des substrats

Le modèle du CYP 2C8 ne permet pas d'identifier clairement un **canal d'accès des substrats**. Les **deux accès** décrits dans les structures RX du P450_{BM3} et du CYP 2C5/3LVdH sont **possibles** (Figure 49):

- **un canal** (canal 2), **similaire à celui du P450BM-3**, se situerait entre la boucle B-C et la partie N-terminale de feuillet β. Son entrée, perpendiculaire au plan de l'hème, serait contrôlée par la boucle F-G.
- **un deuxième canal** (canal 1), **similaire à celui du CYP 2C5/3LVdH**, se glisserait entre l'hélice G et la boucle B-C, le long de l'hélice I et sous sa boucle F-G. Par contre, son entrée est fermée dans ce modèle par des liaisons hydrogènes **entre la fonction guanidinium de Arg241 de l'hélice G et le carbonyle de Arg105 sur la boucle B-C**. L'interaction avec un substrat pourrait rompre ces liaisons et permettre à la boucle B-C de s'écarter pour ouvrir le canal. **En l'absence de substrat, le canal a une entrée chargée positivement avec la présence d'une arginine 241 en plein milieu. Ceci pourrait expliquer la forte affinité du CYP 2C8 pour des composés chargés négativement** (acide rétinoïque, statines, troglitazone) ou polaires (taxol, amiodarone).

Il semble plus probable que les substrats atteignent le site actif du CYP 2C8 en passant par le canal correspondant à celui du CYP2C5/3LVdH, car cette hémoprotéine de lapin présente une forte homologie avec le CYP2C8. C'est ce canal que nous considérerons par la suite.

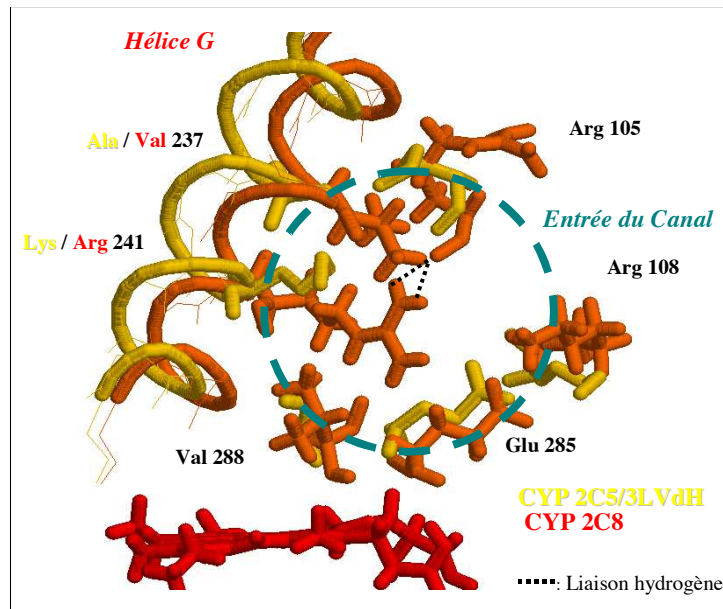


Figure 50 : Superposition des entrées des canaux d'accès des substrats du CYP2C5/3LVdH et du CYP2C8 (Marques-Soares, 2002). Les résidus communs sont indiqués en noir, ceux qui diffèrent sont en jaune pour le CYP2C5/3LVdH et en orange pour le CYP2C8. Arg241 établit des liaisons hydrogènes avec le carbonyle de Arg105, fermant ainsi l'entrée du canal.

III.A.2.c Bilan : les principales caractéristiques topologiques du CYP2C8

En conclusion, la comparaison du modèle du CYP2C8 au modèle du CYP2C9 et à la structure RX du CYP2C5 permet de définir plusieurs caractéristiques particulières au CYP2C8 :

- Son **site actif** est **plus large** que celui des autres CYP2C humains et du CYP2C5 de lapin, avec des résidus latéraux moins encombrants. Par contre sa hauteur est limitée au niveau du toit par la présence d'une phénylalanine 205 spécifique au CYP2C8.
- Cette **phénylalanine 205 est le seul résidu aromatique du site actif**. Contrairement au CYP2C9 et au CYP2C5, le CYP2C8 n'a pas de phénylalanines en position 114 et 476.
- D'après notre modèle, le CYP2C8 possède **deux résidus polaires dans son site actif** : **Ser114** (à l'entrée du site actif) et **Asn99** (située un peu plus haut dans le site actif mais suffisamment flexible pour se rapprocher des substrats).
- Le CYP2C8 comporte **trois autres résidus polaires, spécifiques** : **Ser100, Ser103, Ser359**. Leur rôle n'est pas évident a priori dans notre modèle. Ces résidus pourraient cependant se rapprocher du site actif en présence de substrats, compte tenu de la grande flexibilité conformationnelle des cytochromes P450 au niveau des boucles (chapters I et II).
- Enfin, **l'entrée du canal d'accès des substrats est chargée positivement avec la présence d'une arginine 241 en plein milieu**. Ceci pourrait expliquer la forte affinité du CYP2C8 pour des composés chargés négativement (acide rétinoïque, statines, troglitazone) ou polaires (taxol, amiodarone).

III.A.3 Modèle d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats

Les résultats du pharmacophore des substrats et du modèle du CYP2C8 ont été mis à profit pour la construction d'un modèle d'interaction de l'enzyme avec ses substrats (Marques-Soares, 2002).

III.A.3.a Docking de la fluvastatine dans le site actif modèle du CYP2C8

Un substrat représentatif du pharmacophore, la fluvastatine, a été inséré dans le site actif modèle du CYP2C8 en tenant compte des données biochimiques : son site d'oxydation a été placé à proximité du fer de l'hème (6 Å, valeur proche de la distance classique fer-site d'oxydation des substrats dans le CYP2C9; Poli-Scaife et al., 1997) et sa longue chaîne latérale a été étendue dans le canal d'accès des substrats. L'énergie du complexe CYP2C8-fluvastatine a alors été minimisée à partir de cette position de départ, puis une procédure de docking a été lancée afin de rechercher les positions d'interactions optimales de la fluvastatine dans le site actif (module Docking d'insightII). Trois étapes sont répétées de façon itérative au cours de la procédure de « docking » :

- 1) déplacement aléatoire de la molécule dans le site actif de l'hémoprotéine (par translation et rotation)
- 2) minimisation d'énergie du complexe enzyme/substrat pour rechercher le minimum d'énergie le plus proche
- 3) enregistrement de la position finale si elle diffère suffisamment des positions précédentes retenues

Après la première minimisation (Figure 51 (a)), la fluvastatine a une position proche de celle de départ : son site d'hydroxylation est placé à 6 Å du fer et sa longue chaîne carbonée s'étend dans le canal d'accès des substrats. Elle forme deux interactions majeures avec le CYP2C8 :

- **une interaction de type π - π entre son groupement p-fluorophényle et la phénylalanine 205.** Les deux cycles aromatiques de la fluvastatine et de la phénylalanine sont distants de 4,8 Å et forment un angle d'environ 80° ce qui est compatible avec une interaction π - π selon les règles de Hunter et Sanders (Hunter et al., 1991).
- **des interactions électrostatiques entre sa fonction acide carboxylique, l'arginine 241 et l'aspartate 293.**

Par contre, aucune interaction n'est visible entre le CYP2C8 et les fonctions polaires secondaires de la fluvastatine. Cependant, ces fonctions polaires sont dirigées vers la boucle B-C qui porte deux résidus polaires orientés vers le site actif : Asn99 et Ser114. Du fait de la flexibilité de la boucle B-C, ces résidus pourraient se rapprocher du substrat pour former des liaisons hydrogènes avec ses fonctions polaires secondaires (a) et (b).

Au cours des itérations du «docking», la fluvastatine s'enfonce dans le site actif en glissant sous Phe205 et entraîne avec elle l'arginine 241 qui plonge progressivement dans le canal d'accès des substrats. L'enzyme se compacte autour du substrat jusqu'à la position finale présentée Figure 51(b). Dans cette dernière structure :

- le site d'hydroxylation de la fluvastatine se situe à 5,3 Å du fer
- l'arginine 241 n'interagit plus avec la fonction acide carboxylique de la fluvastatine mais forme des liaisons hydrogènes avec les deux groupes alcools du substrat (dont la fonction polaire (b) du pharmacophore)
- l'interaction π - π entre le fluorophényle de la fluvastatine et la phénylalanine 205 est maintenue.
- Enfin, l'asparagine 99 pourrait former une liaison hydrogène faible avec le site polaire (a) de la fluvastatine situé à 2,4 Å.

Figure 51(a)

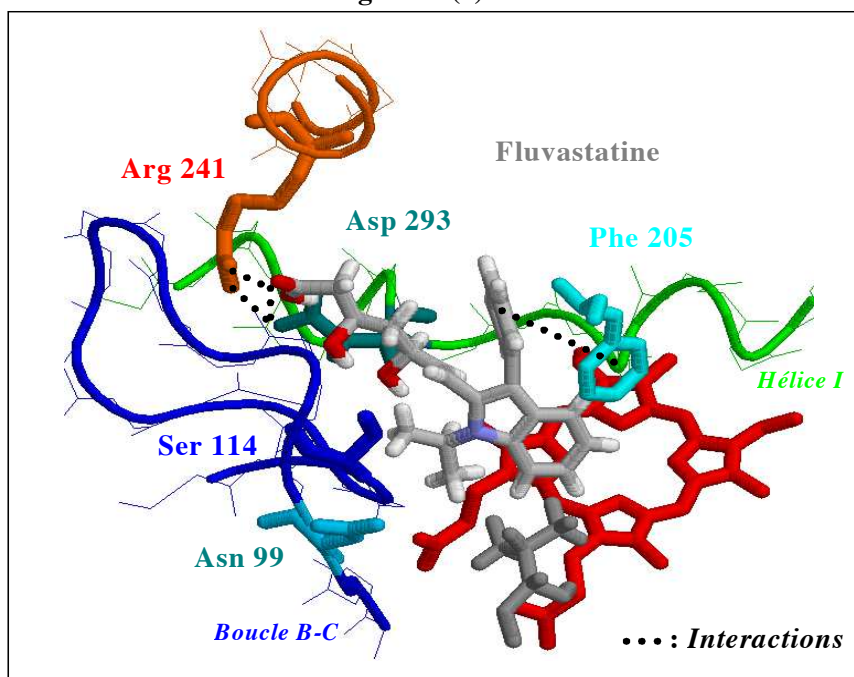


Figure 51(b)

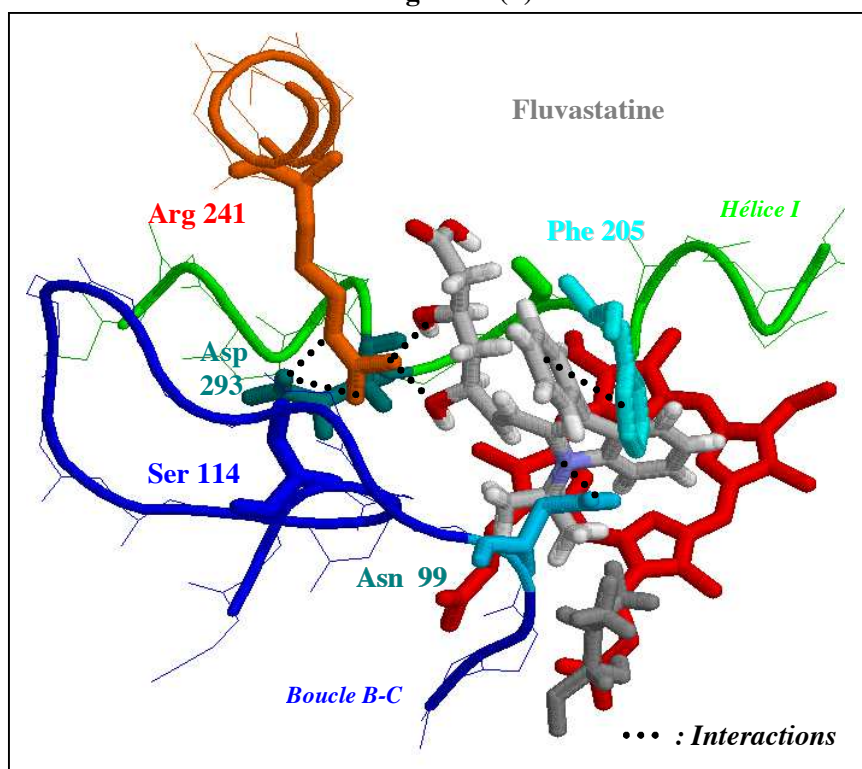


Figure 51 : « Docking » de la fluvastatine dans le site actif modèle du CYP2C8 d'après (Marques-Soares, 2002) (a) première structure minimisée obtenue après insertion de la fluvastatine dans le modèle du CYP2C8 (b) dernière structure obtenue après itérations successives.

III.A.3.b Bilan : modèle d'interaction CYP2C8/substrats

Le docking de la fluvastatine dans le site actif modèle du CYP2C8 permet de proposer un modèle d'interaction de cette hémoprotéine avec le pharmacophore des substrats (Figure 52). Les substrats formeraient deux interactions majeures avec le CYP2C8 :

- Une interaction ionique ou polaire (liaisons hydrogènes) entre leur fonction acide ou polaire terminale et l'arginine 241 et l'aspartate 293.
- Une interaction hydrophobe entre leur motif hydrophobe et la phénylalanine 205, voire π - π si ce motif est aromatique.

Leur fonction polaire (a) et leur fonction polaire (b) pourraient également établir des liaisons hydrogènes respectivement avec l'asparagine 99 (Figure Figure 51(b)) et la sérine 114 (Figure 51(a)).

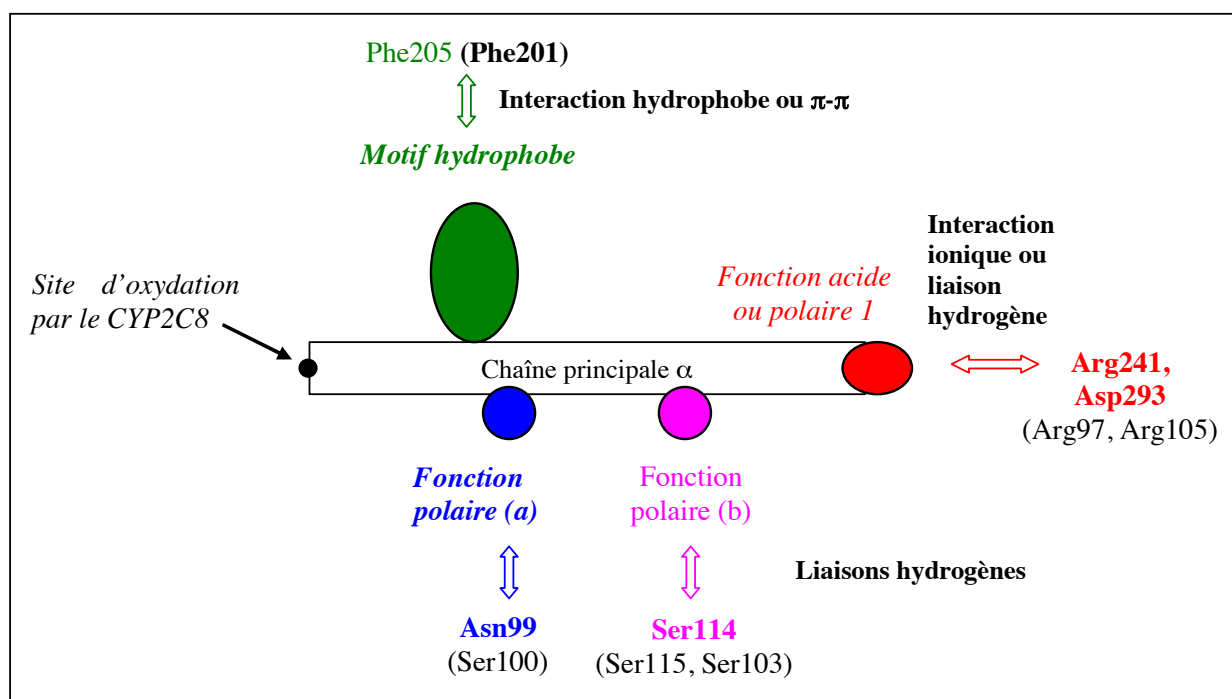


Figure 52 : Modèle d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats. Les résidus interagissant avec les substrats d'après notre modèle sont indiqués en gras. Les autres résidus possibles, mais à priori moins probables, sont indiqués entre parenthèses.

D'autres interactions, moins probables, sont indiquées Figure 52 :

- **Arg105** est située à l'entrée du canal d'accès des substrats dans notre modèle. Des liaisons hydrogènes entre son groupe carbonyle et la fonction guanidium de Arg241 ferment ce canal (cf. Figure 50). Ces liaisons seraient rompues par l'arrivée d'un substrat. La modélisation nous propose alors un scénario au cours duquel Arg241 accompagne la fluvastatine vers le site actif. Nous pouvons imaginer le scénario inverse : par un mouvement de bascule, Arg105 pourrait se rabattre et plonger à la suite du substrat, rejetant Arg241 à l'extérieur du canal. Arg105 pourrait donc être un candidat pour une interaction ionique ou polaire avec les substrats, au même titre que Arg241.

- **Arg97** est située, très bas dans le site actif à proximité de l'hème, dans notre modèle. Elle ne semble pas devoir interagir avec les substrats. Cependant, l'étude de mutagenèse de Ridderstrom et al. (Ridderstrom et al., 2000) avaient conduit les auteurs à postuler l'importance de cet acide aminé dans la reconnaissance de molécules anioniques par le CYP2C9. Nous n'avons donc pas exclu, au départ, un rôle similaire de cette arginine dans le CYP2C8.
- Une autre phénylalanine du SRS2, **Phe201**, est présente au niveau de l'hélice F, mais sa chaîne latérale ne semble pas orientée vers le site actif dans notre modèle. Cet acide aminé aromatique reste cependant un candidat potentiel pour une interaction hydrophobe ou π - π avec les substrats du CYP2C8.
- Enfin **Ser100, Ser 103 et Ser115**, résidus polaires de la boucle B-C, pourraient également interagir avec les fonction polaires secondaires des substrats en raison de la grande flexibilité de cette boucle.

III.A.4 Choix des mutations

Afin de valider ces hypothèses d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats, nous avons décidé de muter tous les acides aminés cités Figure 52 (excepté Asp293 dont le rôle avait déjà été étudié chez certains CYP2 (Domanski and Halpert, 2001)) :

- Arg241, Arg105 et Arg97 candidats pour une interaction ionique ou polaire avec les substrats
- Phe205 et Phe201, potentiellement impliqués dans une interaction hydrophobe ou π - π .
- Asn99, Ser100, Ser103, Ser114, Ser115 candidats possibles pour former des liaisons hydrogènes avec les substrats.

Plusieurs mutations ont été envisagées pour étudier l'effet de la suppression de la charge positive des arginines, de l'aromaticité des phénylalanines et de la polarité des résidus de la boucle B-C sur la reconnaissance de molécules par le CYP2C8.

Les arginines ont d'abord été mutées en alanine afin d'estimer l'importance relative de ces résidus chargés. Puis les acides aminés dont les mutations avaient les effets les plus marqués, ont été étudiés plus en détail en réalisant d'autres mutations. Arg97 a ainsi été mutée dans un deuxième temps en lysine pour conserver la charge à cette position et ainsi évaluer l'influence de la nature de l'acide aminé 97 sur l'activité du CYP2C8. Arg241 a aussi été mutée en leucine, pour supprimer la charge en conservant un certain encombrement stérique, et en acide glutamique afin d'étudier l'effet d'une inversion de charge à cette position.

Les phénylalanines 205 et 201 ont été remplacées par les acides aminés correspondants du CYP2C9 : isoleucine et leucine. Ces mutations permettent de supprimer l'aromaticité en conservant un certain volume hydrophobe à cette position. Phe205 a également été mutée en alanine pour examiner l'effet stérique à cette position clé.

Enfin Asn99 et les sérines de la boucle B-C ont été substituées par des acides aminés non polaires de structure proche : leucine et alanine. La sérine 114 a aussi été remplacée par le résidu correspondant du CYP2C9 et du CYP2C5, une phénylalanine, afin d'examiner l'effet stérique à cette position.

Deux mutations supplémentaires ont également été réalisées : S359I et I476F.

- Ser359 du SRS5 est un résidu polaire spécifique du CYP2C8 : les autres CYP2C humains et le CYP2C5 de lapin ont un acide aminé hydrophobe, une isoleucine, à cette position. Bien que le rôle de cette sérine ne soit pas évident dans notre modèle, nous avons décidé de la muter en isoleucine. Ile359 fait l'objet d'un polymorphisme génétique dans le CYP2C9 à l'origine d'une baisse d'efficacité catalytique de l'enzyme (Tableau 7). Il est donc intéressant d'étudier l'importance de l'acide aminé 359 dans le CYP2C8 afin de comparer les spécificités des deux isoformes.

- Ile476 du SRS6 est également spécifique du CYP2C8 : les autres CYP2C humains et le CYP2C5 de lapin ont un acide aminé aromatique plus encombrant, une phénylalanine, à cette position. De plus, nous avons montré par mutagenèse, le rôle de ce résidu pour la reconnaissance des substrats et inhibiteurs du CYP2C9 (Melet et al., 2003).

Enfin, le mutant F476I du CYP2C9 a des *k_{cat}* très élevées ; nous ne pouvons pas expliquer clairement ce phénomène (cf. Annexe D) (Melet et al., 2003). Nous avons voulu évaluer l'importance de la boucle C-terminale (contenant le SRS6) pour le contrôle des vitesses d'hydroxylation dans le CYP2C8. Ainsi les acides aminés de cette boucle, qui sont spécifiques du CYP2C8 par rapport aux autres CYP2C humains, ont été mutés en leurs résidus correspondants dans le CYP2C9. Les mutations envisagées sont résumées ci-dessous.

Rôle postulé	Mutations réalisées
Interaction ionique ou polaire avec les substrats	R97A, R105A, R241A R97K, R241L, R241E
Interaction hydrophobe ou π-π avec les substrats	F201L, F205I
Liaisons hydrogènes avec les fonctions polaires secondaires des substrats	N99L, S100A, S103A, S114A, S115A S114F
Importance des résidus 359 et 476, spécifiques au CYP2C8	S359I, I476F
Influence de la boucle C-terminale sur les vitesses d'hydroxylation	A471P, T473V, K474N, I476F, S482F

Tableau 23 : Liste des mutations du CYP2C8 réalisées au cours de cette thèse.

Remarquons que tous les résidus sélectionnés (excepté Arg241, adjacent au SRS4, et Ser482) appartiennent à des SRS, zones supposées interagir avec les substrats chez les CYP2 (Gotoh, 1992). L'étude de mutants ou de polymorphismes des CYP2C9 et 2C19 ont permis de montrer l'importance fonctionnelle des résidus 97 (Ridderstrom et al., 2000), 99 (Ibeanu et al., 1996; Tsao et al., 2001), 114 (Haining et al., 1999; Melet et al., 2003), 359 (Chang et al., 1997; Haining et al., 1996; Lee et al., 2002; Veronese et al., 1993; Yamazaki et al., 1998) et 476 (Melet et al., 2003) chez ces isoformes parentes. Par ailleurs, la structure RX du complexe CYP2C5-DMZ (Wester et al., 2003a) positionne les résidus 103, 114, 201, 205 et 476 à moins de 5 Å du substrat. Enfin, dans un article de modélisation publié fin 2001, Ridderstorm et al. ont analysé les différences de sélectivité des CYP2Cs humains par une méthode GRID/CPCA, qui permet de comparer une famille de protéines (Ridderstrom et al., 2001). Cette étude a identifié le CYP2C8 comme l'isoforme la plus distincte des autres CYP2Cs, en particulier au niveau des résidus 114, 205 et 476. Les acides aminés Asn99, Ser103, Ser114, Phe201, Phe205, Arg241, Lys474 et Ile476 sont, entre autres, proposés comme d'importants déterminants de la sélectivité du CYP2C8. L'ensemble de ces données confortent notre choix de mutations pour cette étude.

III.B ETUDE FONCTIONNELLE DE MUTANTS DU CYP2C8

III.B.1 Construction et expression des mutants du CYP2C8

Les ADNc des mutants du CYP2C8 ont été construits comme ceux du CYP2C9, par double PCR, puis clonés dans le vecteur d'expression pYeDP60 par recombinaison homologue dans le levure W(N) (cf. II.C.1 et partie V.B.1 du Matériel et Méthodes). Ils ont ensuite été exprimés dans la souche de levure W(R), surexprimant la réductase de levure.

Mutation	P450 (pmol/mg)	Activité réductase (nmol cyt. c réduit/min/mg prot.)	[réductase]/[P450]
2C8	60 ± 30	800 ± 300	1,8 ± 0,5
R97A	60	1080	2,4
R97K	20	240	1,6
N99L	70	890	1,7
S100A	30	300	1,3
S103A	30	790	3,5
R105A	77	850	1,5
S114A	60	980	2,2
S114F	20	560	3,7
S115A	22	501	3
F201L	25	400	2,1
F205A	50	1000	2,7
F205I	13	270	2,8
R241A	27	550	2,7
R241L	27	400	2
R241E	33	470	1,9
S359I	20	550	3,7
A471P	37	523	1,9
T473V	36	734	2,7
K474N	24	361	2
I476F	44	500	1,5
S482F	24	824	4,6

Tableau 24 : Caractérisation biochimique des microsomes de levure exprimant le CYP2C8 et ses mutants : quantité de P450 (pmol/mg de protéines), activité réductase (nmol de cytochrome c réduit par minute et par mg de protéines) et rapport de la concentration en réductase sur la concentration en P450. Les valeurs indiquées pour le CYP2C8 sont les moyennes ± l'écart type de trois mesures effectuées sur différentes préparations microsomales. Les valeurs indiquées pour les mutants correspondent aux moyennes de deux mesures réalisées sur une même préparation microsomale. Les variations entre ces deux mesures sont inférieures à 10%.

Toutes les préparations microsomales de levure contiennent du P450 détectable en immunoblot (résultats non présentés) et présentent un pic de Soret à 450 nm sous forme réduite en présence de CO et de dithionite. La teneur en P450 et l'activité réductase ont été mesurées pour chacune des préparations (Tableau 24), en suivant les protocoles usuels (cf. partie V.C.3 du Matériel et Méthodes). La quantité de P450 réductase a ensuite été calculée à partir de l'activité réductase en utilisant l'activité spécifique de la P450 réductase de levure dans nos conditions d'incubation (7500 nmol de cyt.c réduit/min/nmol de réductase (Louerat-Oriou et al., 1998)). Les écarts types indiqués pour le CYP2C8 ont été évalués sur plusieurs préparations microsomales. Ils permettent de tenir compte des différences d'efficacité de transformation de W(R) et de conditions de purification entre préparations.

Dans nos conditions de culture, le CYP2C8 sauvage a un niveau d'expression de 60 ± 30 pmol de P450 par mg de protéines microsomales (Tableau 24). Les microsomes contenant les P450 mutés ont une teneur en P450 similaire, à l'exception de cinq mutants (R97K, S114F, S115A, F205I et S359I) qui ont un niveau d'expression plus faible. Le mutant F205I a le niveau d'expression le plus bas (13 pmol/mg de protéines au lieu de 60 ± 30 pmol/mg de protéines).

L'activité réductase des microsomes contenant le CYP2C8 varie de 500 à 1100 nmol de cytochrome c réduit par min et par mg de protéines. Les microsomes contenant les P450 mutés ont, pour la plupart, une activité réductase comparable. Les microsomes correspondant aux mutants R97K, S100A, F205I et K474N ont une activité réductase plus faible, mais leur rapport molaire réductase/P450 se situe aux alentours de 2, comme pour le CYP2C8 sauvage.

Tous les microsomes contenant les P450 mutés ont un rapport molaire réductase/P450 qui vaut 1 à 2,5 fois le rapport molaire des préparations microsomales de CYP2C8. La quantité de réductase n'est donc pas un facteur limitant pour l'activité des différents mutants.

III.B.2 Substrats utilisés pour les tests d'activité

Les propriétés catalytiques des différents mutants ont été comparées à celles du CYP2C8 sauvage à l'aide de six substrats:

- Le taxol, un marqueur d'activité du CYP2C8
- L'acide rétinoïque, la fluvastatine, la troglitazone, bons substrats du CYP2C8, également métabolisés par le CYP2C9 avec des efficacités catalytiques distinctes.
- Le DMZ et le diclofénac, substrats communs aux CYP2C humains et au CYP2C5 de lapin.

III.B.2.a Le Taxol, marqueur d'activité du CYP2C8

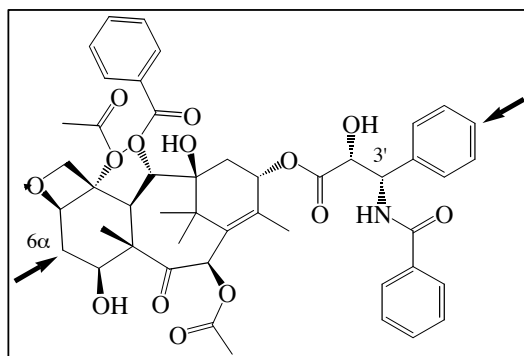


Figure 53 : Les sites d'oxydation du taxol par les cytochromes P450 de foie humain.

Le taxol est un anticancéreux métabolisé *in vivo* en un métabolite majoritaire (6 α -hydroxytaxol) et un métabolite minoritaire (p-C3'-hydroxyphényl-taxol) (Harris et al., 1994; Monsarrat et al., 1993). **L'activité de 6 α -hydroxylation du taxol est spécifique du CYP2C8** (Rahman et al., 1994).

III.B.2.b L'Acide rétinoïque, la fluvastatine et la troglitazone, substrats communs aux CYP2C8, 2C9 (et 3A4)

L'acide rétinoïque, dérivé de la vitamine A, est hydroxylé *in vitro* en position 4 par trois CYP hépatiques (CYP2C8, CYP2C9 et CYP3A4), le CYP2C8 ayant la meilleure efficacité catalytique (Tableau 25).

Des études d'inhibition et des analyses de corrélation montrent que le CYP2C8 est la principale enzyme responsable de la 4-hydroxylation de l'acide rétinoïque dans le foie humain (Nadin and Murray, 1999). **Le CYP2C8 est donc la principale enzyme catalysant la 4-hydroxylation de l'acide rétinoïque *in vitro* et *in vivo*.**

CYP	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque		
	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km
CYP2C8	1,4 ± 0,1	2,1 ± 0,2	1,5
CYP2C9	1,1 ± 0,7	0,02 ± 0,01	0,18
CYP3A4	2,6 ± 1	0,04 ± 0,01	0,15

Tableau 25 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque par des microsomes de cellules lymphoblastiques exprimant les CYP2C8, 2C9 et 3A4 (McSorley and Daly, 2000) .

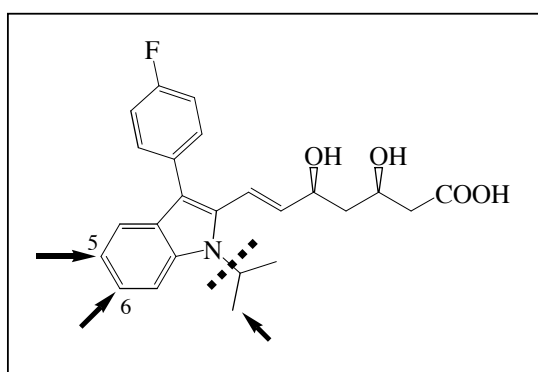


Figure 54 : Les différents sites d'oxydation de la fluvastatine par les cytochromes P450 de foie humain.

La fluvastatine est un antilipémiatique transformé *in vivo* en trois métabolites, les 5-hydroxy-, 6-hydroxy- et N-déisopropyl-fluvastatine (Dain et al., 1993) (Figure 54). Trois enzymes hépatiques sont impliquées dans ce métabolisme : les CYP2C8, CYP2C9 et CYP3A4. La 6-hydroxylation et la N-déalkylation sont catalysées principalement par le CYP2C9, la 5-hydroxylation par le CYP3A4 et le CYP2C8 (Tableau 26).

CYP	5-hydroxylation		6-hydroxylation		N-déisopropylation	
	Km (μM)	kcat (h ⁻¹)	Km (μM)	kcat (h ⁻¹)	Km (μM)	kcat (h ⁻¹)
CYP2C8	2,8	7,9	-	-	-	-
CYP2C9	1	2,3	0,9	4,7	1,8	2,3
CYP3A4	7,1	120	-	-	-	-

Tableau 26 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de la fluvastatine par des microsomes de cellules d'insectes exprimant les CYP2C8, 2C9 et 3A4 (Fischer et al., 1999).

La troglitazone est un antidiabétique qui est éliminé chez l'homme par conjugaison et dans une moindre mesure par oxydation catalysée par des cytochromes P450. *In vitro*, la troglitazone est transformée en métabolite quinonique (Figure 55) par les CYP2C8, 2C9, 2C19 et 3A4 (Yamazaki et al., 1999). Les CYP2C ont une meilleure affinité (Km divisées par 40) pour la troglitazone que le CYP3A4 mais une kcat de 10 à 80 fois plus faible. La fluvoxamine, un inhibiteur du CYP2C19 et le sulfaphénazole, inhibiteur du CYP2C9, n'affectent pas la formation de ce métabolite par des microsomes hépatiques. **Le CYP3A4 et le CYP2C8 seraient donc les principaux cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de la troglitazone dans le foie humain.** L'importance relative de ces deux

P450 dans le métabolisme de la troglitazone *in vivo*, varierait en fonction de la composition en CYP2C8 et CYP3A4 du foie humain et de la concentration en troglitazone (Yamazaki et al., 1999).

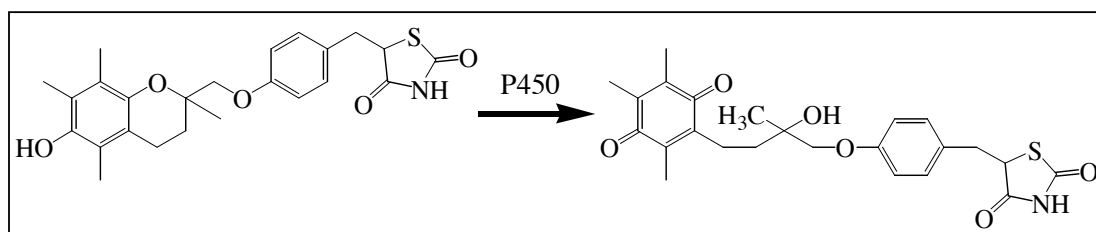


Figure 55 : Oxydation de la troglitazone en métabolite quinonique catalysée par les cytochromes P450 hépatiques (CYP2C8 et CYP3A4 principalement).

CYP	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
CYP2C8	$2,7 \pm 2,5$	$4,2 \pm 1$	1,6
CYP2C9	$3,6 \pm 2,9$	$0,6 \pm 0,1$	0,2
CYP2C19	$3,1 \pm 1,8$	$2,8 \pm 0,3$	0,9
CYP3A4	120 ± 5	47 ± 1	0,4

Tableau 27 : Constantes cinétiques d'oxydation de la troglitazone par des microsomes de cellules d'insectes exprimant les CYP2C8, 2C9, 2C19 et 3A4 (Supersomes, Gentest) (Yamazaki et al., 1999).

III.B.2.c Le DMZ et le diclofénac, substrats communs au CYP2C humains et au CYP2C5 de lapin

L'analogue du sufaphénazole, DMZ, est un bon substrat de tous les CYP2C humains et du CYP2C5 de lapin (Marques-Soares et al., 2003). Il est hydroxylé majoritairement sur le groupe 4-méthyl-phényle (cf. Figure 16) et porte un groupe phényle-pyrazole qui pourrait former une interaction π - π avec les phénylalanines du CYP2C8.

L'antiinflammatoire diclofénac est métabolisé par tous les CYP2C humains et par le CYP2C5 de lapin mais avec des régiosélectivités différentes (cf. Tableau 15). Le CYP2C9 et le CYP2C5 hydroxylent ce substrat sélectivement en position 4' avec des Km inférieures à $100 \mu\text{M}$ tandis que les CYP2C8, 2C18 et 2C19 produisent un mélange de métabolites 4'-hydroxy et 5-hydroxy- diclofénac avec des Km plus élevées (Mancy et al., 1999). Ce substrat, bien que moyennement affin pour le CYP2C8 (Km de l'ordre de $100 \mu\text{M}$), est intéressant pour examiner l'effet des mutations du CYP2C8 sur la régiosélectivité d'hydroxylation.

En conclusion, le taxol, l'acide rétinoïque, la fluvastatine, la troglitazone et le DMZ sont de bons substrats du CYP2C8. Ils comportent certains motifs structuraux communs étudiés lors de la construction du pharmacophore mais leurs structures sont suffisamment variées pour nous permettre d'étudier plusieurs aspects des interactions du CYP2C8 avec ses substrats. Ce sont des molécules:

- de taille variable; le taxol est un substrat volumineux alors que le DMZ est une petite molécule et l'acide rétinoïque un substrat à longue chaîne hydrophobe.
- anioniques à pH physiologique (fluvastatine, acide rétinoïque, troglitazone) ou neutres (taxol, DMZ)
- comportant un phényle à 4 \AA du site d'hydroxylation (taxol, fluvastatine, DMZ) ou un groupe alkyle (troglitazone, acide rétinoïque).

- comportant deux (taxol, fluvastatine, troglitazone), une (DMZ) ou aucune fonction polaire secondaire (acide rétinoïque)

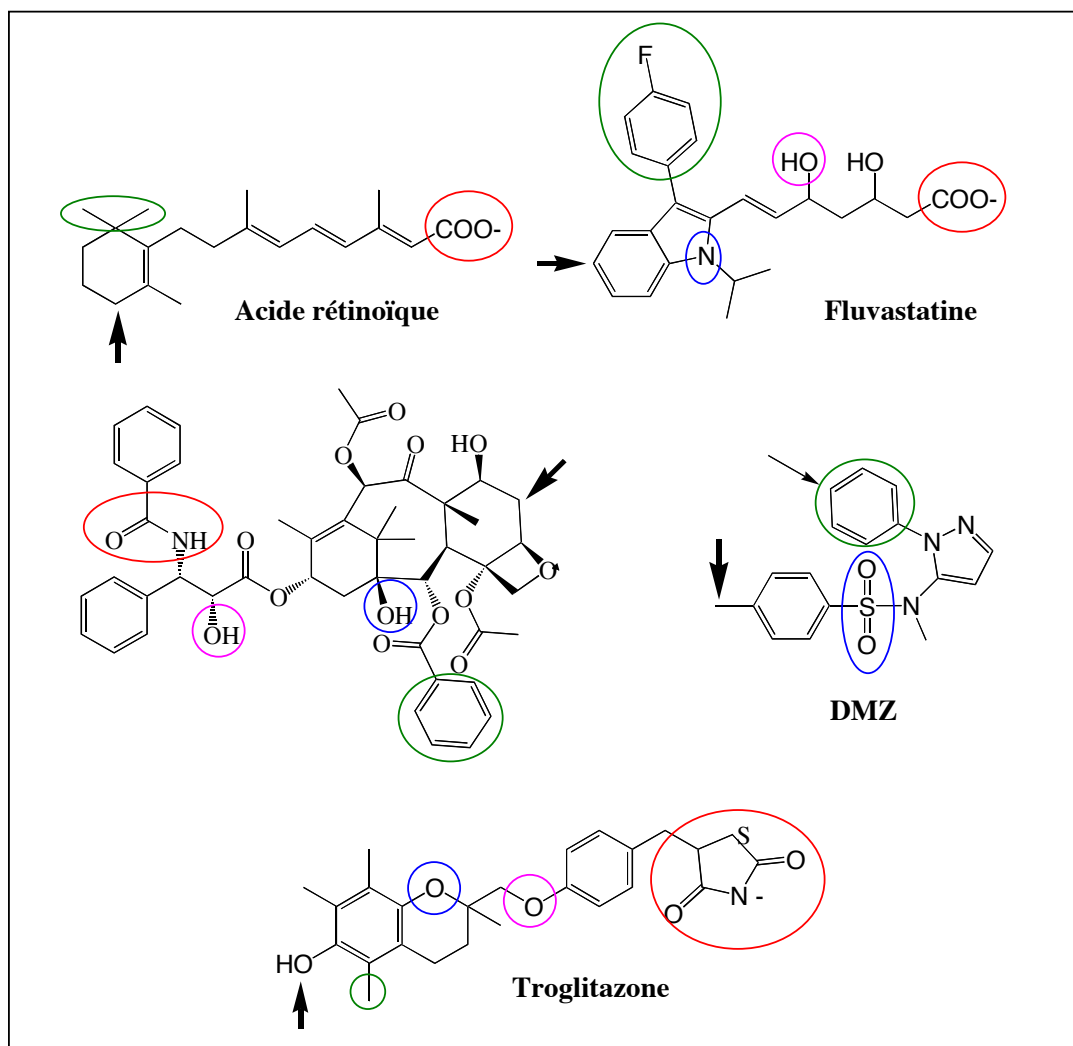


Figure 56 : Les substrats du CYP2C8 utilisés pour cette étude et les motifs structuraux mis en évidence lors de la construction du pharmacophore (représentation à pH physiologique). Les motifs hydrophobes sont entourés en vert, les sites polaires (a) en bleu, les sites polaires (b) en orange et les sites anioniques ou polaires terminaux en rouge. Les sites d'oxydation majoritaire par le CYP2C8 sont indiqués par des flèches.

Ces molécules variées devraient permettre d'évaluer les effets stériques au sein du site actif et de tester nos hypothèses d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats (interaction ionique ou polaire, interaction hydrophobe ou π - π , liaisons hydrogènes...). Enfin, le diclofénac, moins affiné pour le CYP2C8, sera utilisé afin d'examiner l'effet des mutations sur la régiosélectivité d'hydroxylation.

III.B.3 Etude de l'effet des mutations sur l'activité du CYP2C8

Avant de tester ces substrats sur les mutants, nous avons déterminé les conditions d'incubation et d'analyse HPLC avec le CYP2C8 sauvage. Les gradients d'HPLC séparant les substrats de leurs métabolites ont été mis au point au préalable avec l'aide de Patrick Dansette. Puis nous avons déterminé le domaine de linéarité de la formation des produits majoritaires en fonction de la quantité de protéines et du temps. Un criblage d'activité des 21 mutants du CYP2C8 a alors été réalisé avec quatre substrats, taxol, acide rétinoïque, fluvastatine et diclofénac, dans les conditions d'incubation suivantes :

- P450 0,05 μ M, taxol 50 μ M, 3 minutes
- P450 0,05 μ M, acide rétinoïque 200 μ M, 2 minutes
- P450 0,05 μ M, fluvastatine 100 μ M, 10 minutes
- P450 0,05 μ M, diclofénac 800 μ M, 10 minutes

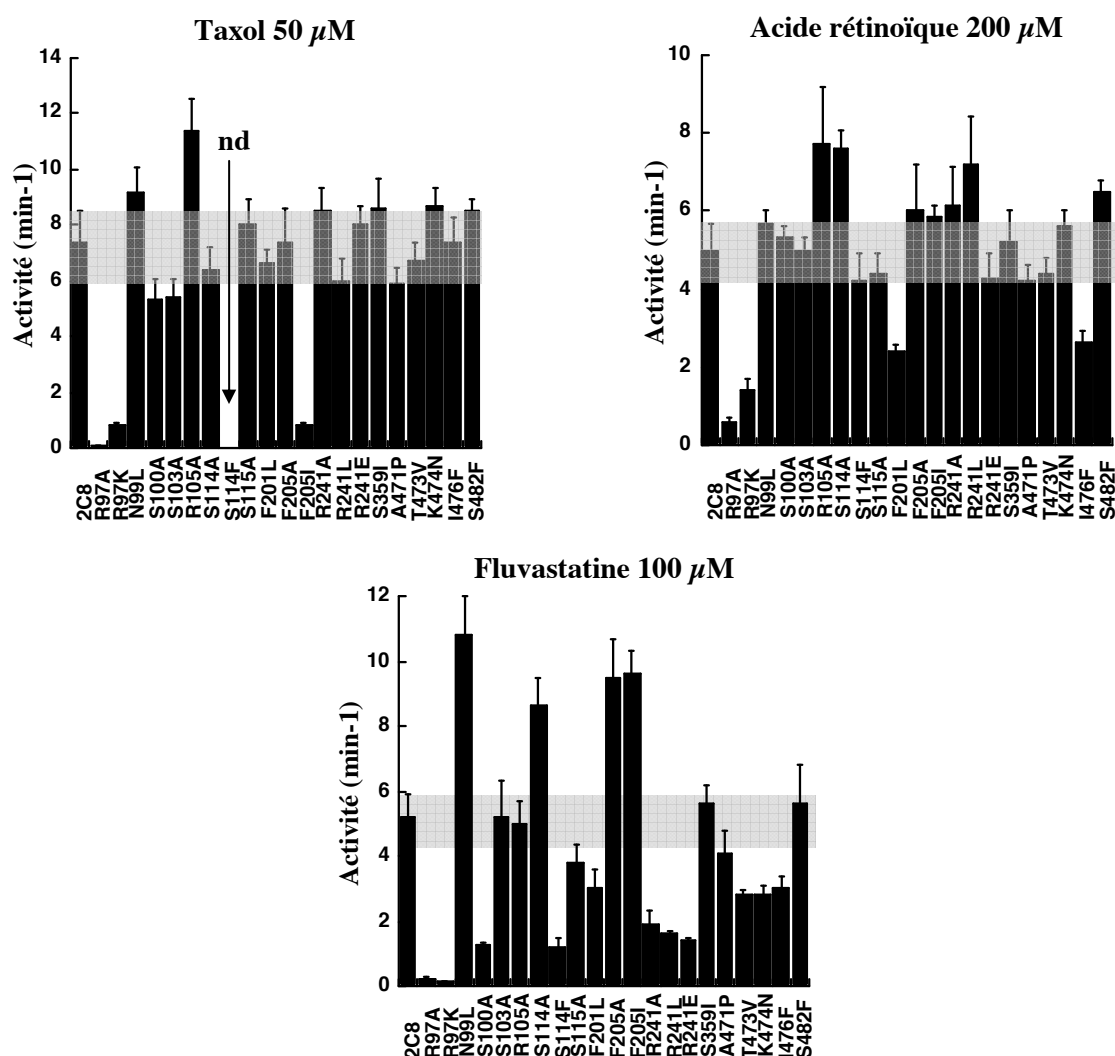


Figure 57 : Activités d'hydroxylation du taxol 50 μ M, de l'acide rétinoïque 200 μ M, et de la fluvastatine 100 μ M par le CYP2C8 et ses mutants (moyenne \pm l'écart type sur trois mesures). La zone grisée permet de visualiser les valeurs non significativement différentes de celles du CYP2C8; nd = métabolite non détecté.

Les temps choisis se situent dans la zone de linéarité des cinétiques d'hydroxylation par le CYP2C8. Les concentrations en substrat sont au moins 3 fois supérieures à la Km du CYP2C8 sauvage pour avoir des vitesses élevées permettant la détection de faibles activités.

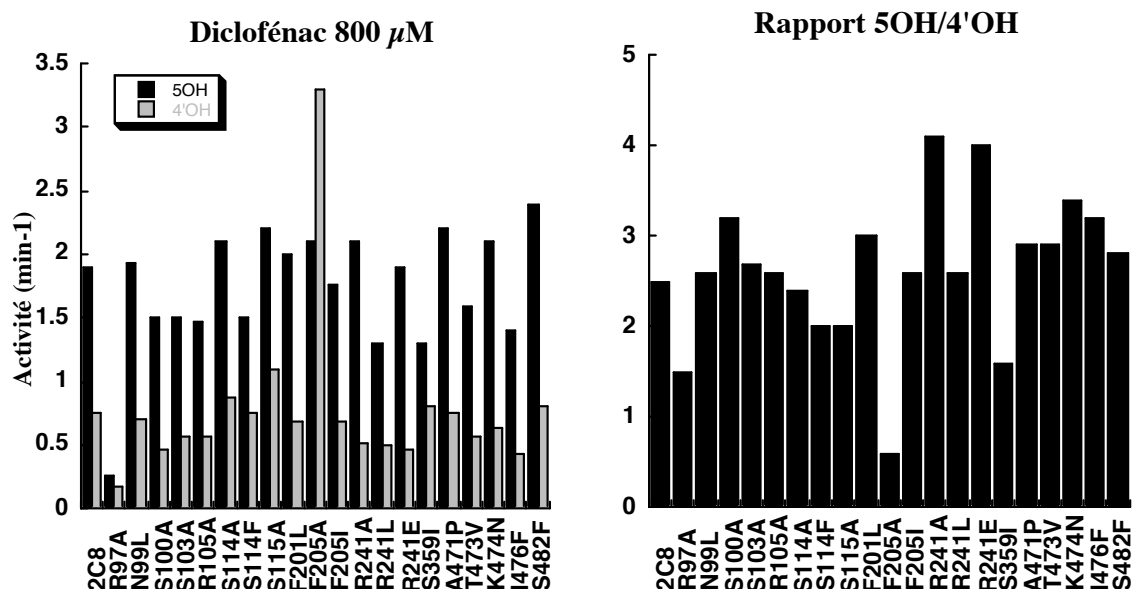


Figure 58 : Activités d'hydroxylation du diclofénac 800 µM par le CYP2C8 et ses mutants et rapport de produits formés 5OH/4'OH. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de deux mesures, l'écart entre ces deux mesures n'excédant pas 10%.

Plusieurs mutations de la boucle B-C (SRS1) induisent des effets très marqués sur les activités d'hydroxylation du CYP2C8 :

- **R97A et R97K sont considérablement moins actifs que le CYP2C8 pour les quatre substrats testés.** Les activités d'hydroxylation sont divisées par un facteur 4 à 8 avec l'acide rétinéique et le diclofénac, et par un facteur supérieur à 10 avec les autres substrats (cf. ci-dessous).

CYP	6α-hydroxylation du taxol 50 µM	4-hydroxylation de l'acide rétinéique 200 µM	5-hydroxylation de la fluvastatine 100 µM	Hydroxylation du diclofénac 800 µM	
				4'OH	5OH
2C8	7,4 ± 0,8	5 ± 0,4	5,2 ± 0,4	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2
R97A	0,08 ± 0,01	0,6 ± 0,06	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,04
R97K	0,8 ± 0,08	1,4 ± 0,3	0,16 ± 0,01	nm	nm

Tableau 28 : Comparaison des activités du CYP2C8 et des mutants R97A et R97K envers le taxol 50 µM, l'acide rétinéique 200 µM, la fluvastatine 100 µM et le diclofénac 800 µM; nm= non mesuré.

- **S114F n'hydroxyle plus le taxol :** aucun métabolite n'est détecté même après 30 minutes d'incubation. Ce mutant a aussi une **activité de 5-hydroxylation de la fluvastatine divisée par 4** alors que la 4-hydroxylation de l'acide rétinéique et du

diclofénac ne semblent pas affectées. A l'inverse, S114A a des activités d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine légèrement augmentées par rapport au CYP2C8 sauvage. **Les mutations en position 114 induisent donc des effets modulés en fonction des substrats pris en charge et de l'acide aminé substitué en position 114.**

Les mutations de la phénylalanine 205 de l'hélice F (SRS2) entraînent également des modifications d'activité modulées. F205A et F205I ont une activité de 4-hydroxylation de l'acide rétinoïque similaire à celle du CYP2C8. Par contre, ils sont plus actifs que l'enzyme sauvage vis-à-vis de la 5-hydroxylation de la fluvastatine. **F205I a une activité de 6 α -hydroxylation du taxol divisée par 10** alors que F205A a une activité qui n'est pas modifiée pour ce substrat. Enfin, **F205A est la seule mutation qui modifie de façon significative la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac**: le rapport de métabolites produits 5OH/4'OH est de 0,5 au lieu de 3 pour le CYP2C8 sauvage.

Les autres mutations ont des effets globalement moins prononcés :

- Le mutant **S100A** a une activité de 5-hydroxylation de la fluvastatine qui est 4 fois inférieure à celle du CYP2C8 mais les autres activités ne sont pas significativement modifiées.
- **Les mutations R241A, R241L, R241E ont des effets globalement similaires.** Elles induisent une diminution de l'activité de 5-hydroxylation de la fluvastatine d'un facteur 3 mais n'affectent pas les activités d'hydroxylation du taxol et de l'acide rétinoïque.
- Les mutants **F201L et I476F** ont des activités de 5-hydroxylation de la fluvastatine et de 4-hydroxylation de l'acide rétinoïque divisées par un facteur de l'ordre de 2.
- Les mutants **T473V et K474N** du SRS6 ont des vitesses d'hydroxylation de la fluvastatine environ 2 fois plus faibles que celle du CYP2C8. Inversement, **N99L** a une activité multipliée par deux avec ce substrat.
- Enfin, les mutations S103A, R105A, S359I, A471P et S482F n'apportent pas de modifications significatives d'activité quel que soit le substrat testé.

Ces tests préliminaires mettent en évidence l'importance fonctionnelle de trois résidus en particulier : les acides aminés 97, 114 et 205. Cependant, ils ne portent que sur une activité à concentration de substrat donnée. Pour compléter cette étude préliminaire, nous avons déterminé les constantes cinétiques de la plupart des mutants vis-à-vis du taxol, de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine. Les constantes cinétiques d'hydroxylation du diclofénac ont été calculées uniquement pour les mutations en position 205 car c'est en mutant cette position que nous avons constaté les changements de régiosélectivité les plus importantes.

Afin d'étudier plus en détail les interactions du CYP2C8 avec les motifs du pharmacophore des substrats, nous avons utilisé deux substrats supplémentaires, le DMZ et la troglitazone. D'après notre modèle de pharmacophore, le DMZ possède une fonction polaire (a) et un motif hydrophobe phényle. La troglitazone possède tous les motifs structuraux du pharmacophore mais son motif hydrophobe n'est pas aromatique : il s'agit d'un méthyle. Nous avons mesuré les constantes cinétiques d'hydroxylation du DMZ par les mutants des résidus 97 à 241, proposés dans le modèle d'interaction du CYP2C8 avec ses substrats. Dans le cas particulier du mutant R241A, nous avons aussi testé l'inhibition de la 6 α -hydroxylation du taxol par la troglitazone. Nous avons préféré mesurer une CI_{50} plutôt qu'une K_m par souci d'économie en enzyme et en temps (la mesure de constantes cinétiques aurait nécessité de mettre au point un nouveau gradient d'HPLC).

Pour simplifier la discussion, les résultats sont présentés par type de résidus mutés (Tableau 29).

N° paragraphe	Titre du paragraphe : objectif de l'étude de mutagenèse	Résidus considérés	Localisation des résidus dans notre modèle
III.B.4	Recherche du résidu interagissant avec la fonction anionique ou polaire terminale des substrats	Arg97 (SRS1) Arg105 (SRS1) et Arg241 (SRS2)	Boucle B-C près de l'hème à l'entrée du canal d'accès des substrats
III.B.5	Recherche du résidu interagissant avec la zone hydrophobe des substrats	Phe201, Phe205 (SRS2)	Toit du site actif (hélice F)
III.B.6	Recherche des résidus interagissant avec les fonctions polaires secondaires des substrats	Asn99, Ser100, Ser103, Ser114 et Ser115 (SRS1) Ser359 (SRS5)	Boucle B-C Boucle 359-366
III.B.7	Influence des résidus de la boucle C-terminale sur la spécificité de substrat et les vitesses d'hydroxylation du CYP2C8	Ala471, Thr473, Lys474, Ile476 (SRS6), Ser482	Boucle C-terminale

Tableau 29 : Les quatre groupes de résidus sélectionnés pour cette étude de mutagenèse.

III.B.4 Recherche du résidu interagissant avec la fonction anionique ou polaire terminale des substrats

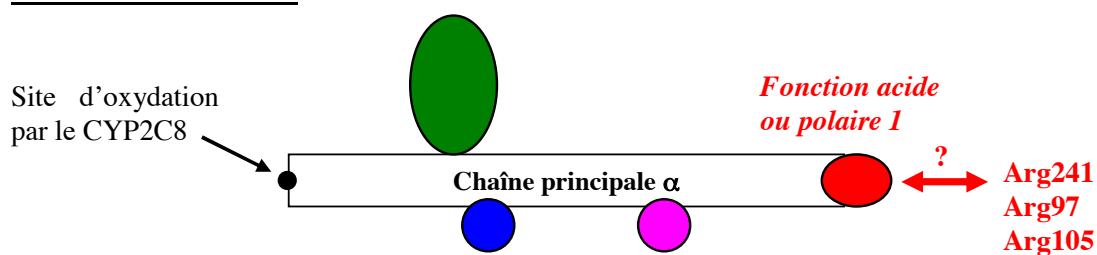


Figure 59 : Représentation schématique des interactions potentielles entre les fonctions acides ou polaires terminales des substrats et trois arginines du CYP2C8.

Les résidus cationiques Arg241, Arg105 et éventuellement Arg97 pourraient interagir avec les fonctions acides ou polaires terminales des substrats du CYP2C8 (cf. Figure 52 et Figure 59).

Ces trois arginines ont été mutées dans un premier temps en alanine, pour examiner l'importance relative de ces résidus chargés pour la reconnaissance de substrats anioniques (acide rétinolique, fluvastatine) ou polaires (taxol). Le DMZ ne comporte aucune fonction acide ou polaire terminale d'après le pharmacophore. Ses constantes cinétiques ne devraient pas être modifiées à priori; nous avons donc utilisé ce substrat au départ comme témoin négatif.

III.B.4.a Résultats

CYP	6 α -hydroxylation du taxol			4-hydroxylation du DMZ		
	Km (μ M)	kcat (min^{-1})	kcat/Km	Km (μ M)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
2C8	10 \pm 2	9 \pm 2	0,9	37 \pm 4	16 \pm 6	0,4
R97A	40 \pm 5	0,1 \pm 0,03	0,003	402 \pm 31	3,8 \pm 0,5	0,009
R97K	94 \pm 12	2 \pm 0,4	0,02	455 \pm 68	3,3 \pm 0,6	0,007
R105A	19 \pm 3	16 \pm 2	0,8	49 \pm 7	24 \pm 4	0,5
R241A	15 \pm 1	11 \pm 1	0,7	94 \pm 14	19 \pm 4	0,2
R241L	13 \pm 1	8 \pm 1	0,6	37 \pm 6	52 \pm 6	1,4
R241E	13 \pm 1	10 \pm 2	0,8	43 \pm 4	13 \pm 1	0,3

Tableau 30 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol et du DMZ (substrats non chargés) par le CYP2C8 et ses mutants en positions 97, 105 et 241 (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes) . Les mesures ont été réalisées dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

CYP	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque			5-hydroxylation de la fluvastatine		
	Km (μ M)	kcat (min^{-1})	kcat/Km	Km (μ M)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
2C8	32 \pm 4	6 \pm 1	0,2	29 \pm 4	7 \pm 2	0,24
R97A	121 \pm 11	0,9 \pm 0,1	0,007	70 \pm 9	0,3 \pm 0,1	0,004
R97K	64 \pm 6	1,8 \pm 0,4	0,03	105 \pm 10	0,3 \pm 0,1	0,003
R105A	33 \pm 4	9 \pm 2	0,3	56 \pm 6	8 \pm 1,5	0,14
R241A	66 \pm 7	7,6 \pm 1	0,1	113 \pm 11	4 \pm 0,7	0,03
R241L	57 \pm 5	9 \pm 1	0,2	102 \pm 14	2,2 \pm 0,6	0,02
R241E	61 \pm 4	5 \pm 0,6	0,08	126 \pm 11	2,2 \pm 0,4	0,02

Tableau 31 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine (substrats anioniques à pH physiologique) par le CYP2C8 et ses mutants en positions 97, 105 et 241 (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes) . Les mesures ont été réalisées dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

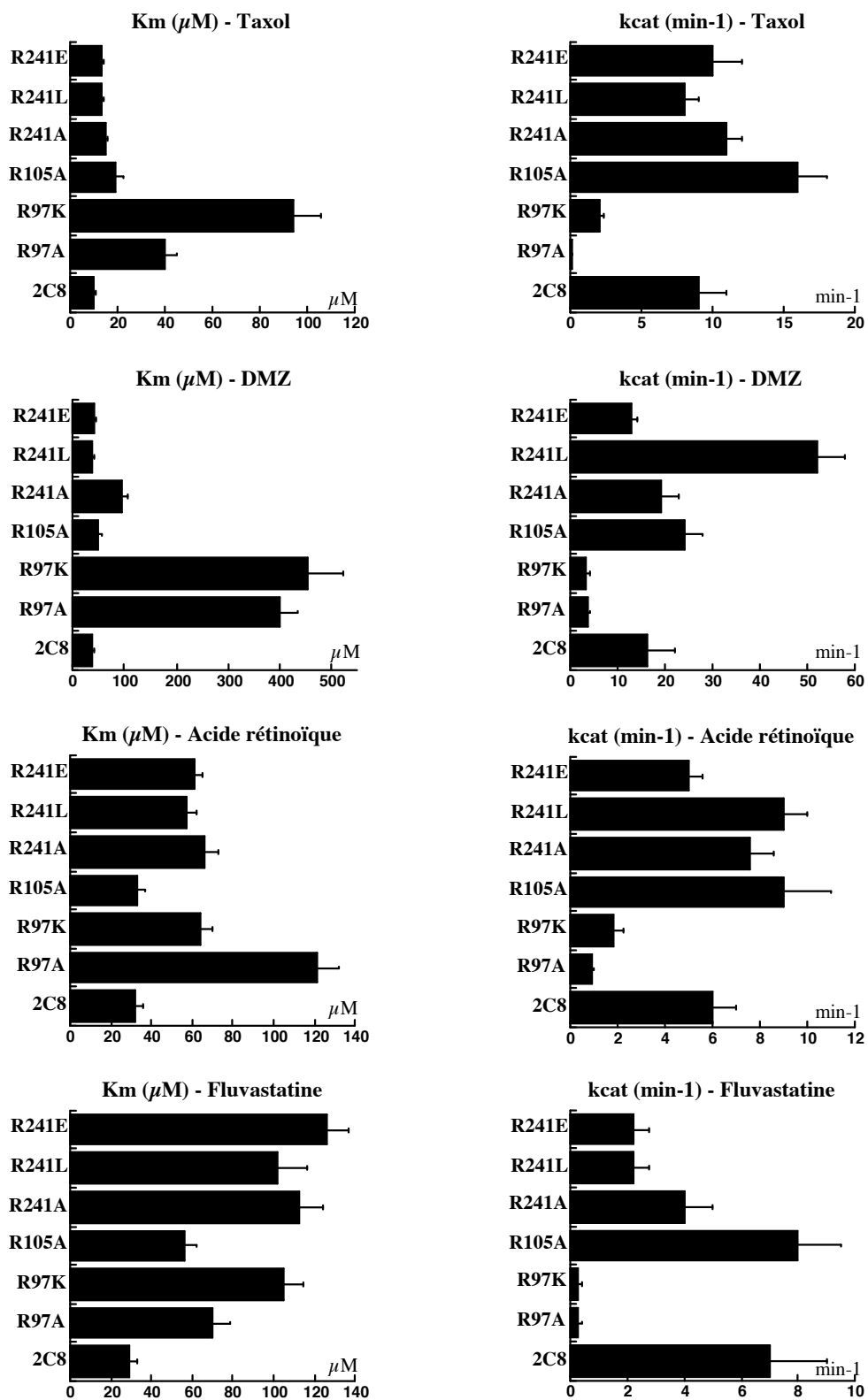


Figure 60 : Histogrammes permettant de visualiser les différences de K_m et k_{cat} entre le CYP2C8 et ses mutants en positions 97, 105 et 241 (données des tableaux 30 et 31).

D'après les tests préliminaires d'activité (cf. III.B.3), nous pouvons effectuer un premier classement des trois arginines en fonction de l'impact de leurs mutations sur l'activité de l'enzyme : la mutation R97A conduit à une chute d'activité quel que soit le substrat, la substitution de R241A réduit l'activité d'hydroxylation de la fluvastatine alors que la mutation R105A semble sans effet. Les mesures de constantes cinétiques confirment et complètent ces données préliminaires :

- La mutation R97A induit un effondrement des efficacités catalytiques (d'un facteur 30 à 300) quel que soit le substrat métabolisé. Cette chute d'efficacité catalytique est due à des augmentations de K_m (d'un facteur 2,5 à 10) couplées à des diminutions de k_{cat} (d'un facteur 4 à 25).
- Contrairement à R97A, la mutation R241A conduit principalement à des modifications de K_m , les constantes k_{cat} étant similaires à celle du CYP2C8 sauvage (excepté pour la fluvastatine où la k_{cat} est divisée par environ 2). Ces effets sont dépendants du substrat pris en charge (Tableau 32). On observe ainsi une augmentation des K_m , non significative avec le taxol, substrat polaire, ($K_m \times 1,5$) et plus marquée avec le DMZ ($K_m \times 2,5$) et l'acide rétinolique et la fluvastatine, deux substrats anioniques à pH physiologique (K_m multipliées par un facteur 2,5 à 4). L'impact de cette mutation sur la reconnaissance des substrats anioniques est confirmée par la perte importante du pouvoir inhibiteur de la troglitazone sur l'activité de 6 α -hydroxylation du taxol ($CI_{50} \times 6$, Tableau 32).

Substrats (fonction terminale polaire ou anionique à pH physiologique)	Km ou CI_{50} (μM)	
	2C8	R241A
Taxol (CONH)	10 \pm 2	15 \pm 1 ($\times 1,5$)
Acide rétinolique (COO ⁻)	32 \pm 4	86 \pm 9 ($\times 2,5$)
Fluvastatine (COO ⁻)	29 \pm 4	113 \pm 11 ($\times 4$)
Troglitazone (CO-N-CO)	8 \pm 1	48 \pm 7 ($\times 6$)

Tableau 32 : Comparaison des K_m ou CI_{50} du CYP2C8 et du mutant R241A vis-à-vis de quatre substrats (le taxol à fonction terminale polaire (amide) - l'acide rétinolique, la fluvastatine et la troglitazone à fonction terminale anionique à pH physiologique). Les K_m sont celles des tableaux 30 et 31. L'effet inhibiteur de la troglitazone sur l'activité de 6 α -hydroxylation du taxol a été mesuré à la K_m de l'enzyme pour le taxol. Les facteurs multiplicatifs entre les K_m ou CI_{50} du mutant R241A et les constantes correspondantes du CYP2C8 sont indiqués en rouge entre parenthèses.

- Enfin, la mutation R105A a peu d'effet sur les constantes cinétiques de l'enzyme pour tous les substrats testés (taxol, DMZ, acide rétinolique et fluvastatine). L'efficacité catalytique de l'enzyme est globalement conservée. Les K_m du mutant sont comparables à celles du CYP2C8 sauvage avec l'acide rétinolique et le DMZ et multipliées par environ deux dans le cas du taxol et de la fluvastatine. De même les k_{cat} subissent des modifications mineures (augmentations d'un facteur 1,5 à 1,8).

Deux arginines du CYP2C8 semblent donc importantes sur le plan fonctionnel : Arg97 et Arg241. D'autres mutants ont été construits à ces positions (R97K, R241L, R241E) pour faciliter l'interprétation des résultats. Le mutant R97K a des constantes cinétiques similaires à celles de R97A vis-à-vis du DMZ et de la fluvastatine. Avec le taxol et l'acide rétinolique, R97K a des efficacités catalytiques meilleures que R97A mais qui restent très inférieures à celles du CYP2C8 sauvage (0,02 au lieu de 0,9 pour le taxol et 0,03 au lieu de 0,2 pour l'acide rétinolique). Les

mutations R241L et R241E ont les mêmes effets que R241A, sauf avec le DMZ. Elles n'affectent pas significativement la K_m d'hydroxylation du DMZ alors que la mutation R241A provoque l'augmentation de cette K_m par un facteur 2,5.

III.B.4.b Discussion

Ces résultats de mutagenèse nous permettent d'évaluer l'importance de trois arginines pour la reconnaissance des substrats et l'activité catalytique du CYP2C8.

Arg105 du CYP2C8 semble avoir un rôle mineur car sa mutation en alanine a peu d'effets sur les constantes cinétiques de l'enzyme. Ce résidu n'est pas non plus essentiel au fonctionnement catalytique du CYP2C9. En effet, sa mutation en alanine dans le CYP2C9 ne modifie pas significativement la K_m de 4'-hydroxylation du diclofénac par cette isoforme (Ridderstrom et al., 2000). Ses mutations en histidine ou phénylalanine induisent une baisse d'activité modérée et indépendante de la nature du substrat (warfarine, diclofénac ou pyrène) (Dickmann et al., 2003). Enfin, la structure RX du CYP2C9 (Williams et al., 2003) positionne ce résidu à l'extérieur de la protéine, au contact du solvant. Arg105 n'est pas dirigée pas vers le canal d'accès des substrats et ne semble pas avoir de rôle particulier; Cet acide aminé 105 pourrait avoir un positionnement relativement similaire dans le CYP2C8.

Deux autres résidus, Arg241 et Arg97, sont importants pour le fonctionnement du CYP2C8.

Les modifications de charge (E, L) et de polarité (L) en position **241** ont les mêmes effets catalytiques, dépendants de la nature du substrat. Les mutations R241L et R241E n'affectent pas significativement la reconnaissance du DMZ, substrat dépourvu de fonction terminale acide ou polaire, ou du taxol, substrat polaire (Tableau 30). Par contre, elles induisent une augmentation des K_m d'hydroxylation de l'acide rétinoïque ($\times 2$) et de la fluvastatine ($\times 4$), deux substrats à fonction terminale acide ($pK < 7$), anioniques à pH physiologique (Tableau 31). Ces résultats pourraient concorder avec notre hypothèse d'interaction ionique ou polaire (liaisons hydrogènes) entre le résidu Arg241 du CYP2C8 et les fonctions terminales acides du pharmacophore des substrats. Cette interaction devrait être a priori la plus forte avec la troglitazone, le substrat qui a la chaîne principale la plus longue et qui devrait ainsi positionner sa fonction terminale (anionique à pH physiologique) le plus proche de Arg241. Les différences de reconnaissance les plus marquées entre le CYP2C8 et les mutants en position 241 sont effectivement constatées en mesurant l'inhibition de ces enzymes par cette molécule (Tableau 32). Nous pouvons alors proposer une interprétation de ces résultats, suggérée par la modélisation du CYP2C8 (cf. III.A.3.b). Au départ, Arg241 reliée à Arg105 par liaisons hydrogènes ferme le canal d'accès des substrats au site actif. L'entrée d'un substrat casserait ces liaisons labiles, en formant une liaison substrat $COOH/COO^-$ -Arg241 qui rejeterait Arg105 hors du site actif (cf. paragraphe précédent sur les effets mineurs de la mutation R105A). Cette liaison ne serait pas rompue par la progression du substrat dans le canal d'accès au site actif. Comme observé au cours de notre procédure de docking, le substrat entraînerait alors Arg241 vers l'hème à cause de cette liaison. Enfin, avec les substrats polaires qui n'ont pas de fonction terminale acide, la liaison avec Arg241 ne serait pas suffisamment forte pour entraîner ce résidu à la suite du substrat : dans ce cas, Arg241 aurait uniquement un rôle de fermeture/ouverture du canal et ne serait plus impliquée dans l'interaction avec les substrats fixés dans le site actif. Une hypothèse alternative à ce scénario est que Arg241 pourrait interagir indirectement avec les substrats à fonction acide du CYP2C8 en servant de point d'ancrage à un réseau de molécules d'eau comme dans le complexe CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b). **Nos résultats suggèrent donc un rôle du résidu Arg241 de l'hélice G dans la reconnaissance des substrats acides ($pK < 7$) par le CYP2C8** mais ils ne permettent pas de dire si cette arginine établit des interactions directes et/ou indirectes avec ces substrats (via des molécules d'eau). Les effets comparables des mutations R241X (X=E, L, A) (avec tous les substrats excepté le DMZ) suggèrent que la structure particulière de la

fonction guanidinium de Arg241 est essentielle à cette reconnaissance. L'augmentation de la K_m d'hydroxylation du DMZ observée uniquement avec le mutant R241A pourrait être due à la plus petite taille du DMZ et à des interactions plus favorables dans les sites actifs du CYP2C8 et des mutants R241E et R241L par rapport au site actif de R241A (du fait du vide créé par la mutation R241A dans la partie du site actif proche de l'entrée du canal d'accès des substrats).

Une autre arginine de la boucle B-C, **Arg97**, ressort de cette étude. Début 2000, Ridderstrom et al. postulaient l'implication de ce résidu dans des interactions électrostatiques avec les substrats anioniques du CYP2C9 (Ridderstrom et al., 2000). Nous avons alors souhaité examiner son rôle dans le CYP2C8. Les mutations de Arg97 sont de loin celles qui ont le plus d'impact sur l'activité catalytique du CYP2C8. La mutation R97A du CYP2C8 induit une baisse systématique des activités quel que soit le substrat. Ceci est en faveur d'un rôle de l'arginine 97 dans (1) l'interaction avec réductase ou (2) la structuration du site actif. Nous pouvons exclure la première hypothèse grâce à l'étude du mutant R97K. En effet, il est peu probable que Arg97 interagisse avec la réductase car le mutation R97K, qui conserve une charge positive en position 97, n'améliore pas considérablement les k_{cat} d'hydroxylation des substrats testés. Concernant le rôle structural de Arg97, nous remarquons que les mutations de Arg97 dans le CYP2C9 ont les mêmes conséquences catalytiques que dans le CYP2C8; en effet, l'activité d'hydroxylation des mutants R97F et R97H chute de 98% par rapport au CYP2C9 sauvage, indépendamment du substrat métabolisé (warfarine polaire, diclofénac anionique ou pyrène molécule apolaire) (Dickmann et al., 2003). Le mutant R97H, a une efficacité catalytique d'hydroxylation du diclofénac divisée par 90, avec une K_m multipliée par 45 et une k_{cat} divisée par deux. De plus, des modifications structurales observées en dichroïsme circulaire sur le mutant R97F ainsi que l'instabilité thermique de R97H sont en faveur d'un rôle de Arg97 dans le maintien de l'intégrité structurale du CYP2C9 (Dickmann et al., 2003). Arg97 est un résidu de la boucle B-C, très conservé chez tous les membres des familles CYP1, CYP2, CYP17 et CYP21 humains. Nous pouvons donc supposer que cet acide aminé remplit une fonction structurale essentielle à l'activité catalytique de nombreux P450 tels que les CYP2C9 et CYP2C8. Cette hypothèse est confirmée par les structures RX du CYP2C5 (avec substrat) (Wester et al., 2003a; Wester et al., 2003b) et du CYP2C9 (Williams et al., 2003) (avec ou sans substrat) (cf. chapitre II), qui révèlent l'interaction de Arg97 avec les propionates de l'hème (cf. Figure 38). D'après Wester et al. et Williams et al., le rôle principal de Arg97 serait donc la fixation de l'hème et non l'interaction avec les substrats comme proposé initialement (Ridderstrom et al., 2000). Pourtant, Arg97 ne semble pas si indispensable à la fixation de l'hème puisque :

- 1) Arg97 dans le CYP2C5 sans substrat ne semble pas interagir avec l'hème
- 2) la mutation R97A n'est pas suffisante pour nuire à l'incorporation de l'hème au sein de l'apoprotéine, les mutants R97A du CYP2C9 (Ridderstrom et al., 2000) et du CYP2C8 (notre étude) exprimés dans la levure ayant un taux d'expression similaire à celui de l'enzyme sauvage (sans formation excessive de P420).
- 3) dans la structure RX du CYP2C9 (Williams et al., 2003), l'hème est fixé au cœur de la protéine par des liaisons hydrogènes avec Arg97 mais aussi Trp120, Arg124, His368 et Arg433.

Outre ses interactions avec l'hème, Arg97 forme des liaisons hydrogènes avec les groupes carbonyles de deux résidus, Val113 (SRS1) et Pro367 (SRS5), appartenant à des boucles du site actif. Ainsi, en plus de la fixation de l'hème, le rôle principal de Arg97 pourrait être la structuration et le positionnement de boucles flexibles de la protéine, dont la boucle B-C, par rapport à l'hème. Sa substitution en alanine entraînerait un changement de conformation du site actif néfaste au bon fonctionnement de l'enzyme.

Pour conclure, nous avons muté trois arginines conservées, situées au niveau du canal d'accès des substrats des CYP2C. Parmi ces trois résidus, seule Arg241 semble interagir avec les fonctions acides terminales du pharmacophore. Nous ne pouvons pas présumer du pH au sein du

site actif de l'enzyme, aussi les substrats acides ($pK < 7$) pourraient être reconnus par le CYP2C8 sous forme R-COOH neutre comme dans le complexe CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b) ou sous forme anionique R-COO⁻ comme dans le complexe CYP2C9-flurbiprofène (Johnson et al., 2003). Nous privilégions cette dernière hypothèse, en raison des modifications de K_m induites par la mutation R241A, uniquement avec les substrats anioniques. Dans la structure RX CYP2C9-flurbiprofène (Johnson et al., 2003), la fonction carboxylate du substrat interagit par liaisons hydrogènes avec une autre arginine conservée, Arg108. Compte tenu de ces données publiées au moment de la rédaction de cette thèse, il serait intéressant de muter ce résidu 108 afin d'explorer son rôle dans la reconnaissance des substrats par le CYP2C8.

III.B.5 Recherche du ou des résidus interagissant avec le motif hydrophobe des substrats

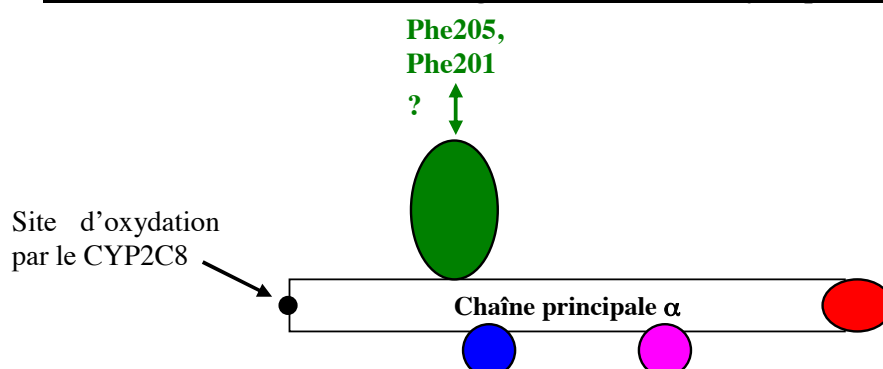


Figure 61 : Représentation schématique des interactions possibles entre le motif hydrophobe du pharmacophore et le toit du site actif (résidus Phe201 et Phe205).

Le motif hydrophobe mis en évidence dans le pharmacophore des substrats pourrait former une interaction hydrophobe ou π - π avec deux phénylalanines du toit du site actif : Phe201 et surtout Phe 205 (spécifique du CYP2C8).

Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé les propriétés catalytiques des trois mutants F201L, F205I et F205A, à celles du CYP2C8 pour deux types de substrats :

- le taxol, la fluvastatine et le DMZ qui comportent un groupe phényle situé à environ 4 Å de leur site d'hydroxylation (cf. Figure 56).
- l'acide rétinoïque qui possède deux méthyles identifiés comme motif hydrophobe non aromatique dans le pharmacophore des substrats (cf. Figure 56).

III.B.5.a Résultats

Les mutations en positions 201 et 205 ont un effet modulé en fonction de la nature de l'acide aminé substitué et du substrat pris en charge (Tableaux 33, 34 et 35). Ainsi, le mutation F205A induit des effets plus marqués que F205I ou F201L. Examinons les effets des mutations en fonction des substrats.

La reconnaissance de la fluvastatine n'est affectée par aucune mutation : les constantes K_m mesurées ne sont pas significativement différentes de celles du CYP2C8 sauvage (Tableau 34).

Dans le cas du DMZ, les K_m de F201L et F205I sont multipliées par 2 par rapport à l'enzyme sauvage et par 4 pour le mutant F205A. La suppression de l'aromaticité en position 201 et 205 augmente les K_m d'hydroxylation du DMZ et cette augmentation est encore plus marquée (K_m multipliée par 4) lorsque l'on réduit l'hydrophobie et la taille du résidu hydrophobe en position 205 par la substitution F205A (Tableau 33).

Les mutations ont des effets contrastés dans le cas du taxol et de l'acide rétinolique (Tableaux 33 et 34); F201L et F205I conduisent à de légères augmentations de K_m ($\times 1,5$ à 2) avec le taxol alors que leurs K_m sont divisées par deux par rapport au CYP2C8 avec l'acide rétinolique. Des effets essentiellement stériques sont observés avec le mutant F205A : ce mutant a une meilleure affinité que le CYP2C8 pour le taxol, un substrat volumineux, (K_m divisée par $2,5$) mais reconnaît moins bien l'acide rétinolique, un substrat beaucoup moins encombrant (K_m multipliée par 4).

Seule la mutation F205A modifie fortement la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac d'après les tests préliminaires d'activité. Les mesures des constantes cinétiques des mutants en position 205 confirment cette observation (Tableau 35). F205I a des constantes cinétiques qui ne diffèrent pas significativement de celles de l'enzyme sauvage alors que F205A a des K_m et k_{cat} fortement augmentées avec un changement de régiosélectivité. F205A a une légère préférence pour la 4'-hydroxylation avec un rapport $k_{cat}_{4'OH}/k_{cat}_{5OH}$ de $1,4$ au lieu de $0,3$ pour le CYP2C8.

CYP	6 α -hydroxylation du taxol			4-hydroxylation du DMZ		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m
2C8	10 \pm 2	9 \pm 2	0,9	37 \pm 4	16 \pm 6	0,4
F201L	24 \pm 5	10 \pm 1	0,4	79 \pm 9	16 \pm 3	0,2
F205A	4 \pm 1	8 \pm 1	2	158 \pm 30	56 \pm 10	0,35
F205I	14 \pm 1	0,9 \pm 0,1	0,06	73 \pm 5	26 \pm 4	0,35

Tableau 33 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol et du DMZ par le CYP2C8 et ses mutants en positions 201 et 205 (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; k_{cat}/K_m en $min^{-1} \cdot \mu M^{-1}$.

CYP	4-hydroxylation de l'acide rétinolique			5-hydroxylation de la fluvastatine		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m
2C8	32 \pm 4	6 \pm 1	0,2	29 \pm 4	7 \pm 2	0,25
F201L	17 \pm 2	2,6 \pm 0,5	0,15	29 \pm 3	3 \pm 0,5	0,1
F205A	119 \pm 19	9 \pm 2	0,08	29 \pm 1,5	18 \pm 3	0,6
F205I	17 \pm 3	7 \pm 1	0,4	38 \pm 5	18 \pm 4	0,5

Tableau 34 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinolique et de la fluvastatine par le CYP2C8 et ses mutants en positions 201 et 205. (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; k_{cat}/K_m en $min^{-1} \cdot \mu M^{-1}$.

CYP	5-hydroxylation du diclofénac			4'hydroxylation du diclofénac		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m
2C8	83 \pm 11	3 \pm 0,5	0,04	109 \pm 8	0,9 \pm 0,1	0,008
F205A	661 \pm 152	7,6 \pm 2	0,01	463 \pm 66	11 \pm 1	0,02
F205I	46 \pm 16	7 \pm 1	0,15	101 \pm 5	1,3 \pm 0,3	0,01

Tableau 35 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du diclofénac par le CYP2C8 et ses mutants F205A et F205I (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; k_{cat}/K_m en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

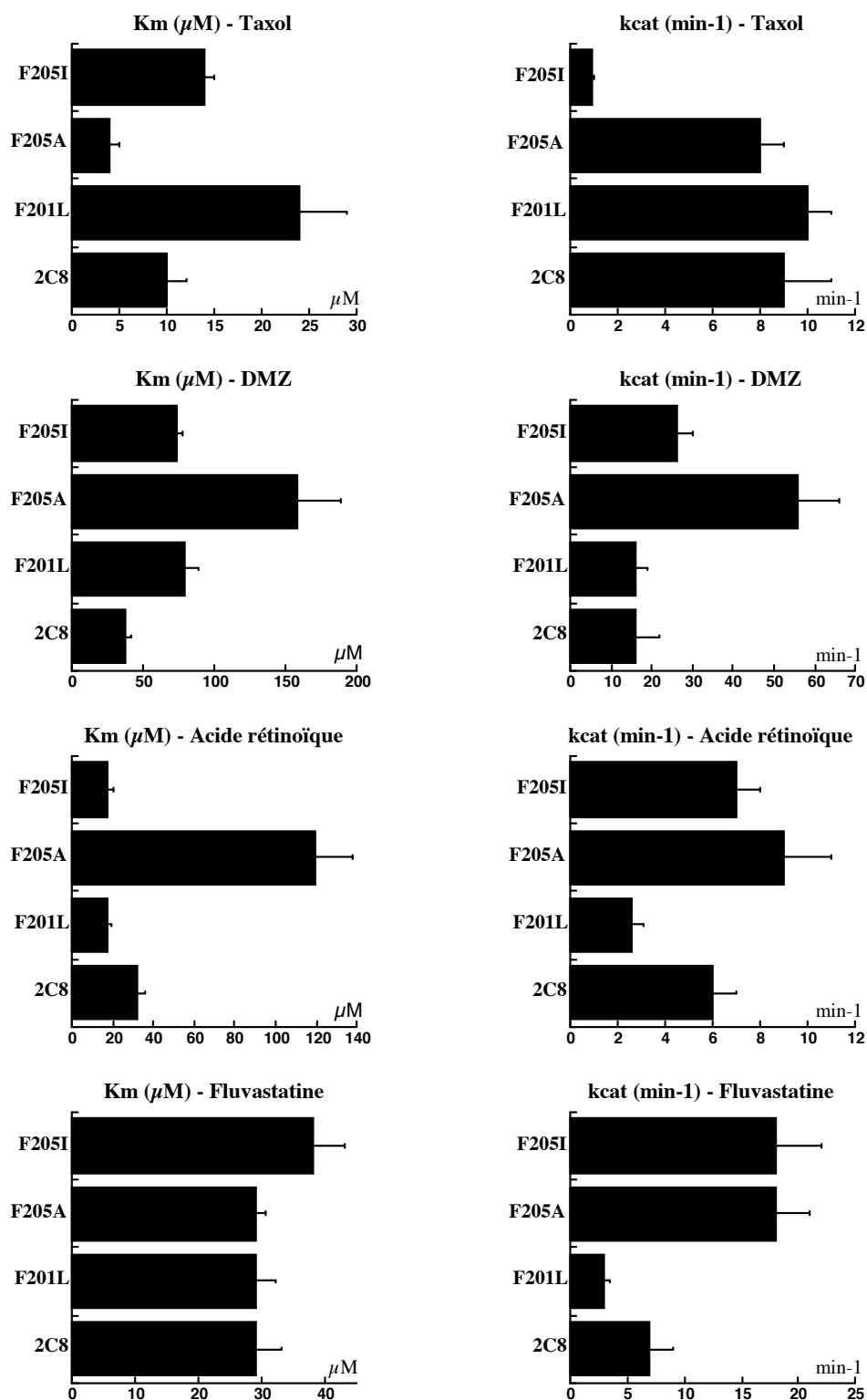


Figure 62 : Histogrammes permettant de visualiser les différences de K_m et k_{cat} entre le CYP2C8 et ses mutants en positions 201 et 205 pour 4 substrats : taxol, DMZ, acide rétinoïque et fluvastatine (données des tableaux 33 et 34).

III.B.5.b Discussion

Les résidus 201 (Leu) et 205 (Val) ont un rôle majeur dans le CYP2C5 de lapin: ils sont impliqués dans des interactions hydrophobes avec certains substrats (Wester et al., 2003a; Wester et al., 2003b) et sont nécessaires à l'activité 21-hydroxylase de la progestérone du CYP2C5/3LVdH (Cosme and Johnson, 2000).

Dans cette étude, nous avons évalué l'importance de l'aromaticité en positions 201 et 205 et de la taille du résidu 205 dans une isoforme humaine parente, le CYP2C8. Les résultats obtenus nous permettent de formuler les hypothèses suivantes :

- 1) Les deux résidus aromatiques, Phe 201 et Phe205, pourraient former des interactions de type π - π avec le DMZ et peut-être également avec le taxol. Par contre, ils ne semblent pas impliqués dans la reconnaissance des noyaux aromatiques de la fluvastatine.
- 2) Phe 201 et Phe205 seraient impliqués dans une interaction hydrophobe avec l'acide rétinolique.
- 3) L'encombrement stérique en position 205 est un facteur important pour la reconnaissance du taxol, de l'acide rétinolique et du diclofénac et l'orientation du diclofénac dans le site actif du CYP2C8.

Nous allons discuter successivement ces différents points.

Le DMZ, le taxol et la fluvastatine sont trois substrats du CYP2C8 qui comportent un motif aromatique (phényle ou fluorophényle), superposable dans le pharmacophore des substrats, pouvant interagir avec Phe201 et Phe205. Les mutations F201L et F205I qui suppriment l'aromaticité à ces positions, tout en conservant une taille et une hydrophobie comparables, augmentent les K_m d'hydroxylation du DMZ d'un facteur 2 par rapport au CYP2C8. Cette augmentation est plus marquée avec le mutation F205A qui diminue l'hydrophobie et la taille du résidu 205 (K_m multipliée par 4). Dans le cas du taxol, la mutation F205I augmente aussi la K_m d'hydroxylation de ce substrat d'un facteur 2. Ces résultats sont en faveur de **l'existence d'interactions π - π** (de faible ΔG) :

- **entre Phe201, Phe205 et le DMZ**
- **entre Phe205 et le taxol**

Par contre, **les deux phénylalanines 201 et 205 semblent jouer un rôle mineur dans la reconnaissance des noyaux aromatiques de la fluvastatine.** En effet, leur mutation ne modifie pas significativement les K_m de l'enzyme pour ce substrat. Ces résultats ne sont pas en accord avec notre modèle d'interaction de la fluvastatine avec le CYP2C8; le groupement fluoro-phényle pourrait ne pas être orienté vers le toit du site actif comme supposé dans ce modèle. Une autre explication possible est suggérée par la superposition fluvastatine/taxol (Figure 45). Le groupement fluorophényle de la fluvastatine a une position légèrement décalée vers le bas par rapport au phényle du taxol. Il pourrait donc être orienté vers le toit du site actif du CYP2C8 mais il ne serait pas positionné suffisamment haut pour interagir avec Phe205.

Contrairement au DMZ, au taxol et à la fluvastatine, **l'acide rétinolique** ne possède pas de motif aromatique identifiable dans le pharmacophore. **Les phénylalanines 201 et 205 semblent interagir avec cette molécule par contact hydrophobe.** En effet, leur substitution par des acides aminés hydrophobes non-aromatiques (Leu ou Ile) cause une diminution des K_m d'un facteur 2. Une interaction purement hydrophobe semble donc favoriser la reconnaissance de ce substrat.

Enfin, les effets de la mutation F205A sur l'hydroxylation du taxol, de l'acide rétinolique et du diclofénac illustrent **l'importance du facteur stérique au niveau du toit du site actif.** Une phénylalanine a un volume de Van der Waals de 135 \AA^3 au lieu de 67 \AA^3 pour une

alanine (Annexe B). En diminuant l'encombrement stérique au niveau du toit, la mutation F205A favorise la reconnaissance du taxol, substrat volumineux (K_m divisée par 2). Par contre, elle défavorise la reconnaissance de l'acide rétinolique, substrat mobile, moins encombrant que le taxol et qui a besoin d'être maintenu par diverses interactions hydrophobes dans le site actif (K_m multipliée par 4). Cette mutation engendre également une modification importante des K_m , k_{cat} et de la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac alors que la substitution de Phe205 par Ile (qui conserve un certain volume hydrophobe) n'a pas d'effet significatif sur les propriétés catalytiques de l'enzyme. L'importance de la taille de ce résidu 205 est confirmée par mutagenèse des résidus équivalents chez d'autres membres de la famille CYP2 comme le CYP2A5 (Lindberg and Negishi, 1989; Juvonen et al., 1991; Szklarz et al., 1995; Pelkonen et al., 1996) et le CYP2B1 (He et al., 1994; Luo et al., 2002). Dans le CYP2A5, l'affinité de l'enzyme pour des ligands coumarines dépend de la taille du résidu 209 (équivalent à 205 du CYP2C8) et la nature de ce résidu détermine les k_{cat} . Dans le CYP2B1, la taille du résidu 206 (équivalent à 205) influence la régiosélectivité et stéréosélectivité d'hydroxylation des stéroïdes. Le volume stérique du résidu 205 serait donc un élément clé des spécificités de reconnaissance des substrats et de leur hydroxylation régiosélective et stéréosélective chez plusieurs CYP2.

En conclusion, la taille du résidu 205 est un facteur important de la reconnaissance des substrats par le CYP2C8. En fonction de l'encombrement stérique à cette position, nous observons des interactions favorables ou défavorables avec le taxol et l'acide rétinolique, deux substrats très différents en taille. Ces résultats semblent témoigner de la proximité du résidu 205 vis-à-vis des substrats. En accord avec ces observations, Phe205 mais aussi Phe201 semblent impliquées dans des interactions hydrophobes (acide rétinolique) voire π - π (DMZ, taxol) avec certains substrats du CYP2C8. Cependant, comme la substitution de Phe en Ile ou Leu induit des augmentations de K_m modérées, nous pouvons supposer que ces interactions π - π sont moins essentielles à la reconnaissance des substrats que dans le CYP2C9 (cf. chapitre II : fortes augmentations de K_m ou K_s associées à une perte des interactions substrats-Phe114 ou Phe476). Enfin, l'importance de l'hydrophobie à ces positions (illustrée par la meilleure affinité des mutants F205L et F201L pour l'acide rétinolique) devrait être confirmée en substituant les phénylalanines en acides aminés hydrophiles (par exemple F205T, F201T).

III.B.6 Recherche des résidus interagissant avec les fonctions polaires secondaires des substrats

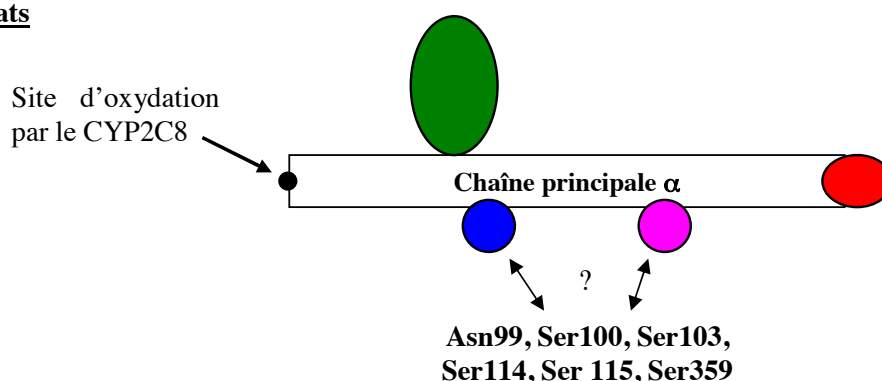


Figure 63 : Représentation schématique des interactions potentielles entre les fonctions polaires secondaires présentes dans certains substrats et 6 résidus polaires du CYP2C8.

Les substrats du CYP2C8 comportent des fonctions polaires qui doivent être accommodées au sein d'un site actif globalement hydrophobe. La plupart de ces fonctions polaires sont superposables et constituent trois motifs du pharmacophore des substrats (Fonction acide ou polaire terminale, et deux fonctions polaires secondaires (a) et (b) cf. III.A.3). Nous avons muté six résidus polaires, une asparagine et cinq sérines, supposées interagir avec les fonctions polaires secondaires du pharmacophore des substrats (directement ou indirectement via un réseau de molécules d'eau). Quatre sérines (Ser100, Ser103, Ser114 et Ser359) sont des résidus polaires spécifiques du CYP2C8, par rapport aux autres CYP2C humains : elles pourraient jouer un rôle important dans la reconnaissance des substrats par cette isoforme.

III.B.6.a Résultats

CYP	4-hydroxylation de l'acide rétinolique			4-hydroxylation du DMZ		
	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
2C8	32 \pm 4	6 \pm 1	0,2	37 \pm 4	16 \pm 6	0,4
N99L	30 \pm 3	7 \pm 1	0,2	32 \pm 3	38 \pm 5	1,2
S100A	28 \pm 6	6 \pm 0,4	0,2	123 \pm 10	11 \pm 1	0,09
S103A	45 \pm 6	6 \pm 0,7	0,13	26 \pm 3	32 \pm 5	1,2
S114A	52 \pm 11	11 \pm 2	0,2	18 \pm 5	20 \pm 3	1,1
S114F	4 \pm 1	4,5 \pm 0,8	1	38 \pm 8	45 \pm 7	1,2
S115A	45 \pm 2	5 \pm 0,6	0,09	59 \pm 9	18 \pm 6	0,3
S359I	44 \pm 3	6,6 \pm 1	0,15	nm	nm	nm

Tableau 36 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinolique et du DMZ par le CYP2C8 et ses mutants en positions 99, 100, 103, 114, 115 et 359 (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$; nm : non mesuré.

CYP	6 α hydroxylation du taxol			5-hydroxylation de la fluvastatine		
	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
2C8	10 \pm 2	9 \pm 2	0,9	29 \pm 4	7 \pm 2	0,25
N99L	23 \pm 2	13 \pm 2	0,6	25 \pm 4	13 \pm 3	0,5
S100A	44 \pm 5	9 \pm 1	0,2	38 \pm 7	1,3 \pm 0,2	0,03
S103A	14 \pm 1	7 \pm 1	0,5	37 \pm 4	9 \pm 2	0,2
S114A	9 \pm 2	7,7 \pm 1,5	0,8	29 \pm 5	13 \pm 2	0,4
S114F	-	<0,1	-	40 \pm 6	1,7 \pm 0,5	0,04
S115A	18 \pm 2	11 \pm 1,5	0,6	53 \pm 8	6 \pm 1	0,11
S359I	8 \pm 1	10 \pm 2	1,2	34 \pm 4	7 \pm 1	0,2

Tableau 37 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol et de la fluvastatine par le CYP2C8 et ses mutants en positions 99, 100, 103, 114, 115 et 359 (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

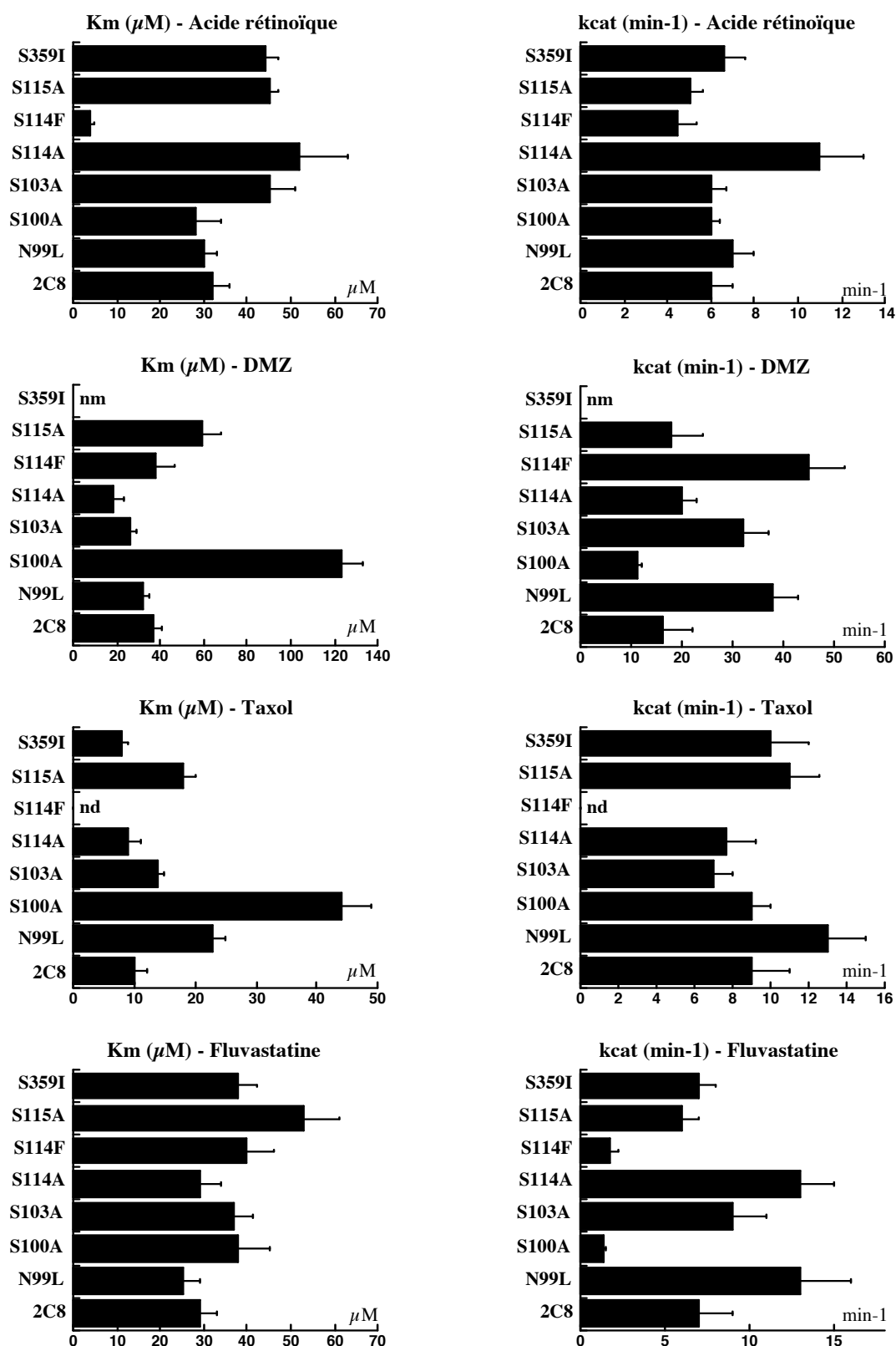


Figure 64 : Histogrammes permettant de visualiser les différences de Km et kcat entre le CYP2C8 et ses mutants en positions 99, 100, 103, 114, 115 et 359 (données des tableaux 36 et 37); nd : métabolite non détecté, nm : non mesuré.

Les mutations N99L, S103A, S114A et S115A ont peu de conséquences sur les propriétés catalytiques du CYP2C8. On peut cependant remarquer que le mutant N99L a une K_m d'hydroxylation du taxol multipliée par deux et que S115A a des K_m augmentées d'un facteur 1,4 à 1,8 quel que soit le substrat.

Les mutations S100A et S114F induisent au contraire des effets très différenciés selon les substrats. La mutation S100A n'affecte pas les K_m d'hydroxylation de l'acide rétinolique et de la fluvastatine. Par contre, elle induit une augmentation des K_m d'hydroxylation du taxol et du DMZ d'un facteur 4 et 3 respectivement. La substitution de Ser114 par une phénylalanine beaucoup plus encombrante, a des effets encore plus contrastés. Les K_m d'hydroxylation de la fluvastatine et du DMZ par le mutant S114F sont comparables aux valeurs obtenues pour le CYP2C8 sauvage. Par contre, la k_{cat} d'hydroxylation de la fluvastatine est divisée par 4 et celle du DMZ multipliée par 3. Les changements les plus importants sont observés avec l'acide rétinolique et le taxol. Le mutant S114F a une bien meilleure affinité pour l'acide rétinolique que le CYP2C8 (K_m divisée par 8) mais il ne semble plus métaboliser le taxol (activité indétectable).

III.B.6.b Discussion

Notre étude de mutagenèse sur le CYP2C9 (Melet et al., 2003) et celle d'Haining et al. (Haining et al., 1999) ont montré l'importance de la phénylalanine 114 dans la reconnaissance des substrats par cette enzyme. Les structures RX des complexes CYP2C5-DMZ (Wester et al., 2003a) ou CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b) et celle encore plus récente du complexe CYP2C9-warfarine (Williams et al., 2003) confirment l'existence d'une interaction π - π entre cette phénylalanine et les noyaux aromatiques des substrats. **Le résidu 114 est une phénylalanine chez tous les CYP2C excepté le CYP2C8 où il s'agit d'une sérine.** La substitution d'une phénylalanine par une sérine conduit à des différences importantes tant au niveau de la taille de l'acide aminé que de sa polarité. La sérine 114, spécifique du CYP2C8, devrait donc avoir un impact non négligeable sur la spécificité de reconnaissance des substrats par cette isoforme.

Nos résultats montrent que c'est effectivement le cas, mais seul le **facteur stérique** (et non la polarité) semble important à cette position clé. En effet, la mutation S114A, quasi-conservative sur le plan stérique, a un effet faible sur les propriétés catalytiques de l'enzyme. Par contre, la substitution de la sérine 114 par une phénylalanine plus encombrante modifie de façon importante la reconnaissance du taxol et de l'acide rétinolique. Le mutant S114F n'hydroxyle plus le taxol, un substrat volumineux qui n'a sans doute plus suffisamment de place pour se positionner dans le site actif. Au contraire, l'augmentation de la contrainte stérique (et de l'hydrophobie) en position 114 entraîne un gain d'affinité vis-à-vis de l'acide rétinolique, molécule plus hydrophobe, moins encombrante et plus flexible que le taxol. **La présence d'une sérine peu encombrante en position 114 est donc un élément clé de la spécificité de substrats du CYP2C8 :** cette isoforme est ainsi le seul CYP2C humain à métaboliser le taxol car, entre autres, les phénylalanines 114 présentes dans les autres CYP2C ne laisseraient plus un espace suffisant pour la fixation de ce substrat de grande taille.

Une autre sérine de la boucle B-C ressort de cette étude de mutagenèse : il s'agit de la **sérine 100** qui semble impliquée dans la reconnaissance de certains substrats du CYP2C8. Dans notre modèle d'interaction, nous proposons Asn99 et Ser100 comme candidats potentiels pour une interaction avec les fonctions polaires (a) des substrats du CYP2C8 (cf. III.A.3). Nos résultats suggèrent que la sérine 100 pourrait bien être le résidu recherché. En effet, l'acide rétinolique n'a pas de fonction polaire (a) identifiable par superposition et la mutation S100A n'affecte pas sa reconnaissance ce qui est cohérent avec notre hypothèse d'interaction. Les substrats taxol et DMZ comportent chacun une fonction polaire (a) susceptible de former des liaisons hydrogènes : un hydroxyle et une fonction sulfone

respectivement. Or la substitution de Ser100 par un résidu non polaire provoque des augmentations de Km d'un facteur 4 avec le taxol et d'un facteur 3 avec le DMZ. Le seul élément qui pourrait remettre en cause notre hypothèse sur le rôle de la sérine 100 est la Km d'hydroxylation de la fluvastatine du mutant S100A (comparable à celle du CYP2C8). Toutefois, la fluvastatine comporte une fonction polaire (a) qui est un atome d'azote conjugué avec un grand nombre d'insaturations et dont le doublet libre est donc peu disponible pour accepter une liaison hydrogène (cf. Figure 56). Cela pourrait ainsi expliquer l'absence d'augmentation de Km du mutant S100A vis-à-vis de ce substrat.

Asn99, l'autre résidu proposé pour interagir avec les fonctions polaires (a) des substrats, n'est apparemment pas un bon candidat (sauf dans le cas du taxol). Cet acide aminé a une influence beaucoup plus réduite sur les propriétés catalytiques du CYP2C8, sa mutation N99L ne modifiant que la Km d'hydroxylation du taxol (multipliée par 2) et la kcat d'hydroxylation du DMZ. D'après nos résultats, le résidu 99 a vraisemblablement un rôle moins important dans le CYP2C8 que dans le CYP2C19 où il est impliqué dans la spécificité de reconnaissance de l'oméprazole (Ibeanu et al., 1996) et de la (S)-méphénytoïne (Tsao et al., 2001).

La polarité des autres résidus mutés, Ser103, Ser115 et Ser359, semble jouer un rôle mineur dans la reconnaissance des substrats et l'activité catalytique du CYP2C8. Les mutations S103A et S115A ont des effets faibles sur les constantes cinétiques mesurées. Enfin, la mutation S359I qui modifie à la fois la polarité et l'encombrement stérique à cette position n'affecte pas significativement les propriétés catalytiques du CYP2C8 envers le taxol, l'acide rétinoïque ou la fluvastatine. Ce résidu ne semble donc pas impliqué dans la spécificité de substrat du CYP2C8.

Nos résultats révèlent l'importance de deux résidus de la boucle B-C, Ser114 et Ser100, pour la spécificité de substrats du CYP2C8. La sérine 114 est un élément clé de cette spécificité. Sa substitution en phénylalanine (le résidu correspondant dans les autres CYP2C) modifie fortement les propriétés catalytiques du CYP2C8, surtout avec des substrats encombrants comme le taxol. Cet impact stérique en position 114 nous indique que ce résidu se situe vraisemblablement à proximité des substrats. Le groupe -OH du résidu 114 ne paraît pas essentiel à la fixation des substrats (S114A), de même que la fonction -OH des sérines 103 et 359 pourtant spécifiques du CYP2C8 par rapport aux autres CYP2C. Toutefois, la perte de polarité en position 114 dans le mutant S114A, pourrait être compensée par la présence d'une sérine voisine Ser115. Il serait donc intéressant de compléter ces résultats en étudiant les effets de la double mutation (S114A, S115A). D'après nos résultats actuels, la chaîne latérale de la sérine 100 serait le meilleur candidat pour former des liaisons hydrogènes avec les fonctions polaires (a) du pharmacophore des substrats. Le résidu pouvant interagir avec les fonctions polaires (b) reste à découvrir.

III.B.7 Influence des résidus de la boucle C-terminale sur la spécificité de substrats et les vitesses d'hydroxylation du CYP2C8

III.B.7.a Résultats

Les mutants A471P et S482F ayant des activités d'hydroxylation similaires à celles du CYP2C8 pour tous les substrats testés, nous n'avons pas jugé utile de mesurer leurs constantes cinétiques.

Les autres mutations ont peu d'effet sur les constantes cinétiques de l'enzyme. Les kcat d'hydroxylation du taxol sont similaires à celle du CYP2C8 sauvage. Les mutants T473V, I476F et K474N ont des kcat d'hydroxylation de la fluvastatine plus faibles que celle du CYP2C8 mais cette différence n'est pas très significative compte tenu des écarts types. Concernant les Km, quelques différences, faibles, sont observées :

- La mutation I476F augmente très légèrement la Km d'hydroxylation du taxol (15 μM au lieu de 10 μM). Elle multiplie par 2 la Km d'hydroxylation de la fluvastatine.
 - La mutation K474N multiplie par 1,7 les Km d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine.
- Les autres constantes cinétiques ne sont pas significativement modifiées par rapport au CYP2C8 sauvage.

CYP	6 α -hydroxylation du taxol		
	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
2C8	10 \pm 2	9 \pm 2	0,9
T473V	11 \pm 1	8 \pm 1	0,7
K474N	11 \pm 1	11 \pm 2	1
I476F	15 \pm 1	10 \pm 1	0,6

Tableau 38 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol par le CYP2C8 et ses mutants T473V, K474N et I476F (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

CYP	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque			5-hydroxylation de la fluvastatine		
	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km	Km (μM)	kcat (min^{-1})	kcat/Km
2C8	32 \pm 4	6 \pm 1	0,2	29 \pm 4	7 \pm 2	0,25
T473V	nm	nm	nm	34 \pm 4	3,7 \pm 0,4	0,1
K474N	52 \pm 6	8 \pm 1,5	0,15	49 \pm 4	4 \pm 0,5	0,08
I476F	26 \pm 6	3 \pm 0,4	0,1	58 \pm 7	4,5 \pm 0,6	0,08

Tableau 39 : Constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine par le CYP2C8 et ses mutants T473V, K474N et I476F (moyenne \pm l'écart type de 3 à 4 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

III.B.7.b Discussion

Les mutations des résidus de la boucle C-terminale ont peu d'effet sur les constantes cinétiques, kcat et Km, de l'enzyme vis-à-vis des différents substrats testés.

Les kcat mesurées sont proches de celles du CYP2C8 ou au maximum divisées par 2. Dans le CYP2C9, la mutation F476I induisait une augmentation de kcat d'hydroxylation de trois substrats (kcat multipliée par 10 pour l'acide tiénilique, par 2 pour le diclofénac et le DMZ). Dans le CYP2C8, la mutation inverse I476F a des effets moins prononcés : elle n'affecte pas la vitesse d'hydroxylation du diclofénac ou du taxol et divise par 2 les kcat d'hydroxylation de l'acide rétinoïque et de la fluvastatine. D'après ces résultats, il semble peu probable que les résidus du SRS6 aient un rôle majeur dans le contrôle des vitesses d'hydroxylation du CYP2C8.

Comme les kcat, les constantes Km des mutants subissent peu de modifications par rapport à celles du CYP2C8. Les augmentations maximales de Km observées sont d'un facteur 2 (mutants K474N et I476F). Les structures RX du CYP2C5 (Wester et al., 2003a; Wester et al., 2003b) et du CYP2C9 (Williams et al., 2003) montrent que le résidu 474 (471

dans le CYP2C5) est orienté vers l'extérieur de la protéine, en contact avec le solvant. Les résidus polaires en position 474 (une lysine dans CYP2C8 et une asparagine dans les autres CYP2C) ne seraient donc pas impliqués dans des interactions avec les substrats mais plutôt dans des interactions externes avec le solvant. Il nous semble donc peu probable que Lys474 intervienne dans la reconnaissance de substrats ou l'activité catalytique du CYP2C8.

D'après les structures RX publiées, le résidu 476 est situé dans le site actif du CYP2C5 et du CYP2C9 et interagit avec les substrats de ces deux enzymes. Plusieurs études de mutagenèse ont montré l'importance des résidus à cette position pour les spécificités de substrats et l'activité catalytique de plusieurs P450 de la famille 2 (CYP2C9 (Melet et al., 2003), CYP2B1 (Szklarz et al., 1995), CYP2D6 (Smith et al., 1998), CYP2E1 (Spatzenegger et al., 2003)). **Le résidu 476 semble jouer un rôle moins important pour la reconnaissance des substrats du CYP2C8** : la mutation de Ile476 en Phe, l'acide aminé correspondant du CYP2C9, a peu d'effet sur les constantes cinétiques d'hydroxylation du taxol, de l'acide rétinoïque ou de la fluvastatine. Les travaux de modélisation de M. Ridderstorm et al. (Ridderstrom et al., 2001) suggèrent l'importance du résidu 476 pour l'orientation du diclofénac dans le site actif des CYP2C. Or, nos résultats montrent que la mutation de ce seul résidu n'est pas suffisant pour affecter la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac par le CYP2C8 (cf. III.B.3).

D'après notre modèle du CYP2C8, Ile 476 pointe vers le site actif et établit des contacts hydrophobes avec la fluvastatine. Pour évaluer l'importance d'une interaction hydrophobe à cette position, il faudrait réduire l'hydrophobie du résidu 476 en construisant par exemple le mutant I476T.

III.C CONCLUSION

L'étude de mutagenèse réalisée sur le CYP2C8 a permis d'obtenir plusieurs résultats majeurs.

Nos données de mutagenèse semblent confirmer l'importance du résidu conservé Arg97 (SRS1), pour l'intégrité structurale et par conséquent, l'activité catalytique du CYP2C8. Sa mutation a les mêmes effets que dans le CYP2C9 ; elle entraîne une chute très forte de l'efficacité catalytique de l'enzyme, indépendante du substrat métabolisé.

Nous avons identifié plusieurs résidus susceptibles d'interagir avec les motifs du pharmacophore des substrats :

- **Arg241 pourrait interagir avec les fonctions acides terminales des substrats, qui sont anioniques à pH physiologique**, soit directement, soit indirectement via un réseau de molécules d'eau.
- **Phe201 (SRS2) et Phe205 (SRS2) sont probablement impliqués dans des interactions hydrophobes (acide rétinoïque) voire π - π avec certains substrats (DMZ, taxol).**
- **Ser100 (SRS1) joue un rôle dans la reconnaissance du taxol et du DMZ. Elle pourrait interagir avec les fonctions polaires (a) de ces substrats.**
- Enfin, **nous avons mis en évidence deux résidus au rôle stérique important : Phe205 (SRS2) et Ser114 (SRS1).** Parmi ces deux résidus, Ser114 jouerait un rôle clé dans les différences de sélectivité entre CYP2C humains. La taille de ce résidu (et non sa polarité) serait l'élément déterminant : sa mutation en une phénylalanine plus encombrante, ne permet plus l'hydroxylation du taxol alors que la mutation S114A est sans effet sur les constantes cinétiques de l'enzyme. La présence d'une phénylalanine en position 114 chez les autres CYP2C expliquerait en partie leur incapacité à métaboliser ce substrat de grande taille.

Ces résultats vont dans le sens de certaines de nos hypothèses (interaction entre Arg241 et la fonction terminale acide/aniionique des substrats, interaction hydrophobe voire π - π de Phe205 ou Phe201 avec certains substrats). Ils nous montrent aussi les limites de notre modèle d'interaction du CYP2C8 avec ses ligands. Nous n'avons pas pu identifier de résidu polaire pouvant interagir avec les fonctions polaires (b) décrites dans le pharmacophore des substrats. Le docking de la fluvastatine dans le site actif modèle du CYP2C8 semble en partie inexact : nous avons supposé, à tort, l'existence d'un π -stacking entre Phe205 et le groupe fluorophényle de la fluvastatine. Les mutations F205I et F205A ayant peu d'effet sur la reconnaissance de la fluvastatine, ce résidu ne serait pas impliqué dans la reconnaissance des noyaux aromatiques de ce substrat.

Par ailleurs, deux nouveaux substrats du CYP2C8 ont été découverts au cours de cette étude : l'amodiaquine ($K_m=1,2 \mu M$) (Li et al., 2002) et l'acide tazaroténique (Figure 65). L'acide tazaroténique se superpose bien à notre pharmacophore (Figure 66), par contre la superposition de l'amodiaquine ne semble pas évidente.

Une analyse *in silico* des sélectivités des CYP2C humains a été publiée fin 2001 (Ridderstrom et al., 2001). Les interactions sélectives des CYP2C avec leurs substrats ont été étudiées par une méthode GRID-CPGA qui permet de comparer une famille de protéines. L'analyse de champs d'interaction moléculaire a conduit les auteurs à proposer l'existence de deux poches de fixation des substrats reliées par une région intermédiaire. D'après cette étude, les déterminants de sélectivité les plus importants sont la géométrie du site actif (facteur stérique) et les interactions hydrophobes avec les substrats, les interactions polaires ayant une contribution plus réduite. Le CYP2C8 serait l'isoforme la plus différente des 4 CYP2C humains en raison de résidus aux propriétés très différentes, en particulier à quatre positions clés : 114, 205, 366 et 476. Les quatre résidus correspondants du CYP2C8, Ser114, Phe205, Val366 et Ile476 auraient un effet stérique. Ser114 et Phe205 contribueraient à la forme du site actif du fait de leur localisation entre les deux poches de fixation des substrats. Par ailleurs, Ser114 pourrait former des liaisons hydrogènes avec les substrats alors que Phe205, Val366 et Ile476 seraient impliqués dans des interactions hydrophobes.

Nos résultats de mutagenèse confirment l'importance stérique du résidu 114 dans la spécificité de substrats du CYP2C8 mais semblent réfuter son rôle dans la formation de liaisons hydrogènes, du moins avec les ligands que nous avons testé. Contrairement aux conclusions de Ridderstorm et al., Phe205 et Ile476 semblent jouer un rôle moins important que prévu dans les différences de sélectivités entre le CYP2C8 et le CYP2C9. En effet, la substitution d'un seul de ces résidus par l'acide aminé correspondant du CYP2C9 n'est pas suffisante pour modifier fortement les propriétés catalytiques de l'enzyme. Il est cependant possible que l'association de ces deux résidus contribue significativement à la forme du site actif et donc la reconnaissance des substrats par le CYP2C8. Pour conclure sur leur rôle dans la spécificité de substrats de cette isoforme, il serait intéressant d'étudier les effets de la double mutation (F205I, I476F).

A la fin de ma thèse, l'équipe d'EF. Johnson (Johnson et al., 2003) a réussi à cristalliser le CYP2C8. Des données structurales préliminaires exposées au congrès de l'ISSX montrent que le CYP2C8 a un site actif deux fois plus grand que le CYP2C5 (Figure 67). La grande taille de ce site actif déjà appréciable dans notre modèle, offre aux substrats des possibilités accrues de mobilité et d'interactions au sein du site actif. Ceci implique vraisemblablement que l'ensemble des substrats (actuels et à venir) ne puissent pas être décrit que dans le cadre d'un seul pharmacophore. A l'instar du CYP3A4 et du CYP2C9, le CYP2C8 pourrait accommoder plusieurs molécules simultanément ce qui rajouterait une complexité supplémentaire à l'étude de cette isoforme. La publication prochaine des structures RX de complexes CYP2C8-substrat devrait nous permettre de mieux comprendre la spécificité de substrats de cette enzyme.

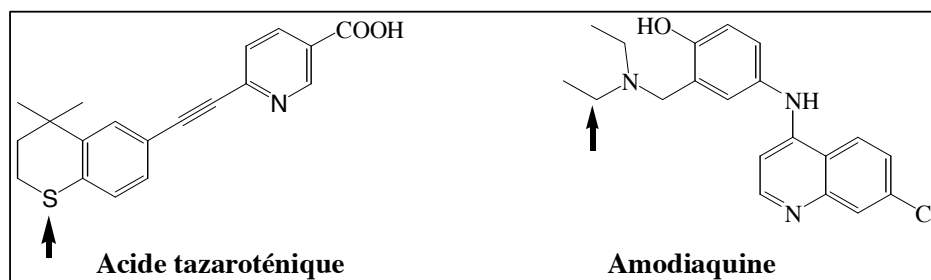


Figure 65 : Structures de l'acide tazaroténique et de l'amodiaquine. Les sites d'hydroxylation par le CYP2C8 sont indiqués par des flèches.

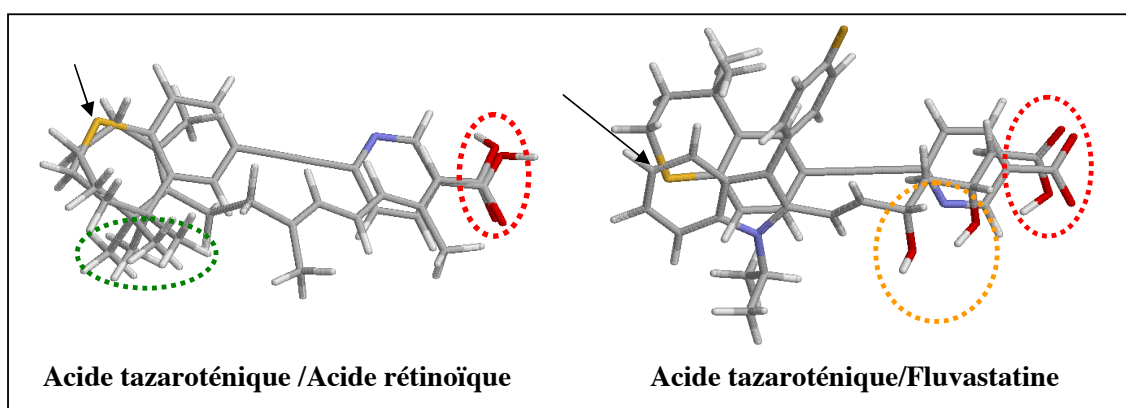


Figure 66 : Superpositions de l'acide tazaroténique avec l'acide rétinoïque et la fluvastatine. Les sites d'oxydation sont indiqués par des flèches.

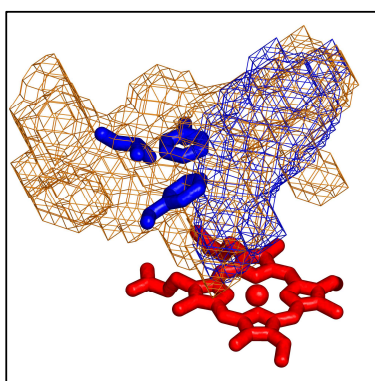


Figure 67 : Volumes des sites actifs des CYP2C8 (en marron) et CYP2C5 (en bleu) d'après EF. Johnson et al. (Johnson et al., 2003).

III.D ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

Les résultats présentés dans ce chapitre sont repris dans l'article joint, actuellement en cours de soumission (cf. page suivante).

Analysis of Human Cytochrome P450 2C8 Substrate Specificity Using a Substrate Pharmacophore and Site-Directed Mutants[†]

Armelle Melet,[‡] Cristina Marques-Soares,[‡] Guillaume A. Schoch,[§] Anne-Christine Macherey,[‡] Maryse Jaouen,[‡] Patrick M. Dansette,[‡] Marie-Agnès Sari,[‡] Eric F. Johnson,[§] and Daniel Mansuy^{*‡}

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 CNRS, Université Paris 5, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France, and Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, MEM-255, La Jolla, California 92037

Received May 25, 2004; Revised Manuscript Received September 6, 2004

ABSTRACT: The structural determinants of substrate specificity of human liver cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) were investigated using site-directed mutants chosen on the basis of a preliminary substrate pharmacophore and a three-dimensional (3D) model. Analysis of the structural features common to CYP2C8 substrates exhibiting a micromolar K_m led to a substrate pharmacophore in which the site of oxidation by CYP2C8 is 12.9, 8.6, 4.4, and 3.9 Å from features that could establish ionic or hydrogen bonds, and hydrophobic interactions with protein amino acid residues. Comparison of this pharmacophore with a 3D model of CYP2C8 constructed using the X-ray structure of CYP2C5 suggested potential CYP2C8 amino acid residues that could be involved in substrate recognition. Twenty CYP2C8 site-directed mutants were constructed and expressed in yeast to compare their catalytic activities using five CYP2C8 substrates that exhibit different structures and sizes [paclitaxel, fluvastatin, retinoic acid, a sulfaphenazole derivative (DMZ), and diclofenac]. Mutation of arginine 241 had marked effects on the hydroxylation of anionic substrates of CYP2C8 such as retinoic acid and fluvastatin. Serine 100 appears to be involved in hydrogen bonding interactions with a polar site of the CYP2C8 substrate pharmacophore, as shown by the 3–4-fold increase in the K_m of paclitaxel and DMZ hydroxylation after the S100A mutation. Residues 114, 201, and 205 are predicted to be in close contact with substrates, and their mutations lead either to favorable hydrophobic interactions or to steric clashes with substrates. For instance, the S114F mutant was unable to catalyze the 6 α -hydroxylation of paclitaxel. The S114F and F205A mutants were the best catalysts for retinoic acid and paclitaxel (or fluvastatin) hydroxylation, respectively, with k_{cat}/K_m values 5 and 2.1 (or 2.4) times higher, respectively, than those found for CYP2C8. Preliminary experiments of docking of the substrate into the experimentally determined X-ray structure of substrate-free CYP2C8, which became available quite recently [Schoch, G. A., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 9497], were consistent with key roles for S100, S114, and F205 residues in substrate binding. The results suggest that the effects of mutation of arginine 241 on anionic substrate hydroxylation could be indirect and result from alterations of the packing of helix G with helix B'.

Cytochrome P450s (CYPs)¹ constitute a superfamily of heme proteins that play important roles in the oxidative metabolism of a large variety of xenobiotics and endobiotics (1). The CYP2Cs make up a major subfamily of P450 enzymes that are found primarily in the liver (2) and, to a lesser extent, in several extrahepatic tissues (3–6). Four members of this subfamily have been identified in humans: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, and CYP2C19 (2, 7). Al-

though the sequences of the four isoforms are more than 80% identical, they have distinct substrate specificities. Understanding the structural basis of these substrate specificities has been the objective of many laboratories.

CYP2C9 and CYP2C19 have been the most studied human CYP2C isoforms because of their important roles in drug metabolism and drug interactions. Their active sites and binding determinants were initially characterized using biochemical, UV-visible, and ¹HNMR spectroscopy (8–14), three-dimensional (3D) molecular models (8, 10, 14–24), and site-directed mutants (18, 22, 25–30) as reviewed in refs 31 and 32. Recently, the X-ray structures of substrate-free CYP2C9 and of the CYP2C9–warfarin (33) and CYP2C9–flurbiprofen (34) complexes have been reported.

By comparison, little was known about the active site of CYP2C8. Fewer CYP2C8 substrates are currently listed in the Human Metabolism Database (http://www.gentest.com/human_p450_database) compared to the number listed for CYP2C9 and CYP2C19. Moreover, most of these CYP2C8 substrates have been proposed on the basis of experiments

[†] The research was supported by funds from CNRS and Ministry of Research (France) (group of D.M.) and by the U.S. National Institutes of Health (Grant GM031001, group of E.F.J.).

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: 33 1 42 86 21 69. Fax: 33 1 42 86 83 87. E-mail: daniel.mansuy@univ-paris5.fr.

[‡] UMR 8601 CNRS.

[§] The Scripps Research Institute.

¹ Abbreviations: CH₃COOH, acetic acid; CH₃CN, acetonitrile; CYP, cytochrome P450; DMSO, dimethyl sulfoxide; DMZ, 4-methyl-N-methyl-N-(2-phenyl-2H-pyrazol-3-yl)benzene sulfonamide; GRID/CPCA, GRID program/Consensus Principal Component Analysis; 3D, three-dimensional; SRS, substrate recognition site; SD, standard deviation.

performed with human liver microsomes using correlation or inhibition studies. The kinetic parameters of purified CYP2C8 for these substrates have been rarely determined. In fact, few high-affinity substrates have been identified so far, and most were characterized recently. This is the case for drugs exhibiting very different structures such as paclitaxel (35), fluvastatin (36), troglitazone (37), amiodarone (38), amodiaquine (39), or tazarotenic acid (40). These recently identified substrates suggest that the role of CYP2C8 in drug metabolism has been underestimated. CYP2C8 also catalyzes the oxidation of endogenous compounds such as retinoids (41, 42) and arachidonic acid (43, 44). Some metabolites of arachidonic acid act as endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs) with vasodilator properties (45), and several studies suggest that CYP2C8 could be a possible EDHF synthase involved in the regulation of vascular homeostasis (46–48).

Homology models (23, 39, 49), based on the first X-ray structure published for a mammalian cytochrome P450, rabbit CYP2C5 (50), have been reported recently for CYP2C8. The first model of CYP2C8 was published in 2001 by Ridderstrom et al. in combination with a GRID/CPCA selectivity analysis of human CYP2C models (23). This selectivity analysis singled out CYP2C8 as the most distinct of the four human CYP2C enzymes because of big differences in the size and properties of some putative active site amino acids such as residues 114, 205, and 476. Docking of some substrates such as rosiglitazone (49) and amodiaquine (39) into CYP2C8 models has led the authors to propose substrate interactions with residues Asn99, Ser114, and Phe205.

Although homology models have been published for CYP2C8, no substrate pharmacophore has been proposed to date and no study based on site-directed mutants has been reported.² This work was performed in an effort to investigate the structural determinants of CYP2C8 substrate specificity. It involved the following steps: (a) the construction of a pharmacophore of the CYP2C8 substrates and of a 3D model of CYP2C8, (b) the choice of 20 site-directed mutations on the basis of possible interactions between CYP2C8 substrates (pharmacophore) and the CYP2C8 model, and (c) a comparison of the catalytic properties of the corresponding mutants toward five CYP2C8 substrates exhibiting different structures. As these studies were being completed, the X-ray structure of substrate-free CYP2C8 at a resolution of 2.7 Å became available (51), which allowed preliminary docking experiments for verifying interactions with some of the substrates that were experimentally analyzed with the site-directed mutants.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Oligonucleotides were synthesized by Genome Express (Paris, France) or Eurogentec (Seraing, Belgium). The TG1 *Escherichia coli* strain [*D(lac pro) supE thi hsdD5 F' traD35 proAB LacIq LacZDM15*] was used for plasmid amplification. *Saccharomyces cerevisiae* strains W(N) and W(R) and the yeast expression vector pYeDP60 were a gift from D. Pompon (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). W303-1B (MAT

a; *ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; ura3-1; trp1-1*) designated as W(N) was described previously (52). Yeast strain W(R) was constructed from strain W(N) by substitution of the natural promoter of the W303-1B gene encoding cytochrome P450 reductase with the galactose-inducible *GAL10-CYC1* hybrid promoter (53). The CYP2C8 expression vector was constructed by insertion of the CYP2C8 cDNA into the pYeDP60 polylinker as reported previously (54). Growth media for *E. coli* and *S. cerevisiae* were obtained from Difco (Coger, France) or GibcoBRL (Cergy-Pontoise, France). Restriction endonucleases and DNA modification enzymes were of the best available grade. Plasmid DNA was isolated with the plasmid miniprep kit from Bio-Rad (Marnes la Coquette, France). NADPH, NADP, glucose 6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase were purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). Fluvastatin was provided by Merck Lipharm, and diclofenac, retinoic acid, and sulfaphenazole were provided by Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Troglitazone was purchased from Cayman Chemicals (SPI-BIO, Massy, France). 4-Methyl-*N*-methyl-*N*-(2-phenyl-2*H*-pyrazol-3-yl)benzene sulfonamide (DMZ) was synthesized according to previously described procedures (55). All other materials not listed were obtained from standard sources.

Site-Directed Mutagenesis

Site-directed mutagenesis of CYP2C8 was performed by two successive PCRs followed by homologous recombination in yeast (56, 57). The general procedures and PCR conditions were described previously (29). The mutagenic primers are listed in Table 1. The final PCR product was cotransformed into yeast strain W(N) with double-digested *Bam*HI–*Eco*RI plasmid expression vector pYeDP60. The DNA of the gap repair clones was extracted according to a method described previously (58) and electroporated into TG1 *E. coli*. For all the selected plasmids, the entire coding region was sequenced by Genome Express (Grenoble, France) to confirm the incorporation of the desired mutation without extraneous changes.

Yeast Transformation, Cell Culture, and Preparation of the Yeast Microsomal Fraction

The expression system used for human liver P450s was based on yeast strain W(R) previously described (53), in which yeast cytochrome P450 reductase was overexpressed. Yeast transformation by the pYeDP60 vector containing CYP2C8 or mutated cDNAs was performed as described previously (53, 58). Yeast culture and microsome preparation are described elsewhere (59). Microsomes were homogenized in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 1 mM EDTA and 20% glycerol (v/v), aliquoted, frozen under liquid N₂, and stored at –80 °C until they were used. The microsomal P450 content was determined according to the method of Omura and Sato (60). The NADPH-cytochrome P450 reductase activity was measured spectroscopically by the method of Vermilion and Coon (61) by monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550 nm ($\epsilon_{550} = 21\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). The protein content in microsomal suspensions was measured by the Bradford procedure (62) using bovine serum albumin as the standard.

² During the revision of the manuscript, data about CYP2C8 mutants at positions 113, 114, 359, 362, and 366 have been reported (77).

Table 1: Oligonucleotides Used in the Construction of CYP2C8 Mutants^a

mutation	primer sequence
R97A	5'-TGGGGAATTGCCT GT CCTCCAGAAAACTC-3'
R97K	5'-TGGGGAATTGCCT TTT CCTCCAGAAAACTC-3'
N99L	5'-GATATTGGGGAA AGG CCTCTCCAG-3'
S100A	5'-TGAGATATTGG GGC ATTGCCTCTCCAG-3'
S103A	5'-GTAATTCCTTG AGC TATTGGGGAAATTG-3'
R105A	5'-CAAGTCCTTAGTA ATTGCT TTGAGATATTGGGGAAATTGC-3'
S114A	5'-CTTCCATTGCTGGCA ATG ATTCCAAGTC-3'
S114F	5'-TCCATTGCTGAAA ATG ATTCCAAGTC-3'
F201L	5'-CTGAGTTTT CAT CAATCTTTTCATC-3'
F205A	5'-CATGGGGAGTTCAGAA TCTGGCG TTTTTCATTGAATC-3'
F205I	5'-CTGGATCCACGGGGAGTTCAGAA TCTGGCG TTTTTCATTGAATC-3'
R241A	5'-CTAATGTA ACTTGCT GTAAGAGCA-3'
R241L	5'-GTTGCTCTTAC ACTA AGTTACATTAGGGAG-3'
R241E	5'-GTTGCTCTTACAGAA AGT TACATTAGGGAG-3'
S359I	5'-CAGAGATACAT TGAC CTCGTCCCCAC-3'
A471P	5'-GAACCTCA ATACTACT CCAGTTACCAAAG-3'
T473V	5'-CTACTGCAGT TGTC AAAGGGATTGTTTC-3'
K474N	5'-CTGCAGTTAC CAAT GGGATTGTTTC-3'
I476F	5'-GTTACCAAAG GGTT TGTTTCTCTG-3'
S482F	5'-CTCTGCCAC CTTCT ACCAGATCTGCTTC-3'

^a Changed nucleotides are in bold. Codons for the changed amino acids are underlined. Primers from mutations R97A to R241A are reverse oligonucleotides.

Immunoblotting

Electrophoresis was carried out using a Bio-Rad Mini Protean II device. Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel (63) and transferred to a nitrocellulose membrane using a Transblot semi-dry transfer cell from Bio-Rad. The membrane was blocked and probed as previously described (64) with a rabbit polyclonal anti-P450 2C antibody kindly provided by P. Beaune (Inserm U490, Paris, France).

Molecular Modeling

Molecular modeling was performed with the Insight II software package from Molecular Simulations Inc. (San Diego, CA).

Pharmacophore Modeling. Five known substrates of CYP2C8 with K_m values of $\leq 10 \mu\text{M}$ were compared. The initial geometries of four substrates (paclitaxel, retinoic acid, troglitazone, and amiodarone) were taken from the Cambridge Structural Database. The conformation of fluvastatin was calculated using four InsightII modules (Builder, Discover_3, Ampac-Mopac, and Biopolymer_3). The molecule was first built using the Builder program and energy minimized using the Discover_3 module, using the method of steepest descent followed by conjugate gradient minimization with the esff force field. Partial atom charges were then calculated (Ampac-Mopac module) and used in a final energy minimization of the fluvastatin 3D structure (Biopolymer_3 module). The most rigid substrates, retinoic acid and fluvastatin, were first superimposed with respect to their oxidation sites, using the Transform-Superimpose module of Insight II. Then all the other molecules were successively overlaid by the same method. The final superimposition highlighted several common structural features.

CYP2C8 3D Model. A 3D model of CYP2C8 was constructed by virtual mutagenesis of rabbit CYP2C5 (50), according to previously described procedures (29, 65). Fluvastatin was placed in the distal binding pocket, in an orientation consistent with the experimentally observed product. The structure was minimized using the Docking module of Insight II.

Docking of Substrates into the Experimentally Determined Structure of CYP2C8. Computer-assisted automated docking of substrates into the experimentally determined structure of CYP2C8 employed Autodock 3.05, a grid-based docking program (66). Autodock uses a search method based on a modified genetic algorithm that employs a local search in identifying low-energy binding sites and orientations of the probe molecule. For each docking run, a $58 \times 74 \times 60$ grid with a spacing of 0.375 \AA was used that encompassed the active site of the A model of the 1PQ2 structure. Explicit polar hydrogens were included in the model. Kollman united atom charges were assigned to the protein using Autodock-tools. Charges for the heme were assigned as described by Helms and Wade (67). Charges were assigned to retinoic acid, fluvastatin, and paclitaxel using the ProdrG (68) server (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrG/>). The results of 50 randomly seeded runs were examined to identify solutions that placed the substrate in the active site at positions appropriate for hydroxylation.

Enzyme Activity Assays

General Enzyme Assay Conditions. Incubations for metabolic activity with yeast microsomes were carried out at 28°C , using glass tubes in a shaking bath. The incubation mixtures contained yeast microsomes ($0.05 \mu\text{M}$ P450), the substrate, and a NADPH-generating system (1 mM NADP⁺, 10 mM glucose 6-phosphate, and 2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase per milliliter) diluted in a 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 1 mM EDTA and 8% glycerol (final concentrations). Activity assays were routinely initiated ($t_0 = 0 \text{ min}$) by addition of the NADPH-generating system to the incubation mixture after a 3 min preincubation at 28°C for temperature equilibration. Several incubation times were used, generally 1, 2, and 3 min. These times were increased, up to 6 times, in the case of low-activity mutants. At t_0 and regularly thereafter, aliquots ($100\text{--}120 \mu\text{L}$) were taken and the reaction was quickly stopped by treatment with 0.5 volume of a cold $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (10:1) mixture containing $5 \mu\text{M}$ internal standard (final concentration). Proteins were then sedimented by centrifugation for 5 min

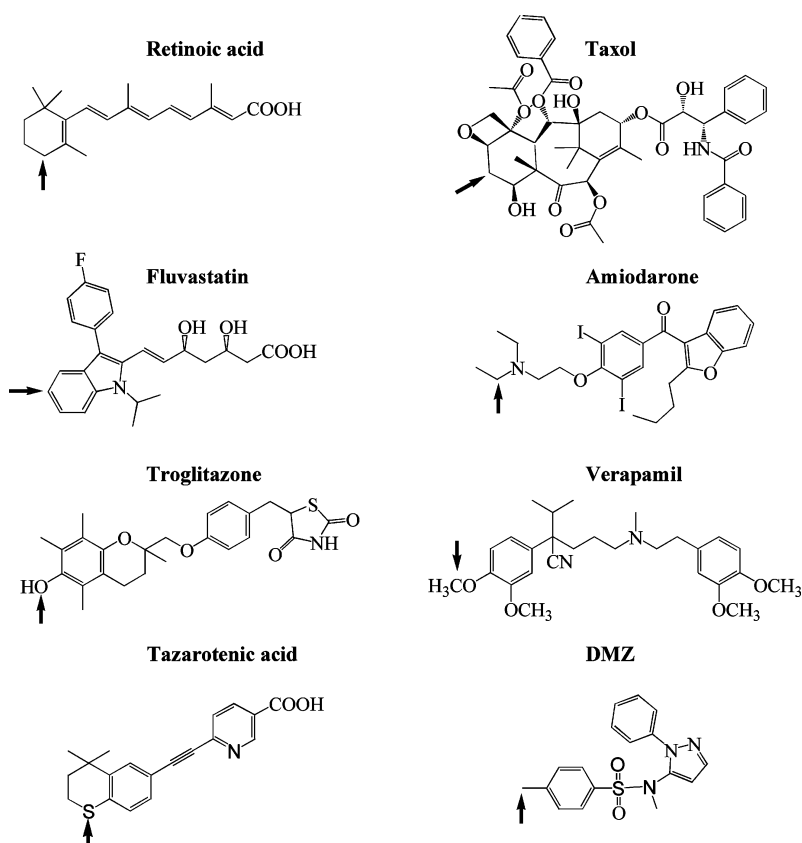


FIGURE 1: Structures of CYP2C8 substrates mentioned in the text. Arrows indicate the major site of oxidation by CYP2C8. Molecules on the left side are anionic at physiological pH; molecules on the right side are neutral or cationic.

at 10 000 rpm, and the supernatant was analyzed by reverse phase HPLC at 40 °C (Spectra system AS 3000 autosampler).

In experiments with retinoic acid, reactions were stopped with 1 volume of a cold $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (10:1) mixture containing 5 μM internal standard and 1 mg/mL butylated hydroxytoluene as an antioxidant. All the procedures were carried out under darkness or subdued lighting.

Paclitaxel 6 α -Hydroxylation. 6 α -Hydroxylation of paclitaxel by CYP2C8 (35) and its mutants was performed under the conditions described above, with tienilic acid as the internal standard. Samples were injected onto a X-Terra MS C18 column (Waters) (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase (A, 5 mM H_3PO_4 ; B, CH_3CN) was delivered at a rate of 1 mL/min with the following gradient: linear gradient from 30 to 45% B for 5 min, a second linear gradient to 55% B over the course of 25 min, a third linear gradient to 100% B over the course of 1 min, and hold for 5 min. Inhibition studies were performed at various concentrations of inhibitors (1–100 μM) and at the K_m concentration of paclitaxel for CYP2C8 or its mutants. The inhibitor and the substrate dissolved in DMSO (final concentration of 1%) were added simultaneously to the incubation mixture.

Fluvastatin 5-Hydroxylation. This hydroxylation (36) was performed under the conditions described above, with cerivastatin as the internal standard. Samples were injected onto a C8 Hypersil MOS column (Thermohypersil-Keystone) (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase [A, 0.1 M ammonium acetate (pH 4.6); B, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:2:1)] was delivered at a rate of 1 mL/min with the following gradient: 17% B for 2 min followed by a linear gradient to

100% B over the course of 25 min followed by an additional 5 min elution. The 5-hydroxyfluvastatin metabolite was quantitated using UV detection at 250 nm.

Retinoic Acid 4-Hydroxylation. This hydroxylation (42) was performed under the conditions described above, with tienilic acid as the internal standard. Samples were injected onto a C8 Hypersil MOS column (Thermohypersil-Keystone) (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase [A, 0.1 M ammonium acetate (pH 4.6); B, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:2:1)] was delivered at a rate of 1 mL/min with the following gradient: 17% B for 2 min, a linear gradient to 100% B over the course of 20 min, and hold for 15 min.

Diclofenac Hydroxylation. Diclofenac hydroxylation was monitored at 280 nm according to a previously described procedure (29).

DMZ Hydroxylation. The incubation conditions are described above. HPLC procedures for the analysis of DMZ hydroxylation were derived from a previously described protocol (55). Samples were injected onto a C8 Hypersil MOS column (Thermohypersil-Keystone) (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase [A, H_2O ; B, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:2:1)] was pumped at a rate of 1 mL/min according to the following gradient: 100% A for 1 min followed by a linear gradient to 100% B over the course of 23 min and hold for 6 min. Monitoring of the column effluent was performed at 230 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Structural Comparison of High-Affinity CYP2C8 Substrates and Construction of a Preliminary Substrate Phar-

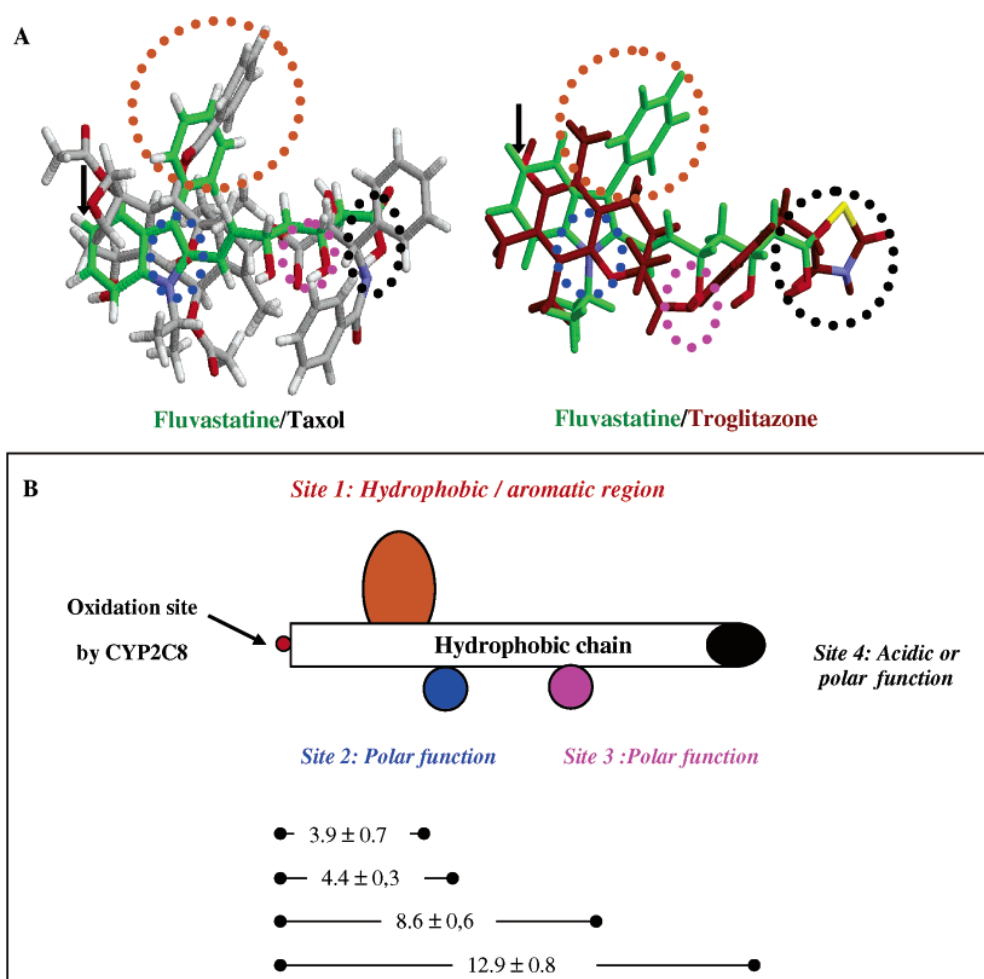


FIGURE 2: Pharmacophore model of CYP2C8 substrates. (A) Examples of superimpositions of substrates performed to construct the pharmacophore (fluvastatin and paclitaxel, and fluvastatin and troglitazone). Sites of oxidation by CYP2C8 are denoted with arrows. Common structural features of the substrates that correspond to sites 1–4 of the pharmacophore (Figure 2B) are circled using colors identical to those of the corresponding pharmacophore sites. (B) Pharmacophore model of CYP2C8 substrates. Sites 1–4 indicate common structural features that could represent sites of interaction with CYP2C8. Site 1 could provide π -stacking or hydrophobic interactions. Sites 2 and 3 are potential hydrogen-bonding sites. Site 4 could form ionic or hydrogen bonds with CYP2C8 residues. Distances were measured in angstroms between the oxidized atom and the anchoring carbon of site 1 on the main chain of the substrate, and between the oxidized atom and the heteroatom possibly involved in hydrogen or ionic bonds of sites 2–4.

macrophore. Substrates of CYP2C8 displaying a micromolar K_m and reported to be mainly oxidized at only one position were used to find common structural determinants and to build a preliminary substrate pharmacophore. Five molecules, paclitaxel (35), retinoic acid (42, 69), fluvastatin (36), troglitazone (37), and amiodarone (38), fulfilled the criteria. Figure 1 shows that these compounds exhibit very different structures and indicates the main oxidation site by CYP2C8.

The major conformations of these substrates either were obtained from their corresponding X-ray structure or were deduced from molecular modeling calculations (see Experimental Procedures). The pharmacophore was built by superimposition of the substrates on two template molecules, retinoic acid and fluvastatin, by matching their oxidation sites in the first step and then by looking for analogous functional groups.

Analysis of the overlay (Figure 2A) indicates common structural characteristics of these substrates. As shown in Figures 1 and 2, all of the compounds have a long hydrophobic chain with an acidic ($pK < 7$) or polar group

$12.9 \pm 0.8 \text{ \AA}$ from the oxidation site (site 4 in Figure 2B) and a hydrophobic or aromatic moiety $3.9 \pm 0.7 \text{ \AA}$ from the oxidation site (site 1 in Figure 2B). Retinoic acid, fluvastatin, and troglitazone are negatively charged at physiological pH, and their terminal polar groups are carboxylate functions for the two former molecules or a $(CO)_2N^-$ function from the thiazolidinedione ring of the latter. In paclitaxel and amiodarone, site 4 is a neutral, polar group, i.e., the oxygen atom of the amide function of paclitaxel and the oxygen atom of the benzofurane ring of amiodarone. Two supplementary polar groups (sites 2 and 3 in Figure 2B) are also present in all of the substrates except retinoic acid. They are located 4.4 ± 0.3 and $8.6 \pm 0.3 \text{ \AA}$ from the oxidation site. They are a hydroxyl and an ester keto group in paclitaxel, a nitrogen atom and a hydroxyl group in fluvastatin, a heterocyclic oxygen atom and another ether oxygen atom in troglitazone, and an iodine atom and the oxygen atom of the keto function in amiodarone.

Two medium-affinity substrates of CYP2C8, the drug verapamil ($K_m = 50\text{--}185 \text{ \mu M}$) (70, 71) and a recently

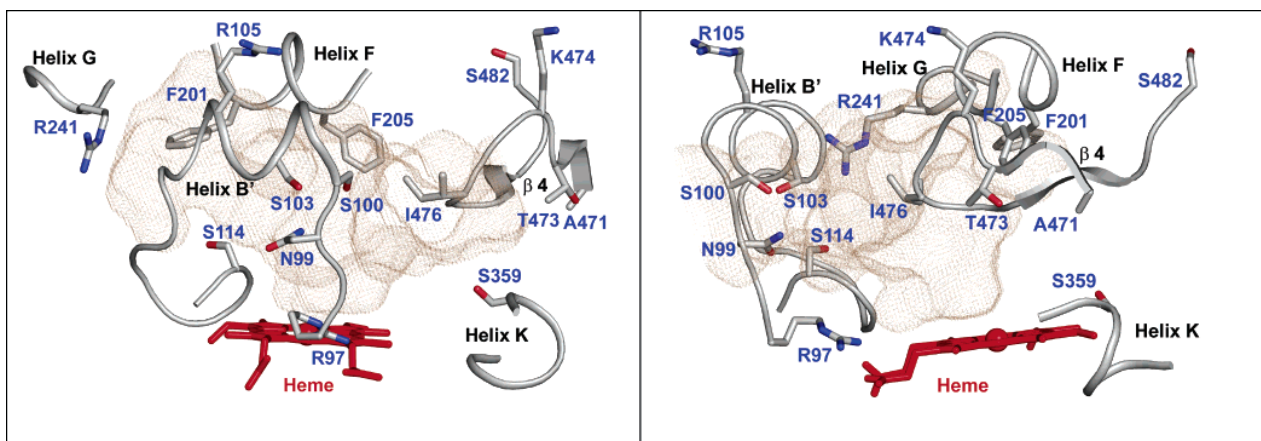


FIGURE 3: Orthogonal views of the substrate binding cavity of CYP2C8 (PDB entry 1PQ2) depicting residues selected for mutagenesis in this study. Residues mutated in this study are depicted as stick figures and identified by blue labels. The surface (in gray) of the substrate binding cavity is rendered as mesh, and was calculated using a 1.4 Å probe with VOIDOO (76). This figure was generated using PYMOL (<http://www.pymol.org>).

described substrate of CYP2C5 and human CYP2Cs, DMZ (see Figure 1 for its formula; $K_m = 40 \pm 5 \mu\text{M}$) (55), were then overlaid on the pharmacophore. Verapamil fit with the model even though it was somewhat longer than the other substrates. Sites 4, 3, and 2 correspond to the oxygen of an OCH_3 substituent, the tertiary amine nitrogen atom, and the cyano function of verapamil, respectively. DMZ is much smaller than the other substrates and was overlaid with the portion of the pharmacophore that is close to the oxidation site (sites 2 and 1 corresponding to the SO_2 and phenyl groups of DMZ, respectively). This poorer fit of verapamil and DMZ to the pharmacophore could explain their lower affinity for CYP2C8. Finally, a recently described substrate of CYP2C8, tazarotenic acid (Figure 1) (40) ($K_i \approx 30 \mu\text{M}$), could easily be incorporated into the pharmacophore as its carboxylate function and pyridine nitrogen atom corresponded to sites 4 and 3, respectively.

Construction of a 3D Model of CYP2C8 and Choice of the Mutants. A tentative 3D model of CYP2C8 was constructed by virtual mutagenesis of CYP2C5 using the X-ray structure of CYP2C5 (50), and procedures identical to those previously reported for constructing 3D models of CYP2C9 (29) and of CYP2Bs (65). The main structural characteristics of the active site of our model were very similar to those of other previously reported CYP2C8 models (23, 39, 49). The CYP2C8 active site appeared to be much larger than those of other CYP2Cs even though it is somewhat height-limited by Phe205, which is specific for CYP2C8 and located in the roof of the active site. This was in agreement with a previously reported CYP2C8 model (23) and was confirmed by an X-ray structure of substrate-free CYP2C8 (51) that became available at the end of the work described in this article.

Docking of substrates such as fluvastatin in the active site of the CYP2C8 model suggested some amino acid residues from the protein that could interact with the different structural features of the substrate pharmacophore model. For instance, in our preliminary CYP2C8–fluvastatin model, the carboxylate and fluorophenyl groups of the substrate interacted with the Arg241 guanidinium group and the Phe205 phenyl group, respectively. Moreover, Asn99 and

Ser114 from the B–C loop were not far from the substrate, and given the flexibility of this loop upon substrate binding to P450 2Cs (72, 73), these residues could be involved in hydrogen bonding interactions with the hydroxyl groups of fluvastatin.

Such a preliminary analysis led us to select Arg241 and two other arginines of the B–C loop, Arg105 and Arg97, as possible candidates for interactions with the negatively charged or polar terminal groups of CYP2C8 substrates (site 4 of the pharmacophore). These arginines were first mutated to alanines (R97A, R105A, and R241A). Arg97 and 241 were later substituted with other residues (R97K, R241L, and R241E) to improve the understanding of the importance of these two amino acid positions.

On the basis of the same analysis, Phe205, and another aromatic residue, Phe201, from substrate recognition site 2 (SRS2) of CYP2 proteins according to Gotoh (74), were selected as candidates for hydrophobic interactions with the hydrophobic region of substrates (site 1 of the pharmacophore). Phe201 and Phe205 were mutated to Leu or Ile, to suppress the aromatic ring with minimal changes in side chain hydrophobicity and bulk (F201L and F205I). The F205A mutant was also constructed to investigate the influence of the side chain length at this position.

As far as residues possibly establishing hydrogen bonds with sites 2 and 3 of the pharmacophore (Figure 2B) are concerned, not only Asn99 and Ser114 but also serines 100, 103, and 359, which are polar residues specific to CYP2C8 within the human CYP2C family, were selected for site-directed mutagenesis. Serine residues 100, 103, and 114 were replaced with alanines (S100A, S103A, and S114A), and Asn99 was replaced with a leucine (N99L) to suppress the polar function with minimal change in the side chain bulk. Ser114 was also replaced with a bulky phenylalanine, which is present in other CYP2Cs such as CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, and CYP2C5.

In our CYP2C8–fluvastatin model, Ile476 was sufficiently close to the central phenyl group of fluvastatin to form hydrophobic contacts. Although this residue did not interact with an identified pharmacophore motif of fluvastatin, we decided to further investigate the role of Ile476 and other

residues of the C-terminal loop (Ala471, Thr473, Lys474, and Ser482) that are specific to CYP2C8 within the human CYP2C subfamily. These amino acids were mutated to the corresponding residues in CYP2C9.

All the aforementioned residues (except Arg241 and Ser482) are predicted to reside in substrate recognition sites SRS1, SRS2, SRS5, and SRS6 of CYP2 proteins according to Gotoh (74). Figure 3 shows the positioning of the mutated residues in the X-ray structure of free CYP2C8 (51), which became available before completion of this work. It appears that most of the mutated residues are either within or in the proximity of the CYP2C8 active site.

Construction and Expression of CYP2C8 Mutants. All of the CYP2C8 mutants were constructed using a double-PCR approach followed by homologous recombination in yeast (56, 57). The mutants were expressed in yeast strain W(R) that overexpresses cytochrome P450 reductase (53). Immunoblotting using anti-CYP2C IgG revealed the immunoreactive protein in all microsomal preparations (data not shown). In their Fe(II) state, all the mutants bound CO as evidenced by the appearance of a 450 nm peak in visible difference spectroscopy. Only small peaks at 420 nm corresponding to <10% cytochrome P420 were observed. Recombinant P450 specific contents in yeast microsomal preparations were calculated from the difference spectra and were 60 ± 30 pmol of CYP/mg of microsomal protein for CYP2C8 and varied from 13 to 77 pmol of CYP/mg of protein for the various mutants. The yeast P450 reductase: CYP molar ratio was 2 ± 0.5 for wild-type CYP2C8 and ranged from 1.5 to 2.7 for the mutants, except for S114F, S359I, and S482F, for which it was larger (4 ± 0.5). The data indicate that there was sufficient reductase in the preparations of yeast microsomes containing each mutant for P450 monooxygenase activities.

Catalytic Activities of CYP2C8 Mutants. Initial characterization of the catalytic activities of CYP2C8 and its mutants was performed on three different CYP2C8 substrates (paclitaxel, retinoic acid, and fluvastatin) at a single concentration much higher than the reported K_m of the wild-type enzyme (Figure 4). The oxidation of these substrates at the positions indicated in Figure 1 was followed by HPLC (see Experimental Procedures). The paclitaxel hydroxylation rates were not significantly different from those of wild-type CYP2C8, except for the R97A, R97K, S114F, and F205I mutants, and to a lesser extent for R105A. R97K and F205I displayed 10-fold lower activity than CYP2C8. The extent of hydroxylation of paclitaxel was drastically reduced in the case of R97A (1% of CYP2C8 activity) and was not even detectable with the S114F mutant (even after an extended 30 min incubation). In contrast, the R105A mutant exhibited slightly increased activity.

The retinoic acid hydroxylation rates were similar to those of the wild-type enzyme except for the R97A, R97K, R105A, S114A, F201L, I476F, and S482F mutants. The R97A, R97K, F201L, and I476F mutants were 8, 4, 2, and 2 times less active than CYP2C8, respectively, whereas R105A, S114A, and S482F were slightly more active.

A greater number of mutants displayed altered catalytic activities toward fluvastatin. Fluvastatin hydroxylation rates were not significantly changed by the S103A, R105A, S359I, A471P, and S482F mutations, while all the other mutants exhibited activity significantly lower or higher than that of

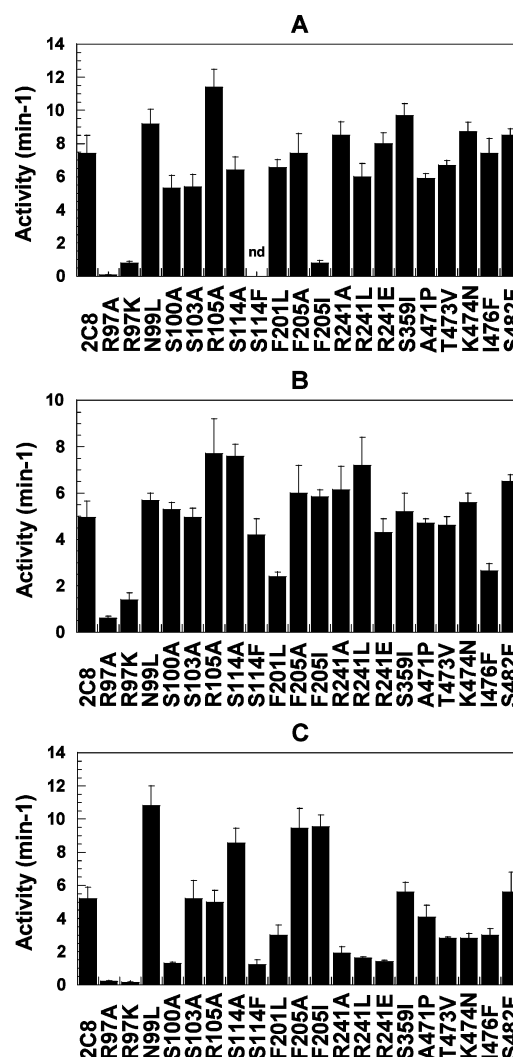


FIGURE 4: Hydroxylase activities of yeast-expressed CYP2C8 and its mutants at a single substrate concentration: (A) 50 μ M paclitaxel, (B) 200 μ M retinoic acid, and (C) 100 μ M fluvastatin. Assays were performed as described in Experimental Procedures. Mean values \pm the standard deviation from three experiments.

CYP2C8. The most spectacular effects were again observed with the R97A and R97K mutants which exhibited \sim 3% of the wild-type activity. The S100A and S114F mutations led to a 4-fold decrease in the fluvastatin hydroxylation rate, and the R241A, R241L, and R241E mutations caused a 3-fold decrease in activity. The F201L, T473V, K474N, and I476F mutants exhibited a lower activity than CYP2C8, whereas the N99L, F205A, and F205I mutants exhibited a 2-fold increase in activity.

According to these results, mutations at positions 97 (SRS1), 114 (SRS1), and 205 (SRS2) produced the most notable effects, by significantly altering the hydroxylation rates of at least two tested substrates. Substitutions of Arg97 with alanine or lysine caused a spectacular decrease in the hydroxylation rates of all the tested substrates. In contrast, mutations at position 114 and 205 led to a behavior that was dependent on the substrate and nature of the substituted amino acids.

A more detailed study of the effects of the mutations on the recognition and hydroxylation of substrates by CYP2C8

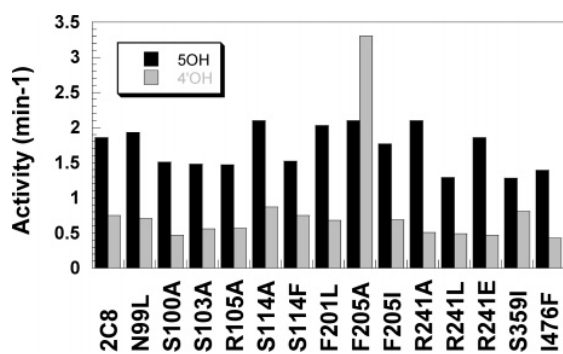


FIGURE 5: Regioselectivity of diclofenac hydroxylation by yeast-expressed CYP2C8 and several mutants. 4'- and 5-hydroxylation activities (min^{-1}) were measured at $800 \mu\text{M}$ diclofenac, as described in Experimental Procedures. Listed values are the mean of two experiments. The variability between each of the duplicate values was $\leq 10\%$.

was performed to determine the kinetic constants of the oxidation of four substrates, retinoic acid, fluvastatin, paclitaxel, and DMZ. The different structural characteristics of these substrates allowed us to probe different aspects of CYP2C8 binding and catalysis. For instance, retinoic acid and fluvastatin are anionic molecules at physiological pH (with a carboxylate function as site 4), whereas paclitaxel and DMZ are neutral. DMZ, the shortest molecule, does not contain any functional group at site 4 in the pharmacophore. Paclitaxel and fluvastatin involve two matching polar functions (sites 2 and 3 of the pharmacophore, Figure 2B); on the other hand, DMZ only bears the polar group at site 2, and retinoic acid has no groups at these sites. The CYP2C8 mutants were also compared for their regioselectivity of diclofenac hydroxylation (Figure 5), as CYP2C8 produces both 5-hydroxy- and 4'-hydroxydiclofenac, whereas CYP2C9 is highly regioselective, with the almost exclusive formation of 4'-hydroxydiclofenac (75).

The detailed kinetic studies were performed with most of the mutants. Recent reports indicate that Arg97 is involved in heme binding by CYP2C5 and CYP2C9 proteins, as clearly shown in the X-ray structures of the CYP2C5–DMZ (72) and CYP2C5–diclofenac (73) complexes, and of CYP2C9 (33). The dramatic decrease in the activities of CYP2C8 upon mutation of Arg97, which was observed with all the tested substrates (Figure 4), may reflect major changes in the active site resulting from modifications in heme binding. Very similar results have been obtained after mutation of Arg97 in CYP2C9 (28). Therefore, mutants R97A and R97K were not studied in more detail, as altered kinetic characteristics may not be strictly related to the mode of substrate binding by CYP2C8.

The results obtained with the other mutants are presented by groups of mutated residues that could interact with the different sites on the pharmacophore model (Figure 2B).

Effects of Mutations of Arginines 105 and 241. Tables 2 and 3 show that the R105A mutation has only very small effects on CYP2C8 catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) with all of the substrates studied. Only small increases in the K_m values were observed for fluvastatin and paclitaxel hydroxylation. Similar results indicating that Arg105 does not play an important role in substrate binding have been published for the CYP2C9 R105A mutant (28). Interestingly, mutation of Arg241 led to different effects as a function of the substrate

Table 2: Kinetic Parameters for Retinoic Acid 4-Hydroxylation and Fluvastatin 5-Hydroxylation by Yeast-Expressed CYP2C8 and Its Mutants^a

CYP	retinoic acid 4-hydroxylation			fluvastatin 5-hydroxylation		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m^b	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m^b
2C8	32 ± 4	6 ± 1	0.2	29 ± 4	7 ± 2	0.25
R105A	33 ± 4	9 ± 2	0.3	56 ± 6	8 ± 1.5	0.14
R241A	66 ± 7	7.6 ± 1	0.1	113 ± 11	4 ± 0.7	0.03
R241L	57 ± 5	9 ± 1	0.2	102 ± 14	2.2 ± 0.6	0.02
R241E	61 ± 4	5 ± 1	0.08	126 ± 11	2.2 ± 0.4	0.02
F201L	17 ± 2	2.6 ± 0.5	0.15	29 ± 3	3 ± 0.5	0.1
F205A	119 ± 13	9 ± 2	0.08	29 ± 2	18 ± 3	0.6
F205I	17 ± 2	7 ± 1	0.4	38 ± 5	18 ± 4	0.5
N99L	30 ± 3	7 ± 1	0.2	25 ± 4	13 ± 1	0.5
S100A	28 ± 6	6 ± 1	0.2	38 ± 7	1.3 ± 0.2	0.03
S103A	45 ± 6	6 ± 1	0.13	37 ± 4	9 ± 2	0.2
S114A	52 ± 11	11 ± 2	0.2	29 ± 5	13 ± 1	0.4
S114F	4 ± 1	4.5 ± 1	1.1	40 ± 6	1.7 ± 0.3	0.04
S359I	44 ± 3	6.6 ± 1	0.15	38 ± 6	7 ± 1	0.2
I476F	26 ± 6	3 ± 0.4	0.1	58 ± 7	4.5 ± 0.6	0.08

^a K_m and k_{cat} were estimated by nonlinear regression analysis of the rate vs concentration; assays were performed as described in Experimental Procedures. Mean values \pm SD from three experiments. ^b k_{cat}/K_m in $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$.

Table 3: Kinetic Parameters for Paclitaxel 6 α -Hydroxylation and DMZ Hydroxylation by Yeast-Expressed CYP2C8 and Its Mutants^a

CYP	paclitaxel 6 α -hydroxylation			DMZ 4-hydroxylation		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m^b	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m^b
2C8	10 ± 2	9 ± 2	0.9	37 ± 4	16 ± 6	0.4
R105A	19 ± 3	16 ± 2	0.8	49 ± 7	24 ± 4	0.5
R241A	15 ± 1	11 ± 1	0.7	94 ± 14	19 ± 4	0.2
R241L	13 ± 1	8 ± 1	0.6	37 ± 6	52 ± 6	1.4
R241E	13 ± 1	10 ± 2	0.8	43 ± 2	13 ± 1	0.3
F201L	24 ± 5	9.7 ± 0.3	0.4	79 ± 9	16 ± 3	0.2
F205A	4 ± 1	8 ± 1	2	158 ± 30	56 ± 10	0.35
F205I	14 ± 1	0.9 ± 0.1	0.06	73 ± 5	26 ± 4	0.35
N99L	23 ± 1	13 ± 2	0.6	32 ± 3	38 ± 5	1.2
S100A	44 ± 5	9 ± 1	0.2	123 ± 10	11 ± 1	0.09
S103A	14 ± 1	7 ± 1	0.5	26 ± 3	32 ± 5	1.2
S114A	9 ± 2	8 ± 1	0.9	18 ± 5	20 ± 3	1.1
S114F	—	<0.1 ^c	—	38 ± 8	45 ± 7	1.2
S359I	8 ± 1	10 ± 2	1.2	nd ^d	nd ^d	nd ^d
I476F	15 ± 1	10 ± 1	0.7	nd ^d	nd ^d	nd ^d

^a K_m and k_{cat} were estimated by nonlinear regression analysis of the rate vs concentration. Assays were performed as described in Experimental Procedures. Mean values \pm SD from three experiments. ^b k_{cat}/K_m in $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. ^c Formation of 6 α -hydroxypaclitaxel was not detected under our conditions. ^d Not determined.

structure. The K_m values for the hydroxylation of neutral substrates such as paclitaxel and DMZ did not significantly change upon mutation of Arg241 (except for the particular case of DMZ and R241A). By contrast, the K_m values determined for the hydroxylation of the acidic substrates, retinoic acid and fluvastatin, which contain a carboxylate group at pharmacophore site 4 (at physiological pH), increased in the R241 mutants (2- and 4-fold increases for retinoic acid and fluvastatin, respectively). This was accompanied by a marked decrease in the catalytic efficiency for fluvastatin hydroxylation (k_{cat}/K_m 10-fold lower). These results suggest that Arg241 could be involved in an interaction with the terminal function of substrates (site 4 in Figure 2B). This binding interaction should be stronger with

Table 4: Comparison of K_m or IC_{50} of CYP2C8 and Its R241A Mutant toward Four Substrates^a

substrate (site 4 at physiological pH)	K_m or IC_{50} (μM)	
	2C8	R241A
paclitaxel (CONH)	10 \pm 1	15 \pm 1
retinoic acid (COO ⁻)	32 \pm 2	86 \pm 5
fluvastatin (COO ⁻)	29 \pm 2	113 \pm 11
trogliatzone (CO-N ⁻ -CO)	8 \pm 1	48 \pm 7

^a K_m values are derived from Tables 2 and 3. IC_{50} (in italics) are the concentrations of trogliatzone that inhibit 50% of 6 α -hydroxylation of paclitaxel (10 or 15 μM , K_m values) by CYP2C8 and its R241A mutant. Assay conditions are described in Experimental Procedures. Mean values \pm SD from three experiments.

substrates bearing a negative charge at site 4 that could establish an ionic bond with the guanidinium group of Arg241. To confirm this assumption, experiments were carried out with CYP2C8 and the R241A mutant to compare the inhibitory effects of another CYP2C8 substrate bearing a terminal anionic function at site 4, trogliatzone (Figure 1). Table 4 shows that trogliatzone is a better inhibitor of CYP2C8 than of the R241A mutant (IC_{50} values of 8 \pm 1 and 48 \pm 7 μM , respectively). The data listed in Table 4 indicate that substrates bearing a terminal negative charge (retinoic acid, fluvastatin, and trogliatzone) have a higher affinity for CYP2C8 than for the R241A mutant (3–6-fold increase in K_m or IC_{50}), whereas a neutral substrate, paclitaxel, exhibits similar affinities for CYP2C8 and the R241A mutant. The equivalent of Arg241 in CYP2C5, Lys241, is located at the entrance of the substrate access channel of CYP2C5 (50). Moreover, in the X-ray structure of the CYP2C5–diclofenac complex (73), the terminal carboxylate group of diclofenac is engaged in the substrate access channel and is separated from Lys241 by a network of water molecules.

The small effects of the R241L and R241E mutations on the K_m of hydroxylation of DMZ, a neutral substrate that is too short to interact with Arg241, are in agreement with the above-mentioned role of Arg241. The increased K_m found for DMZ hydroxylation after the R241A mutation, and not after the R241L or R241E mutation, could reflect the short length of DMZ and more favorable interactions in the slightly smaller active sites of CYP2C8 and the R241E and R241L mutants when compared to the R241A mutant. Interestingly, the R241L mutant was the most efficient catalyst of DMZ hydroxylation, as it showed a k_{cat}/K_m value of 1.4 min⁻¹ μM^{-1} , which is more than 3 times greater than that of CYP2C8. This increase in catalytic efficiency is only due to an increase in k_{cat} (Table 3).

Effects of Mutations of Phenylalanines 201 and 205. Mutations of Phe201 and -205 affected CYP2C8 kinetic parameters in a substrate-dependent manner. They had very small effects on the K_m of fluvastatin hydroxylation, whereas they had large and differing effects on the K_m of hydroxylation of the three other substrates. The loss of the phenyl ring of Phe201 or -205 in the F201L, F205A, and F205I mutants increased the K_m of DMZ hydroxylation, and the effect was larger in the F205A mutant (4-fold instead of 2-fold). This could be related to the loss of favorable π – π interactions between these protein phenyl rings and the phenyl ring of DMZ (site 1 in Figure 2B). The much larger K_m increase displayed by the F205A mutant probably reflects

less favorable hydrophobic interactions between the DMZ phenyl ring and the methyl group of F205A, when compared with the alkyl groups of F201L and F205I.

Mutations of Phe201 and Phe205 had differing effects on the observed K_m for retinoic acid and paclitaxel hydroxylation. Mutations F201L and F205I led to a 2-fold decrease in the K_m of retinoic acid hydroxylation, whereas mutation F205A produced a 4-fold increase. In contrast, mutations F201L and F205I produced a small increase in the K_m of paclitaxel hydroxylation, whereas mutation F205A elicited a 2-fold decrease. These effects may reflect the very different structures and sizes of these two substrates. The loss of π – π interactions between a phenyl ring of paclitaxel (site 1) and the phenyl rings of Phe201 and 205 could explain the increase in the K_m of paclitaxel hydroxylation observed with the F201L and F205I mutations. In the case of retinoic acid, stronger hydrophobic interactions between hydrophobic site 1 of the pharmacophore (corresponding to the dimethyl-substituted part of the cyclohexyl group) with the alkyl chain of Leu201 or Ile205 than with the phenyl group of Phe201 (or Phe205) would explain the decrease in K_m , observed with the F201L and F205I mutations.

If Phe205 is in contact with substrates in the CYP2C8 active site, then the F205A mutation would provide more space above the heme, leading to a better accommodation of paclitaxel, the biggest substrate that has been studied. The additional space would also account for the weaker binding of retinoic acid as it would allow more mobility and reduced position restraints in the active site. In that regard, it is noteworthy that mutation F205A is the only one that gave a significant increase in the catalytic efficiency of CYP2C8 for paclitaxel hydroxylation (2-fold increase in k_{cat}/K_m , Table 3). Moreover, the F205A mutation produced the most spectacular change in the regioselectivity of diclofenac hydroxylation, as it was the only mutation that produced an inversion of the 5-hydroxydiclofenac:4'-hydroxydiclofenac ratio in favor of 4'-hydroxylation (Figure 5). Taken together, these data indicate that amino acid 205 is an important determinant in substrate positioning in the CYP2C8 active site.

Effects of Mutations of Asn99, Ser100, Ser103, Ser114, and Ser359. The S103A, S359I, and N99L mutations produced relatively minor effects on the catalytic properties of CYP2C8 toward the four studied substrates. However, there was a significant increase in the K_m of paclitaxel hydroxylation (2-fold increase) and also an increase in the k_{cat} for the hydroxylation of three substrates observed with the N99L mutant.

In contrast, the results shown in Tables 2 and 3 suggest that Ser100 could be involved in hydrogen bonding interactions with site 2 of the substrate pharmacophore (Figure 2B). Indeed, the S100A mutation displayed an increased K_m for hydroxylation of paclitaxel and DMZ (between 3- and 5-fold, Table 3), two CYP2C8 substrates involving features at site 2 in the pharmacophore that can easily establish a hydrogen bond with Ser100 (a hydroxyl and a SO₂ function, respectively, Figure 1). In contrast, the K_m for hydroxylation of retinoic acid, which has no polar group at pharmacophore site 2 (Figure 1) and should not bind to Ser100, was not significantly changed in the S100A mutant (Table 2). In fact, the kinetic constants of retinoic acid hydroxylation were not affected by this mutation. Finally, the catalytic efficiency of

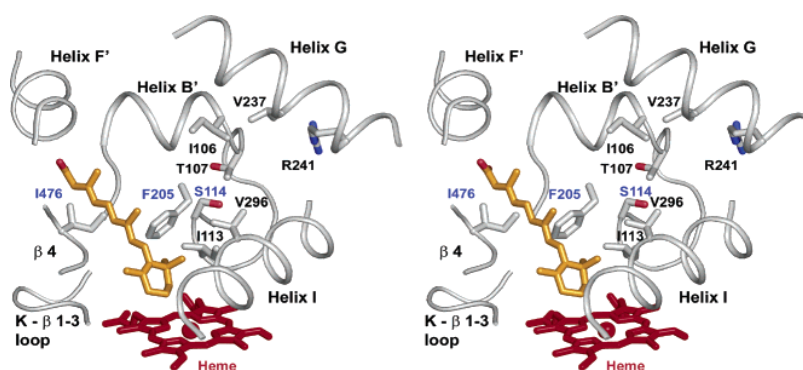


FIGURE 6: Computational docking of retinoic acid in the experimentally determined structure of CYP2C8 (PDB entry 1PQ2). Residues mutated in this study that altered retinoic acid hydroxylation are labeled in blue together with docked retinoic acid (in yellow). The S114F change produces a 7-fold decrease in K_m . Basic residues are not available within the active site for interaction with the carboxylate. The side chains of residues 106, 107, 113, 114, 237, and 296 prevent direct interactions between the side chain of retinoic acid and the guanidine group of R241. This figure was generated using PYMOL.

mutant S100A for fluvastatin hydroxylation was considerably lower (8-fold) than that of CYP2C8.

The hydroxyl of Ser114 seems to be much less important for substrate recognition than that of Ser100, because the S114A mutation did not affect the K_m values of paclitaxel and fluvastatin hydroxylations, only slightly increased the K_m of retinoic acid hydroxylation, and even decreased by a factor 2 the K_m of DMZ hydroxylation. However, residue 114 appears to be in the proximity of the substrates in the CYP2C8 active site, as it has been shown to be in CYP2C9 by a mutagenesis study (29), because the S114F mutation led to dramatic and contrasting effects on CYP2C8 substrate hydroxylation. The S114F mutant was completely inactive for paclitaxel hydroxylation, and this may reflect space constraints on the very bulky paclitaxel substrate imposed by increasing the size of residue 114. On the other hand, the S114F mutant exhibited a much better affinity for retinoic acid, with an 8-fold lower K_m value (Table 2), than CYP2C8. This may reflect the long hydrophobic chain of this substrate, which is not too bulky (when compared to paclitaxel). The space constraints and possible supplementary interactions supplied by the phenyl group of Phe114 from mutant S114F could promote optimal binding. Interestingly, the S114F mutant exhibited the highest catalytic efficiency for retinoic acid hydroxylation, and its k_{cat}/K_m value was 5-fold higher than that of CYP2C8.

Effects of the I476F Mutation. Mutation I476F in CYP2C8 had small effects on the hydroxylation of retinoic acid and paclitaxel. However, it led to a 2-fold increase in the K_m of fluvastatin hydroxylation and a 3-fold decrease in the k_{cat}/K_m of this reaction (Tables 2 and 3).

Automated Docking Studies Using the Experimentally Determined Structure of CYP2C8. Quite recently, the structure of CYP2C8 was determined to 2.7 Å by X-ray diffraction (51). The structure of CYP2C8 in the absence of a substrate exhibits a closed structure with an active site volume that is 2-fold larger than that seen for the structure of CYP2C5 used to model CYP2C8. The larger active site of 2C8 extends outward from the heme between β -sheet 1 and helix F', and the overall shape and polarity of the active site cavity differ from those seen in CYP2C5 (50, 72, 73). Preliminary substrate docking experiments using this experimentally determined structure were carried out in an effort to further understand the results obtained with the site-

directed mutants. The computer-simulated docking studies were carried out using Autodock (66). The program permits rotations around bonds in the substrate when it searches for a fit. However, the protein model is static. Comparisons of structures determined for different substrate complexes with CYP2C5 indicate that some regions of the active site, particularly helix B' and helices F and G, are relatively flexible and move to accommodate substrates of different sizes (72, 73). Thus, conformational changes in the protein induced by substrate binding could lead to solutions that are not predicted from the static model of the substrate-free protein. In this regard, docking of paclitaxel in the active site proved to be relatively difficult as slight differences produce highly unfavorable scores. Although a reasonable docking location was found (not shown), the tight fit suggests that the structure is likely to change with paclitaxel bound.

Retinoic acid is a long molecule that is relatively rigid due to the conjugation of the double bonds in the hydrophobic side chain bearing the carboxylate group. For the docking, rotations were permitted for the carboxylate moiety and the ring relative to the side chain. Autodock predicts a single docking location in the active site with the site of hydroxylation located close to the heme iron (Figure 6). The carboxylate is oriented toward the entrance of the solvent channel that occurs on the N-terminal side of helix B' rather than on the C-terminal side as in CYP2C5. The strongest effects of mutagenesis on retinoic acid oxidation were obtained with the F205A mutant that exhibited a 4-fold decrease in binding affinity and with the S114F mutant that displayed a 7-fold increase in binding affinity. Mutations in helix B' had little effect on the oxidation of retinoic acid. This is consistent with the docking of this substrate (Figure 6) in a position that does not contact the mutated residues in helix B' and that allows room for S114F mutation. The decrease in the apparent K_m seen for the S114F mutant would be consistent with a reduction in the degree of motion of retinoic acid in the binding site cavity effected by the presence of the larger side chain, whereas the F205A mutation may have the opposite effect.

In contrast to the restricted docking results with retinoic acid, a relatively large number of reasonable locations and orientations were predicted for fluvastatin binding reflecting the size of the active site cavity and the flexibility of the substrate. Only those predictions that placed the site of

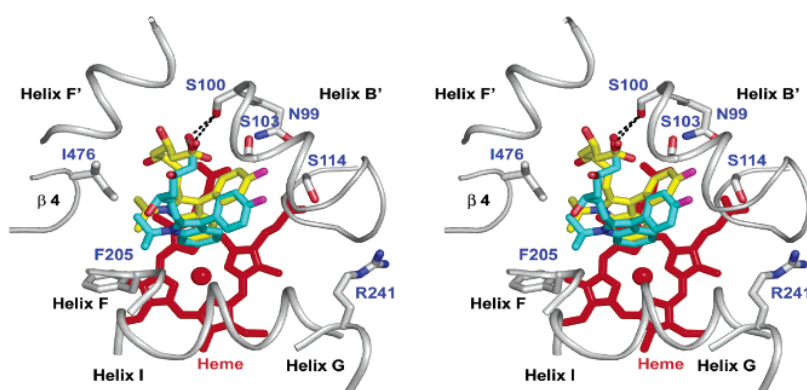


FIGURE 7: Alternate predictions for the docking of fluvastatin. Two docking solutions for fluvastatin (yellow and blue) illustrate the potential to accommodate the polar side chain of the substrate in alternative conformations that maintain a productive orientation for metabolism in the proximity of the heme (red) iron. There is a close correspondence of the two molecules near the heme iron, whereas the flexible alkyl-carboxylic side chains exhibit different conformations. In both cases, the substrate interacts with S100 of helix B'. Side chains of mutated residues that affect fluvastatin 5-hydroxylation are labeled in blue. This figure was generated using PYMOL.

hydroxylation in a reasonable position for oxidation are considered here. As depicted in Figure 7, the polar side chain of fluvastatin can adopt more than one orientation that is both reasonable and consistent with the observed regioselectivity of hydroxylation. The carboxylate of fluvastatin interacts with polar residues in the first turn of helix B' (Figure 7) through potential hydrogen bonding interactions. Consistent with the docking result, the S100A mutation decreases k_{cat}/K_m for fluvastatin 5-hydroxylation by 8-fold. In contrast, the S100A mutation has no effect on retinoic acid hydroxylation, consistent with a lack of apparent hydrogen bonding interactions between retinoic acid and this region. The effects of mutations N99L, S114F, F205A/I, and I476F on fluvastatin oxidation are consistent with the docking results as these residues are all close to the docked substrate (Table 2 and Figure 7).

The differential effects of mutating R241 on the oxidation of retinoic acid and fluvastatin are also consistent with the docking results. The docking prediction for retinoic acid places the carboxylate moiety far from R241 (Figure 6), and relatively small effects of the R241 mutations are observed on its hydroxylation relative to what would be expected for hydrogen bonding stabilized by the attraction of complementary charges. However, the R241 mutations have a greater effect on fluvastatin hydroxylation. The carboxylate side chains of all of the substrates are prevented from interacting directly with the guanidine group of R241 by steric hindrance created by several residues depicted in Figure 7. The effect of R241 mutations on fluvastatin binding may result from alterations of the packing of helix G with helix B' that result from mutation of residue 241. The C-terminal end of helix B' interacts directly with R241 and adjacent residues. Noticeably, the charge inversion in the R241E mutant does not significantly increase the effect when compared to the R241L and R241A mutations, which is consistent with the absence of a required role in providing a stabilizing ionic interaction with the substrate within the interior of the active site cavity. Alternatively, relatively small conformation changes in helix B', such as those seen in CYP2C5 upon binding of different substrates (72, 73), could increase the accessibility of R241 to the substrates leading to the potential for more direct interactions.

CONCLUSION

The very recent X-ray structure of substrate-free CYP2C8 (51) indicates that CYP2C8 has an especially large active site when compared with other CYP2C structures. This great size should permit more substrate mobility and more possible interactions with the protein residues. It also explains the great diversity of CYP2C8 substrate structures and the ability to accommodate large substrates such as paclitaxel (Figure 1). However, this renders more difficult any general substrate pharmacophore determination and any explanation of the effects of site-directed mutations on substrate binding and hydroxylation. In that context, our studies provide initial data on a limited number of known high-affinity (micromolar K_m) substrates that will help to clarify the presumably complex problem of substrate recognition by CYP2C8.

Our analysis of the structural determinants that are common to eight CYP2C8 substrates, and of the protein residues that could be involved in the binding of the corresponding functional groups present in the pharmacophore (on the basis of the study of 20 site-directed mutants), leads to the following propositions.

(1) Most of the studied substrates involve a terminal anionic or polar function ~ 13 Å from the hydroxylation site, and one or two secondary polar functions ~ 8.5 and ~ 4.5 Å from the site of hydroxylation. The relatively extended polar region of the helix B' and surrounding regions of the protein may contribute to an increased number of high-affinity binding conformations by offering the substrate multiple binding modes that are favorable for hydrogen bonding. The increased entropy due to multiple conformations of the bound substrate may contribute significantly to a favorable free energy for binding of flexible substrates such as fluvastatin. These polar interactions are also consistent with the pharmacophore model, which emphasizes the polarity of the CYP2C8 substrates distal from the site of hydroxylation. Ser100 is a residue in helix B' that appears to play an important role in substrate binding (see Tables 2 and 3 and Figure 7). Asn99 could also be involved in the binding of paclitaxel (Table 3). Mutation of Arg 241 has important effects on the kinetics of CYP2C8-mediated hydroxylation of anionic substrates. However, the molecular origin of these effects remains to be established.

(2) Residues 201, 205, and 114 appear to be in close contact with the substrates. As a function of the nature and size of these residues in CYP2C8 or its mutants, and of the substrate structure, these residues may establish either favorable π -stacking (CYP2C8 and paclitaxel and DMZ) or hydrophobic (F201L or F205I and retinoic acid, S114F and retinoic acid) interactions, or unfavorable steric interactions (S114F and paclitaxel).

In relation with these important roles of Phe205 and Ser114, it is noteworthy that significant improvements of the catalytic efficiencies of CYP2C8 have been obtained by mutating these residues. Thus, among all the mutants described above, S114F was the most efficient catalyst for retinoic acid hydroxylation, with a k_{cat}/K_m value 5 times higher than that of CYP2C8. Also, F205A was the best catalyst for paclitaxel and fluvastatin hydroxylation with k_{cat}/K_m values 2.1 and 2.4 times higher, respectively, than those of CYP2C8.

A more detailed understanding of the diverse modes of substrate binding in the active site of CYP2C8 and of the effects of mutations, particularly the R241 mutations, will be obtained after the crystal structures of several CYP2C8–substrate complexes have been determined.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Roger Attias (UMR 8601) for his help in the molecular modeling experiments on CYP2C8 and its substrates.

REFERENCES

- Ortiz de Montellano, P. R. (1995) *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*, Plenum Press, New York.
- Guengerich, F. P. (1995) in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.) pp 473–535, Plenum Press, New York.
- Zeldin, D. C., DuBois, R. N., Falck, J. R., and Capdevila, J. H. (1995) Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform, *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 76–86.
- Lin, H. C. J., Kobari, Y., Zhu, Y., Stemeran, M. B., and Pritchard, K. A. J. (1996) Human umbilical vein endothelial cells express P450 2C8 mRNA: Cloning of endothelial P450 epoxygenase, *Endothelium* 4, 219–229.
- Klose, T. S., Blaisdell, J. A., and Goldstein, J. A. (1999) Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13, 289–295.
- Ding, X., and Kaminsky, L. S. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 149–173.
- Goldstein, J. A., and de Morais, S. M. (1994) Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily, *Pharmacogenetics* 4, 285–299.
- Mancy, A., Broto, P., Dijols, S., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1995) The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: An approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling, *Biochemistry* 34, 10365–10375.
- Mancy, A., Dijols, S., Poli, S., Guengerich, P., and Mansuy, D. (1996) Interaction of sulfaphenazole derivatives with human liver cytochromes P450 2C: Molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP 2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP 2C9, *Biochemistry* 35, 16205–16212.
- He, M., Korzekwa, K. R., Jones, J. P., Rettie, A. E., and Trager, W. F. (1999) Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9, *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 16–28.
- Ha-Duong, N. T., Dijols, S., Marques-Soares, C., Minoletti, C., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2001) Synthesis of sulfaphenazole derivatives and their use as inhibitors and tools for comparing the active sites of human liver cytochromes P450 of the 2C subfamily, *J. Med. Chem.* 44, 3622–3631.
- Ha-Duong, N. T., Marques-Soares, C., Dijols, S., Sari, M. A., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2001) Interaction of new sulfaphenazole derivatives with human liver cytochrome p450 2Cs: Structural determinants required for selective recognition by CYP 2C9 and for inhibition of human CYP 2Cs, *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 189–200.
- Ha-Duong, N. T., Dijols, S., Macherey, A. C., Goldstein, J. A., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2001) Ticlopidine as a selective mechanism-based inhibitor of human cytochrome P450 2C19, *Biochemistry* 40, 12112–12122.
- Poli-Scaife, S., Attias, R., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1997) The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: An NMR study, *Biochemistry* 36, 12672–12682.
- Smith, D. A., and Jones, B. C. (1992) Speculations on the substrate structure–activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes, *Biochem. Pharmacol.* 44, 2089–2098.
- Jones, B. C., Hawksworth, G., Horne, V. A., Newlands, A., Morsman, J., Tute, M. S., and Smith, D. A. (1996) Putative active site template model for cytochrome P4502C9 (tolbutamide hydroxylase), *Drug Metab. Dispos.* 24, 260–266.
- Lewis, D. F. (1998) The CYP2 family: Models, mutants and interactions, *Xenobiotica* 28, 617–661.
- Jung, F., Griffin, K. J., Song, W., Richardson, T. H., Yang, M., and Johnson, E. F. (1998) Identification of amino acid substitutions that confer a high affinity for sulfaphenazole binding and a high catalytic efficiency for warfarin metabolism to P450 2C19, *Biochemistry* 37, 16270–16279.
- Payne, V. A., Chang, Y. T., and Loew, G. H. (1999) Homology modeling and substrate binding study of human CYP2C18 and CYP2C19 enzymes, *Proteins* 37, 204–217.
- Ekins, S., Bravi, G., Binkley, S., Gillespie, J. S., Ring, B. J., Wikel, J. H., and Wrighton, S. A. (2000) Three- and four-dimensional-quantitative structure activity relationship (3D/4D-QSAR) analyses of CYP2C9 inhibitors, *Drug Metab. Dispos.* 28, 994–1002.
- Afzelius, L., Zamora, I., Ridderstrom, M., Andersson, T. B., Karlen, A., and Masimirembwa, C. M. (2001) Competitive CYP2C9 inhibitors: Enzyme inhibition studies, protein homology modeling, and three-dimensional quantitative structure–activity relationship analysis, *Mol. Pharmacol.* 59, 909–919.
- Tsao, C. C., Wester, M. R., Ghanayem, B., Coulter, S. J., Chanas, B., Johnson, E. F., and Goldstein, J. A. (2001) Identification of human CYP2C19 residues that confer S-mephenytoin 4'-hydroxylation activity to CYP2C9, *Biochemistry* 40, 1937–1944.
- Ridderstrom, M., Zamora, I., Fjellstrom, O., and Andersson, T. B. (2001) Analysis of selective regions in the active sites of human cytochromes P450, 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19 homology models using GRID/CPA, *J. Med. Chem.* 44, 4072–4081.
- De Groot, M. J., Alex, A. A., and Jones, B. C. (2002) Development of a combined protein and pharmacophore model for cytochrome P450 2C9, *J. Med. Chem.* 45, 1983–1993.
- Ibeanu, G. C., Ghanayem, B. I., Linko, P., Li, L. P., Pedersen, L. G., and Goldstein, J. A. (1996) Identification of residues 99, 220, and 221 of human cytochrome P450 2C19 as key determinants of omeprazole hydroxylase activity, *J. Biol. Chem.* 271, 12496–12501.
- Klose, T. S., Ibeanu, G. C., Ghanayem, B. I., Pedersen, L. G., Li, L., Hall, S. D., and Goldstein, J. A. (1998) Identification of residues 286 and 289 as critical for conferring substrate specificity of human CYP2C9 for diclofenac and ibuprofen, *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 240–248.
- Haining, R. L., Jones, J. P., Henne, K. R., Fisher, M. B., Koop, D. R., Trager, W. F., and Rettie, A. E. (1999) Enzymatic determinants of the substrate specificity of CYP2C9: Role of B'-C loop residues in providing the π -stacking anchor site for warfarin binding, *Biochemistry* 38, 3285–3292.
- Ridderstrom, M., Masimirembwa, C., Trump-Kallmeyer, S., Ahlefeldt, M., Otter, C., and Andersson, T. B. (2000) Arginines 97 and 108 in CYP2C9 are important determinants of the catalytic function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 983–987.
- Melet, A., Assrir, N., Jean, P., Pilar Lopez-Garcia, M., Marques-Soares, C., Jaouen, M., Dansette, P. M., Sari, M. A., and Mansuy, D. (2003) Substrate selectivity of human cytochrome P450 2C9: Importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac and sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 80–91.
- Flanagan, J. U., McLaughlin, L. A., Paine, M. J., Sutcliffe, M. J., Roberts, G. C., and Wolf, C. R. (2003) Role of conserved Asp293

- of cytochrome P450 2C9 in substrate recognition and catalytic activity, *Biochem. J.* 370, 921–926.
31. Domanski, T. L., and Halpert, J. R. (2001) Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis, *Curr. Drug Metab.* 2, 117–137.
 32. Lewis, D. F. (2003) Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 32–44.
 33. Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D., and Jhoti, H. (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin, *Nature* 424, 464–468.
 34. Wester, M. R., Yano, J. K., Schoch, G. A., Yang, C., Griffin, K. J., Stout, C. D., and Johnson, E. F. (2004) The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 279, 35630–35637.
 35. Rahman, A., Korzekwa, K. R., Grogan, J., Gonzalez, F. J., and Harris, J. W. (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8, *Cancer Res.* 54, 5543–5546.
 36. Fischer, V., Johanson, L., Heitz, F., Tullman, R., Graham, E., Baldeck, J. P., and Robinson, W. T. (1999) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: Effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions, *Drug Metab. Dispos.* 27, 410–416.
 37. Yamazaki, H., Shibata, A., Suzuki, M., Nakajima, M., Shimada, N., Guengerich, F. P., and Yokoi, T. (1999) Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 27, 1260–1266.
 38. Ohyama, K., Nakajima, M., Nakamura, S., Shimada, N., Yamazaki, H., and Yokoi, T. (2000) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: An approach to predict the contribution with relative activity factor, *Drug Metab. Dispos.* 28, 1303–1310.
 39. Li, X. Q., Bjorkman, A., Andersson, T. B., Ridderstrom, M., and Masimirembwa, C. M. (2002) Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: A new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 399–407.
 40. Attar, M., Dong, D., Ling, K. H., and Tang-Liu, D. D. (2003) Cytochrome P450 2C8 and flavin-containing monooxygenases are involved in the metabolism of tazarotenic acid in humans, *Drug Metab. Dispos.* 31, 476–481.
 41. Leo, M. A., Lasker, J. M., Raucy, J. L., Kim, C. I., Black, M., and Lieber, C. S. (1989) Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P4502C8, *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 305–312.
 42. Nadin, L., and Murray, M. (1999) Participation of CYP2C8 in retinoic acid 4-hydroxylation in human hepatic microsomes, *Biochem. Pharmacol.* 58, 1201–1208.
 43. Rifkind, A. B., Lee, C., Chang, T. K., and Waxman, D. J. (1995) Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: Regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 380–389.
 44. Daikh, B. E., Lasker, J. M., Raucy, J. L., and Koop, D. R. (1994) Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1427–1433.
 45. Zeldin, D. C. (2001) Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism, *J. Biol. Chem.* 276, 36059–36062.
 46. Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., and Busse, R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries, *Nature* 401, 493–497.
 47. Fleming, I. (2000) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries, *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 166–170.
 48. Fleming, I. (2001) Cytochrome P450 and vascular homeostasis, *Circ. Res.* 89, 753–762.
 49. Lewis, D. F. (2002) Homology modelling of human CYP2 family enzymes based on the CYP2C5 crystal structure, *Xenobiotica* 32, 305–323.
 50. Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. (2000) The crystallographic structure of a mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: Structural adaptations for membrane binding and functional diversity, *Mol. Cell* 5, 121.
 51. Schoch, G. A., Yano, J. K., Wester, M. R., Griffin, K. J., Stout, C. D., and Johnson, E. F. (2004) Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site, *J. Biol. Chem.* 279, 9497–9503.
 52. Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA, *Cell* 56, 619–630.
 53. Truan, G., Cullin, C., Reisdorf, P., Urban, P., and Pompon, D. (1993) Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome *bs*, *Gene* 125, 49–55.
 54. Urban, P., Cullin, C., and Pompon, D. (1990) Maximizing the expression of mammalian cytochrome-P-450 monooxygenase activities in yeast cells, *Biochimie* 72, 463–472.
 55. Marques-Soares, C., Dijols, S., Macherey, A. C., Wester, M. R., Johnson, E. F., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2003) Sulfaphenazole derivatives as tools for comparing cytochrome P450 2C5 and human cytochromes P450 2Cs: Identification of a new high affinity substrate common to those enzymes, *Biochemistry* 42, 6363–6369.
 56. Ma, Y. H., Gebremedhin, D., Schwartzman, M. L., Falck, J. R., Clark, J. E., Masters, B. S., Harder, D. R., and Roman, R. J. (1993) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries, *Circ. Res.* 72, 126–136.
 57. Pompon, D., and Nicolas, A. (1989) Protein engineering by cDNA recombination in yeasts: Shuffling of mammalian cytochrome P-450 functions, *Gene* 83, 15–24.
 58. Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
 59. Bellamine, A., Gautier, J. C., Urban, P., and Pompon, D. (1994) Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability, *Eur. J. Biochem.* 225, 1005–1013.
 60. Omura, T., and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2385.
 61. Vermilion, J. L., and Coon, M. J. (1974) Highly purified detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductase from phenobarbital-induced rat liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1315–1322.
 62. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
 63. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
 64. Renaud, J. P., Cullin, C., Pompon, D., Beaune, P., and Mansuy, D. (1990) Expression of human liver cytochrome-P450 3A4 in yeast: A functional model for the hepatic enzyme, *Eur. J. Biochem.* 194, 889–896.
 65. Spatzenegger, M., Wang, Q., He, Y. Q., Wester, M. R., Johnson, E. F., and Halpert, J. R. (2001) Amino acid residues critical for differential inhibition of CYP2B4, CYP2B5, and CYP2B1 by phenylimidazoles, *Mol. Pharmacol.* 59, 475–484.
 66. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.
 67. Helms, V., and Wade, R. C. (1995) Thermodynamics of water mediating protein–ligand interactions in cytochrome P450cam: A molecular dynamics study, *Biophys. J.* 69, 810–824.
 68. van Aalten, D. M., Bywater, R., Findlay, J. B., Hendlich, M., Hoof, R. W., and Vriend, G. (1996) PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 10, 255–262.
 69. McSorley, L. C., and Daly, A. K. (2000) Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation, *Biochem. Pharmacol.* 60, 517–526.
 70. Busse, D., Cosme, J., Beaune, P., Kroemer, H. K., and Eichelbaum, M. (1995) Cytochromes of the P450 2C subfamily are the major enzymes involved in the O-demethylation of verapamil in humans, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353, 116–121.
 71. Tracy, T. S., Korzekwa, K. R., Gonzalez, F. J., and Wainer, I. W. (1999) Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 47, 545–552.
 72. Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dansette, P. M., Mansuy, D., and Stout, C. D. (2003) Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å Resol-

- tion: Evidence for multiple substrate binding modes, *Biochemistry* 42, 6370–6379.
73. Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dijols, S., Dansette, P. M., Mansuy, D., and Stout, C. D. (2003) Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: Evidence for an induced fit model of substrate binding, *Biochemistry* 42, 9335–9345.
74. Gotoh, O. (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences, *J. Biol. Chem.* 267, 83–90.
75. Mancy, A., Antignac, M., Minoletti, C., Dijols, S., Mouries, V., Duong, N. T., Battioni, P., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1999) Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromes P450 active sites: Particular efficiency and regioselectivity of P450 2Cs, *Biochemistry* 38, 14264–14270.
76. Kleywegt, G. J., and Jones, T. A. (1994) Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures, *Acta Crystallogr. D* 50, 178–185.
77. Kerdpin, O., Elliot, D. J., Boye, S. L., Birkett, D. J., Yoovathavorn, K., and Miners, J. O. (2004) Differential contribution of active site residues in substrate recognition sites 1 and 5 to cytochrome P450 2C8 substrate selectivity and regioselectivity, *Biochemistry* 43, 7834–7842.

BI0489309

CHAPITRE IV : Conclusion générale

Les CYP2C constituent une importante sous-famille de cytochromes P450 localisés principalement dans le foie mais aussi dans d'autres sites extrahépatiques, dont le système cardiovasculaire (chapitre I). Quatre membres de cette sous-famille ont été identifiés chez l'homme : les CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19. Malgré une faible homologie de séquence, ces isoformes ont des spécificités de substrats relativement distinctes. Pour comprendre l'origine de ces différences, le laboratoire dirigé par Daniel Mansuy étudie depuis plusieurs années la topologie de leurs sites actifs et les spécificités de substrats et d'inhibiteurs de ces enzymes. En l'absence de structures RX de P450 humains, ce travail a été effectué jusqu'à présent en combinant plusieurs approches à la fois *in silico* (pharmacophore de substrats, modèles de protéines et de complexes enzyme-ligand) et *in vitro* (recherche de substrats et inhibiteurs spécifiques, RMN, RPE et mutagenèse dirigée).

Au début de ma thèse a été publiée la première structure RX d'un P450 de mammifère, le CYP2C5 de lapin (Williams et al., 2000b), qui présente environ 80% d'identité de séquence avec les CYP2C humains. Cristina Marques a utilisé cette structure RX pour construire un nouveau modèle du CYP2C9 (Marques-Soares, 2002), à priori plus fiable que les précédents modèles bâtis au laboratoire à partir des structures RX de P450 bactériens (Ha Duong, 2001; Jean, 1997; Minoletti, 1998). Un premier modèle du CYP2C8 et un premier pharmacophore des substrats ont également été proposés (Marques-Soares, 2002).

Ma thèse s'est insérée dans la continuité de ce travail, mon objectif étant d'utiliser les outils de la biologie moléculaire (mutagenèse dirigée, construction de chimères) pour identifier certains résidus clés de ces hémoprotéines et au final valider ou infirmer les prédictions d'interaction enzyme-ligand de nos nouveaux modèles.

9 mutants du CYP2C9, 21 mutants du CYP2C8 et 4 chimères 2C8/2C9 ont été construits au cours de cette thèse et exprimés dans la souche de levure W(R). Les principaux résultats obtenus sont exposés ci-dessous dans leur chronologie.

La première partie de mon travail a été consacrée à l'étude de la spécificité de reconnaissance de molécules par le CYP2C9, par mutagenèse dirigée. Le CYP2C9 a fait l'objet de nombreuses publications au laboratoire comme dans la littérature mais peu de mutants de cette enzyme avait été construits et caractérisés au début de ma thèse (cf. chapitre I). Cette isoforme a trois particularités par rapport aux autres CYP2C humains qui ont servi de point de départ à notre étude : elle est inactivée par l'acide tiénilique, elle hydroxyle régiosélectivement le diclofénac en position 4' et elle a une forte affinité pour le sulfaphénazole, un inhibiteur spécifique. Le docking de ces trois molécules dans le site actif modèle du CYP2C9 a mis en évidence des interactions potentielles avec plusieurs acides aminés de l'apoprotéine. Ces résidus ont alors été mutés afin d'évaluer la fiabilité de ces prédictions. **Cette étude de mutagenèse a donné trois résultats majeurs exposés dans le chapitre II et dans l'article joint :**

- **Nous avons identifié Ser365 (SRS5) comme le résidu responsable de l'inactivation suicide du CYP2C9 par l'acide tiénilique (Melet et al., 2003).** Ce résidu nucléophile, spécifique du CYP2C9, fixerait de manière covalente le métabolite électrophile de l'acide tiénilique, inactivant ainsi l'enzyme irréversiblement. Notons que cet acide aminé avait été également recherché par des techniques de radiomarquage du site actif mais que toutes les tentatives avaient échoué en raison de l'instabilité des adduits formés (Koenigs et al., 1999 + une étude effectuée au laboratoire).
- **Nous avons confirmé le rôle clé du résidu aromatique Phe114 dans des interactions de type π - π avec les noyaux aromatiques de ligands classiques du CYP2C9** tels que l'acide tiénilique, le diclofénac et le sulfaphénazole (Melet et al., 2003). En effet, la suppression de l'aromaticité de ce résidu (par la mutation F114I) ou de l'aromaticité des ligands (en substituant le groupe phényle du sulfaphénazole par un cyclohexyle) causait une

perte d'affinité importante de l'enzyme envers ces molécules. Les données obtenues avec le mutant F114I ont corroboré des résultats antérieurs de Haining et al. sur le mutant F114L (Haining et al., 1999). Elles ont en plus prouvé la grande proximité du résidu 114 vis-à-vis des ligands (affinité du mutant F114I pour le dérivé du sulfaphénazole à groupement cyclohexyle), ce qui réfute les résultats de modélisation de De Groot et al. (De Groot et al., 2002), postulant un rôle indirect de Phe114 dans la reconnaissance de molécules par le CYP2C9.

- Enfin, en étudiant le mutant F476I, **nous avons apporté la première preuve expérimentale du rôle clé d'un autre résidu aromatique, Phe476 (SRS6), dans la reconnaissance de ligands par le CYP2C9 (probablement par interaction π - π) et la régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac** (Melet et al., 2003). L'étude complémentaire d'une série de mutants F476X (X=A, E, R, H, W) a confirmé l'importance du résidu Phe476 pour la fixation de l'acide tiénilique et du diclofénac dans le site actif du CYP2C9 (Annexe D). Cependant la très forte augmentation des k_{cat} d'hydroxylation de l'acide tiénilique constatée avec les mutants F476I et F476A reste difficile à expliquer à l'heure actuelle. Dans la mesure où le résidu 476 se trouve dans le canal d'accès du solvant, cet effet pourrait être lié à une vitesse accrue d'accès des protons au site actif de l'enzyme.

La deuxième partie de ma thèse a été consacrée à l'étude de chimères et de mutants du CYP2C8 (chapitre III de cette thèse). L'intérêt de nombreux laboratoires pour le CYP2C8 était récent et dû, d'une part à la mise en évidence de son rôle dans le métabolisme d'un grand nombre croissant de médicaments, et d'autre part à la découverte de son rôle probable dans la régulation de la vasodilatation. Aussi, un seul modèle 3D de CYP2C8 avait été publié au début de ce travail; de plus, aucun pharmacophore des substrats ou étude de mutagenèse n'était rapporté dans la littérature.

Le CYP2C8 a la particularité de métaboliser des substrats de tailles très diverses, des petites molécules comme le DMZ ou des substrats volumineux comme le taxol. Pour étudier les modes de reconnaissance des substrats par le CYP2C8, nous avons d'abord utilisé une stratégie indépendante des modèles, en construisant des chimères CYP2C8/CYP2C9 (Annexe F). Une étude préliminaire sur 4 chimères a révélé l'importance de la séquence 360-431 (contenant les résidus 360-370 du SRS5) pour la reconnaissance du taxol alors que ces mêmes résidus 360-431 semblent moins essentiels à la fixation de la fluvastatine ou du diclofénac. D'après nos résultats, la partie C-terminale du CYP2C8 (résidus 388-490 contenant le SRS6) pourrait jouer un rôle dans l'hydroxylation de la fluvastatine.

Parallèlement, Cristina Marques a abouti fin 2001 à la construction d'une première ébauche de pharmacophore des substrats et d'un premier modèle 3D de CYP2C8 (Marques-Soares, 2002). Cinq substrats très affins ($K_m \leq 10 \mu M$) et ne possédant qu'un site majeur d'oxydation ont été sélectionnés pour construire ce pharmacophore. Ces molécules comportent une fonction terminale acide ou polaire (à $12,9 \pm 0,8 \text{ \AA}$ du site d'oxydation), un motif hydrophobe (à $3,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$) et également deux fonctions polaires secondaires (a) et (b), présentes dans tous les substrats sauf l'acide rétinolique. Ces résultats me permettaient d'envisager à ce stade une approche de mutagenèse dirigée, plus rationnelle. La caractérisation des chimères a alors été arrêtée prématurément au profit de l'étude de mutants ponctuels, dont les propriétés catalytiques étaient plus faciles à interpréter.

Le choix des mutations s'est appuyé sur les résultats du docking de la fluvastatine (une des molécules du pharmacophore) dans le site actif modèle du CYP2C8 et sur l'alignement de séquence entre CYP2C humains (permettant d'identifier les résidus des SRS spécifiques du CYP2C8). **L'étude des propriétés catalytiques d'une vingtaine de mutants, vis-à-vis de cinq substrats du CYP2C8 de taille et de structures différentes, a permis d'identifier six résidus, impliqués dans la reconnaissance et l'hydroxylation de ces molécules (Arg97,**

Ser100, Ser114, Phe201, Phe205, Arg241). Les effets des mutations à ces positions nous permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

- **Arg97 (SRS1) joue un rôle clé dans la fixation de l'hème et la structuration du site actif des CYP2C8 et CYP2C9.** En effet, la mutation de ce résidu conservé dans le CYP2C8 a les mêmes effets que dans le CYP2C9 (Ridderstrom et al., 2000) : elle provoque une chute dramatique d'efficacité catalytique avec tous les substrats testés.

- **Quatre résidus semblent interagir avec les motifs du pharmacophore des substrats. Arg241, située à l'entrée du canal d'accès des substrats dans notre modèle, interagirait avec les fonctions terminales acides des substrats (anioniques à pH physiologique), directement ou indirectement via un réseau de molécules d'eau. Ser100 (SRS1) semble être impliquée dans des liaisons hydrogènes avec les fonctions polaires secondaires du taxol et du DMZ (fonctions polaires (a) du pharmacophore). Enfin, Phe201 (SRS2) et Phe205 (SRS2) pourraient établir des interactions hydrophobes (acide rétinolique) voire π - π (taxol, DMZ) avec les motifs hydrophobes de certains substrats .**

- **Phe205 (SRS2) et Ser114 (SRS1) semblent très proches des substrats dans le site actif.** En fonction de la taille des résidus 205 et 114 et du type de substrat, nous observons **des effets stériques favorables (S114F et acide rétinolique, F205A et taxol) ou défavorables (S114F et taxol, F205A et acide rétinolique)**. Le faible encombrement stérique du résidu Ser114 est capital pour la reconnaissance d'un substrat volumineux comme le taxol. Il n'est donc pas étonnant que les autres CYP2C qui possèdent une phénylalanine encombrante en position 114 ne puissent pas métaboliser ce substrat. **Ser114 serait donc un élément clé de la spécificité de substrats du CYP2C8.**

- Enfin, les résidus de la boucle C-terminale ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la fixation de substrats par le CYP2C8, leur mutation ayant peu d'effets sur les Km. Par contre, la mutation des résidus Lys474 (SRS6) et Ile476 (SRS6) induit une baisse de la kcat d'hydroxylation de la fluvastatine ce qui rejoint les résultats que nous avons obtenus par l'étude de chimères CYP2C8/CYP2C9 (Annexe F).

L'importance clé des acides aminés Phe205 et Ser114 pour la reconnaissance et l'hydroxylation des substrats par le CYP2C8 est clairement illustrée par l'amélioration des propriétés catalytiques du CYP2C8 :

- vis-à-vis de l'hydroxylation du taxol et de la fluvastatine, après la mutation F205A ; le mutant F205A est le plus efficace de tous les mutants testés; il a une kcat/Km 2 à 3 fois plus grande que celle du CYP2C8 pour ces deux hydroxylations.

- vis-à-vis de l'hydroxylation de l'acide rétinolique après la mutation S114F; le mutant S114F est plus efficace pour cette hydroxylation, avec une kcat/Km 5 fois plus élevée que celle du CYP2C8.

Tout à la fin de ma thèse, les structures RX de deux complexes CYP2C5-substrat (Williams et al., 2000a), CYP2C5-DMZ (Wester et al., 2003a) et CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b), ainsi que les structures du CYP2C9 (Williams et al., 2003) et du complexe CYP2C9-warfarine (Williams et al., 2003) ont été publiées. De plus, les structures RX du complexe CYP2C9-flurbiprofène et du CYP2C8 ont été présentées à plusieurs congrès (Johnson et al., 2003). Les données correspondantes disponibles sont, en grande partie, en accord avec les interprétations que nous avons données pour nos résultats de mutagenèse. Ceci indique que les caractéristiques des complexes CYP2C-substrat révélées par leur structure cristalline se retrouvent en solution. Les principales données en accord avec nos interprétations sont les suivantes :

- Arg97 interagit avec les propionates de l'hème dans le CYP2C9 et les complexes CYP2C5-substrat. Il jouerait un rôle dans la fixation de l'hème et la structuration des boucles du site actif autour de la protoporphyrine IX de fer.

- La sérine 365 est bien localisée dans le site actif du CYP2C9, dans une orientation favorable à la fixation du métabolite électrophile de l'acide tiénilique.
- D'après les structures RX des complexes CYP2C9-substrats (Williams et al., 2003) (Johnson et al., 2003), les phénylalanines 114 et 476 forment des interactions π - π avec les noyaux aromatiques du flurbiprofène et de la warfarine respectivement. Ces mêmes phénylalanines interagissent avec les noyaux aromatiques du diclofénac dans la structure RX du complexe CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b) ce qui conforte nos résultats sur le CYP2C9.
- Le résidu 241 (Lys241) du CYP2C5 sert de point d'ancrage à un réseau de molécules d'eau interagissant avec la fonction acide carboxylique du diclofénac (Wester et al., 2003b). Son rôle pourrait être similaire dans le CYP2C8.

Enfin, les structures RX des complexes CYP2C9-substrats et nos résultats de mutagenèse nous permettent d'apprécier la qualité prédictive de nos modèles de CYP2C9 et CYP2C8.

Notre modèle de CYP2C9 construit à partir de la structure RX du CYP2C5 de lapin, est meilleur que le précédent modèle construit à partir de structures RX de cinq P450 bactériens (Ha Duong, 2001). En effet ce dernier ne positionnait pas la boucle C-terminale contenant le SRS6 (et donc Phe476) dans le site actif de l'enzyme. Notre nouveau modèle semble assez prédictif des interactions avec les résidus du site actif (Ser365, Phe114, Phe476), par contre il offre une représentation beaucoup moins fiable du positionnement des acides aminés à l'entrée du canal d'accès des substrats, zone particulièrement mobile dans les cytochromes P450, en particulier au niveau de la boucle B-C très flexible (la position de Arg108 constatée dans la structure RX du complexe CYP2C9-flurbiprofène (Johnson et al., 2003) aurait été difficile à prévoir par modélisation).

En ce qui concerne notre modèle de CYP2C8, la prévision d'une taille très grande du site actif par rapport aux autres CYP2C est en accord avec les données disponibles sur la structure RX du CYP2C8 (Johnson et al., 2003). La taille du site actif du CYP2C8 permet la fixation de gros substrats comme le taxol. Elle devrait aussi permettre une mobilité accrue et des possibilités d'interactions multiples des substrats de plus petite taille dans le site actif. Ceci explique les effets très différents de certaines mutations pour l'hydroxylation de substrats de structures variées. Cette grande taille du site actif implique vraisemblablement que l'ensemble des substrats du CYP2C8 ne puissent pas être décrits dans le cadre d'un seul pharmacophore. Malgré tout, nos résultats de mutagenèse confirment plusieurs prédictions du modèle, comme l'importance de Phe205 dans la fixation des substrats, ou l'interaction de Arg241 avec les sites anioniques de certains substrats. Ils en infirment d'autres, comme l'existence de liaisons hydrogènes entre Asn99 et Ser114 et les sites polaires (a) et (b) des substrats (les résultats de mutagenèse ne seraient en accord qu'avec une telle liaison entre Asn99 et le taxol). En outre, l'interaction CYP2C8-fluvastatine indiquée par notre modèle n'est pas en accord avec l'absence d'effet de la mutation F205I sur l'hydroxylation de ce substrat.

Les différences de comportement du CYP2C9 et du CYP2C8 vis-à-vis des substrats semblent donc liées, entre autres :

- A une taille très différente de leur site actif, permettant l'accès de plus gros substrats comme le taxol dans le cas du CYP2C8, et vraisemblablement, une plus grande mobilité des substrats dans le site actif du CYP2C8.
- A la nature très différente de certains résidus clés du site actif : c'est le cas des résidus 114 et 476 qui sont des phénylalanines dans le CYP2C9 et une sérine et une isoleucine dans le CYP2C8. Phe114 et Phe476 permettent d'établir des liaisons de type π - π avec les substrats du CYP2C9, qui portent très souvent un ou plusieurs cycles aromatiques. C'est aussi le cas du résidu 205, une phénylalanine dans le CYP2C8 qui semble restreindre la

hauteur du toit du site actif et peut établir une liaison π - π avec les substrats aromatiques et qui est une isoleucine dans le CYP2C9.

Cette thèse souligne ainsi la complémentarité de la mutagenèse dirigée et de la modélisation moléculaire pour l'étude topologique des CYP2C. La modélisation permet de visualiser les sites actifs, de prédire certaines interactions ou d'interpréter certains résultats de mutagenèse. La mutagenèse dirigée permet par contre de corriger ces modèles et de générer parfois de nouvelles enzymes plus efficaces que l'enzyme sauvage.

Les données de mutagenèse obtenues au cours de ma thèse ont permis d'améliorer notre connaissance de la topologie des sites actifs des CYP2C9 et CYP2C8 et des résidus impliqués dans la fixation de molécules par ces enzymes. Cependant, certains résultats restent difficiles à interpréter. La publication prochaine de nouvelles structures RX de complexes CYP2C9-substrat et de complexes CYP2C8-substrat devrait nous fournir quelques éléments de réponse.

CHAPITRE V : Matériel et Méthodes

V.A PRODUITS ET ENZYMES EMPLOYES

V.A.1 Produits commerciaux

Les produits utilisés pour les milieux de culture (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, Bactocasaminoacids, Yeast Extract, Bactopeptone) proviennent de Difco (fournisseur COGER, Paris, France). Le glucose et le galactose ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Le dithionite de sodium, la BSA et le cytochrome c sont fournis respectivement par Merck, Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) et New England Biolabs (fournisseur OZYME, St Quentin en Yvelines, France). Les réactifs utilisés pour les mesures d'activité NADPH, NADP, le glucose-6-phosphate et la glucose-6-phosphate déshydrogénase proviennent de Roche Diagnostics (Meylan, France). Le diclofénac, le sulfaphénazole, le taxol, l'acide rétinolique, l'amiodarone proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'acide tiénilique, la fluvastatine et la cézivastatine sont des dons d'Anphar-Rolland (Chilly-Mazarin, France), de Merck Lipla et de Bayer, respectivement. La troglitazone est un produit issu de Cayman Chemicals (fournisseur SPI-BIO, Massy, France). Les oligonucléotides ont été achetés à la société Genome Express (Paris, France) ou Eurogentec (Seraing, Belgique).

V.A.2 Produits synthétisés : dérivés du sulfaphénazole

Tous les dérivés du sulfaphénazole utilisés au cours de ma thèse ont été synthétisés au laboratoire par Sylvie Dijols. Les protocoles de synthèse des molécules **1** à **3** sont décrits dans plusieurs publications (Ha-Duong et al., 2001a; Ha-Duong et al., 2001b; Melet et al., 2003).

V.A.3 Milieux de culture et tampons

Les compositions des milieux de culture et des tampons sont indiquées respectivement dans les tableaux 1 et 2.

Milieux nutritifs pour <i>E. coli</i>	
LB	10g tryptone 5g Yeast Extract 5g NaCl 1ml NaOH 1N
LBA	LB+50µg/ml d'ampicilline rajoutée au moment de l'emploi
Milieux nutritifs pour <i>S. cerevisiae</i>	
SGI	7g Yeast Nitrogen Base 1g casaminoacides 30 mg de tryptophane au moment de l'emploi 5g glucose
YE2X	20g Yeast Extract 20g bactopeptone

Tableau 40 : Composition des milieux de culture (par litre de milieu). Les milieux solides ont la même composition que les milieux liquides avec en plus 15g d'agar.

STET	Sucrose 8% Tris 50mM EDTA 50mM pH=8
TE	Tris 50 mM EDTA 50mM pH=7,4
TES	Tris 50mM EDTA 1-2mM Sorbitol 0,6M pH=7,4
TEG	Tris 50mM EDTA 50mM Glycérol 20% pH=7,4
Tampon phosphate	Phosphate 0,1M EDTA 0,1mM pH=7,4

Tableau 41 : Composition des solutions tampons utilisées (à 25°C).

V.A.4 Matériel biologique : souches et vecteurs

V.A.4.a *Souches bactériennes d'Escherichia coli*

TG1 : *D(lac pro) supE thi hsdD5 F' traD35 proAB LacIq LacZDM15*
XI1blue : *recA1, end A1, gyrA96thi-1hsd R17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacI^oZΔM15Tn10 (Ter^r)]^c*

V.A.4.b *Souches de levures Saccharomyces cerevisiae*

Les souches W(N), W(R) et W(hR) ont été construites par l'équipe de Denis Pompon au Centre de Génétique moléculaire (Gif/Yvette, France).

W(303-1B) ou W(N) : souche sauvage exprimant la P450 réductase et le cytochrome b5 endogènes (Thomas and Rothstein, 1989) de génotype MAT **a**; *ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; ura3-1; trp1-1*.

W(R) : souche dérivée de W(303-1B) surexprimant la P450 réductase de levure (Truan et al., 1993) de génotype MAT **a**; *ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; ura3-1; trp1-1* ; YRED : : [*ura3⁻-GAL10-CYC1-YRED*]. Cette souche a été obtenue par introduction d'un promoteur inductible fort en amont de la P450 réductase de levure de W(303-1B).

W(hR) : souche dérivée de W(303-1B) surexprimant la P450 réductase humaine (Urban et al., 1993) de génotype MAT **a**; *ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; ura3-1; trp1-1*; YRED : : [*ura3⁻-GAL10-CYC1-HRED*]. Le gène de la P450 réductase de levure a été disrupté et remplacé par le gène de la P450 réductase humaine sous le contrôle du promoteur inductible fort GAL10-CYC1.

V.A.4.c Vecteurs

pYeDP60 : vecteur navette *E. Coli / Saccharomyces cerevisiae* multicopie dont la cassette d'expression est sous le contrôle du promoteur inducible fort *GAL10-CYC1* et du terminateur de la *PGK*. Une origine de réplication bactérienne *ORI* et un marqueur de sélection bactérien *AMPR* (gène de résistance à l'ampicilline) permettent l'utilisation d' *E. coli* comme hôte de clonage. Une origine de réplication de levure *ORI2 μ* et deux marqueurs de sélection *URA3* et *ADE2* (gènes essentiels à la biosynthèse de nucléotides) permettent l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* comme hôte d'expression du CYP.

p2C9DP60 (ou p2C8DP60) : vecteur navette *E. coli / Saccharomyces cerevisiae* multicopie portant la phase ouverte de lecture du CYP2C9 (CYP2C8) (Urban et al., 1990). L'ADNc du CYP2C9 (CYP2C8) a été cloné par recombinaison homologue dans le vecteur pYeDP60.

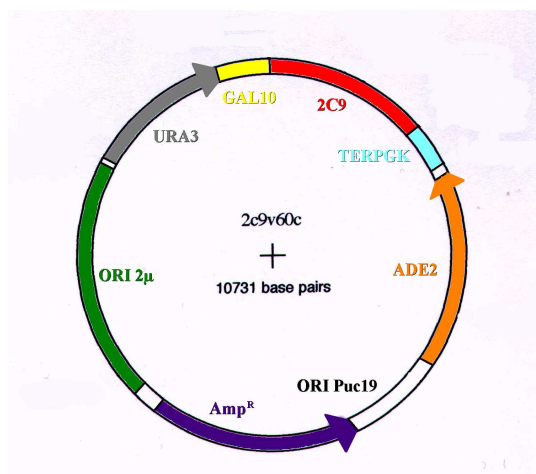


Figure 68: Vecteur d'expression pYeDP60 portant l'ORF du CYP2C9.

V.B CONSTRUCTION DES MUTANTS

V.B.1 Mutagenèse dirigée et clonage

V.B.1.a Essai de mutagenèse avec le kit Quick Change (Stratagene)

Le kit Quick Change a été mis au point par la société Stratagene pour amplifier la totalité d'un vecteur matrice (taille ≤ 10 kb) à partir de deux amorces antiparallèles. Le produit de PCR est un plasmide muté ouvert à ses extrémités. Le vecteur matrice méthylé est ensuite digéré par l'endonucléase DpnI pendant 1h à 37°C. Un aliquot de 1 μ l est prélevé et transfecté par choc thermique dans des bactéries XL1-Blue supercompétentes (Stratagène). Après transformation, les bactéries referment le plasmide muté (Figure 69).

Les protocoles d'incubation, de PCR et de transformation figurent sur la notice du kit. Plusieurs paramètres doivent être optimisés pour obtenir la mutation désirée : le choix des amorces, la quantité d'ADN matrice (de 5 à 50 ng) et les conditions de PCR.

Nous n'avons pas réussi à muter le vecteur p2C9DP60 par cette méthode, en raison de la taille de notre vecteur (sur un nombre d'expériences limité).

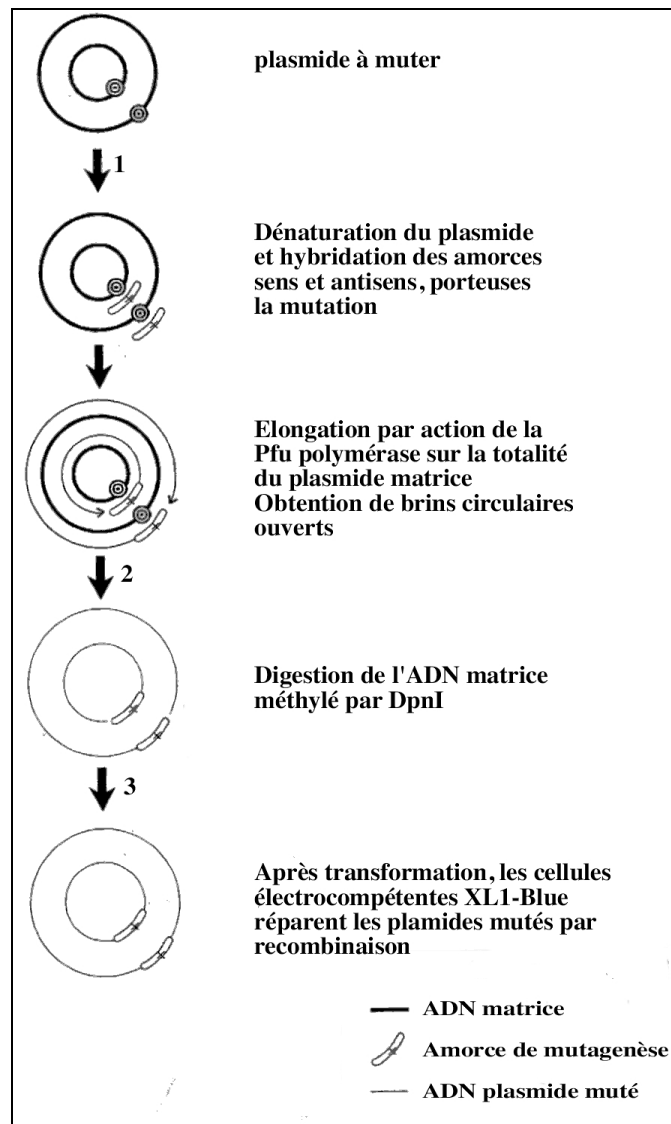


Figure 69 : Principe du kit Quick Change (Stratagene). Etape 1 : PCR, Etape 2 : digestion de l'ADN matrice, Etape 3 : Transformation.

V.B.1.b Mutagenèse par double PCR

La mutagenèse dirigée des CYP2C9 et 2C8 a été réalisée par deux PCR successives d'après le mode opératoire indiqué dans le Tableau 42. Les oligonucléotides comportant les mutations sont répertoriés dans les tableaux 3 et 4. Deux autres oligonucléotides ont été utilisés : Pro (5'-ACGACACATGATCATATGGCATGCATGTGCTCTGTATGTATATAA-3') et Ter (5'-TCACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTTCGA-3') qui s'hybrident respectivement avec le promoteur (région -136 à -181 en amont de l'ATG) et le terminateur du vecteur d'expression (amorce antisens s'hybridant entre +1900 à +1855). La première PCR (PCR1) s'effectue entre l'amorce mutée et l'amorce Pro (pour les mutations des acides aminés de 97 à 241A) ou Ter (pour les mutations des acides aminés de 241L à 482). Le produit de PCR obtenu et Pro ou Ter servent d'amorces pour la deuxième PCR (PCR2) qui amplifie la totalité du gène.

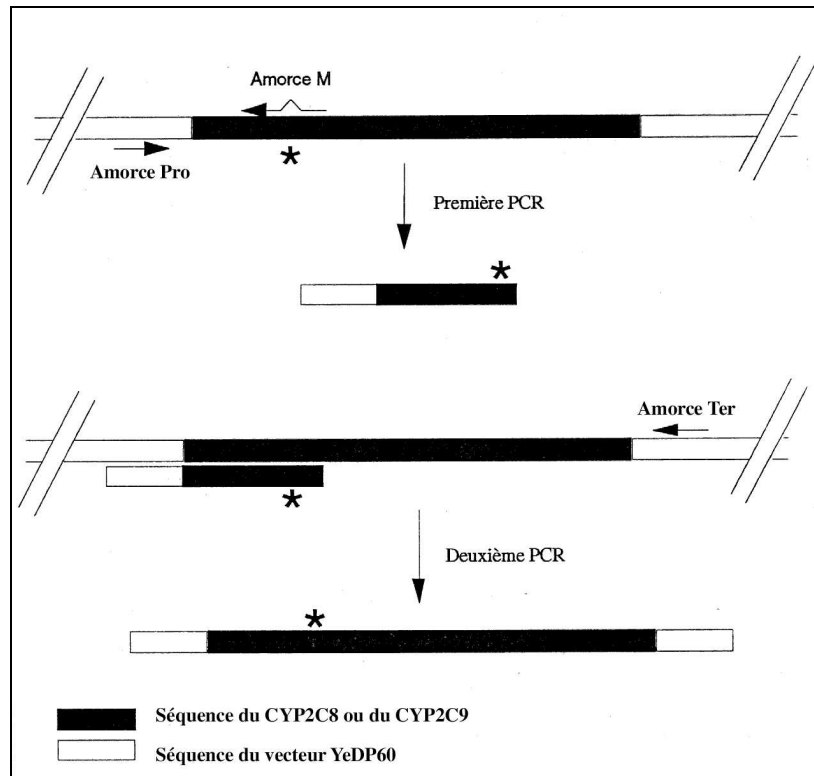


Figure 70 : Stratégie générale de construction des mutants des CYP2C8 et CYP2C9. La première PCR utilise l'amorce M contenant la mutation et l'amorce Pro (ou Ter). La deuxième PCR utilise le fragment amplifié à la première PCR et l'amorce Ter (ou Pro). La base mutée est désignée par *.

Composition du mélange de PCR	Programmation de la PCR sur un minicycler™ à effet peltier
PCR1	
39,5µl H ₂ O stérile 1 µl matrice p2C9YeDP60 (5ng/µl) 1 µl amorce mutée 15µM 1µl amorce Ter ou Pro 15µM 1µl MgSO ₄ 100mM 1µl dNTPs 25mM 5µl tampon Pfu 10X 3 gouttes huile minérale 0,5µl Pfu polymérase	1) prédénaturation 94°C 2 min 2) dénaturation 92°C 40s 3) hybridation 50°C 2 min 4) élongation 72°C 1min30 5) terminaison 72°C 4 min nombre de cycles de 2) à 4) : 26
PCR2	
19,75µl H ₂ O stérile 1µl matrice p2C9YeDP60 (5ng/µl) 20µl PCR1 2µl amorce Pro ou Ter 15µM 1,25µl MgSO ₄ 100mM 1µl dNTPs 25mM 5µl tampon Pfu 10X 3 gouttes huile minérale 1µl Pfu polymérase	1) prédénaturation 94°C 2 min 2) dénaturation 92°C 30s 3) hybridation 50°C 1 min 4) élongation 68°C 3min 5) terminaison 72°C 4 min nombre de cycles de 2) à 4) : 24

Tableau 42 : Composition des mélanges de PCR et programmes utilisés.

Mutation	Séquence de l'oligonucléotide
F94L	5'-GCCTCTTCCAGATA <u>TA</u> ACTCCTCCTCTCCAAG-3'
F110I	5'-GAAAACAATTCCAAT <u>TC</u> CCTCTGTTAG-3'
F114I	5'-CTTTCCATTGCTG <u>ATA</u> AACAATTCCAAATCC-3'
F476A	5'-AGTTGTCAATGGAG <u>GCT</u> GCCTCTGTGCCGC-3'
F476E	5'-CTCCAGTTGTCAATGG <u>GAG</u> AGGCCCTCTGTGCCGC-3'
F476H	5'-CTCCAGTTGTCAATGGAC <u>AT</u> GCCTCTGTGCCGC-3'
F476I	5'-AGTTGTCAATGGAT <u>TGC</u> CCTCTGTGC-3'
F476R	5'-CAGTTGTCAATGGAC <u>CGT</u> GCCTCTGTCC-3'
F476W	5'-AGTTGTCAATGGAT <u>GGAT</u> GGGCCCTCTGTGC-3'

Tableau 43 : Oligonucléotides de synthèse utilisés pour réaliser la mutagenèse dirigée du CYP2C9 par PCR. Les mutations ponctuelles sont indiquées en gras, les codons correspondants sont soulignés. Les oligonucléotides F94L, F110I et F114I sont des amorces antisens.

Mutation	Séquence de l'oligonucléotide
R97A	5'-TGGGGAATTGCCT <u>TGCT</u> CCAGAAAATC-3'
R97K	5'-TGGGGAATTGCCT <u>TTTT</u> CCAGAAAATC-3'
N99L	5'-GATATTGGGGAA <u>AGG</u> CCTCTTCCAG-3'
S100A	5'-TGAGATATTGG <u>GGC</u> ATTGCCTCTTCCAG-3'
S103A	5'-GTAATCCTTTG <u>GAGCT</u> ATTGGGGAATTG-3'
R105A	5'-CAAGTCCTTTAGTAATT <u>TGCT</u> TGAGATATTGGGGAATTGC-3'
S114A	5'-CTTTCCATTGCT <u>GGCA</u> ATGATTCCAAGTC-3'
S114F	5'-TCCATTGCTG <u>AAA</u> ATGATTCCAAGTCC-3'
S115A	5'-CATCTCTTTCCATT <u>GGC</u> GGAAATGATC-3'
F201L	5'-CTGAGTTTTTCATT <u>CAAT</u> CTTTTCATC-3'
F205A	5'-CATGGGGAGTTCAGAATCCT <u>GGC</u> GTTTTTCATTGAATC-3'
F205I	5'-CTGGATCCACGGGGAGTTCAGAATCCT <u>GAT</u> GTTTTTCATTGAATC-3'
R241A	5'-CTAATGTAACCT <u>TGCT</u> GTAAAGAGCA-3'
R241L	5'-GTTGCTCTTACAC <u>CTA</u> AGTTACATTAGGGAG-3'
R241E	5'-GTTGCTCTTACAG <u>GAA</u> AGTTACATTAGGGAG-3'
S359I	5'-CAGAGATAC <u>ATT</u> GACCTCGTCCCCAC-3'
A471P	5'-GAACCTCAATACTACT <u>CCAG</u> TTACCAAAG-3'
T473V	5'-CTACTGCAGTT <u>GT</u> CAAAGGGATTGTTTC-3'
K474N	5'-CTGCAGTTACCA <u>AT</u> GGGATTGTTTC-3'
I476F	5'-GTTACCAAAGGG <u>TTT</u> GTTTCTCTG-3'
S482F	5'-CTCTGCCACCCT <u>TCT</u> ACCAGATCTGCTTC-3'

Tableau 44 : Oligonucléotides de synthèse utilisés pour réaliser la mutagenèse dirigée du CYP2C8 par PCR. Les mutations ponctuelles sont indiquées en gras, les codons correspondants sont soulignés. Les oligonucléotides R97A à R241A sont des amorces antisens.

V.B.1.c Clonage par recombinaison homologue dans la levure

Digestions

Le produit de la double PCR est purifié selon le protocole usuel (extraction au phénol/chloroforme puis précipitation dans deux volumes d'éthanol) et repris dans 10 μ l d'eau stérile. Parallèlement, le vecteur pYeDP60 est digéré par EcoRI et BamHI une heure à 37°C, purifié et repris dans 20 μ l d'eau stérile. Les concentrations de vecteur linéarisé et de produit de PCR purifié sont alors estimées sur gel d'électrophorèse.

Transformation de levure par choc thermique

Des levures compétentes sont préparées selon le protocole décrit par Gietz et al (Gietz et al., 1992). 50 μ l de cellules compétentes sont mélangées à 240 μ l de PEG 50%, 36 μ l de LiOAc 1 M, 50 μ l d'ADN de sperme de hareng (1 mg/ml) bouilli 2 minutes à 90°C et quelques μ l de vecteur linéarisé et de produit de double PCR en quantités égales (environ 10 ng) dilués dans un volume total de 34 μ l. Les cellules sont incubées 30 minutes à 28°C sous agitation avant de subir un choc thermique de 30 minutes à 42°C. Après 1 minute de centrifugation à 10000 rpm, elles sont reprises dans 100 μ l de liquide ringer stérilisé (NaCl 0.9%) puis étalées sur milieu minimum SGI. Les boîtes de Pétri sont incubées 3 jours à 28°C. Les colonies sont ensuite repiquées sur milieu SGI afin d'éliminer les clones abortifs.

Transformation d'une souche d' *E.coli* TG1 par l'ADN plasmidique de levures recombinantes

L'ADN plasmidique de levure contient des éléments inconnus qui inhibent la transformation. D. Gietz propose le protocole d'extraction suivant afin de limiter cet effet inhibiteur. Les transformants sont repris dans 10 ml de milieu liquide SGI et incubés une nuit à 28°C sous agitation. Le lendemain, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 3000 rpm et reprises dans 200 μ l de STET stérile. Des billes de verre de 0,45 mm sont ajoutées jusqu'à affleurement de la surface du mélange. Les tubes sont vortexés en continu pendant 10 minutes, plongés 3 minutes à 100°C puis brièvement dans la glace. Après 10 minutes de centrifugation à 4°C, les surnageants sont repris dans un demi-volume d'acétate d'ammonium 7,5M et incubés au moins 20 minutes à -20°C. Le mélange est alors centrifugé à 4°C pendant 20 minutes puis le surnageant est précipité pendant 30 minutes à -20°C dans deux volumes d'éthanol 95% glacé. Après avoir été culotté, l'ADN est rincé à l'éthanol 70% et repris dans 50 μ l d'eau stérile. 1 μ l de la solution d'ADN est utilisé pour transformer 20 μ l de cellules bactériennes TG1 par électroporation.

V.B.2 Analyse des transformants

L'ADN des transformants est purifié en grandes quantités (Maxiprep) à l'aide du kit Biorad et envoyé à la société Génome Express pour séquençage (5 μ g d'ADN par séquence). Si aucune mutation indésirable n'a été détectée, l'ADN du CYP2C muté est utilisé pour transformer la souche de levure W(R) en suivant le protocole décrit en V.B.1.c.

V.C PREPARATIONS MICROSOMALES (Bellamine et al., 1994)

V.C.1 Culture cellulaire

Les souches de levure transformées sont cultivées à 28°C sous agitation continue :

J0 : Une préculture est réalisée à 28°C dans 20 ml de milieu SGI + 5g/l de glucose et 30 mg/l de tryptophane.

J1 : La préculture estensemencée au 1 :100 dans 200 ml de milieu SGI + 5g/l de glucose.

- J2** : A h+24hrs, la culture est supplémentée par 200 ml de milieu YE2X + 2-3% d'éthanol
J3 : A h+48 hrs, l'induction du CYP et de la réductase est amorcée par addition de galactose 20g/l final.
J4 : La culture est arrêtée par réfrigération rapide après une induction de 12 à 15 heures puis centrifugée à 4°C, 5 minutes à 6000 rpm (centrifugeuse Beckmann J2-21). Les culots sont repris et rassemblés dans un minimum de TES. Les cellules peuvent alors être congelées à -80°C ou fractionnées directement jusqu'à obtention des microsomes.

V.C.2 Préparation des microsomes

La fraction microsomale est obtenue par centrifugation différentielle. Toutes les manipulations sont réalisées à 4°C.

Les cellules sont d'abord cassées mécaniquement par des billes de verre (0,45-0,50 mm ; Braun Biotech International) en agitant manuellement 10 minutes à 4°C ou à l'aide d'un broyeur (4-5 broyages de 30 secondes espacés de 30 secondes). Les billes sont ensuite éliminées par filtration sur fritté. Le broyat est alors centrifugé à 10000 rpm, 10 minutes, à 4°C afin de séparer les débris cellulaires (culots) du cytosol et des microsomes (surnageant). Le surnageant est centrifugé à 35000 rpm (100 000g) pendant 1h30 à 4°C puis le culot de microsomes est homogénéisé dans un tampon Tris 50 mM, EDTA 1 mM, glycérol 20%, pH= 7,4. La suspension microsomale est ensuite aliquotée, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

V.C.3 Caractérisation des préparations microsomales

V.C.3.a *Dosage de la concentration en cytochrome P450*

La concentration en CYP est mesurée par spectroscopie différentielle (Uvikon 860 muni d'une sphère de diffusion) selon la méthode de T. Omura et R. Sato (Omura and Sato, 1964). Les microsomes sont dilués dans du tampon TE de façon à réduire la turbidité (dilution 1/20 à 1/40) puis répartis entre deux cuves de 500 μ l de 1 cm de trajet optique. Après enregistrement de la ligne de base (entre 400 et 550 nm), le fer des cytochromes est réduit par ajout de quelques grains de dithionite de sodium dans les deux cuves. La solution de la cuve échantillon est alors saturée en CO par barbotage et le spectre d'absorption est mesuré. La concentration en CYP est calculée en mesurant l'absorption à 450 nm, caractéristique du complexe Fe^{II}-CO ($\epsilon = 91000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Il se forme parfois une espèce absorbant à 420 nm ($\epsilon = 183000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) qui correspond à une population hétérogène inactive de CYP.

V.C.3.b *Dosage des protéines microsomales*

La concentration en protéines des microsomes est mesurée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), en utilisant de l'albumine de sérum de bœuf comme étalon.

V.C.3.c *Dosage de l'activité de la NADPH-cytochrome P450-réductase*

L'activité de la NADPH-cytochrome P450-réductase est mesurée par spectroscopie différentielle en suivant l'absorption du cytochrome c réduit par les électrons transférés du NADPH par la réductase.

40 μ l de cytochrome c à 4mM (80 μ M final) et 4 μ l de microsomes dilués (1/20) sont mélangés dans 2mL de tampon TE puis répartis dans deux cuves. Après mesure de l'autozéro

à 550nm, la réaction est amorcée par 5µl de NADPH 10 mM dans la cuve de mesure. La cinétique de réduction du cytochrome c est suivie par mesure de l'absorbance à 550 nm de la forme réduite ($\epsilon = 21\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). L'activité réductasique est calculée à partir de la pente de la droite obtenue, et est exprimée en nmol de cytochrome c réduit / min / mg de protéines.

V.C.3.d Immunodétection des CYP2C par Western Blot

Cette analyse a été réalisée selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli, 1970) (par Maryse Jaouen dans le cas des mutants du CYP2C9). 50 µg de microsomes sont déposés sur gel de polyacrylamide 10% SDS (gel readygel Biorad) en condition dénaturante. Les protéines sont séparées après dénaturation sous une tension de 200V et une intensité de 80mA pendant 30 minutes. Les protéines sont alors transférées sur feuille de nitocellulose (Trans-Blot® transmedium Biorad) par transfert semi-sec sous une intensité de 400 mA en courant constant pendant 1 heure (transblot semi-Dry cell Biorad).

L'immunodétection est réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la feuille de nitocellulose est incubée 1h à température ambiante dans du lait PBS Tween 5% puis une nuit à 4°C en présence d'anticorps primaires anti-2C de lapin dilués au 1/1000 dans du lait PBS Tween 0,5%. Après plusieurs lavages (6 fois 10 min avec une solution PBS Tween 0,5% et 10 min avec du PBS seul), la feuille est incubée 1h à température ambiante en présence d'anticorps anti-lapin couplés à la peroxydase dilués au 1/1000 dans du PBS. Après plusieurs lavages au PBS (6 fois 10 min), les protéines sont révélées à la diaminobenzidine (10 mg/ml PBS, H₂O₂ 30%). La coloration apparaît en quelques secondes. La réaction est alors arrêtée par plusieurs lavages au PBS.

V.D MESURE DE CONSTANTES DE DISSOCIATION K_S

Les constantes de dissociation K_s permettent de quantifier l'affinité d'une molécule pour un P450. Elles sont mesurées selon la méthode de C.R. Jefcoate (Jefcoate, 1978) par spectroscopie UV-différentielle.

Les spectres UV-visibles différentiels sont enregistrés sur un spectrophotomètre Aminco, équipé d'un système d'exploitation Olis-DW2 ou un Kontron Uvicon 860, entre 350 et 500 nm. Les P450 microsomaux sont dilués dans du tampon phosphate 0,1M pH=7,4 à une concentration entre 0,1 - 0,2 µM puis la solution est également répartie entre deux cuves en quartz de 500 µL. Après enregistrement de la ligne de base, on ajoute des aliquots de 0,5 à 5 µl d'une molécule dissoute dans du DMSO, en concentrations croissantes (entre 0,5 µM et 1 mM) dans la cuve échantillon. Des volumes équivalents de solvant sont ajoutés dans la cuve de référence (volume final de solvant organique ajouté < 6 % du volume total).

Pour chaque concentration en molécule est mesurée la différence de densité optique ΔDO entre le minimum et le maximum du spectre observé. Lorsque ces molécules sont en fort excès par rapport au cytochrome P450, la différence de densité optique ΔDO dépend de la concentration de la molécule C, en suivant la relation :

$$\Delta DO = \frac{\Delta DO_{\max} * C}{K_s + C}$$

avec ΔDO_{max} : différence de densité optique maximale
 K_s : constante d'interaction spectrale

La constante de dissociation est calculée par régression non linéaire de la courbe de ΔDO en fonction de la concentration en molécule C en utilisant cette équation.

V.E MESURES D'ACTIVITES HYDROXYLASES

V.E.1 Conditions générales d'incubation des cytochromes P450

Les incubations sont réalisées à 28°C ou 37°C (activité taxol) dans des tubes à hémolyse en verre, sous agitation, à l'air.

Les cytochromes P450 microsomaux sont dilués dans du tampon Tris 50 mM contenant de l'EDTA (1 mM) et du glycérol (8 % v/v), à pH = 7,4 pour atteindre une concentration finale de 0,03 à 0,2 µM. Dans le cas particulier des mutants S365A et S365G, un tampon phosphate 50mM pH=7,4 contenant 0,5mM d'EDTA a été utilisé. Après une préincubation de 3 minutes, le substrat et/ou l'inhibiteur dilué dans du méthanol ou du DMSO est additionné (1% final en solvant organique). La réaction est amorcée par l'addition de système générateur de NADPH (NADP 1 mM, glucose-6-phosphate 10 mM, glucose-6-phosphate déshydrogénase 2 U/mL). Des prélèvements de V=140 µL pour analyse par spectroscopie UV ou de V =120 µL pour l'analyse par HPLC, sont transférés et vortexés aux temps voulus dans des tubes eppendorfs contenant une solution d'arrêt (volume V/2 d'acétonitrile/acide acétique (10 :1) en général, volume V/2 de méthanol pour l'activité d'hydroxylation du DMZ, volume V d'acétonitrile/acide acétique (10 :1) pour l'activité d'hydroxylation de l'acide rétinolique). Les échantillons sont conservés dans la glace jusqu'à la fin de l'expérience puis centrifugés 5 min à 10 000g, pour précipiter les protéines.

La quantité de produits formés est analysée par HPLC ou spectroscopie UV :

- pour une analyse par HPLC, le surnageant est directement injecté; un standard interne est en général ajouté dans la solution précipitante.
- pour une analyse par spectroscopie UV, le surnageant est incubé 2 h à 28°C, de façon à éliminer le NADPH qui absorbe fortement à 340 nm, puis il est à nouveau centrifugé avant d'être analysé.

V.E.2 5-hydroxylation des dérivés 2-arylthiophènes par les CYP 2C et cinétique d'inactivation du CYP2C9 et du mutant S365A par l'acide tiénilique

V.E.2.a *5-hydroxylation des dérivés 2-arylthiophènes*

Les dérivés 2-arylthiophènes sont hydroxylés par les CYP2C de foie humain en position 5 du noyau thiophène et les produits formés sont facilement détectés par spectroscopie UV-visible vers 390 nm (Neau et al., 1990) (Figure 71).

En effet, les composés non hydroxylés absorbent vers 270-310 nm avec un coefficient d'extinction molaire ϵ inférieur à $16000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Par contre, à $\text{pH} > \text{pKa}$ (d'environ 2,5), les produits 5-hydroxylés ont une charge négative sur l'oxygène qui se délocalise sur l'ensemble de la molécule. Cette forte résonance explique l'absorption intense vers 390 nm des composés hydroxylés avec un ϵ compris entre 27000 et 30000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. L'absorbance dépend peu des substituants sur le noyau benzénique. Pour cette raison, le coefficient d'absorption molaire ϵ sera considéré comme égal à $28000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pour tous les produits des dérivés 2-arylthiophènes.

Cette méthode de dosage par spectroscopie UV-visible a été adaptée aux microsomes de levures exprimant les CYP2Cs par M.P. Lopez-Garcia et al. (Lopez-Garcia et al., 1993). Le produit hydroxylé est dosé sur un spectromètre Kontron Uvicon 860, dans des cuves en verre de 150 µl.

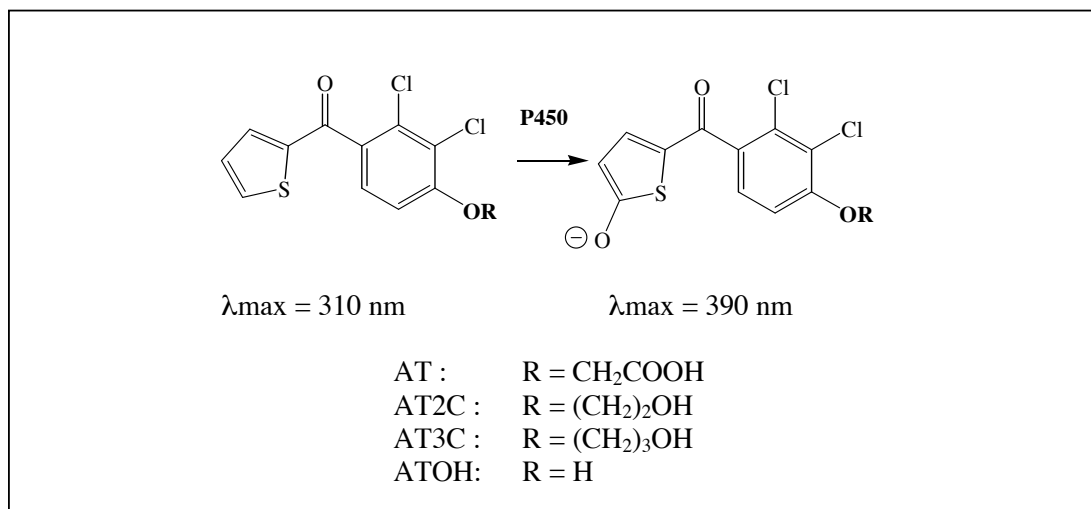


Figure 71 : Métabolisme de l'acide tienilique et de ses dérivés par les CYP 2C humains. AT : acide tienilique.

V.E.2.b Cinétiques d'inactivation par l'acide tienilique : activité résiduelle en fonction du temps de préincubation en présence d'inhibiteur suicide

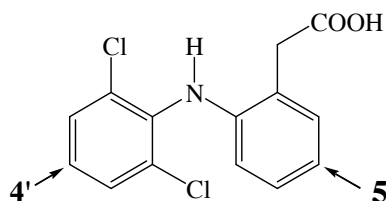
La cinétique d'inactivation mesure l'activité résiduelle d'une enzyme lorsque celle-ci est préincubée dans une premier temps en présence de l'inhibiteur suicide dans des conditions de catalyse. Classiquement, l'activité résiduelle d'une enzyme après préincubation avec un inhibiteur de type substrat suicide est déterminée avec un substrat différent. Le substrat suicide est alors éliminé par dilution ou lavages successifs de la fraction microsomale avant les mesures d'activité. Les particularités des fractions microsomales de levure exprimant le CYP2C9 (instabilité dans des conditions de lavage successifs et faible concentration en P450/mg de protéines) et la forte affinité de l'acide tienilique pour ce P450 n'ont pas permis d'appliquer les procédures classiques pour suivre l'inactivation du CYP2C9 exprimé dans la levure par l'acide tienilique.

Le protocole utilisé pour mesurer l'inactivation du mutant S365A reprend celui décrit par Lopez-Garcia et al. dans le cas du CYP2C9 exprimé dans la levure (Lopez-Garcia et al., 1994).

0,2 μM en P450 sont préincubés selon les conditions générales détaillées en V.E.1, en présence de 10 μM d'acide tienilique et d'un système générateur de NADPH. A différents temps de la préincubation (entre 0 et 45 min), des aliquots de 300 μl sont prélevés et 100 μM d'acide tienilique sont alors ajoutés. Un aliquot de 140 μl est immédiatement prélevé (t₀) et arrêté dans un demi-volume de solution précipitante CH₃CN/CH₃COOH. Le milieu d'incubation restant est incubé pendant 5 min à 28°C puis un deuxième aliquot de 140 μl (t₅) est prélevé. La formation du métabolite 5-hydroxylé de l'acide tienilique entre les temps t₀ et t₅ permet de mesurer l'activité résiduelle du P450, exprimée en % par rapport à l'activité initiale au début de la cinétique d'inactivation (au temps t=0 de la préincubation).

V.E.3 Hydroxylation du diclofénac

Le diclofénac peut être hydroxylé en deux positions 4' et 5, par les CYP2C humains (Mancy et al., 1999).



Les métabolites formés sont séparés par HPLC :

<i>Standard interne</i>	5 µM d'acide tiénilique	
<i>Colonne</i>	XTerra MS C18 (250 × 4,6 mm, 5µm)	
<i>Phase mobile</i>	Débit : 1 mL / min	
<i>Solvant A :</i>	NH ₄ CO ₃ (25 mM) pH=8	
<i>Solvant B :</i>	CH ₃ CN	
<i>Détection</i>	absorption UV à 280 nm	

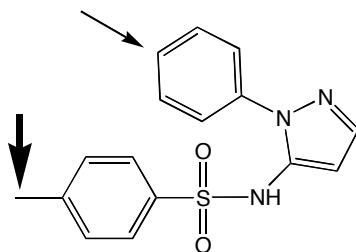
Pour avoir une meilleure séparation entre le 3' et 4'-OH diclofénac, nous pouvons augmenter le pH du solvant A à 10.

Gamme étalon :

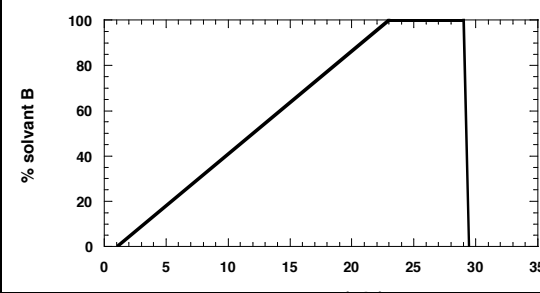
Pour une aire correspondant à 5 µM d'AT de 199565, la concentration en dérivé 4'OH-diclofénac du milieu d'incubation est de : $[4'OH] = (Aire (4'OH) + 224) / 21492$

Pour une aire correspondant à 5 µM d'AT de 193312, la concentration initiale en dérivé 5OH-diclofénac est de : $[5 OH] = (Aire (5 OH) - 1419) / 24256$.

V.E.4 Hydroxylation du DMZ par les CYP 2C



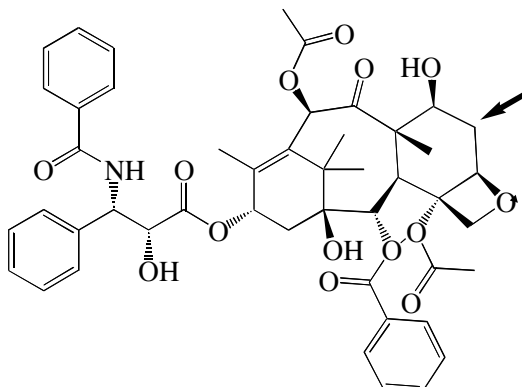
Le dérivé du sulphafénazole, DMZ, est oxydé par les CYP2C en deux métabolites, l'un majoritaire (hydroxylation du méthyle benzilyque), l'autre très minoritaire (hydroxylation du N-phényle). La formation du produit d'oxydation majoritaire est suivie par HPLC (Marques-Soares et al., 2003):

Standard interne	-	
Colonne	C8 Hypersil MOS (250 × 4,6 mm, 5µm)	
Phase mobile Solvant A : Solvant B :	Débit : 1 mL / min H ₂ O CH ₃ CN/MeOH/H ₂ O (7/2/1)	
Détection	absorption UV à 230 nm	

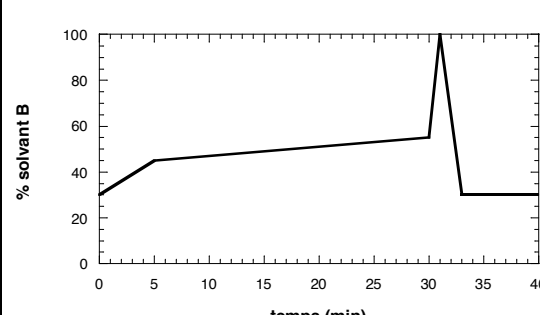
Le DMZ et son métabolite ayant le même ϵ , nous n'avons pas utilisé de standard interne. La concentration en métabolite est alors calculée à partir de la relation suivante :
 $[\text{métabolite}] = \frac{\text{Aire métabolite}}{\text{Aire métabolite} + \text{Aire DMZ}} \times [\text{DMZ}]_0$

V.E.5 6 α -hydroxylation du taxol par le CYP 2C8

La formation du métabolite 6 α -hydroxylé du taxol est suivie par HPLC à 230 nm (Rahman et al., 1994). Le taxol et son métabolite ayant le même ϵ , nous n'avons pas utilisé de standard interne.



Pour la mesure d'activité sans inhibiteur :

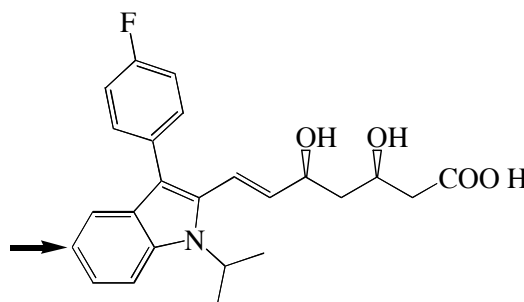
Standard interne	-	
Colonne	XTerra MS C18 (250 × 4,6 mm, 5µm)	
Phase mobile Solvant A : Solvant B :	Débit : 1 mL / min H ₃ PO ₄ (5 mM) CH ₃ CN	
Détection	absorption UV à 230 nm	

Pour la mesure d'activité avec inhibiteur : on utilise un gradient identique mais la phase de 100% en acétonitrile est étendue à 5 minutes afin de bien éluer les inhibiteurs qui sont parfois très hydrophobes. Un standard interne est utilisé pour les cas où un métabolite de l'inhibiteur a le même temps de rétention que le taxol.

<i>Standard interne</i>	5 µM d'acide tiénilique	
<i>Colonne</i>	XTerra MS C18 (250 × 4,6 mm, 5µm)	
<i>Phase mobile</i>	Débit : 1 mL / min	
<i>Solvant A :</i>	H ₃ PO ₄ (5 mM)	
<i>Solvant B :</i>	CH ₃ CN	
<i>Détection</i>	absorption UV à 230 nm	

V.E.6 5-hydroxylation de la fluvastatine par le CYP 2C8

Le CYP 2C8 hydroxyle la fluvastatine en position 5 (Fischer et al., 1999).



Cette activité est suivie par HPLC à 250 nm :

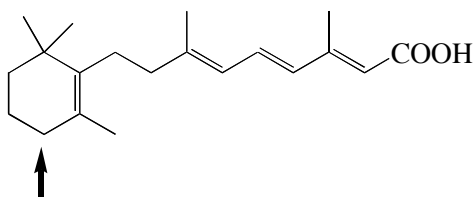
<i>Standard interne</i>	5 µM cérvatatine	
<i>Colonne</i>	C8 Hypersil MOS (250 × 4,6 mm, 5µm)	
<i>Phase mobile</i>	Débit : 1 mL / min	
<i>Solvant A :</i>	Acétate d'ammonium (0,1M, pH=4,6)	
<i>Solvant B :</i>	CH ₃ CN/MeOH/H ₂ O (7/2/1)	
<i>Détection</i>	absorption UV à 250 nm	

Gamme étalon :

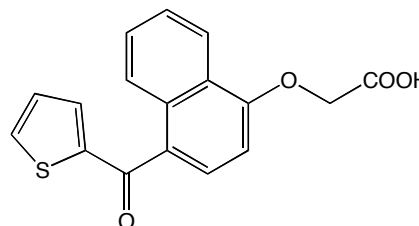
Pour une aire correspondant à 5 µM de cérvatatine de 122768, la concentration en dérivé 5OH-fluvastatine du milieu d'incubation est de : $[5OH] = (Aire(5OH) + 207) / 34826$.

V.E.7 4-hydroxylation de l'acide rétinolique par le CYP 2C8

Le CYP2C8 hydroxyle l'acide rétinolique en position 4 (Nadin and Murray, 1999). La réaction est arrêtée par un volume de solution précipitante froide d'acétonitrile / acide acétique (10 :1) contenant 5 µM de molécule E1 (standard interne) et 1 mg/ml de BHT (pour protéger les produits d'une suroxydation) puis la quantité de produit formé est analysée par HPLC.



Acide rétinolique



Standard interne E1

<i>Standard interne</i>	5 µM molécule E1	
<i>Colonne</i>	C8 Hypersil MOS (250 × 4,6 mm, 5µm)	
<i>Phase mobile</i>	Débit : 1 mL / min	
<i>Solvant A :</i>	Acétate d'ammonium (0,1M, pH=4,6)	
<i>Solvant B :</i>	CH ₃ CN/MeOH/H ₂ O (7/2/1)	
<i>Détection</i>	absorption visible à 350 nm	

V.E.8 Mesure des constantes cinétiques des activités d'oxydation catalysées par les cytochromes P450

Les vitesses initiales (v) d'oxydation des substrats par les cytochromes P450 sont mesurées pour des concentrations croissantes en substrat ([S]). Nous obtenons en général des courbes de v en fonction de [S] qui peuvent être modélisées par l'équation de **Michaelis – Menten**, selon laquelle :

$$v = \frac{k_{cat} \times [S]}{K_m + [S]}$$

avec deux constantes cinétiques : **k_{cat} : vitesse d'oxydation maximale**
K_m : constante de Michaelis – Menten

Ces relations sont valables en milieu dilué, où la concentration en enzyme est nettement inférieure à celle en substrat, et lorsqu'il y a moins de 10% de produits formés. Les CYP étant dans un environnement membranaire, les constantes mesurées sont des constantes cinétiques apparentes.

Les constantes cinétiques, k_{cat} et K_m , sont caractéristiques de l'oxydation d'un substrat donné par un cytochrome P450 donné. Elles sont calculées à l'aide du logiciel Kaleidagraph 3.0 par régression non linéaire à partir de l'équation de Michaelis-Menten. On peut aussi les déterminer en traçant la droite de Lineweaver – Burk de $1/v$ en fonction de $1/[S]$:

$$1/v = K_m/k_{cat} \times 1/[S] + 1/k_{cat}$$

V.F MESURE DU POUVOIR INHIBITEUR D'UNE MOLECULE

Le pouvoir inhibiteur d'une molécule sur l'activité d'oxydation d'un substrat par un cytochrome P450 peut être quantifié par la mesure de deux grandeurs (Segel, 1993).

V.F.1 Mesure de CI50

La CI50 est la concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'activité d'oxydation d'un substrat par un cytochrome P450, à une concentration en substrat donnée. Elle est obtenue en mesurant l'activité résiduelle en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur. Elle dépend de la concentration en substrat.

V.F.2 Mesure de constantes d'inhibition compétitive K_i

Un inhibiteur compétitif est une molécule qui se fixe de façon réversible dans le site actif de l'enzyme, à la place du substrat. La constante d'équilibre entre le complexe enzyme-inhibiteur et l'enzyme libre est appelée constante d'inhibition compétitive K_i . En présence d'inhibiteur, la vitesse instantanée d'oxydation du substrat v est diminuée et est liée à la concentration en inhibiteur $[I]$ et à la constante K_i par la relation :

$$1/v = K_m/(k_{cat} \times [S]) \times (1 + [I]/K_i) + 1/k_{cat}$$

avec k_{cat} : vitesse maximale d'oxydation du substrat

K_m : constante cinétique michaelienne $[S]$: concentration en substrat

La constante K_i est déterminée en mesurant, les variations des vitesses initiales en fonction des concentrations en substrat, à différentes concentrations en inhibiteur. En traçant le graphe $1/v=f([I])$ on obtient plusieurs droites qui se coupent en un même point d'abscisse - K_i . Pour un inhibiteur compétitif, CI50 et K_i sont liées par la relation :

$$K_i = CI50 \times K_m / (K_m + [S])$$

L'IC50 dépend de la nature et de la concentration en substrat, contrairement à la K_i . Pour comparer le pouvoir inhibiteur d'une molécule sur plusieurs enzymes, indépendamment des substrats utilisés, il faut donc comparer ses constantes d'inhibition K_i , ou ses CI50 mesurées pour chaque enzyme à la concentration K_m en substrat de l'activité suivie (alors $CI50 = 2 \times K_i$).

Remarque : impact de la fixation non-spécifique des microsomes sur les mesures de constantes K_m (Kalvass et al., 2001) et K_i (Margolis and Obach, 2003)

Les microsomes exprimant les cytochromes P450 sont composés de protéines et de phospholipides. Lors des mesures d'activité, les substrats et inhibiteurs ajoutés au milieu réactionnel peuvent se fixer de façon non spécifique aux microsomes. Cette fixation non

spécifique a un impact sur les mesures de constantes K_m et K_i car elle réduit la concentration en molécule effectivement accessible au P450. Elle dépend de la nature physico-chimique des substrats et inhibiteurs (caractère lipophile, charge etc...). Ainsi, pour les composés qui ont un taux de fixation non spécifique élevé (Kalvass et al., 2001) (Margolis and Obach, 2003) :

- Les valeurs de K_m et K_i apparents augmentent avec la concentration en microsomes
- Par contre, les valeurs corrigées par la mesure de la fraction non liée sont relativement indépendante de cette concentration microsomale.

D'après Margolis et al., cette fixation non spécifique serait due principalement aux phospholipides. Elle permet d'expliquer en partie les différences de K_m et K_i constatées dans la littérature entre différents laboratoires travaillant avec des systèmes d'expression et des concentrations microsomales variées.

Au laboratoire, nous utilisons un système d'expression dans la levure et nous mesurons les K_m et CI_{50} à des concentrations microsomales d'environ 1,5 mg de protéines/ml. Les P450 exprimés dans des cellules d'insectes infectées par baculovirus ont en général des taux d'expression en P450/mg de protéines et des activités spécifiques plus élevées qui permettent de travailler à des concentrations microsomales plus basses (0,1 à 0,4 mg de protéines/ml). Par conséquent, les valeurs de K_m dans ces systèmes sont en général plus faibles que les K_m équivalentes mesurées au laboratoire.

V.G METHODES DE MODELISATION MOLECULAIRE

Tous les calculs de modélisation ont été réalisés par Cristina Marques en utilisant les modules du logiciel InsightII fourni par MSI (Molecular Simulation Inc., San Diego, CA). Les grandes lignes des méthodes suivies sont décrites ci-dessous.

V.G.1 Minimisation de l'énergie d'une structure 3D

Ceci consiste à rechercher une conformation représentant un minimum d'énergie d'une molécule ou d'une protéine. Les calculs sont réalisés grâce au module Discover_3, en utilisant :

- le champ de force esff (il contient les paramètres qui permettent de calculer les potentiels des atomes d'une protéine ou d'une molécules chimique, utilisés dans les calculs d'énergie).
- deux méthodes de calcul successives : minimisation grossière par la méthode « Steepest Descent » (10 itérations), puis affinement par la méthode du « Gradient Conjugé » (le calcul s'arrête après 600 itérations, ou quand le gradient est inférieur à 0,1).

Remarque : le champ de force utilisé ne permet pas de modéliser le fer des cytochromes P450. C'est pourquoi dans tous les modèles de ces hémoprotéines construits, le fer est supprimé, et l'hème est fixé dans une structure plane (comme s'il ligandait le fer).

V.G.2 Construction de modèles des CYP 2C9 et 2C8 par mutagenèse virtuelle du CYP 2C5/3LVdH

Le fichier contenant les données sur la structure RX du CYP 2C5/3LVdH est extrait d'une base de donnée PDB qui regroupe toutes les structures de protéines et d'acides nucléiques publiées, gérée par « The Brookhaven National Laboratory » et disponible sur internet (<http://www.rcsb.org>).

Cette structure RX du CYP 2C5/3LVdH est minimisée (en suivant la méthode décrite au paragraphe précédent) pour la détendre et supprimer les contraintes dues à une organisation

cristalline. Ses résidus qui diffèrent de ceux du cytochrome à modéliser sont ensuite remplacés par ceux du cytochrome en question, en utilisant le module Biopolymer. La structure est ensuite à nouveau minimisée pour obtenir un modèle du CYP 2C9.

V.G.3 Modélisation de la structure 3D de molécules

Des modèles de structures 3D de molécules dont la structure RX ne figurent pas dans la « Cambridge Structural Database » peuvent être construits en suivant la méthode :

1. construction de la molécule en utilisant le module Builder ;
2. calcul de ses charges partielles en utilisant les formules d'Ampac ;
3. minimisation de la structure de la molécule (selon la méthode décrite chap. V.G.1).

V.G.4 « Docking » de substrats et inhibiteurs dans les modèles de structures 3D des CYP 2C9 et 2C8

Les substrats et inhibiteurs dont la structure 3D est extraite de la « Cambridge Structural Database » ou construite (selon la méthode décrite au paragraphe précédent) sont insérés manuellement dans le site actif du modèle 3D du cytochrome, en tenant compte des données biochimiques (site d'oxydation proche de l'hème, atome dont la distance au fer est connue).

Une zone des résidus de l'hémoprotéine à moins de 15 Å de la molécule est définie. Le complexe molécule – cytochrome est minimisé (méthode décrite en V.G.1) en ne bougeant que les résidus dans cette zone (les autres résidus et l'hème sont fixés). Une méthode permet ensuite de rechercher des positions d'interactions optimales de la molécule avec l'hémoprotéine (des minima d'énergie), en répétant de façon itérative les trois étapes suivantes :

1. déplacement aléatoire de la molécule dans le site actif de l'hémoprotéine (par translation et rotation).
2. minimisation du complexe molécule – cytochrome (comme ci-dessus), pour rechercher le minimum d'énergie le plus proche.
3. enregistrement de la position finale si elle diffère suffisamment des positions précédentes retenues.

V.G.5 Construction d'un « pharmacophore »

Un pharmacophore de substrats de cytochromes P450 est l'ensemble des motifs communs à ces substrats qui interagiraient avec l'hémoprotéine. Ces motifs sont déterminés en superposant les substrats, selon des points définis (comme les sites d'oxydation connus), grâce à la fonction « Transform - Superimpose » d'InsightII.

V.G.6 Réalisation des images de modélisation

Les images de modélisation ont été réalisées sur les logiciels de visualisation RasTop 2.0 ou ViewerLite 4.2 (MSI), à partir de fichiers pdb.

CHAPITRE VI : Annexes

Annexe A : Expression hétérologue de P450 humains

Les P450 sont présents dans tous les tissus, il est donc extrêmement complexe d'étudier des formes individuelles sur organes entiers. L'immunoinhibition est la seule méthode simple et efficace pour déterminer le rôle de chaque isoforme dans le métabolisme *in situ* d'un médicament. Or, pour produire des anticorps spécifiques, il faut disposer de P450 purifiés en grandes quantités.

Les techniques classiques de purification de P450 à partir de tissus humains ont rapidement posé problème. En effet, elles sont peu reproductibles et le matériel de départ, (les tissus humains) est disponible en quantité limitée. De plus, l'isolement des différentes isoenzymes est difficile en raison des similitudes de leurs caractéristiques physicochimiques. Enfin, certaines isoformes peu exprimées *in vivo* ne peuvent pas être purifiées avec des rendements suffisants, même après induction. L'émergence de la biologie moléculaire a permis de s'affranchir de ces problèmes avec le développement de systèmes d'expression hétérologue.

Aujourd'hui, il existe des systèmes d'expression variés stables ou transitoires; le vecteur porteur de l'ADNc du P450 est transfecté dans une cellule hôte qui peut être procaryote (bactéries), eucaryote inférieur (levures), ou eucaryote supérieur (cellules d'insectes ou de mammifères). Dans ces cellules hôtes, le niveau de production de P450 endogènes doit être négligeable par rapport à la production hétérologue.

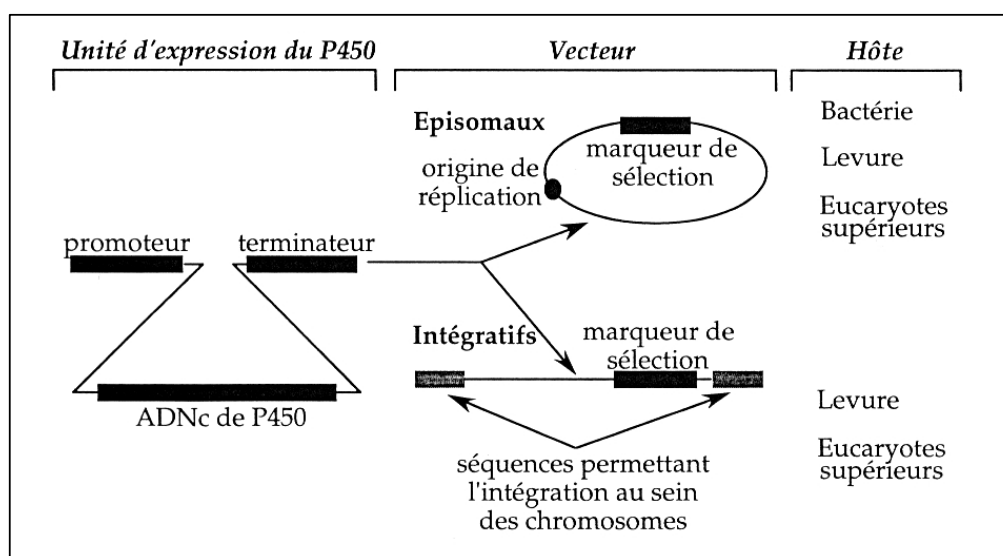


Figure 72 : Les principes de l'expression hétérologue de cytochromes P450.

Les avantages respectifs des différents systèmes sont déterminés à partir de deux critères principaux (tableau 1):

- **la technique de purification** (facilité de manipulation, temps et coût des cultures, rendement de purification).
- **l'expression du P450 dans le système choisi par rapport aux conditions humaines.**

L'expression d'un ADNc de P450 de mammifère fonctionnel passe par des étapes critiques. L'hème non lié de manière covalente à la protéine est mis en place en cours de synthèse. Les P450 humains sont membranaires et nécessitent un environnement lipidique propice à leur stabilité et leur activité catalytique. Les P450 fonctionnent avec un partenaire d'oxydoréduction, comme la cytochrome P450 réductase, également membranaire.

Le choix du système d'expression s'effectuera en fonction du type d'étude à réaliser : cristallographique, biochimique, pharmacologique ou toxicologique.

Les systèmes qui produisent de grandes quantités de P450 (*E. coli*, Baculovirus/cellules d'insectes, levure) seront utilisés pour des études cristallographiques ou biochimique (structure/activité).

Les systèmes qui se rapprochent le plus des conditions humaines (cellules de mammifère) seront privilégiés pour les études pharmaco-toxicologiques.

	Cellules d'insectes	Cellules de mammifères		Micro-organismes	
	SF9	Systèmes stables	Systèmes transitoires	Levure	<i>E. coli</i>
Facilité de manipulation	++	+	+	+++	++++
Temps de culture	Quelques semaines	Quelques semaines	Quelques semaines	2 à 3 jours	Quelques heures
Stabilité du système	++	+	-	++++	++++
Rendement	+++	+	++	+++	++++
Côût	++++	++++	++++	++	+
Cultures à grande échelle	+	+	+	+++	++++
Modifications post-traductionnelles	+++	++++	++++	++	+
Avantage principal	Système eucaryote à hauts rendements de production : un compromis entre la levure et les cellules de mammifère	Cellules de mammifères : environnement le plus proche des conditions humaines pour des études de toxicologie		Très forts rendements, faible coût, facilité de manipulation, extrapolable facilement en cultures à grande échelle	
Inconvénient principal	Côût et temps des cultures			Moins adapté pour les études toxicologiques que les cellules de mammifères	Système procaryote, problèmes de protéolyse et de corps d'inclusion

Tableau 45 : Caractéristiques des différents systèmes d'expression hétérologue.

A.1 Expression dans les cellules de mammifères

Ces systèmes sont à priori les plus adéquats pour l'expression d'ADNc de P450 humains car les cellules de mammifères possèdent toute la machinerie cellulaire nécessaire à une bonne traduction et à des modifications post-traductionnelles correctes. De plus, les cellules hôtes utilisées possèdent des partenaires redox endogènes capables de soutenir l'activité des P450s.

L'expression de P450 dans ces systèmes peut être transitoire ou stable.

- **Expression transitoire**

Des vecteurs réplicatifs, portant l'origine de réplication du virus SV40 ou dérivés de virus de la vaccine sont transfectés respectivement dans des cellules COS (dérivées de reins de singes verts) ou HepG2 (cellules humaines d'embryoblastes) (Gonzalez and Gelboin, 1991) (Zuber et al., 1986). Le taux d'expression de P450 dans les cellules COS est faible, entre 5 et 10 pmoles de P450 par mg de protéines (Clark and Waterman, 1991) et très variable selon l'efficacité de transfection. Ces cellules sont surtout utilisées pour des études de localisation cellulaire de protéines induites. Les cellules HepG2 transfectées expriment entre 10 et 20 pmoles de P450 par mg de protéines. Aoyama et al. a identifié dans un tel système les isoformes de P450 responsables du métabolisme de l'Aflatoxine B1 (Aoyama et al., 1990).

- **Expression stable**

Un deuxième type de système, permettant une expression stable, utilise les lignées cellulaires V79 (dérivée de fibroblastes du poumon d'hamster chinois) et AHH-1 (cellules lymphoblastiques B humaines) (Crespi et al., 1993). Ces cellules, V79 et AHH-1, sont transfectées respectivement à l'aide de vecteurs intégratifs portant le promoteur du virus SV40 (Doehmer and Oesch, 1991) ou de vecteurs répliatifs multicopie dérivés du virus d'Epstein-Barr (Crespi et al., 1993). Elles sont couramment utilisées en toxicologie pour des études de mutagenèse car elles possèdent un marqueur génétique (gène de l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase) dont l'inactivation induit une résistance à la cytotoxicité de la 6-thioguanine.

Ces systèmes d'expression dans les cellules de mammifère sont adaptés à des études biochimiques et pharmaco-toxicologiques car ils fournissent un environnement très proche des conditions humaines. Cependant, leurs principaux inconvénients résident dans le faible niveau d'expression (de 5 à 50 pmoles de P450/mg de protéines), des conditions de manipulation contraignantes (niveau de sécurité L2) ainsi que le coût et la durée des cultures.

A.2 Expression dans les cellules d'insectes

Certains laboratoires utilisent des cellules d'insectes SF9 transfectées par un baculovirus recombinant pour l'expression de P450 (Gonzalez et al., 1991). Les cellules d'insectes ne synthétisent pas assez de réductase et d'hème. Pour pallier à ces inconvénients, le P450 et la réductase sont coexprimés et un précurseur d'hème est ajouté au milieu de culture (Assefa A. 1989). Dans ces conditions, les P450 hétérologues ont un niveau d'expression (jusqu'à 700 pmol/mg de protéines) et des activités spécifiques élevées (Gonzalez et al., 1991).

Ce système est actuellement celui qui offre le meilleur rendement de P450 par cellule (Barnes et al., 1994). Il est très utile pour détecter des métabolites minoritaires en raison de l'activité spécifique élevée des P450 produits. Cependant, la cytochrome P450 réductase est surexprimée par rapport au P450 : des coexpressions de P450 réductase et de P450 conduisent à des rapports molaires P450 réductase/P450 de 10/1 ce qui est 100 fois supérieur au rapport molaire du foie humain d'environ 1/10 (Lee et al., 1995). Ce système n'est donc pas très représentatif du fonctionnement physiologique des CYP. Il est utilisé principalement pour la purification de ces enzymes pour études structurales et la préparation de métabolites.

A.3 Expression dans *Escherichia coli*

L'expression de P450 humains dans *E. coli* présentent plusieurs avantages : la facilité de manipulation génétique, le faible coût et la rapidité des cultures ainsi qu'un haut niveau d'expression (500 nmoles de P450 par litre de culture, 200 à 1000 pmoles de P450 par mg de protéines).

Plusieurs optimisations ont été nécessaires pour atteindre un tel niveau d'expression (Barnes, 1996):

- **des modifications de la séquence N-terminale des ADNc** n'affectant pas les propriétés catalytiques du P450 exprimé. Le deuxième acide aminé est changé en alanine, résidu présent dans la plupart des protéines exprimées dans *E. coli*. Des mutations silencieuses des huit premiers codons augmentent la richesse en A,T dans cette région, limitant ainsi la formation de structures secondaires inhibitrices de l'ARNm
- **des optimisations des vecteurs d'expressions** (par exemple, choix d'un promoteur inductible)
- **des optimisations des conditions de culture**

En général, les cultures sont maintenues à une température inférieure à 30°C pendant l'induction; dans certains cas, l'addition d'un précurseur de l'hème, l'acide δ aminolévulinique permet d'augmenter le rendement d'expression du P450.

Ce système est adapté à la production d'anticorps, aux études biochimiques (structure/activité), spectroscopiques et cristallographiques mais pas aux études pharmacologiques. En effet, il présente certains inconvénients liés à l'expression de protéines membranaires.

L'hôte bactérien possède des mécanismes traductionnels et post-traductionnels différents d'une cellule eucaryote qui peuvent conduire à la formation de corps d'inclusion (agrégats insolubles). De plus, *E. coli* est dépourvu de réticulum endoplasmique et de cytochrome P450 réductase endogène ce qui pose problème pour l'étude fonctionnelle directe de P450 membranaires. Les P450 produits *dans E. coli* sont inactifs mais peuvent être purifiés en grande quantité pour des études structurales et la cristallogénèse.

Des systèmes ont été reconstitués à partir de P450 recombinants et de P450 réductase purifiée afin de restaurer une activité pour des études biochimiques (rapports réductase/P450 = 10/1). Ils offrent une grande souplesse pour l'optimisation de l'activité catalytique des P450 mais les compositions lipidiques de ces systèmes reconstitués sont très différentes des membranes physiologiques. Plus récemment, différentes stratégies ont été adoptées pour obtenir une expression fonctionnelle directe du P450 à la membrane plasmique d'*E. coli*. La réductase est coexprimée avec un P450 humain en utilisant deux plasmides distincts (Blake et al., 1996; Pritchard et al., 1998) ou un seul plasmide portant le P450 et la réductase sous forme biscistronique (Dong and Porter, 1996; Blake et al., 1996; Chun et al., 1996; Shet et al., 1997; Parikh and Guengerich, 1997) ou comme protéines de fusion (Fisher et al., 1992 ; Shet et al., 1997). Dans ces conditions, l'activité du P450 est détectable sur cellules entières ce qui offre la possibilité d'utiliser les bactéries comme bioréacteurs pour la biosynthèse de métabolites.

A.4 Expression dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure est un bon compromis entre les cellules de mammifères et les bactéries (Pompon et al., 1997). En effet la levure présente les mêmes avantages en terme de culture que *E. coli* : la rapidité de croissance, la facilité de manipulation et un coût de production modéré. Contrairement aux bactéries, la levure est un eucaryote unicellulaire qui possède une compartimentation cellulaire et des processus post-traductionnels similaires aux cellules humaines (clivage de la méthionine Nterm, acétylation Nterm, phosphorylation) à quelques exceptions près (les glycosylations post-traductionnelles par exemple). Elle possède un cytochrome P450 réductase endogène qui peut servir de donneur d'électrons aux P450 hétérologues sans passer par un système reconstitué. L'activité des P450 endogènes n'est pas détectable spectralement et interfère donc rarement avec celle des P450 recombinants.

Pour toutes ces raisons, la levure représente un hôte choix pour l'expression hétérologue de protéines membranaires telles que les P450. Les rendements obtenus (25 à 150 pmoles de P450 /mg de protéines) sont en outre suffisants pour envisager une production industrielle.

L'expression des P450 dans *S. cerevisiae* a commencé dès 1985 (Oeda et al., 1985). Depuis, les systèmes d'expression ont été améliorés. Dans les systèmes de première génération, seul le P450 était exprimé, la cytochrome P450 réductase étant celle de la cellule hôte (Oeda et al., 1985; Brian et al., 1989). Dans ces systèmes, le niveau d'expression des P450 était assez bas (80 pmoles/mg protéines) et les activités spécifiques mesurées étaient faibles en raison de la faible quantité de cytochrome P450 réductase endogène. Pour pallier à ces inconvénients, des systèmes de deuxième et troisième générations ont été développés. Différentes stratégies ont été envisagées afin d'augmenter la quantité de cytochrome P450 réductase et de ce fait l'activité des P450 recombinants :

- **l'expression de protéines de fusion P450 hétérologue/P450 réductase** : ce type de construction artificielle donne des activités spécifiques 10 fois plus importantes (Yabusaki et al., 1988).
- **la coexpression du P450 et de la P450 réductase introduits sur le même vecteur** : cette construction a l'avantage de donner des niveaux d'expression équivalents de P450 et P450 réductase (Eugster et al., 1992).
- **la construction de souches de levure modifiées surexprimant la cytochrome P450 réductase de levure** (Truan et al., 1993) **ou la cytochrome P450 réductase humaine** (système de troisième génération) (Urban et al., 1993). L'intégration génomique de la cytochrome P450 réductase a permis de contourner le problème d'instabilité posé par les systèmes précédents. La cytochrome P450 réductase de levure couple parfois mal avec certaines isoformes de P450 humains ce qui a suggéré la construction de levures recombinantes surexprimant la cytochrome P450 réductase humaine.

Des souches de levure surexprimant la cytochrome P450 réductase de levure W(R) ou la cytochrome P450 réductase humaine W(hR) ont été développées au laboratoire de Denis Pompon (IGM, Gif sur Yvette) (Pompon et al., 1996). Nous les utiliserons pour l'expression hétérologue des CYP2C (cf. partie V.A.4 du Matériel et Méthodes).

Annexe B : Les acides aminés et leurs propriétés

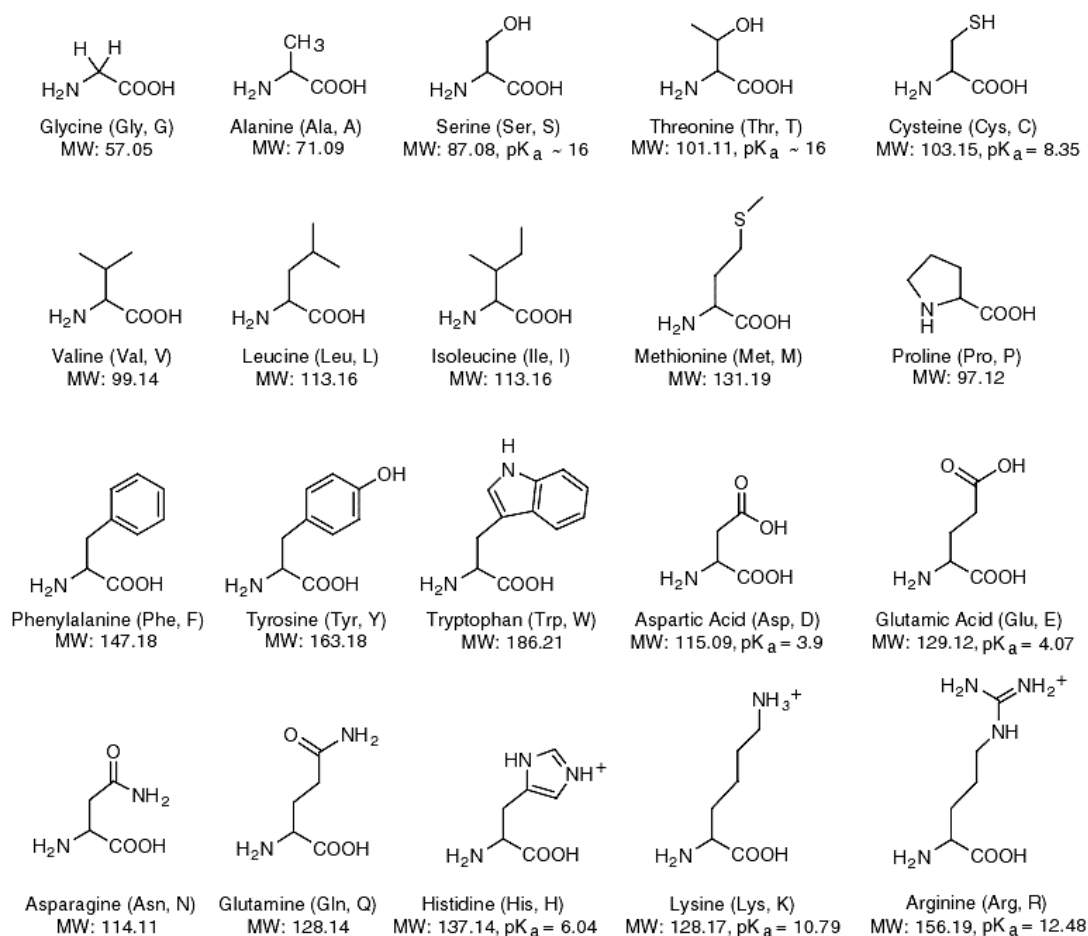


Figure 73 : Structure des acides aminés, masses moléculaires et pKa.

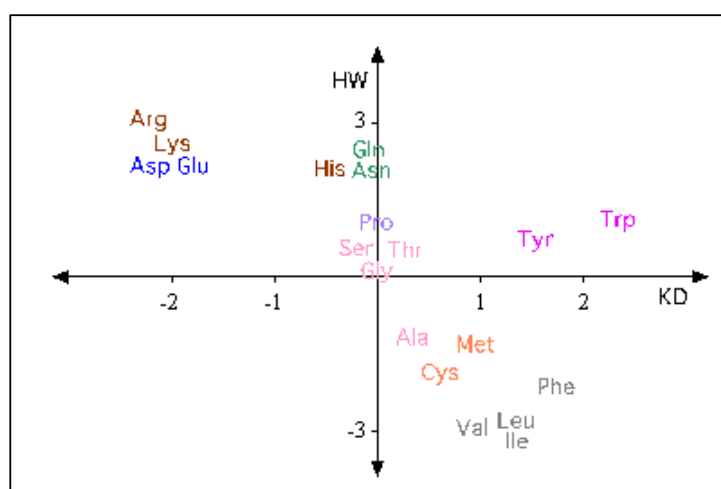


Figure 74 : Hydrophobicités relatives des acides aminés. KD= indice d'hydrophobie de Kyle-Doolittle, HW=indice d'hydrophilie de Hoop et Wood.

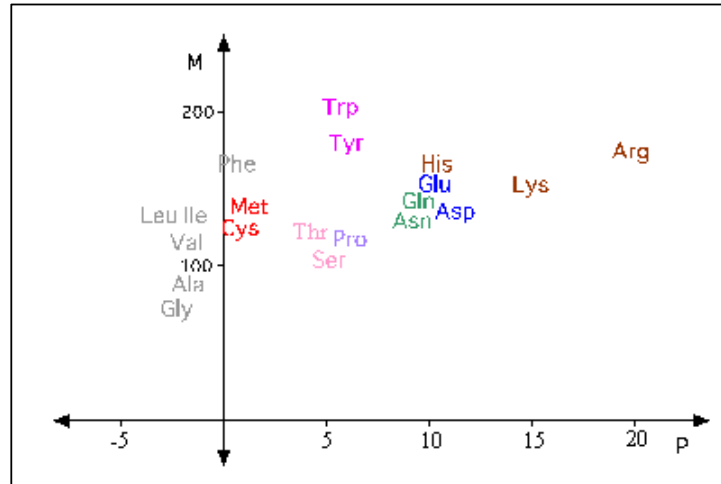


Figure 75 : Echelle de polarité des différents acides aminés. M=masse molaire, P=indice de polarité (différences d'énergie libre lors du passage d'un solvant apolaire à un solvant polaire).

Residue	Residue mass ^a (daltons)	Van der Waals volume ^b (Å ³)	Frequency in proteins ^c (%)
Ala (A)	71.09	67	8.3
Arg (R)	156.19	148	5.7
Asn (N)	114.11	96	4.4
Asp (D)	115.09	91	5.3
Cys (C)	103.15	86	1.7
Gln (Q)	128.14	114	4.0
Glu (E)	129.12	109	6.2
Gly (G)	57.05	48	7.2
His (H)	137.14	118	2.2
Ile (I)	113.16	124	5.2
Leu (L)	113.16	124	9.0
Lys (K)	128.17	135	5.7
Met (M)	131.19	124	2.4
Phe (F)	147.18	135	3.9
Pro (P)	97.12	90	5.1
Ser (S)	87.08	73	6.9
Thr (T)	101.11	93	5.8
Trp (W)	186.21	163	1.3
Tyr (Y)	163.18	141	3.2
Val (V)	99.14	105	6.6
Weighted average ^d	119.40	161	

Tableau 46: Volumes de Van der Waals des différents acides aminés.

Annexe C : Alignement de séquence des CYP2

Références des différents CYP dans Swissprot

CYP2E1	homme	P05181	CYP2B4	lapin	P00178
CYP2D1	rat	P10633	CYP2B5	lapin	P12789
CYP2D6	homme	P10635	CYP2B11	chien	P24460
CYP2C9	homme	P11712	CYP2B6	homme	P20813
CYP2C19	homme	P33261	CYP2B2	rat	P04167
CYP2C18	homme	P33260	CYP2B1	rat	P00176
CYP2C8	homme	P10632	CYP2A4	souris	P15392
CYP2C5	lapin	P00179	CYP2A5	souris	P20852
CYP2C2	lapin	P00181	CYP2A6	homme	P11509
CYP2C3	lapin	P00182			

Les acides aminés étudiés par mutagenèse et qui sont importants pour le fonctionnement catalytique du CYP2C9 sont indiqués en rouge. Les acides aminés du CYP2C5 et du CYP2C9 en contact avec les substrats d'après les structures RX sont indiqués en vert. Ces données confirment l'importance des SRS définis par Gotoh dans la reconnaissance des substrats par les CYP2.

2E1	-----MSALGV-----TVALLVWAAFLLLVSMWRQVHSSWNLPFGFPLPII	42
2D1	-----MELLNGTGLW-SMAIFTVIFILLVDMHRRHRWTSRYPPGPVWPVL	46
2D6	-----MGL---EALV-PLAVIVAIFLLVDMHRRQRWAARYPPGPLPLPGL	43
2C9	-----MDS-----LVVLVLCCLSCLLLSLWRQSSGRGKLPFGPTPLPVI	39
2C19	-----MDP-----FVVLVLCCLSCLLLSIWRQSSGRGKLPFGPTPLPVI	39
2C18	-----MDP-----AVALVLCCLSCFLLSLWRQSSGRGRLPSGPTPLPII	39
2C8	-----MEP-----FVVLVLCCLSFMLLSLWRQSCRRRKLPPGPTPLPII	39
2C5	-----MDP-----VVVLVGLCLCCLLLSIWKQNSGRGKLPFGPTPFPII	39
2C2	-----MDL-----VVVLGCLCCLLLPSLWKQSHGGGKLPFGPTPFPII	39
2C3	-----MDL-----LIILGICLSCVLLSLWKKTHGKGLPPGPTPLPVV	39
2B4	-----MEFS-----LLLLLAFLAGLLLLFRGHPKAHGRLPFGPSPPLPVL	40
2B5	-----MEFS-----LLLLLAFLAGLLLLFRGHPKAHGRLPFGPSPPLPVL	40
2B11	-----MELS-----VLLLLALLTGLLLLMARGHPKAYGHLPPGPRPLPIL	40
2B6	-----MELS-----VLLFLALLTGLLLLVQRHPNTHDRLPFGPRLPPLL	40
2B2	-----MEPS-----ILLLLALLVGFLLLVVRGHPKSRGNFPPGPRPLPLL	40
2B1	-----MEPT-----ILLLLALLVGFLLLVVRGHPKSRGNFPPGPRPLPLL	40
2A4	-----MLTSGLL----LVAAVAFLSVLVMSVWQQRKLSGKLPFGPTPLPFV	43
2A5	-----MLTSGLL----LVAAVAFLSVLVMSVWQQRKLSGKLPFGPTPLPFI	43
2A6	-----MLASGML----LVALLVCLTVMVMSVWQQRKSKGKLPFGPTPLPFI	43

SRS1

2E1	GNLFQLELKNIPKSFTRLAQRFGPVFTLYVGSQRMVVMHGYKAVKEALLDYKDEFSGRGD	102
2D1	GNLLQVDLSNMPYSLYKLQHRYGDVFSLQKGWKPMVIVNRLKAVQEVLVTHGEDTADRPP	106
2D6	GNLLHVDFQNTPYCFDQLRRRFGDVFSLQLAWTPVVVNLGLAAVREALVTHGEDTADRPP	103
2C9	GNILQIGIKDISKSLTNLSKVYGPVFTLYFGLKPIVVLHGVEAVKEALIDLGEFEFSRGI	99
2C19	GNILQIDIKDVKSLTNLSKIYGPVFTLYFGLERMVVLHGVEVVEALIDLGEFEFSGRGH	99
2C18	GNILQLDVKDMSKSLTNFSKVYGPVFTVYFGLKPIVVLHGVEAVKEALIDHGEFEFSRGS	99
2C8	GNMLQIDVKDICKSFTNFSKVYGPVFTVYFGMNPVVFHGVEAVKEALIDNGEFEFSGRGN	99
2C5	GNILQIDAKDISKSLTKFSECYGPVFTVYLGMPKPTVVLHGVEAVKEALVDLGEFEFAGTGS	99
2C2	GNVLQLDFKDLKSLTNLSKVYGPVFTVYLGMPKPTVVVHGVEAVKEALVDLGHESGRSR	99
2C3	GNLLQLETKDINKSLSMLAKEYGSIFTLYFGMKPAVVLYGYEGVIEALIDRGEFEFSRGI	99
2B4	GNLLQMDRKGLLRSFLRLREKYGDVFTVYLGSRPVVVLCTDAIREALVDQAEAFSGRGK	100
2B5	GNLLQMDRKGLLRSFLRLREKYGDVFTVYLGSRPVVVLCTDAIREALVDQAEAFSGRGK	100
2B11	GNFLQMDRKGLLKSFLRLQEKYGDVFTVYLGPRRTVMMLCGDAIREALVDNAEAFSGRGK	100
2B6	GNLLQMDRRGLLKSFLRFREKYGDVFTVHLGPRPVVMLCGVEAIREALVDKAEAFSGRGK	100
2B2	GNLLQLDRGGLLNSFMQLREKYGDVFTVHLGPRPVVMLCGTDTIKEALVGQAEAFSGRGT	100
2B1	GNLLQLDRGGLLNSFMQLREKYGDVFTVHLGPRPVVMLCGTDTIKEALVGQAEAFSGRGT	100
2A4	GNFLQLNTEQMYNSLMKISQRYGPVFTIYLGSRRIVVLGQAEAVKEALVDQAEFEFSGRGE	103
2A5	GNFLQLNTEQMYNSLMKISQRYGPVFTIYLGPRRIVVLGQAEAVKEALVDQAEFEFSGRGE	103
2A6	GNYLQLNTEQMYNSLMKISERYGPVFTIHLGPRRVVVLGHDVAVREALVDQAEFEFSGRGE	103

SRS1

2E1	LPAFHAHRD-----RGIIFNNGPTWKDIRRFSLTTLRN YGMGKQ-----GNESRIQRE	150
2D1	VPIFKCLGVKPRSQGVILASYGPEWREQRRFSVSTLRTFGMGKK-----SLEEWVTKE	159
2D6	VPI TQILGFGPRSQGVFLARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKK-----SLEQWVTEE	156
2C9	FPLAERANRG----FGIVFNSGKKWKEIRRFSMLTLRNFGMGKR-----SIEDRVQEE	148
2C19	FPLAERANRG----FGIVFNSGKRWKEIRRFSMLTLRNFGMGKR-----SIEDRVQEE	148
2C18	FPVAEKVNKG----LGI LFSNGKRWKEIRRFCMLTLRNFGMGKR-----SIEDRVQEE	148
2C8	SPISQRITKG----LGISSNGKRWKEIRRFSLTTLRNFGMGKR-----SIEDRVQEE	148
2C5	VPILEKVS KG----LGI AFSNAKTWKEMRRFSMLTLRNFGMGKR-----SIEDRIQEE	148
2C2	FLVTAKLNKG----FGVIFNSGKRWTETRRFSMLTLRNFGMGKR-----SIEERVQEE	148
2C3	FPVFDVRTKG----LGI VFSSGEKWKETRRFSLTVLRNLGMGKK-----TIEERIQEE	148
2B4	IAVVDPIFQG----YGVIFANGERWRALRRFSLATMRDFGMGKR-----SVEERIQEE	149
2B5	IAVVDPIFQG----YGVVFANGEHWRALRRFSLATMRDFGMGKR-----SVEERIQEE	149
2B11	IAVVEPVFQG----YGVVFANGERWKT LRRFSLATMRDFGMGKR-----SVEERIQEE	149
2B6	IAMVDPPFRG----YGVIFANGNRWKLRRFSVT TMRDFGMGKR-----SVEERIQEE	149
2B2	IAVIEPIFKE----YGVIFANGERWKALRRFSLATMRDFGMGKR-----SVEERIQEE	149
2B1	IAVIEPIFKE----YGVIFANGERWKALRRFSLATMRDFGMGKR-----SVEERIQEE	149
2A4	QATFDWLFKG----YGI AFSSGERAKQLRSFSIATLRDFGVGKR-----GIEERIQEE	152
2A5	QATFDWLFKG----YGVVFSSGERAKQLRRFSIATLRDFGVGKR-----GIEERIQEE	152
2A6	QATFDWVFKG----YGVVFSNGERAKQLRRFSIATLRDFGVGKR-----GIEERIQEE	152

SRS2

2E1	AHFLEALRK TQGP--FDPTFLIGCAPCNVIADILFRKHFD--YNDEKFLRLMYLFNENF	207
2D1	AGHLCDAFTAQAGQS--INPKAMLNKALCNVIASLI FARRFE--YEDPYLIRMVKLVEESI	216
2D6	AACLCAAFANHSGRP--FRPNGLLDKAVSNVIASLTCGRRFE--YDDPRFLRLDLAQEGL	213
2C9	ARCLVEELRKTKASP--CDPTFILGCAPCNVICSIIFHKRFD--YKDQQFLNMEKLNENI	205
2C19	ARCLVEELRKTKASP--CDPTFILGCAPCNVICSIIFQKRFD--YKDQQFLNMEKLNENI	205
2C18	ARCLVEELRKTNASP--CDPTFILGCAPCNVICSVIFHDRFD--YKDQRFNLNMEKFNENL	205
2C8	AHCLVEELRKTKASP--CDPTFILGCAPCNVICSVVFQKRFD--YKDQNF LTMKRFNENF	205
2C5	ARCLVEELRKTNASP--CDPTFILGCAPCNVICSVIFHNRFD--YKDEEF LKLMESLNENV	205
2C2	AHCLVEELRKTNASP--CDPTFILGAAPCNVICSVIFQNRFD--YTDQDFLSIMGKFNENF	205
2C3	ALCLIQALRKTNASP--CDPTFLLFCVPCNVICSVIFQNRFD--YDDEKFLSLIKYFHENF	205
2B4	ARCLVEELRKSKGAL--LDNTLLFHSITSNIICSI VFGKRFD--YKDPVFLRLDLFFQSF	206
2B5	ARCLVEELRKSKGAL--LDNTLLFHSVTSNIICSI VFGKRFD--YKDPVFLRLDLFFQSF	206
2B11	AQCLVEELRKTEGVL--QDPTFFFHSMTANIICSI VFGKRFG--YKDPEFLRLMNLFYVSF	206
2B6	AQCLIEELRKSKGAL--MDPTFLFQSITANIICSI VFGKRFG--YQDQEF LKMLNLFYQTF	206
2B2	AQCLVEELRK SQAP--LDPTFLFQCITANIICSI VFGGERFD--YTDRQFLRLLELFYRTF	206
2B1	AQCLVEELRK SQAP--LDPTFLFQCITANIICSI VFGGERFD--YTDRQFLRLLELFYRTF	206
2A4	AGFLIDFRKTNGAF--IDPTFYLSRTVSNVISSIVFGDRFD--YEDKEFLSLLRMMLGSL	209
2A5	AGFLIDFRKTNGAF--IDPTFYLSRTVSNVISSIVFGDRFD--YEDKEFLSLLRMMLGSL	209
2A6	AGFLIDAHRTGGAN--IDPTFFLSRTVSNVISSIVFGDRFD--YKDKFEFLSLLRMMLGIF	209

SRS3

2E1	HLLSTPWLQLYNNFSPFLHYLPGSHRQVIKNVAEVKE----YVSERVKEHHQSLDPNCP-	262
2D1	TEVSGFIPEVLNTFP--ALLRIPGLADKVFQGQKTFMA----LLDNLLAENRTTWDPAQPP	271
2D6	KEESGFLREVLNAV P-VLLHIPALAGKVLRFQKAPLT----QLDELLTEHRMTWDPAQPP	268
2C9	KILSSPWIQCNNFSPIIDYFPGTHNKLKNVAFMK S----YILEKVKEHQESMDMNNP-	260
2C19	RIVSTPWIQICNNFPTIIDYFPGTHNKLKNLAFMES----DILEKVKEHQESMDINNP-	260
2C18	RILSSPWIQVCNNFPALIDYLP GSHNKIAENFAYIKS----YVLERIKEHQESLDMNSA-	260
2C8	RILNSPWIQVCNNFPLIDCFPGTHNKLKNVALTRS----YIREKVKEHQASLDVNNP-	260
2C5	RILSSPWLQVYNNFPALLDYFPGIHKTLKNADYIKN----FIMEKVKEHEKLLDVNNP-	260
2C2	KILNSPWWQFCNCFPI LFDYFPGSHRKAVKNIFYVKN----YITEQIKEHQKSLDINNP-	260
2C3	ELLGT PWIQLYNIFP--ILHYLPGSHRQLFKNIDGQIK----FILEKVQEHQESLDSNNP-	259
2B4	SLISSFSSQVFELFPGLKHFPGTHRQIYRN LQEINT----FIGQSVKHRATLDPSNP-	261
2B5	SLISSFSSQVFELFPGLKHFPGTHRQIYRN LQEINT----FIGQTVKHRATLDPSNP-	261
2B11	ALISSFSSQMFELFHSFLKYFPGTHRQVYNNLQEIK A----FIARMVEKHRETLDPSAP-	261
2B6	SLISSVFGQLFELFSGFLKYFPGAHRQVYKNLQEINA----YIGHSVEKHRETLDPSAP-	261
2B2	SLISSFSSQVFEFFSGFLKYFPGAHRQISKNLQEILD----YIGHIVEKHRETLDPSAP-	261
2B1	SLISSFSSQVFEFFSGFLKYFPGAHRQISKNLQEILD----YIGHIVEKHRETLDPSAP-	261
2A4	QFTATSMGQVYEMFSSVMKHLPGPQQQAFKELQGLD----FITKKVEHNQRTLDPNSP-	264
2A5	QFTATSMGQLYEMFSSVMKHLPGPQQQAFKELQGLD----FITKKVEHNQRTLDPNSP-	264
2A6	QFTSTSTGQLYEMFSSVMKHLPGPQQQAFQLQGLD----FIAKKVEHNQRTLDPNSP-	264

SRS4

2E1	RDLTDCLLVEMEKEKHS AERLYTMDGITVVT----VADLFFAGTET	TSTTLRYGLLLMKY	318
2D1	RNLTAFLAEVEKAKGNPES SFNDE NLRMV----VVDLFTAGMVT	TATTLWALLMLLY	327
2D6	RDLTEAFLAEME KAKGNPES SFNDE NLRIV----VADLFSAGMVT	TSTTLAWGLLLMLH	324
2C9	QDFIDCFLMKMEKEKHNQ PSEFTIE SLENT----AVDLFGAGTET	TSTTLRYALLLLLKH	316
2C19	RDFIDCFLIKMEKEKHNQ QSEFTIENLVIT----AADLLGAGTET	TSTTLRYALLLLLKH	316
2C18	RDFIDCFLIKMEQE KHNQ QSEFTV E SLIAT----VTDMFGAGTET	TSTTLRYGLLLLLKY	316
2C8	RDFIDCFLIKMEQE KDNQ KSEFN IENLVGT----VADL FVAGTET	TSTTLRYGLLLLLKH	316
2C5	RDFIDCFLIKMEQENN---LEFTLES LVIA----VSDLFGAGTET	TSTTLRYSLLLLLKH	313
2C2	RDFIDCFLIKMEQE KCNQ QSEFTIENLLTT----VSDVFMAGTET	TSTTLRYGLLLLLMKH	316
2C3	RDFVDHFLIKMEKEKHK QSEFTMDNLITT----IWDVFSAGTDT	TSNTLKFALLLLLKH	315
2B4	RDFIDVYLLRMEKDKSDP SSEFHQNLI LIT----VLSLFFAGTET	TSTTLRYGFLMLKY	317
2B5	RDFIDVYLLRMEKDKSDP SSEFHHRNLI LIT----VLT LFFAGTET	TSTTLRYGFLMLKY	317
2B11	RDFIDAYLIRMDKEKAEP SSEFHHRNLI DT----ALS LFFAGTET	TSTTLRYGFLMLKY	317
2B6	KDLIDTYLLHMEKEKSN AHSEF SHQNLNLN----T LSLFFAGTET	TSTTLRYGFLMLKY	317
2B2	RDFIDTYLLRMEKEKSN HHTEFH HENLMIS----L LSLFFAGTET	GSSTTLRYGFLMLKY	317
2B1	RDFIDTYLLRMEKEKSN HHTEFH HENLMIS----L LSLFFAGTET	SSSTTLRYGFLMLKY	317
2A4	RDFIDSFLIRMLEEKNPNTE FYMKNLVLT----T LNLFFAGTET	VSTTLRYGFLMLKY	320
2A5	RDFIDSFLIRMLEEKNPNTE FYMKNLVLT----T LNLFFAGTET	VSTTLRYGFLMLKH	320
2A6	RDFIDSFLIRMQEE EKNPNTE FYLKNLVMT----T LNLFI GGTET	VSTTLRYGFLMLKH	320

SRS5

2E1	PEIEEKLHEEIDRVIGPSRIPAIKDRQEMPYMDAVVHEIQRFITL	VPSNLPHEATRDITF	378
2D1	PDVQRRVQQEIDEVIGQVRCPEMTDQAHMPYTN AVIHEVQRF	GDIAPLNLP RFTSCDIEV	387
2D6	PDVQRRVQQEIDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVIHEVQRF	GDIVPLGMTHMSTRDIEV	384
2C9	PEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRSHMPYTD AVVHEVQRY	IDLLPTSLPHAVTCDIKF	376
2C19	PEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQDRGHMPYTD AVVHEVQRY	IDLIPTSLPHAVTCDVKF	376
2C18	PEVTAKVQEEIECVVGRNRSPCMQDRSHMPYTD AVVHEIQRY	IDLLPTNLPHAVTCDVKF	376
2C8	PEVTAKVQEEIDHVIGRHRSPCMQDRSHMPYTD AVVHEIQRY	SDLVPTGVPHAVTTDTKF	376
2C5	PEVAARVQEEIERVIGRHRSPCMQDRSRMPYTD AVIHEIQRF	IDLLPTNLPHAVTRDVRF	373
2C2	PEVIAKVQEEIERVIGRHRSPCMQDRSRMPYTD AVIHEIQRY	INLIPNNVPHTTICNLKF	376
2C3	PEITAKVQEEIEHVIGRHRSPCMQDRTRMPYTD AVMHIEIQRY	VDLVPTSLPHAVTQDIEF	375
2B4	PHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDR AKMPYTD AVIHEIQRL	GDLIPFGVPHVTKD TQF	377
2B5	PHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDR AKMPYTD AVIHEIQRL	GDLVPGFAPHMVTKD TQF	377
2B11	PHIAERIYKEIDQVIGPHRLPSLDDR AKMPYTD AVIHEIQRF	GDLIPGVPHMVTKD ICF	377
2B6	PHVAERVYREIEQVIGPHRPP ELHDR AKMPYTE AVIYEIQRF	SDLLPMGVPHIVTQHTSF	377
2B2	PHVTEKVQKEIDQVIGSHRPPSLDDR TKMPYTD AVIHEIQRF	ADLAPIGLPHRVTKD TMF	377
2B1	PHVAEKVQKEIDQVIGSHRLPTLDDR SKMPYTD AVIHEIQRF	SDLVPIGVPHRVTKD TMF	377
2A4	PDIEAKVHEEIDRVIGRNRQPKYEDRMKMPYTE AVIHEIQRF	ADLIPMGLARRVTKD TKF	380
2A5	PDIEAKVHEEIDRVIGRNRQPKYEDRMKMPYTE AVIHEIQRF	ADMIPMGLARRVTKD TKF	380
2A6	PEVEAKVHEEIDRVIGKNRQPKFEDRAKMPYME AVIHEIQRF	GDVIPMSLARRVKKD TKF	380

2E1	RGYLIPKGTVVVPTLDSVL YDNQEFDPDEKFKPEHFLNENG---	KFKYSDFKPFSTGKR	435
2D1	QDFVIPKGTTLIINLSSVLKDET VWEKPHRFHPEHFLDAQG---	NFKVKEAFMPFSAGRR	444
2D6	QGFRIPKGTTLITNLSSVLKDEAVWEK PFRFHPEHFLDAQG---	HFKVKEAFLPFSAGRR	441
2C9	RNYLIPKGTTLISLTSVLH DNKEFPNPEMFDPHHFLDEGG---	NFKKSKYFMPFSAGKR	433
2C19	RNYLIPKGTTLITSLTSVLH DNKEFPNPEMFDPRHFLDEGG---	NFKKSNYFMPFSAGKR	433
2C18	RNYLIPKGMTIITSLTSVLH DNKEFPNPEMFDPGHFLDKSG---	NFKKSDYFMPFSAGKR	433
2C8	RNYLIPKGTTIMALLTSVLH DDKEFPNPNIFDPGHFLDKNG---	NFKKSDYFMPFSAGKR	433
2C5	RNYFIPKGTDIITSLTSVLH DEKAFNPNKVFDPGHFLDESG---	NFKKSDYFMPFSAGKR	430
2C2	RNYLIPKGTDLVLTSLSSVLH DDKEFPNPNDRFDPGHFLDASG---	NFRKSDYFMPFSAGKR	433
2C3	NGYLIPKGTDIIPSLTSVL YDDKEFPNPEKFDPGHFLDESG---	NFKKSDYFMPFSAGKR	432
2B4	RGYVIPKNTEVFPVLSALH DDPYFETPNTFNPGHFLDANG---	ALKRNEGFMPFSLGKR	434
2B5	RGYVIPKNTEVFPVLSALH DDPYFETPNTFNPGHFLDADG---	ALKRNEGFMPFSLGKR	434
2B11	RGYIIPKGTTEVFPILHSAL NDPHYFEKPDVFNPDHFLDANG---	ALKKNEAFIPFSIGKR	434
2B6	RGYIIPKDTTEVFLILSTALH DDPHYFEKPD AFNPDHFLDANG---	ALKKTEAFIPFSLGKR	434
2B2	RGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFDHPDTFNPEHFLDADG---	TLKKSEAFMPFSTGKR	434
2B1	RGYLLPKNTEVYPI LSSALHDPQYFDHPDSFNPEHFLDANG---	ALKKSEAFMPFSTGKR	434
2A4	RDFLLPKGTEVFPMLGSVLKDPKFFSNPKDFNPKHFLDDKG---	QFKKSAFVFPFSIGKR	437
2A5	RDFLLPKGTEVFPMLGSVLKDPKFFSNPKDFNPKHFLDDKG---	QFKKNAFVFPFSIGKR	437
2A6	RDFFLPKGTEVYPM LGSVLRDPSFFSNPQDFN PQHFLNEKG---	QFKKSAFVFPFSIGKR	437

SRS6

2E1	VCAGEGLARMELFLLLCAILQHFNKPLVDPKDIDLSPIHIGFGCIPPRYKLCVIPRS--	493
2D1	ACLGEPLARMELFLFFTCLLQRFSSVSPVQPRPSTHG-FFAFPVAPLPYQLCAVVREQGL	504
2D6	ACLGEPLARMELFLFFTSLQHFSSVPTGQPRPSHHG-VFAFLVSPSPYELCAVPR---	497
2C9	ICVGEALAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDTTPVVNGFASVPPFYQLCFIPV---	490
2C19	ICVGEGLARMELFLFLTFILQNFNLKSLIDPKDLDTTPVVNGFASVPPFYQLCFIPV---	490
2C18	MCMGEGLARMELFLFLTTILQNFNLKSQVDPKDIDITPIANAFGRVPPLYQLCFIPV---	490
2C8	ICAGEGLARMELFLFLTTILQNFNLKSVDDLKLNLTAVTKGIVSLPPSYQICFIPV---	490
2C5	MCVGEGLARMELFLFLTSILQNFKLSLVEPKDLDTAVVNGFVSVPPSYQLCFIPI---	487
2C2	VCVGEALARMELFLFLTAILQNFTPKPLVNPNNVDENPFSSGIVRVPPLYRVSFIPV---	490
2C3	ACVGEGLARMELFLLLTTILQHFLLKPLVDPKDIDITPVENGFVSVPPSYELCFVVPV---	489
2B4	ICLGEGIARTEFLFFTTILQNFNSIASPVPPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLAR---	491
2B5	ICLGEGIARTEFLFFTTILQNFNSIASPVPPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLAR---	491
2B11	ICLGEGLARMELFLFFTTILQNFNSVASPMAPEDIDLTPQEIGVGKLPVYQISFLSRGGC	494
2B6	ICLGEGIARAELFLFFTTILQNFNSMASPVAPEDIDLTPQECGVGKIPPTYQIRFLPR---	491
2B2	ICLGEGIARNELFLFFTTILQNFNSVSHLAPKDIDLTPKESGIAKIPPTYQICFSAR---	491
2B1	ICLGEGIARNELFLFFTTILQNFNSVSHLAPKDIDLTPKESGIGKIPPTYQICFSAR---	491
2A4	YCFGEGLARMELFLFLTNIMQNFHFKSTQAPQDIDVSPRLVGFVTIPPTYTMSFLSR---	494
2A5	YCFGEGLARMELFLFLTNIMQNFHFKSTQAPQDIDVSPRLVGFATIPPTYTMSFLSR---	494
2A6	NCFGEGLARMELFLFFTTVMQNFRLKSSQSPKDIDVSPKHVGFATIPRNYTMSFLPR---	494

Annexe D : Etudes complémentaires sur une série de mutants F476X du CYP2C9

Le mutant du CYP2C9, F476I, a des kcat d'hydroxylation élevées, en particulier avec l'acide tiénilique. Dans la mesure où le résidu équivalent du CYP2C5 (F473) se trouve dans le canal d'accès du solvant au site actif, nous pouvons supposer que cette augmentation de kcat pourrait être due à une amélioration du transfert de protons au site actif pendant la catalyse.

Pour mieux appréhender ce phénomène, nous avons essayé d'évaluer l'influence de la nature du résidu 476 sur les activités du CYP2C9, en construisant une série de mutants F476X (X=A, W, H, R, E).

D.1 Construction et expression des mutants F476X

Pour construire les mutants F476X, nous avons utilisé le protocole de mutagenèse précédemment décrit (Melet et al., 2003). La phénylalanine 476 a été mutée en :

- Alanine, résidu hydrophobe de plus petite taille que l'isoleucine
- Tryptophane et histidine, deux autres résidus aromatiques qui modifient l'encombrement stérique (Trp) ou la charge (His) à cette position
- Arginine et acide glutamique, deux résidus chargés positivement ou négativement.

Tous ces mutants ont été exprimés dans la levure W(R), mais leur niveau d'expression varie avec la nature de la mutation (Tableau 47). Les P450 mutés F476A, I et H ont des niveaux d'expression comparables à ceux du CYP2C9 sauvage. Par contre, les mutants F476R et F476E sont faiblement exprimés ce qui est peu surprenant car naturellement, on ne retrouve pas de résidu chargé à cette position dans les cytochromes P450. Le mutant F476W est également faiblement exprimé sans doute en raison de l'encombrement stérique important à cette position.

Toutes les préparations microsomales ont un rapport molaire réductase/P450 supérieur ou égal à celui du CYP2C9 : la quantité de réductase est donc en principe suffisante pour le fonctionnement catalytique des P450 mutés.

CYP	P450 (pmol/mg)	Activité réductase nmol cyt.c réduit/min/mg prot.
2C9	40 ± 15	510 ± 130
F476A	23	546
F476I	30 ± 15	505 ± 100
F476W	13	500
F476H	36	690
F476R	8	470
F476E	16	787

Tableau 47 : Caractérisation biochimique des microsomes de levure W(R) exprimant des mutants du CYP2C9 en position 476 : niveau d'expression du cytochrome P450 en pmol par mg de protéines microsomales et activité réductase exprimée en nmol de cytochrome c réduit par min et par mg de protéines. Les valeurs indiquées pour le CYP2C9 et le mutant F476I sont les moyennes ± l'écart type de trois mesures effectuées sur différentes préparations microsomales. Les valeurs indiquées pour les autres mutants F476X correspondent aux moyennes de deux mesures réalisées sur une même préparation, les variations entre les deux mesures étant inférieures à 10%.

D.2 Propriétés catalytiques des mutants F476X

Nous avons comparé les activités catalytiques des différents mutants F476X, à l'aide de deux substrats classiques du CYP2C9, l'acide tiénélique et le diclofénac. Les résultats sont présentés dans les tableaux 48 et 49.

5-hydroxylation de l'acide tiénélique ^(a)				
CYP	Activité (min ⁻¹) (AT 100 μM)	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km ^(b)
2C9	5	5 ± 1	4 ± 2	0,8
F476A	16	35 ± 4	20 ± 2	0,6
F476I	27	46 ± 9	36 ± 2	0,8
F476W	2	nm ^(c)	nm	nm
F476H	5	9 ± 2	7 ± 1	0,8

Tableau 48 : Activité spécifique et constantes cinétiques de 5-hydroxylation de l'acide tiénélique par des microsomes de levure exprimant le CYP2C9 et ses mutants en position 476. (a) Les valeurs indiquées représentent les moyennes de trois mesures indépendantes ± l'écart type (b) kcat/Km en min⁻¹.μM⁻¹. (c) nm = non mesuré ; les constantes cinétiques de F476W, F476E et F476R n'ont pas pu être mesurées par spectroscopie UV-visible en raison de la trop faible expression de ces mutants.

CYP	4'-hydroxylation du diclofénac			5-hydroxylation du diclofénac			kcat _{4'OH} /kcat _{5OH}
	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km	Km (μM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km	
2C9	15 ± 5	53 ± 10	3,5	-	<0,1	-	> 530
2C8	109 ± 3	0,9 ± 0,1	0,008	83 ± 11	3,2 ± 0,4	0,04	0,25
F476A	49 ± 5	60 ± 6	1,2	46 ± 4	19 ± 2	0,4	3,2
F476I	55 ± 8	93 ± 2	1,8	72 ± 13	28 ± 3	0,4	3,3
F476W	73 ± 3	33 ± 3	0,5	102 ± 8	2,5 ± 0,2	0,03	13,2
F476H	71 ± 1	38 ± 3	0,5	67 ± 9	3,6 ± 0,5	0,05	10,6
F476R	260 ± 10	33 ± 1	0,2	243 ± 26	3,9 ± 0,4	0,02	8,5
F476E	214 ± 40	33 ± 1	0,2	206 ± 29	6,2 ± 0,1	0,03	5,3

Tableau 49 : Comparaison des propriétés catalytiques du CYP2C9, de ses mutants 476 et du CYP2C8 vis-à-vis de l'hydroxylation du diclofénac. (moyenne ± l'écart type de 3 mesures indépendantes). Le mode opératoire est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes; kcat/Km en min⁻¹.μM⁻¹.

Hydroxylation de l'acide tiénilique :

Le mutant F476H a des constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide tiénilique proches de celles du CYP2C9 sauvage. Par contre, la substitution de Phe476 en Ala ou Ile (acides aminés non aromatiques) entraîne une augmentation conjointe des constantes cinétiques K_m et k_{cat} , qui au final modifie peu l'efficacité catalytique de l'enzyme.

Hydroxylation du diclofénac :

Avec le diclofénac, les effets observés sont plus complexes. Toutes les mutations affectent les K_m et les régiosélectivités d'hydroxylation. Par contre, les k_{cat} de 4'-hydroxylation sont peu modifiées (excepté pour F476I). Détaillons les effets des mutations sur les K_m puis sur les k_{cat} , pour l'hydroxylation du diclofénac :

- **Effets sur les K_m**

Quel que soit le résidu hydrophobe ou aromatique substitué en position 476 (A, I, W, H), les mutants ont des constantes K_m de 4'-hydroxylation et de 5-hydroxylation relativement comparables et qui se rapprochent de celles du CYP2C8.

Les mutations F476E et F476R induisent une augmentation très marquée de la K_m de 4'-hydroxylation du diclofénac et catalysent la 5-hydroxylation de ce composé avec une K_m comparable à celle de la 4'-hydroxylation.

- **Effets sur les k_{cat}**

Les mutants F476W, F476H, F476R, F476E (substitution par des résidus aromatiques et/ou chargés) ont une k_{cat} de 4'-hydroxylation du diclofénac proches de celle du CYP2C9 et une k_{cat} de 5-hydroxylation proche de celle du CYP2C8.

Les mutants F476A et F476I (substitution par des résidus aliphatiques hydrophobes) ont des k_{cat} de 4' et 5-hydroxylation élevées, les k_{cat} de F476I étant les plus fortes. La k_{cat} de 4'-hydroxylation est multipliée par deux par rapport à celle du CYP2C9 et la k_{cat} de 5-hydroxylation est augmentée d'un facteur 6 à 9 par rapport à celle du CYP2C8.

Discussion :

Les résultats ci-dessus confirment la grande importance du résidu Phe476 dans la reconnaissance des substrats par le CYP2C9, déjà notée dans le chapitre II et la publication correspondante jointe.

- Le remplacement de Phe476 par un résidu hydrophobe non aromatique (F476A et F476I) conduit, pour les deux substrats étudiés, à une forte augmentation de la K_m , d'un facteur 3 à 9, comme on s'y attend après une perte d'interaction de type π - π . Cette augmentation de K_m est associée à une forte augmentation de la k_{cat} pour l'hydroxylation de l'acide tiénilique (d'un facteur 5 à 9), ce qui fait qu'au final l'efficacité catalytique de l'enzyme pour ce substrat n'est que très peu modifiée. Ce phénomène existe aussi dans le cas du diclofénac, mais uniquement pour F476I, ce qui fait que pour ce mutant aussi, l'efficacité catalytique n'est divisée que par deux. La raison de cette forte augmentation de k_{cat} n'est pas claire à l'heure actuelle. Dans la mesure où le résidu 476 se trouve dans le canal d'accès du solvant au site actif, cet effet pourrait être lié à une vitesse plus ou moins grande d'accès des protons au site actif.

- Le remplacement de Phe476 par une histidine ne change que très peu les constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide tiénilique (faible augmentation à la fois de la K_m et de la k_{cat} et k_{cat}/K_m identique), ce qui pourrait suggérer que l'interaction de type π - π mise en évidence entre ce substrat aromatique et Phe476 serait conservé avec His476. Ceci n'est par contre pas vrai dans le cas de l'hydroxylation du diclofénac pour laquelle on constate une augmentation de K_m importante ($\times 5$).

- Le remplacement de Phe476 par un tryptophane conduit à une forte diminution de l'efficacité catalytique de l'enzyme pour les deux substrats étudiés., vraisemblablement à cause de l'encombrement plus important du nouveau résidu. On note aussi une très forte chute de l'activité catalytique après remplacement de Phe476 par des acides aminés chargés (R ou E).

- Enfin, tous les mutants obtenus présentent une **régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac très modifiée, intermédiaire entre celle du CYP2C9 (4'-hydroxylation presque exclusive) et celle du CYP2C8 (5-hydroxylation légèrement majoritaire)**. Ces résultats mettent clairement en évidence le rôle clé du résidu Phe476 dans le positionnement du diclofénac dans le site actif, qui conduit à une présentation quasi exclusive du noyau dichloro-phényl à l'espèce active. A cet égard, il faut noter que les mutants à résidu 476 aromatique, F476W et F476H sont ceux qui favorisent le plus l'hydroxylation en 4' (après le CYP2C9). Par contre, ceux qui possèdent un résidu aliphatique, F476A et F476I, se rapprochent le plus du CYP2C8, qui possède lui-même une isoleucine en 476.

Ces résultats, qui soulignent l'importance de la phénylalanine 476 dans la reconnaissance et l'hydroxylation de substrats aromatiques par le CYP2C9, sont en accord avec les résultats récents sur les structures RX du complexe CYP2C5-diclofénac (Wester et al., 2003b) et du complexe CYP2C9-warfarine (Williams et al., 2003).

Annexe E : Bilan des mutations ayant un effet notable sur les propriétés catalytiques du CYP2C9

SRS	Région du CYP2C9	Mutations [ref.]	Effets	Rôle possible du résidu muté
1	Boucle B-C A proximité de l'hème	R97A [2] R97F [3] R97H [3]	4'-hydroxylation du diclofénac : Km ×13 mutant quasi-inactif, modifications structurales observées en dichroïsme circulaire 4'-hydroxylation du diclofénac : Km×45, kcat/2,5 activités de 7-hydroxylation de la (S)-warfarine et de 1-hydroxylation du pyrène très réduites (<98%). Instabilité thermique	Rôle structural, stabilisation de l'hème ?
1	Boucle B-C, Entrée du canal d'accès des substrats	R108A [2] R108F [3] R108H [3]	Activité de 4'-hydroxylation du diclofénac inférieure à 1% de la kcat du CYP2C9. Perte quasi-totale d'activité d'hydroxylation du diclofénac (substrat anionique), la (S)-warfarine (substrat à fonction polaire), conservation de 70% de l'activité d'hydroxylation du pyrène substrat apolaire. Mutant peu actif : perte d'activité >80% quel que soit le substrat. Activité d'hydroxylation du pyrène au moins 5 fois plus élevée que l'hydroxylation du diclofénac et de la warfarine. Spectre d'absorption inhabituel du P450 à l'état Fe ^{III} : type II (imidazole de l'histidine ligand de l'hème)	Interaction ionique avec les substrats
1	Boucle B-C (site actif)	V113L [4]	Mutant inactif vis-à-vis de la (S)-warfarine (effet stérique), activité d'hydroxylation de l'acide laurique peu modifiée	Interaction hydrophobe + rôle stérique
1	Boucle B-C (site actif)	F114L [4] F114I [5]	Modification des profils métaboliques de la (S) warfarine et de l'acide arachidonique. Augmentation importante des Km ou Ki de ligands aromatiques (7-hydroxylation de la (S)-warfarine : Km×13, kcat/4, 4'-hydroxylation du diclofénac : Km × 10, sulfaphénazole : Ki ×100) pas d'effet sur les constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide laurique, un substrat non-aromatique. Hydroxylation des substrats aromatiques très affectée par la mutation (très faible activité de 5-hydroxylation de l'acide tiénilique, diclofénac non métabolisé) Sulfaphénazole : Ks×500 dérivé du sulfaphénazole (phényle-pyrazole remplacé par cyclohexyle-pyrazole) : Ks/75	π-stacking avec les noyaux aromatiques des substrats
-	Fin de l'hélice F	L208V [1]	4'-hydroxylation du diclofénac : kcat / 25 5-hydroxylation de l'acide tiénilique : activité/5	Interactions membranaires de surface, transfert des protons
-	Boucle F-G	S210T [1]	4'-hydroxylation du diclofénac : kcat / 22 5-hydroxylation de l'acide tiénilique : activité/4	
-	Hélice G'	S220P [1]	4'-hydroxylation du diclofénac : kcat / 10	Interaction avec la réductase
-	Hélice G	K241E [1]	5-hydroxylation de l'acide tiénilique : Km×30 4'-hydroxylation du diclofénac : Km×4, kcat / 6	Reconnaissance des substrats directe ou via des molécules d'eau
-	Hélice G	<i>R244C</i> [6]	Diminution des kcat dépendante du rapport P450 réductase/P450	Interaction avec la réductase

4	Hélice I Entrée canal d'accès des substrats	S286N [1]	5-hydroxylation de l'acide tiénilique : $K_m \times 20$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 10$, $k_{cat} / 2$?
4	Hélice I Entrée canal substrats	E288V [1]	Pas d'effet sur les constantes cinétiques d'hydroxylation de l'acide tiénilique. Inhibition par excès de substrat avec le diclofénac	?
4	Hélice I Entrée canal d'accès des substrats	N289I [1] (N289I, S286N) (N289L, E288V, S286N)	5-hydroxylation de l'acide tiénilique : $K_m \times 20$, $k_{cat}/4$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 10$, $k_{cat}/5$ (comme k_{cat} CYP2C19) 5-hydroxylation de l'acide tiénilique : $K_m \times 30$, $k_{cat}/3$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 8$, $k_{cat}/2$ 5-hydroxylation de l'acide tiénilique : $K_m \times 40$, $k_{cat}/9$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 12$, $k_{cat}/30$ triple mutant à propriétés catalytiques proche de celles du CYP2C19 pour les deux substrats	? sélection des substrats au niveau du canal d'accès
4	Hélice I (site actif)	D293E D293A [7] D293N ou D293Q [7]	Peu d'effets 1'-hydroxylation du tolbutamide (fonction polaire) : $K_m \times 5$, $k_{cat}/11$ 4'-hydroxylation du diclofénac (anionique) : $K_m \times 10$, $k_{cat}/530$ O-déméthylation du dextrometorphan (N basique) : $K_m \times 3$, $k_{cat}/60$ Mauvaise incorporation de l'hème	Rôle structural + stabilisation des fonctions polaires des substrats (par liaisons hydrogènes)
5	Fin de l'hélice K (site actif)	<i>I359L</i> [8] [9] <i>I359T</i> [10]	7-hydroxylation de la (S)-warafarine : $K_m \times 3$, $k_{cat}/3$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 6$, $k_{cat}/1,5$ 4'-hydroxylation du flurbiprofen : $K_m \times 6$, $k_{cat}/2$ 4'-hydroxylation du cyclophosphamide : $K_m \times 3$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $k_{cat}/2,4$	positionnement relatif de la boucle par rapport à l'hélice I. Influence indirecte sur la fixation des substrats
5	Boucle 360- 367	D360E [11]	7-hydroxylation de la (S)-warafarine : $K_m \times 12$ 4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 5$ 1-hydroxylation de l'acide laurique : $K_m \times 3$, $k_{cat}/4$?
5	Boucle 360-367 (site actif)	L362A [12] L362I [12] [1]	4'-hydroxylation du diclofénac : $K_m \times 8$, $k_{cat}/3$ 4'-hydroxylation du diclofénac : comme le CYP2C9	Interaction hydrophobe avec les substrats
5	Boucle (site actif)	S365A S365G [5]	Pas d'inactivation suicide par l'acide tiénilique (AT)	Fixation covalente du métabolite électrophile de l'AT
6	Boucle C-terminale (site actif)	F476I [5]	5-hydroxylation de l'acide tiénilique : $K_m \times 9$ et $k_{cat} \times 9$ 4'-hydroxylation diclofénac : $K_m \times 4$, $k_{cat} \times 2$ 5-hydroxylation du diclofénac : K_m proche de celle du CYP2C8, k_{cat} élevée Changement de régiosélectivité d'hydroxylation du diclofénac : K_m type 2C8 pour ce substrat, k_{cat} beaucoup plus élevées Sulfaphénazole : $K_i \times 37$	π -stacking avec les noyaux aromatiques des substrats

Tableau 50 : Liste des mutations ayant un effet notable sur les propriétés catalytiques du CYP2C9. Les variants alléliques sont indiqués en italique. Les références sont indiquées par les numéros suivants : [1] mutants 2C9/2C19, collaboration UMR8601/JA. Goldstein (résultats non publiés) [2] Ridderstrom, 2000 #117 [3] (Dickmann et al., 2003) [4] (Haining et al., 1999) [5] (Melet et al., 2003) [6] (Crespi and Miller, 1997) [7] (Flanagan et al., 2003) [8] (Yamazaki et al., 1998) [9] (Chang et al., 1997) [10] (Ieiri et al., 2000) [11] (Dickmann

et al., 2001) [12] (Afzelius et al., 2001). Les régions du CYP2C9 ont été déterminées à partir de la structure RX de l'enzyme (Williams et al., 2003).

Annexe F : Etude de chimères 2C8/2C9

Malgré 89,4% d'homologie de séquence protéique, les CYP2C8 et CYP2C9 ont chacun des substrats spécifiques. Pour identifier les différences de séquences responsables des spécificités du CYP2C8, nous avons entrepris la construction de deux types de chimères 2C8/2C9.

- 1) des chimères CYP2C9/2C8 afin d'identifier les régions minimales qui confèrent une activité de type CYP2C8 au CYP2C9.
- 2) des chimères inverses CYP2C8/2C9 (dans lesquelles un SRS du CYP2C8 est remplacé par le SRS correspondant du CYP2C9) afin de déterminer les zones importantes pour l'activité de l'enzyme.

F.1 Construction et expression des chimères CYP2C8/CYP2C9

Pour construire des chimères CYP 2C8/2C9 nous avons mis à profit l'efficacité du système de recombinaison de *S. cerevisiae* et sa capacité à faire de la recombinaison homologue (entre zones identiques) et homéologue (entre zones non identiques de forte homologie de séquence).

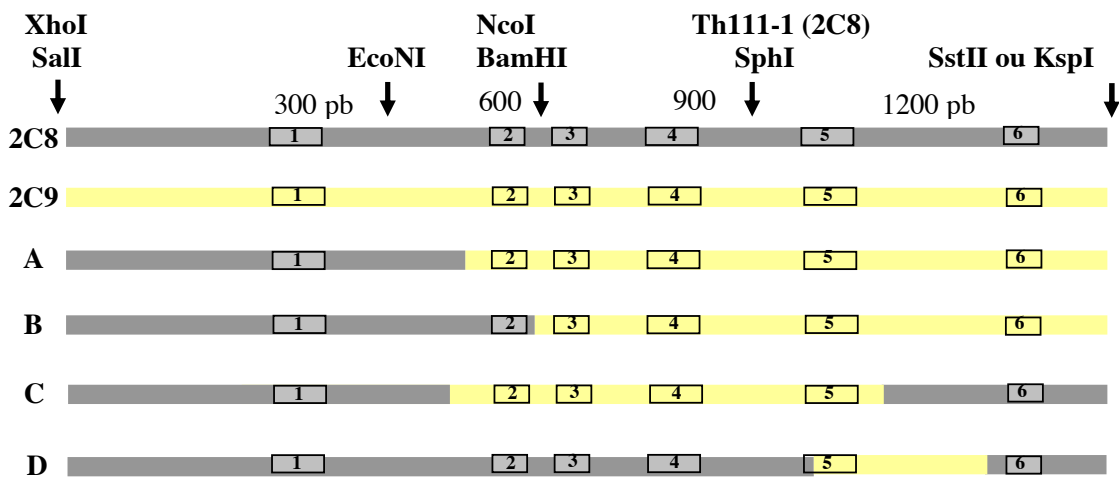


Figure 76 : Représentation schématique des séquences des chimères CYP2C8/CYP2C9. Les sites de restriction uniques présents le long des séquences du CYP2C8 et CYP2C9 sont indiqués par des flèches. Les SRS prédits par Gotoh sont indiqués par des numéros de 1 à 6. Chimère A= 2C9/2C8¹⁻¹⁸⁰, Chimère B= 2C9/2C8¹⁻²⁰⁸, Chimère C= 2C9/2C8^{1-168 et 388-490}, Chimère D= 2C8/2C9³⁶⁰⁻⁴³¹ ; pb : paire de bases.

Quatre chimères (Figure 76) ont été construites en suivant le même protocole. Deux fragments d'ADN sont obtenus par digestion enzymatique des plasmides p2C9DP60 et p2C8DP60 suivie d'une purification sur gel Low Melting. Ces fragments sont ensuite co-transformés dans la souche de levure W(N), qui effectue la recombinaison. L'ADN des transformants est alors analysé par restriction après passage dans *E. coli*, puis séquencé et exprimé dans la souche W(R). W(N) a une meilleure efficacité de recombinaison que W(R) c'est pourquoi nous avons choisi cette souche pour la construction des ADN chimériques.

Les chimères A et B ont été préparées en mélangeant les ADN suivants (cf. Figure 77) :

- Le plasmide p2C9DP60 a été digéré par XhoI et EcoNI. XhoI coupe dans le promoteur GAL10-CYC1 en position -400 et EcoNI en +453 du 2C9. Le plus gros fragment a été purifié sur gel Low Melting.
- Le plasmide p2C8DP60 a été digéré par NcoI qui coupe en amont du promoteur GAL10-CYC1 et au milieu du 2C8 en position +631. Le plus petit fragment a été isolé.

La recombinaison a eu lieu au niveau du promoteur GAL10-CYC1 dans des zones d'homologie et entre les positions 450 et 631 du CYP2C8 et du CYP2C9, dans des zones de forte homologie.

La chimère C a été construite par recombinaison entre un fragment de CYP2C8 et un fragment de CYP2C9 obtenus de la façon suivante :

- Le plasmide p2C9DP60 a été digéré par EcoRI qui coupe la plasmide en +1474 et +10724. Le plus petit fragment a été purifié sur gel Low Melting
- Le plasmide p2C8DP60 a été digéré par EcoNI et Th111-1. EcoNI coupe en +453 et Th111-1 en +1078. Le plus gros fragment a été purifié puis co-transformé dans W(N) avec le fragment (-7, +1474) de p2C9DP60.

Enfin, en voulant construire une chimère (SRS1 2C9/SRS2 à SRS5 2C8/ SRS1 2C9), nous avons obtenu la chimère D. Le plasmide p2C8DP60 a été digéré par AgeI qui coupe en +1090 et +10220. Le p2C9DP60 a été digéré par EcoNI (+453) et Bsu36I (+778). Le fragment (-511, +1090) de p2C8DP60 et le gros fragment de p2C9DP60 compris entre les positions (+778, +453) ont été recombinés dans W(N).

Ces chimères, une fois construites, ont été exprimées dans W(R). Les caractéristiques des différentes préparations microsomales sont présentées ci-dessous.

CYP	P450 (pmol/mg)	Activité réductase nmol cyt.c réduit/min/mg prot.	[réductase]/[P450]
2C8	60 ± 30	800 ± 300	1,8
2C9	40 ± 15	510 ± 130	1,7
A	47	900	2,6
B	51	890	2,3
C	8	318	5
D	81	600	1

Tableau 51 : Caractérisation biochimique des microsomes de levure contenant le CYP2C8, le CYP2C9 et les chimères A, B, C et D : quantité de P450, activité réductase et rapport molaire réductase/P450. Les valeurs indiquées pour les CYP2C8 et CYP2C9 sont les moyennes ± l'écart type de trois mesures effectuées sur différentes préparations microsomales. Les valeurs indiquées pour les chimères correspondent aux moyennes de deux mesures réalisées sur une même préparation, les variations entre les deux mesures étant inférieures à 10%.

Les microsomes correspondant aux chimères A, B et D ont une quantité de P450 et une activité réductase comparables aux valeurs observées pour les préparations de CYP2C8 et CYP2C9 sauvages (Tableau 51). Le remplacement des SRS 1 et 6 du CYP2C9 par ceux du CYP2C8 (chimère C) affecte le niveau d'expression en P450. Toutefois, le rapport molaire réductase/P450 de 5 indique que cette chimère a suffisamment de réductase pour assurer son fonctionnement catalytique.

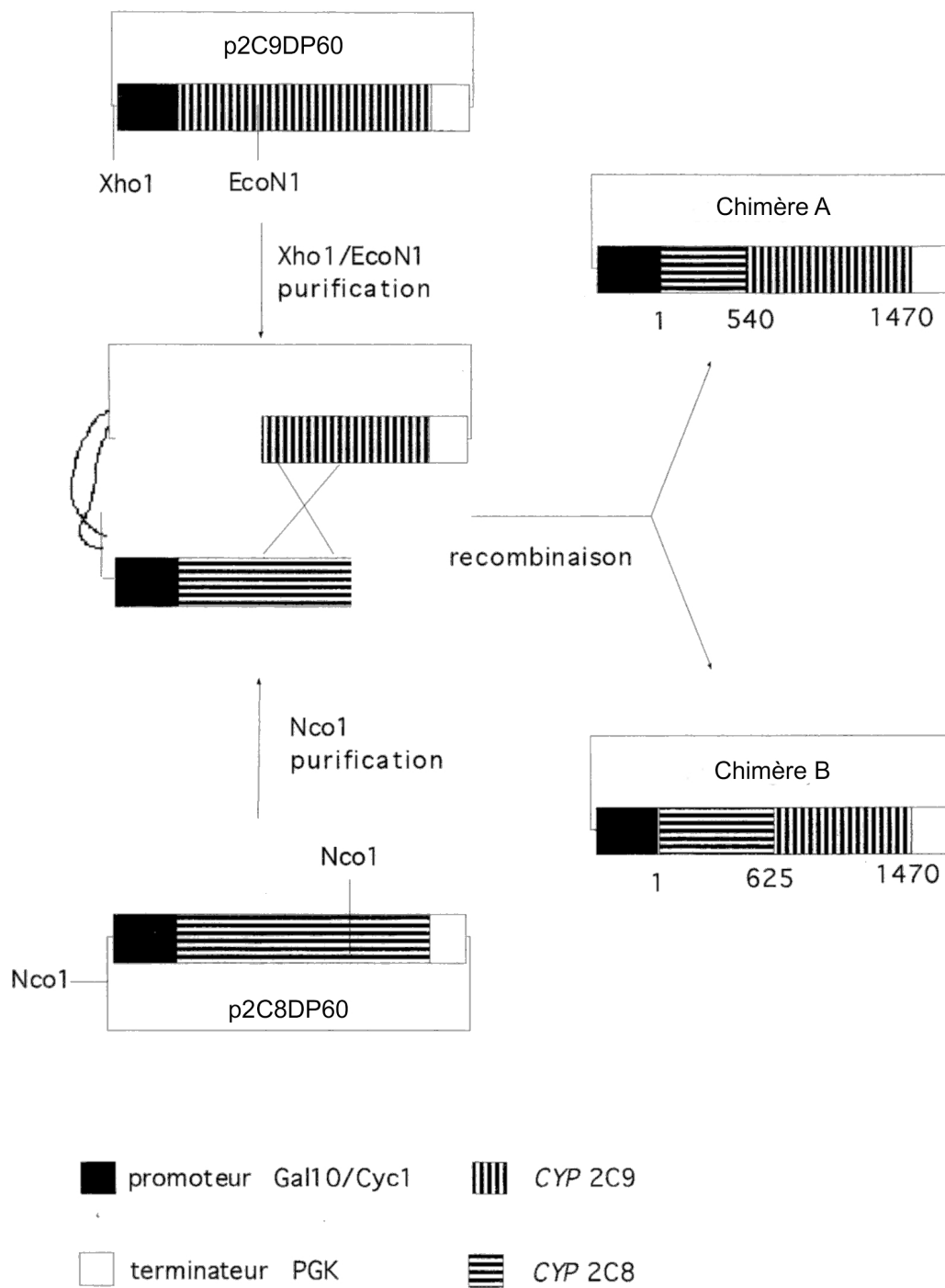


Figure 77 : Construction des chimères A et B par recombinaison homologue dans la levure *W(N)*.

F.2 Propriétés catalytiques des différentes chimères

CYP	6 α -hydroxylation du taxol 50 μ M	5-hydroxylation de la fluvastatine 100 μ M	Hydroxylation du diclofénac 1 mM	
			4'OH	5OH
2C8	7,4 \pm 0,8	4,7 \pm 0,5	0,45 \pm 0,05	1,1 \pm 0,1
2C9	nd	< 0,1	53 \pm 10	<0,1
A	nd	nd	nd	1 \pm 0,1
B	nd	nd	nd	0,04 \pm 0,01
C	nd	0,45 \pm 0,05	nd	0,5 \pm 0,1
D	nd	3 \pm 0,5	0,8 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1

Tableau 52 : Activités d'hydroxylation du taxol 50 μ M, de la fluvastatine 100 μ M et du diclofénac 1 mM par le CYP2C8 et les chimères A, B, C, D. Les activités sont exprimées en min^{-1} (moyennes \pm l'écart type sur trois mesures); nd : métabolite non détecté.

CYP	4'-hydroxylation du diclofénac		5-hydroxylation du diclofénac	
	Km (μ M)	kcat (min^{-1})	Km (μ M)	kcat (min^{-1})
2C8	109 \pm 3	0,9 \pm 0,1	83 \pm 11	3,2 \pm 0,4
2C9	15 \pm 5	53 \pm 10	-	<0,1
A	nd	nd	665 \pm 58	1,7 \pm 0,1
D	251 \pm 34	1 \pm 0,1	177 \pm 17	2,5 \pm 0,1

Tableau 53 : Constantes cinétiques d'hydroxylation du diclofénac par le CYP2C8 et les chimères A et C (moyennes \pm l'écart type sur trois mesures); nd : métabolite non détecté.

Les propriétés catalytiques des chimères ont été comparées à celles des enzymes sauvages CYP2C8 et CYP2C9, en mesurant trois activités :

- La 4'- et la 5-hydroxylation du diclofénac, substrat commun aux CYP2C8 et CYP2C9 mais métabolisé par ces deux enzymes avec des régiosélectivités distinctes (cf. Introduction I.D.5)
- La 6 α -hydroxylation du taxol et la 5-hydroxylation de la fluvastatine, spécifiques du CYP2C8.

Ces activités ont été mesurées à une seule concentration en substrat, très largement supérieure à la Km (Tableau 52). Les constantes cinétiques d'hydroxylation du diclofénac ont été mesurées lorsque l'activité de la chimère était suffisante et sont présentées dans le tableau Tableau 53.

La chimère C est peu exprimée et de plus peu active envers les trois substrats testés. Les résultats concernant cette chimère sont donc à prendre avec précaution. Sa faible activité pourrait témoigner d'une désorganisation structurale et non du rôle d'éventuels résidus dans la reconnaissance de substrats.

Hydroxylation du diclofénac :

La substitution des résidus 360-431 du CYP2C8 (contenant les résidus 360-370 du SRS5) par ceux du CYP2C9 (chimère D) a peu d'effet sur l'hydroxylation du diclofénac par cette enzyme. Les Km de 4' et 5-hydroxylation sont multipliées par deux par rapport au CYP2C8 sauvage alors que les kcat ne sont pas modifiées. D'après ces résultats, **les résidus 360-370 du SRS5 jouent vraisemblablement un rôle mineur dans la reconnaissance régiosélective du diclofénac par le CYP2C8.**

L'oxydation du diclofénac par les chimères A, B, C conduit à la formation d'un seul métabolite détectable dans nos conditions d'analyse : le 5-hydroxydiclofénac. **Le remplacement des résidus N-terminaux 1-180 du CYP2C9 (incluant le SRS1) par ceux du CYP2C8 fait perdre la spécificité de 4'-hydroxylation au CYP2C9** (chimère A). La chimère A possède alors une efficacité catalytique de 5-hydroxylation 20 fois inférieure à celle du CYP2C8 et n'a aucune activité 4'-hydroxylase détectable. Ce résultat va dans le sens de nos expériences de mutagenèse sur le CYP2C9 qui ont montré le rôle capital du résidu 114 du SRS1 dans la spécificité de substrats de cette isoforme. (Melet et al., 2003). Les substitutions cumulées des SRS1 et SRS2 du CYP2C9 ont des conséquences encore plus drastiques puisque la chimère B n'a quasiment plus d'activité d'hydroxylation du diclofénac. Enfin, la chimère C est également moins active que la chimère A : les substitutions cumulées des SRS1 et SRS6 accentuent la perte d'activité hydroxylase vis-à-vis de ce substrat.

5-hydroxylation de la fluvastatine :

La substitution de la partie N-terminale du CYP2C9 par la partie N-terminale du CYP2C8 ne suffit pas à conférer une activité de 5-hydroxylation de la fluvastatine (chimères A et B). Par contre, une légère activité hydroxylase est observée avec la chimère C (comprenant les SRS1 et SRS6 du CYP2C8). **La partie C-terminale du CYP2C8 pourrait donc jouer un rôle dans la reconnaissance et l'oxydation de ce substrat.** Notre étude de mutagenèse sur le CYP2C8 montre que les mutants du SRS6, K474N et I476F, ont des efficacités catalytiques divisées par 3 (surtout à cause d'une diminution de kcat) ce qui conforte notre hypothèse (cf. III.B.7). Enfin, la chimère D (2C8/2C9³⁶⁰⁻⁴³¹) conserve 65% de l'activité 5-hydroxylase du CYP2C8. **Les résidus 360-370 du SRS5 du CYP2C8 ne semble donc pas jouer un rôle majeur pour l'hydroxylation de ce substrat.**

6a-hydroxylation du taxol :

Aucune chimère ne métabolise le taxol dans nos conditions d'analyse. Les parties N-terminale (SRS1 et SRS2 inclus) ou C-terminale (SRS6 inclus) du CYP2C8 ne sont pas suffisantes pour conférer une activité hydroxylase du taxol aux chimères A, B ou C.

La substitution des résidus 360-431 du CYP2C8 par ceux du CYP2C9 (chimère D) supprime l'activité hydroxylase du taxol alors que les activités hydroxylases de la fluvastatine et du diclofénac sont en grande partie conservées. Certains résidus de cette région 360-431 pourraient donc jouer un rôle important dans la reconnaissance du taxol par le CYP2C8. 11 acides aminés diffèrent entre le CYP2C8 et le CYP2C9 dans cette partie de séquence (cf. Tableau 54). Parmi ces résidus figurent trois acides aminés du SRS5 (362, 365 et 366) qui sont des cibles potentielles pour une étude de mutagenèse. Ridderstorm et al ont identifié les acides aminés 362 et 366 comme résidus importants pour la sélectivité du CYP2C8, par une analyse GRID/CPCA de modèles de CYP2C humains (Ridderstrom et al., 2001). **Cette étude conforte l'hypothèse d'un rôle des résidus 362 et 366 dans la reconnaissance du taxol par le CYP2C8.**

N°résidu	362	365	366	372	390	398	405	410	415	416	423
CYP2C8	Val	Gly	Val	Thr	Leu	Asp	Asn	Gly	Lys	Asn	Asp
CYP2C9	Leu	Ser	Leu	Cys	Ser	Asn	Glu	His	Glu	Gly	Glu

Tableau 54 : Liste des résidus qui diffèrent entre le CYP2C8 et le CYP2C9 dans la partie de séquence 360-431.

Ces données sur 4 chimères CYP2C8/CYP2C9 nous permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

- La partie 360-431 du CYP2C8, qui inclut les résidus 360-370 du SRS5, semble nécessaire à la reconnaissance du taxol alors qu'elle paraît nettement moins essentielle pour l'hydroxylation de la fluvastatine ou du diclofénac.
- La reconnaissance spécifique du taxol semble particulièrement sensible à des changements de séquence du CYP2C8. Ainsi, aucune chimère ne métabolise ce substrat. Le volumineux taxol établit certainement des interactions multiples au sein du site actif, impliquant plusieurs voire tous les SRS.
- Les chimères A et C diffèrent dans leur partie C-terminale. La chimère A n'a pas d'activité 5-hydroxylase de la fluvastatine alors que la chimère C est faiblement active. La partie C-terminale du SRS6 pourrait donc jouer un rôle dans la reconnaissance et l'oxydation de la fluvastatine.

Pour avoir des informations plus conséquentes, il aurait fallu poursuivre cette étude sur davantage de chimères et construire éventuellement des mutants de chimères. Cela demande du temps et les résultats ne sont pas garantis; en effet les chimères que nous avons obtenues sont globalement peu actives ou faiblement exprimée (chimère C). De plus, les données sur des chimères peuvent être difficiles à interpréter car plusieurs résidus sont modifiés en même temps et seul un phénomène global est observable.

Fin 2001, nous disposions d'un modèle de CYP2C8 construit au laboratoire par Cristina Marques qui nous permettait de cibler des résidus à muter. Nous avons alors décidé d'arrêter prématurément ces expériences pour privilégier l'étude de mutants ponctuels.

CHAPITRE VII : Bibliographie

- Afzelius, L., Zamora, I., Ridderstrom, M., Andersson, T. B., Karlen, A., and Masimirembwa, C. M. (2001). Competitive CYP2C9 inhibitors: enzyme inhibition studies, protein homology modeling, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *Mol Pharmacol* 59, 909-919.
- Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P. S., Gelboin, H. V., and Gonzalez, F. J. (1990). Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4790-4793.
- Attar, M., Dong, D., Ling, K. H., and Tang-Liu, D. D. (2003). Cytochrome P450 2C8 and flavin-containing monooxygenases are involved in the metabolism of tazarotenic acid in humans. *Drug Metab Dispos* 31, 476-481.
- Barnes, H. J. (1996). Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 272, 3-14.
- Barnes, H. J., Jenkins, C. M., and Waterman, M. R. (1994). Baculovirus expression of bovine cytochrome P450c17 in Sf9 cells and comparison with expression in yeast, mammalian cells, and *E. coli*. *Arch Biochem Biophys* 315, 489-494.
- Bauersachs, J., Hecker, M., and Busse, R. (1994). Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br J Pharmacol* 113, 1548-1553.
- Beaune, P., Dansette, P. M., Mansuy, D., Kiffel, L., Finck, M., Amar, C., Leroux, J. P., and Homberg, J. C. (1987). Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 551-555.
- Beaune, P., Pessayre, D., Dansette, P., Mansuy, D., and Manns, M. (1994). Autoantibodies against cytochromes P450: role in human diseases. *Adv Pharmacol* 30, 199-245.
- Bell, P. H., and Roblin, R. O. (1942). Studies in chemotherapy: A theory in the relation of structure activity of sulfanilamide type compounds. *J Am Chem Soc* 64, 2905-2911.
- Bellamine, A., Gautier, J. C., Urban, P., and Pompon, D. (1994). Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability. *Eur J Biochem* 225, 1005-1013.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Campbell, W. B., and Harder, D. R. (1999). Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res* 84, 484-488.
- Chang, T. K., Yu, L., Goldstein, J. A., and Waxman, D. J. (1997). Identification of the polymorphically expressed CYP2C19 and the wild-type CYP2C9-ILE359 allele as low-K_m catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation. *Pharmacogenetics* 7, 211-221.

- Clark, B. J., and Waterman, M. R. (1991). The hydrophobic amino-terminal sequence of bovine 17 alpha-hydroxylase is required for the expression of a functional hemoprotein in COS 1 cells. *J Biol Chem* 266, 5898-5904.
- Cooper, J. R., Levin, S., Narashimulu, S., Rosenthal, O., and Estabrook, R. W. (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400-403.
- Correia, M. A., Farrell, G. C., Olson, S., Wong, J. S., Schmid, R., Ortiz de Montellano, P. R., Beilan, H. S., Kunze, K. L., and Mico, B. A. (1981). Cytochrome P-450 heme moiety. The specific target in drug-induced heme alkylation. *J Biol Chem* 256, 5466-5470.
- Cosme, J., and Johnson, E. F. (2000). Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding. *J Biol Chem* 275, 2545-2553.
- Cosme, J., and Johnson, E. F. (2002). Analyzing binding of N-terminal truncated, microsomal cytochrome P450s to membranes. *Methods Enzymol* 357, 116-120.
- Crespi, C. L., Langenbach, R., and Penman, B. W. (1993). Human cell lines, derived from AHH-1 TK+/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology* 82, 89-104.
- Crespi, C. L., and Miller, V. P. (1997). The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 7, 203-210.
- Daikh, B. E., Lasker, J. M., Raucy, J. L., and Koop, D. R. (1994). Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9. *J Pharmacol Exp Ther* 271, 1427-1433.
- Dain, J. G., Fu, E., Gorski, J., Nicoletti, J., and Scallen, T. J. (1993). Biotransformation of fluvastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos* 21, 567-572.
- Davydov, R., Makris, T. M., Kofman, V., Werst, D. E., Sligar, S. G., and Hoffman, B. M. (2001). Hydroxylation of camphor by reduced oxy-cytochrome P450cam: mechanistic implications of EPR and ENDOR studies of catalytic intermediates in native and mutant enzymes. *J Am Chem Soc* 123, 1403-1415.
- De Groot, M. J., Alex, A. A., and Jones, B. C. (2002). Development of a combined protein and pharmacophore model for cytochrome P450 2C9. *J Med Chem* 45, 1983-1993.
- de Waziers, I., Cugnenc, P. H., Yang, C. S., Leroux, J. P., and Beaune, P. H. (1990). Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 387-394.
- Delaforge, M., Jaouen, M., and Mansuy, D. (1983). Dual effects of macrolide antibiotics on rat liver cytochrome P-450. Induction and formation of metabolite-complexes: a structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 32, 2309-2318.

- Deprez, E., Gerber, N. C., Di Primo, C., Douzou, P., Sligar, S. G., and Hui Bon Hoa, G. (1994). Electrostatic control of the substrate access channel in cytochrome P-450cam. *Biochemistry* 33, 14464-14468.
- Dickmann, L. J., Jones, J. P., and Rettie, A. E. (2003). Differential roles of R97, R108 and D293 in enzyme stability and substrate specificity of CYP2C9. Paper presented at: 8th European ISSX meeting (Dijon, France).
- Dickmann, L. J., Rettie, A. E., Kneller, M. B., Kim, R. B., Wood, A. J., Stein, C. M., Wilkinson, G. R., and Schwarz, U. I. (2001). Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol* 60, 382-387.
- Ding, X., and Kaminsky, L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 149-173.
- Doehmer, J., and Oesch, F. (1991). V79 Chinese hamster cells genetically engineered for stable expression of cytochromes P450. *Methods Enzymol* 206, 117-123.
- Domanski, T. L., and Halpert, J. R. (2001). Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis. *Curr Drug Metab* 2, 117-137.
- Estabrook, R. W., Cooper, J. R., and Rosenthal, O. (1963). *Biochem J* 338, 741-755.
- Eugster, H. P., Bartsch, S., Wurgler, F. E., and Sengstag, C. (1992). Functional co-expression of human oxidoreductase and cytochrome P450 1A1 in *Saccharomyces cerevisiae* results in increased EROD activity. *Biochem Biophys Res Commun* 185, 641-647.
- Fischer, V., Johanson, L., Heitz, F., Tullman, R., Graham, E., Baldeck, J. P., and Robinson, W. T. (1999). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* 27, 410-416.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., and Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401, 493-497.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Michaelis, U. R., Kiss, L., Fleming, I., and Busse, R. (2001). Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension* 38, 1427-1432.
- Flanagan, J. U., McLaughlin, L. A., Paine, M. J., Sutcliffe, M. J., Roberts, G. C., and Wolf, C. R. (2003). Role of conserved Asp293 of cytochrome P450 2C9 in substrate recognition and catalytic activity. *Biochem J* 370, 921-926.
- Fleming, I. (2000). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Trends Cardiovasc Med* 10, 166-170.
- Fulton, D., McGiff, J. C., and Quilley, J. (1998). Pharmacological evaluation of an epoxide as the putative hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 497-503.

- Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes
Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77, 493-509.
- Ged, C., Umbenauer, D. R., Bellew, T. M., Bork, R. W., Srivastava, P. K., Shinriki, N., Lloyd, R. S., and Guengerich, F. P. (1988). Characterisation of cDNAs, mRNAs and protéins related to human liver microsomal cytochrome P450-mephenytoin 4'-hydroxylase. *Biochemistry* 27, 6929-6940.
- Gerber, N. C., and Sligar, S. G. (1994). A role for Asp-251 in cytochrome P-450cam oxygen activation. *J Biol Chem* 269, 4260-4266.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425.
- Goldstein, J. A., and de Morais, S. M. (1994). Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4, 285-299.
- Gomez, D. Y., Wachter, V. J., Tomlanovich, S. J., Hebert, M. F., and Benet, L. Z. (1995). The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 58, 15-19.
- Gonzalez, F. J., and Gelboin, H. V. (1991). Human cytochromes P450: evolution, catalytic activities and interindividual variations in expression. *Prog Clin Biol Res* 372, 11-20.
- Gonzalez, F. J., Kimura, S., Tamura, S., and Gelboin, H. V. (1991). Expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Methods Enzymol* 206, 93-99.
- Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267, 83-90.
- Graham, S. E., and Peterson, J. A. (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys* 369, 24-29.
- Guengerich, F. P. (1992). Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *Faseb J* 6, 745-748.
- Guengerich, F. P. (1995). Human cytochromes P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, P. R. Ortiz de Montellano, ed. (New York, Plenum Press), pp. 473-535.
- Guengerich, F. P., and MacDonald, T. L. (1990). Mechanisms of cytochrome P-450 catalysis. *Faseb J* 4, 2453-2459.
- Ha Duong, N. T. (2001) Topologie des sites actifs des cytochromes P450 humains de la famille 2C : recherche d'inhibiteurs spécifiques, modélisation moléculaire et comparaison des cytochromes P450 2C9 et 2C19, Université Paris-sud, Orsay.

- Ha-Duong, N. T., Dijols, S., Marques-Soares, C., Minoletti, C., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2001a). Synthesis of sulfaphenazole derivatives and their use as inhibitors and tools for comparing the active sites of human liver cytochromes P450 of the 2C subfamily. *J Med Chem* *44*, 3622-3631.
- Ha-Duong, N. T., Marques-Soares, C., Dijols, S., Sari, M. A., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2001b). Interaction of new sulfaphenazole derivatives with human liver cytochrome p450 2Cs: structural determinants required for selective recognition by CYP 2C9 and for inhibition of human CYP 2Cs. *Arch Biochem Biophys* *394*, 189-200.
- Haining, R. L., Hunter, A. P., Veronese, M. E., Trager, W. F., and Rettie, A. E. (1996). Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* *333*, 447-458.
- Haining, R. L., Jones, J. P., Henne, K. R., Fisher, M. B., Koop, D. R., Trager, W. F., and Rettie, A. E. (1999). Enzymatic determinants of the substrate specificity of CYP2C9: role of B¹-C loop residues in providing the pi-stacking anchor site for warfarin binding. *Biochemistry* *38*, 3285-3292.
- Halpert, J., Naslund, B., and Betner, I. (1983). Suicide inactivation of rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol in vivo and in vitro. *Mol Pharmacol* *23*, 445-452.
- Haouzi, D., Lekehal, M., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Robin, M. A., Letteron, P., Fau, D., and Pessayre, D. (2000). Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* *32*, 303-311.
- Harris, C. C. (1989). Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* *10*, 1563-1566.
- Harris, J. W., Katki, A., Anderson, L. W., Chmurny, G. N., Paukstelis, J. V., and Collins, J. M. (1994). Isolation, structural determination, and biological activity of 6 alpha-hydroxytaxol, the principal human metabolite of taxol. *J Med Chem* *37*, 706-709.
- Haseman, C. A., Ravichandran, K. G., Peterson, J. A., and Deisenhofer, J. (1994). Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Angstroms resolution. *J Mol Biol* *236*, 1169-1185.
- Hayhurst, G. P., Harlow, J., Chowdry, J., Gross, E., Hilton, E., Lennard, M. S., Tucker, G. T., and Ellis, S. W. (2001). Influence of phenylalanine-481 substitutions on the catalytic activity of cytochrome P450 2D6. *Biochem J* *355*, 373-379.
- Hedlund, E., Gustafsson, J. A., and Warner, M. (2001). Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr Drug Metab* *2*, 245-263.
- Heinemeyer, G., Gramm, H. J., Simgen, W., Dennhardt, R., and Roots, I. (1987). Kinetics of hexobarbital and dipyrone in critical care patients receiving high-dose pentobarbital. *Eur J Clin Pharmacol* *32*, 273-277.

- Hiner, A. N., Raven, E. L., Thorneley, R. N., Garcia-Canovas, F., and Rodriguez-Lopez, J. N. (2002). Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *J Inorg Biochem* *91*, 27-34.
- Hlavica, P. (1984). On the function of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-dependent oxygenase system. *Arch Biochem Biophys* *228*, 600-608.
- Homberg, J. C., André, A., and Abuaf, N. (1984). A new anti-liver-kidney-microsome anti-LKM2 in tienilic acid induced hepatitis. *Clin Exp Immunol* *55*, 561-570.
- Hrycay, E. G., Gustafsson, J. A., Ingelman-Sundberg, M., and Ernster, L. (1976). The involvement of cytochrome P-450 in hepatic microsomal steroid hydroxylation reactions supported by sodium periodate, sodium chlorite, and organic hydroperoxides. *Eur J Biochem* *61*, 43-52.
- Hsu, A., Granneman, G. R., and Bertz, R. J. (1998). Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents. *Clin Pharmacokinet* *35*, 275-291.
- Hunter, C. A., and Sanders, J. K. M. (1990). The nature of pi-pi interactions. *J Am Chem Soc* *112*, 5525-5534.
- Hunter, C. A., Singh, J., and Thornton, J. M. (1991). Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol* *218*, 837-846.
- Hutzler, J. M., Hauer, M. J., and Tracy, T. S. (2001). Dapsone activation of CYP2C9-mediated metabolism: evidence for activation of multiple substrates and a two-site model. *Drug Metab Dispos* *29*, 1029-1034.
- Hutzler, J. M., Kolwankar, D., Hummel, M. A., and Tracy, T. S. (2002). Activation of CYP2C9-mediated metabolism by a series of dapsone analogs: kinetics and structural requirements. *Drug Metab Dispos* *30*, 1194-1200.
- Ibeanu, G. C., Ghanayem, B. I., Linko, P., Li, L. P., Pedersen, L. G., and Goldstein, J. A. (1996). Identification of residues 99, 220, and 221 of human cytochrome P450 2C19 as key determinants of omeprazole hydroxylase activity. *J Biol Chem* *271*, 12496-12501.
- Ieiri, I., Tainaka, H., Morita, T., Hadama, A., Mamiya, K., Hayashibara, M., Ninomiya, H., Ohmori, S., Kitada, M., Tashiro, N., *et al.* (2000). Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit* *22*, 237-244.
- Ingelman-Sundberg, M., and Johansson, I. (1980). Cytochrome b5 as electron donor to rabbit liver cytochrome P450LM2 in reconstituted phospholipid vesicles. *BBRC* *97*, 582-589.
- Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M., and McLellan, R. A. (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* *20*, 342-349.
- Jackson, C. J., Lamb, D. C., Marczylo, T. H., Warrilow, A. G., Manning, N. J., Lowe, D. J., Kelly, D. E., and Kelly, S. L. (2002). A novel sterol 14alpha-demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *J Biol Chem* *277*, 46959-46965.

- Jean, P. (1997) Mécanisme d'inhibition des cytochromes P450 hépatiques par les 2-aryylthiophènes et modélisation moléculaire, Paris V, Paris.
- Jean, P., Lopez-Garcia, P., Dansette, P., Mansuy, D., and Goldstein, J. L. (1996). Oxidation of tienilic acid by human yeast-expressed cytochromes P-450 2C8, 2C9, 2C18 and 2C19. Evidence that this drug is a mechanism-based inhibitor specific for cytochrome P-450 2C9. *Eur J Biochem* 241, 797-804.
- Jefcoate, C. R. (1978). Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods Enzymol* 52, 258-279.
- Jin, S., Makris, T. M., Bryson, T. A., Sligar, S. G., and Dawson, J. H. (2003). Epoxidation of olefins by hydroperoxo-ferric cytochrome P450. *J Am Chem Soc* 125, 3406-3407.
- Johnson, E. F., Wester, M. R., Schoch, G., Yano, J. K., and Stout, C. D. (2003). Structural characterization of substrate and inhibitor binding to 2C P450s. Paper presented at: 8th European ISSX meeting (Dijon, France, Drug Metabolism Reviews).
- Jounaidi, Y. (2002). Cytochrome P450-based gene therapy for cancer treatment: from concept to the clinic. *Curr Drug Metab* 3, 609-622.
- Kalb, V. F., Woods, C. W., Turi, T. G., Dey, C. R., Sutter, T. R., and Loper, J. C. (1987). Primary structure of the P450 lanosterol demethylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* 6, 529-537.
- Kalvass, J. C., Tess, D. A., Giragossian, C., Linhares, M. C., and Maurer, T. S. (2001). Influence of microsomal concentration on apparent intrinsic clearance: implications for scaling in vitro data. *Drug Metab Dispos* 29, 1332-1336.
- Kent, U. M., Juschyshyn, M. I., and Hollenberg, P. F. (2001). Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P450 structure and function. *Curr Drug Metab* 2, 215-243.
- Khan, K. K., and Halpert, J. R. (2000). Structure-function analysis of human cytochrome P450 3A4 using 7-alkoxycoumarins as active-site probes. *Arch Biochem Biophys* 373, 335-345.
- Klingenberg, M. (1958). Pigment for rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 375, 376-386.
- Klose, T. S., Blaisdell, J. A., and Goldstein, J. A. (1999). Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol* 13, 289-295.
- Lapple, F., von Richter, O., Fromm, M. F., Richter, T., Thon, K. P., Wisser, H., Griese, E. U., Eichelbaum, M., and Kivisto, K. T. (2003). Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics* 13, 565-575.
- Lee, C. A., Kadwell, S. H., Kost, T. A., and Serabjit-Singh, C. J. (1995). CYP3A4 expressed by insect cells infected with a recombinant baculovirus containing both CYP3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase is catalytically similar to human liver microsomal CYP3A4. *Arch Biochem Biophys* 319, 157-167.

- Lee, C. R., Goldstein, J. A., and Pieper, J. A. (2002). Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 12, 251-263.
- Leemann, T. D., Transon, C., Bonnabry, P., and Dayer, P. (1993). A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Drugs Exp Clin Res* 19, 189-195.
- Lehnerer, M., Schulze, J., Achterhold, K., Lewis, D. F., and Hlavica, P. (2000). Identification of key residues in rabbit liver microsomal cytochrome P450 2B4: importance in interactions with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biochem (Tokyo)* 127, 163-169.
- Lewis, D. F. (1998). The CYP2 family: models, mutants and interactions. *Xenobiotica* 28, 617-661.
- Li, H., and Poulos, T. L. (1997). The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol* 4, 140-146.
- Li, X. Q., Bjorkman, A., Andersson, T. B., Ridderstrom, M., and Masimirembwa, C. M. (2002). Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 399-407.
- Lin, H. C. J., Kobari, Y., Zhu, Y., Stemerman, M. B., and Pritchard, K. A. J. (1996). Human umbilical vein endothelial cells express P450 2C8 mRNA: cloning of endothelial P450 epoxygenase. *Endothelium* 4, 219-229.
- Lin, J. H., and Lu, A. Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 35, 361-390.
- Locuson, C. W., 2nd, Wahlstrom, J. L., Rock, D. A., and Jones, J. P. (2003). A new class of CYP2C9 inhibitors: probing 2C9 specificity with high-affinity benzobromarone derivatives. *Drug Metab Dispos* 31, 967-971.
- Lopez-Garcia, M. P., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1994). Thiophene derivatives as new mechanism-based inhibitors of cytochromes P-450: inactivation of yeast-expressed human liver cytochrome P-450 2C9 by tienilic acid. *Biochemistry* 33, 166-175.
- Lopez-Garcia, P., Dansette, P. M., Valadon, P., Amar, C., Beaune, P. H., Guengerich, F. P., and Mansuy, D. (1993). Human-liver cytochromes P-450 expressed in yeast as tools for reactive-metabolite formation studies. Oxidation activation of tienilic acid by cytochromes P-450 2C9 and 2C10. *Eur J Biochem* 213, 223-232.
- Louerat-Oriou, B., Perret, A., and Pompon, D. (1998). Differential redox and electron-transfer properties of purified yeast, plant and human NADPH-cytochrome P-450 reductases highly modulate cytochrome P-450 activities. *Eur J Biochem* 258, 1040-1049.
- Mace, K., Bowman, E. D., Vautravers, P., Shields, P. G., Harris, C. C., and Pfeifer, A. M. (1998). Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer* 34, 914-920.
- Mallat, A. (1992). [Cytochrome P-450III A, cyclosporine and drug interactions]. *Gastroenterol Clin Biol* 16, 295-298.

- Mancy, A., Antignac, M., Minoletti, C., Dijols, S., Mouries, V., Duong, N. T., Battioni, P., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1999). Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromes P450 active sites: particular efficiency and regioselectivity of P450 2Cs. *Biochemistry* 38, 14264-14270.
- Mancy, A., Broto, P., Dijols, S., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1995). The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling. *Biochemistry* 34, 10365-10375.
- Mancy, A., Dijols, S., Poli, S., Guengerich, P., and Mansuy, D. (1996). Interaction of sulfaphenazole derivatives with human liver cytochromes P450 2C: molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP 2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP 2C9. *Biochemistry* 35, 16205-16212.
- Mansuy, D., Battioni, P., and Battioni, J. P. (1989). Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases. *Eur J Biochem* 184, 267-285.
- Mansuy, D., Gans, P., Chottard, J. C., and Bartoli, J. F. (1977). Nitrosoalkanes as Fe(II) ligands in the 455-nm-absorbing cytochrome P-450 complexes formed from nitroalkanes in reducing conditions. *Eur J Biochem* 76, 607-615.
- Mansuy, D., and Renaud, J. P. (1995). Heme-thiolate proteins different from cytochromes P450 catalysing monooxygenations. In *Cytochromes P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, P. R. Ortiz de Montellano, ed. (New York, Plenum Press), pp. 537-574.
- Mansuy, D., and Ullrich, V. (1975). Proceedings: P-450 carbene-complexes. *Z Klin Chem Klin Biochem* 13, 376.
- Margolis, J. M., and Obach, R. S. (2003). Impact of non-specific binding to microsomes and phospholipid on the inhibition of cytochrome P4502D6: implications for relating in vitro inhibition data to in vivo drug interactions. *Drug Metab Dispos* 31, 606-611.
- Marques-Soares, C. (2002) Topologie des sites actifs des cytochromes P450 2C8 et 2C9 de foie humain: étude de leur spécificité de substrats et utilisation de la structure RX du CYP2C5 comme référence., Université Paris XI (Orsay).
- Marques-Soares, C., Dijols, S., Macherey, A. C., Wester, M. R., Johnson, E. F., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2003). Sulfaphenazole derivatives as tools for comparing cytochrome P450 2C5 and human cytochromes P450 2Cs: identification of a new high affinity substrate common to those enzymes. *Biochemistry* 42, 6363-6369.
- McLean, M. A., Yeom, H., and Sligar, S. G. (1996). Carbon monoxide binding to cytochrome P450BM-3: evidence for a substrate-dependent conformational change. *Biochimie* 78, 700-705.
- McSorley, L. C., and Daly, A. K. (2000). Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 60, 517-526.
- Means, G. E., and Feeney, R. E. (1990). Chemical modifications of proteins: history and applications. *Bioconjug Chem* 1, 2-12.

- Melet, A., Assrir, N., Jean, P., Pilar Lopez-Garcia, M., Marques-Soares, C., Jaouen, M., Dansette, P. M., Sari, M. A., and Mansuy, D. (2003). Substrate selectivity of human cytochrome P450 2C9: importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac and sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid. *Arch Biochem Biophys* 409, 80-91.
- Miners, J. O., Smith, K. J., Robson, R. A., McManus, M. E., Veronese, M. E., and Birkett, D. J. (1988). Tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. Kinetic characterisation and relationship to other cytochrome P-450 dependent xenobiotic oxidations. *Biochem Pharmacol* 37, 1137-1144.
- Minoletti, C. (1998) Topologie du site actif des cytochromes P450 2C9 et 2C18 : modélisation par homologie et mise au point de substrats et inhibiteurs spécifiques du P450 2C18, Université de Paris-Sud, Orsay.
- Miura, H., and Gutterman, D. D. (1998). Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* 83, 501-507.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., and Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263, 663-665.
- Monsarrat, B., Alvinerie, P., Wright, M., Dubois, J., Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Donehower, R. C., and Rowinsky, E. K. (1993). Hepatic metabolism and biliary excretion of Taxol in rats and humans. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 39-46.
- Morel, F., Beaune, P. H., Ratanasavanh, D., Flinois, J. P., Yang, C. S., Guengerich, F. P., and Guillouzo, A. (1990). Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur J Biochem* 191, 437-444.
- Muck, W. (2000). Clinical pharmacokinetics of cerivastatin. *Clin Pharmacokinet* 39, 99-116.
- Müller, G. C., and Miller, J. A. (1953). The metabolism of methylated aminoazo dyes: oxydative demethylation by rat liver homogenates. *J Biol Chem* 202, 579-587.
- Munro, A. W., Malarkey, K., McKnight, J., Thomson, A. J., Kelly, S. M., Price, N. C., Lindsay, J. G., Coggins, J. R., and Miles, J. S. (1994). The role of tryptophan 97 of cytochrome P450 BM3 from *Bacillus megaterium* in catalytic function. Evidence against the 'covalent switching' hypothesis of P-450 electron transfer. *Biochem J* 303, 423-428.
- Nadin, L., and Murray, M. (1999). Participation of CYP2C8 in retinoic acid 4-hydroxylation in human hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol* 58, 1201-1208.
- Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., and Shoun, H. (1993). Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem* 268, 8350-8355.
- Neau, E., Dansette, P. M., Andronik, V., and Mansuy, D. (1990). Hydroxylation of the thiophene ring by hepatic monooxygenases. Evidence for 5-hydroxylation of 2-arylthiophenes as a general metabolic pathway using a simple UV-visible assay. *Biochem Pharmacol* 39, 1101-1107.

- Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., and et al. (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 10, 1-14.
- Nebert, D. W., and Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155-1162.
- Nelson, D. R., and Strobel, H. W. (1987). Evolution of cytochrome P-450 proteins [published erratum appears in *Mol Biol Evol* 1988 Mar;5(2):199]. *Mol Biol Evol* 4, 572-593.
- Nelson, D. R., and Strobel, H. W. (1989). Secondary structure prediction of 52 membrane-bound cytochromes P450 shows a strong structural similarity to P450cam. *Biochemistry* 28, 656-660.
- Newcomb, M., Aebischer, D., Shen, R., Chandrasena, R. E., Hollenberg, P. F., and Coon, M. J. (2003). Kinetic isotope effects implicate two electrophilic oxidants in cytochrome p450-catalyzed hydroxylations. *J Am Chem Soc* 125, 6064-6065.
- Oeda, K., Sakaki, T., and Ohkawa, H. (1985). Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* 4, 203-210.
- Ohta, Y., Sakaki, T., Yabusaki, Y., Ohkawa, H., and Kawato, S. (1994). Rotation and membrane topology of genetically expressed methylcholanthrene-inducible cytochrome P-450IA1 lacking the N-terminal hydrophobic segment in yeast microsomes. *J Biol Chem* 269, 15597-15600.
- Ohyama, K., Nakajima, M., Nakamura, S., Shimada, N., Yamazaki, H., and Yokoi, T. (2000). A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* 28, 1303-1310.
- Omura, T., and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem* 239, 2379-2385.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Park, B. K., and Kitteringham, N. R. (1990). Drug-protein conjugation and its immunological consequences. *Drug Metab Rev* 22, 87-144.
- Park, B. K., Pirmohamed, M., and Kitteringham, N. R. (1995). The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* 68, 385-424.
- Paulsen, M. D., and Ornstein, R. L. (1995). Dramatic differences in the motions of the mouth of open and closed cytochrome P450BM-3 by molecular dynamics simulations. *Proteins* 21, 237-243.
- Payne, V. A., Chang, Y. T., and Loew, G. H. (1999). Homology modeling and substrate binding study of human CYP2C9 enzyme. *Proteins* 37, 176-190.

- Peterson, J. A., and Graham, S. E. (1998). A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure* 6, 1079-1085.
- Podust, L. M., Stojan, J., Poulos, T. L., and Waterman, M. R. (2001). Substrate recognition sites in 14 α -sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. *J Inorg Biochem* 87, 227-235.
- Poli-Scaife, S., Attias, R., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (1997). The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an NMR study. *Biochemistry* 36, 12672-12682.
- Pompon, D., Gautier, J. C., Perret, A., Truan, G., and Urban, P. (1997). Simulation of human xenobiotic metabolism in microorganisms. Yeast a good compromise between *E. coli* and human cells. *J Hepatol* 26 Suppl 2, 81-85.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., and Urban, P. (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. In *Cytochrome P450, Pt B*, E. F. Johnson, and M. R. Waterman, eds. (525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, Academic Press Inc), pp. 51-64.
- Popp, R., Bauersachs, J., Hecker, M., Fleming, I., and Busse, R. (1996). A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol* 497, 699-709.
- Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., and Kraut, J. (1985). The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* 260, 16122-16130.
- Rahman, A., Korzekwa, K. R., Grogan, J., Gonzalez, F. J., and Harris, J. W. (1994). Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* 54, 5543-5546.
- Rao, S., Aoyama, R., Schrag, M., Trager, W. F., Rettie, A., and Jones, J. P. (2000). A refined 3-dimensional QSAR of cytochrome P450 2C9: computational predictions of drug interactions. *J Med Chem* 43, 2789-2796.
- Richardson, T. H., and Johnson, E. F. (1994). Alterations of the regiospecificity of progesterone metabolism by the mutagenesis of two key amino acid residues in rabbit cytochrome P450 2C3v. *J Biol Chem* 269, 23937-23943.
- Ridderstrom, M., Masimirembwa, C., Trump-Kallmeyer, S., Ahlefeldt, M., Otter, C., and Andersson, T. B. (2000). Arginines 97 and 108 in CYP2C9 are important determinants of the catalytic function. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 983-987.
- Ridderstrom, M., Zamora, I., Fjellstrom, O., and Andersson, T. B. (2001). Analysis of selective regions in the active sites of human cytochromes P450, 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19 homology models using GRID/CPCA. *J Med Chem* 44, 4072-4081.
- Roberts, E. S., Hopkins, N. E., Alworth, W. L., and Hollenberg, P. F. (1993). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 2-ethylnaphthalene: identification of an active-site peptide. *Chem Res Toxicol* 6, 470-479.
- Rodriguez-Lopez, J. N., Lowe, D. J., Hernandez-Ruiz, J., Hiner, A. N., Garcia-Canovas, F., and Thorneley, R. N. (2001). Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish

peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle. *J Am Chem Soc* *113*, 11838-11847.

Sadeque, A. J., Eddy, A. C., Meier, G. P., and Rettie, A. E. (1992). Stereoselective sulfoxidation by human flavin-containing monooxygenase. Evidence for catalytic diversity between hepatic, renal, and fetal forms. *Drug Metab Dispos* *20*, 832-839.

Scarborough, P. E., Ma, J., Qu, W., and Zeldin, D. C. (1999). P450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues. *Drug Metab Rev* *31*, 205-234.

Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Sligar, S. G. (2000). The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* *287*, 1615-1622.

Segel, I. H. (1993). Simple inhibition systems. In *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, I. H. Segel, ed. (Wiley classics Library), pp. 100.

Shimokawa, H., Yasutake, H., Fujii, K., Owada, M. K., Nakaike, R., Fukumoto, Y., Takayanagi, T., Nagao, T., Egashira, K., Fujishima, M., and Takeshita, A. (1996). The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* *28*, 703-711.

Smith, G., Modi, S., Pillai, I., Lian, L. Y., Sutcliffe, M. J., Pritchard, M. P., Friedberg, T., Roberts, G. C., and Wolf, C. R. (1998). Determinants of the substrate specificity of human cytochrome P-450 CYP2D6: design and construction of a mutant with testosterone hydroxylase activity. *Biochem J* *331*, 783-792.

Spatzenegger, M., Liu, H., Wang, Q., Debarber, A., Koop, D. R., and Halpert, J. R. (2003). Analysis of differential substrate selectivities of CYP2B6 and CYP2E1 by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J Pharmacol Exp Ther* *304*, 477-487.

Stern, J. O., and Peisach, J. (1974). A model compound study of the CO-adduct of cytochrome P-450. *J Biol Chem* *249*, 7495-7498.

Straub, P., Ramarao, M. K., and Kemper, B. (1993). Preference for aromatic substitutions at tryptophan-120, which is highly conserved and a potential mediator of electron transfer in cytochrome P450 2C2. *Biochem Biophys Res Commun* *197*, 433-439.

Szklarz, G. D., He, Y. A., and Halpert, J. R. (1995). Site-directed mutagenesis as a tool for molecular modeling of cytochrome P450 2B1. *Biochemistry* *34*, 14312-14322.

Takahashi, H., Sato, T., Shimoyama, Y., Shioda, N., Shimizu, T., Kubo, S., Tamura, N., Tainaka, H., Yasumori, T., and Echizen, H. (1999). Potentiation of anticoagulant effect of warfarin caused by enantioselective metabolic inhibition by the uricosuric agent benzbromarone. *Clin Pharmacol Ther* *66*, 569-581.

Tanaka, M., Kanatsuka, H., Ong, B. H., Tanikawa, T., Uruno, A., Komaru, T., Koshida, R., and Shirato, K. (2003). Cytochrome P-450 metabolites but not NO, PGI₂, and H₂O₂

contribute to ACh-induced hyperpolarization of pressurized canine coronary microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1939-1948.

Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619-630.

Tracy, T. S., Rosenbluth, B. W., Wrighton, S. A., Gonzalez, F. J., and Korzekwa, K. R. (1995). Role of cytochrome P450 2C9 and an allelic variant in the 4'-hydroxylation of (R)- and (S)-flurbiprofen. *Biochem Pharmacol* 49, 1269-1275.

Truan, G., Cullin, C., Reisdorf, P., Urban, P., and Pompon, D. (1993). Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. *Gene* 125, 49-55.

Tsao, C. C., Wester, M. R., Ghanayem, B., Coulter, S. J., Chanas, B., Johnson, E. F., and Goldstein, J. A. (2001). Identification of human CYP2C19 residues that confer S-mephenytoin 4'-hydroxylation activity to CYP2C9. *Biochemistry* 40, 1937-1944.

Urban, P., Cullin, C., and Pompon, D. (1990). Maximizing the expression of mammalian cytochrome-P-450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* 72, 463-472.

Urban, P., Truan, G., Gautier, J. C., and Pompon, D. (1993). Xenobiotic metabolism in humanized yeast: engineered yeast cells producing human NADPH-cytochrome P-450 reductase, cytochrome b5, epoxide hydrolase and P-450s. *Biochem Soc Trans* 21, 1028-1034.

Veronese, M. E., Doecke, C. J., Mackenzie, P. I., McManus, M. E., Miners, J. O., Rees, D. L., Gasser, R., Meyer, U. A., and Birkett, D. J. (1993). Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily. *Biochem J* 289, 533-538.

Veronese, M. E., Mackenzie, P. I., Doecke, C. J., McManus, M. E., Miners, J. O., and Birkett, D. J. (1991). Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P4502C9. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 1112-1118.

Von Wachenfeldt, C., and Johnson, E. F. (1995). Structures of eukaryotic cytochromes P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, P. R. Ortiz de Montellano, ed. (New York, Plenum Press), pp. 183-223.

Watkins, P. B., Wrighton, S. A., Schuetz, E. G., Maurel, P., and Guzelian, P. S. (1986). Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem* 261, 6264-6271.

Waxman, D. J., Chen, L., Hecht, J. E., and Jounaidi, Y. (1999). Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev* 31, 503-522.

Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1, REVIEWS3003.

Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dansette, P. M., Mansuy, D., and Stout, C. D. (2003a). Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å Resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry* 42, 6370-6379.

- Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dijols, S., Dansette, P. M., Mansuy, D., and Stout, C. D. (2003b). Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding. *Biochemistry* 42, 9335-9345.
- White, R. E., and Coon, M. J. (1980). Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochem* 49, 315-356.
- White, R. E., Sligar, S. G., and Coon, M. J. (1980). Evidence for a homolytic mechanism of peroxide oxygen-oxygen bond cleavage during substrate hydroxylation by cytochrome P-450. *J Biol Chem* 255, 11108-11111.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. (2000a). The crystallographic structure of a mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* 5, 121.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. (2000b). Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* 81, 183-190.
- Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D., and Jhoti, H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 424, 464-468.
- Williams, R. T. (1947). *Detoxification mechanisms: the metabolism of drugs and allied organic compounds* (London, Chapman & Hall LTD).
- Wrighton, S. A., Maurel, P., Schuetz, E. G., Watkins, P. B., Young, B., and Guzelian, P. S. (1985). Identification of the cytochrome P-450 induced by macrolide antibiotics in rat liver as the glucocorticoid responsive cytochrome P-450p. *Biochemistry* 24, 2171-2178.
- Yabusaki, Y., Murakami, H., Sakaki, T., Shibata, M., and Ohkawa, H. (1988). Genetically engineered modification of P450 monooxygenases: functional analysis of the amino-terminal hydrophobic region and hinge region of the P450/reductase fused enzyme. *DNA* 7, 701-711.
- Yamazaki, H., Inoue, K., Chiba, K., Ozawa, N., Kawai, T., Suzuki, Y., Goldstein, J. A., Guengerich, F. P., and Shimada, T. (1998). Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 56, 243-251.
- Yamazaki, H., Shibata, A., Suzuki, M., Nakajima, M., Shimada, N., Guengerich, F. P., and Yokoi, T. (1999). Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 27, 1260-1266.
- Yanev, S., Kent, U. M., Pandova, B., and Hollenberg, P. F. (1999). Selective mechanism-based inactivation of cytochromes P-450 2B1 and P-450 2B6 by a series of xanthates. *Drug Metab Dispos* 27, 600-604.
- Yano, J. K., Koo, L. S., Schuller, D. J., Li, H., Ortiz de Montellano, P. R., and Poulos, T. L. (2000). Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 275, 31086-31092.

- Yasukochi, T., Okada, O., Hara, T., Sagara, Y., Sekimizu, K., and Horiuchi, T. (1994). Putative functions of phenylalanine-350 of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam. *Biochim Biophys Acta* 1204, 84-90.
- Yu, C., and Gunsalus, I. C. (1970). Crystalline cytochrome P-450cam. *Biochem Biophys Res Commun* 40, 1431-1436.
- Zeldin, D. C., DuBois, R. N., Falck, J. R., and Capdevila, J. H. (1995). Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxidase isoform. *Arch Biochem Biophys* 322, 76-86.
- Zhang, Q. Y., Dunbar, D., Ostrowska, A., Zeisloft, S., Yang, J., and Kaminsky, L. S. (1999). Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27, 804-809.
- Zhou, H. H., Anthony, L. B., Wood, A. J., and Wilkinson, G. R. (1990). Induction of polymorphic 4'-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin. *Br J Clin Pharmacol* 30, 471-475.
- Zuber, M. X., Simpson, E. R., and Waterman, M. R. (1986). Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science* 234, 1258-1261.