

ETUDE du CYTOCHROME P450 2J2 HUMAIN :Recherche de substrats et d'inhibiteurs sélectifs ;Détermination de la topologie de son site actif

Pierre Lafite

▶ **To cite this version:**

Pierre Lafite. ETUDE du CYTOCHROME P450 2J2 HUMAIN :Recherche de substrats et d'inhibiteurs sélectifs ;Détermination de la topologie de son site actif. Autre. Université René Descartes - Paris V, 2007. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-00192090⟩

HAL Id: tel-00192090

https://theses.hal.science/tel-00192090v1

Submitted on 26 Nov 2007

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.



HAL Authorization

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Ecole doctorale Médicament

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Chimie

THESE

présentée par

M. Pierre LAFITE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ETUDE du CYTOCHROME P450 2J2 HUMAIN : Recherche de substrats et d'inhibiteurs sélectifs ; Détermination de la topologie de son site actif

Soutenue le 14 Juin 2007

Membres du Jury :

Rapporteurs

Dr. Danièle WERCK
Dr. Jean-Pierre SALAUN

Examinateurs

Pr. Arnaud DUCRUIX
Dr. François ANDRE
Dr. Daniel MANSUY (Directeur de thèse)

Thèse réalisée au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques
UMR CNRS 8601 - Université Paris Descartes, sous la direction du Dr. Daniel Mansuy
Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères 75270 Paris Cedex 06

Résumé :

Ce manuscrit présente une étude fonctionnelle et structurale du cytochrome P450 2J2 humain (CYP2J2), enzyme exprimée dans les tissus cardiovasculaires, dont les rôles biologiques sont mal connus. En utilisant la terfénadone comme base structurale, qui est un composé oxydé régiosélectivement par le CYP2J2, plusieurs composés ont été synthétisés se sont révélés être des inhibiteurs affins et sélectifs du CYP2J2. En particulier, un inhibiteur très affin et compétitif (Ki = 160 nM) et deux substrats suicides efficaces du CYP2J2 (kinact/Ki 3000 L/mol/s) ont été mis en évidence. L'étude de l'oxydation de ces composés par le CYP2J2 a révélé une régiosélectivité surprenante, en faveur d'une position chimiquement moins réactive vis-à-vis des oxydations. La caractérisation du site actif du CYP2J2 et l'identification de résidus importants pour la reconnaissance des dérivés de terfénadone a pu être réalisée en construisant un modèle par homologie 3D de cette enzyme et par le docking de certains dérivés dans le site actif du CYP2J2. Enfin, une étude préliminaire des rôles biologiques possibles du CYP2J2 a été réalisée en étudiant les effets inhibiteur de ce P450. En conclusion, ce travail a permis de caractériser les premiers outils biochimiques d'étude des rôles biologiques du CYP2J2, de proposer une première topologie du site actif du CYP2J2, et d'affiner les rôles biologiques du CYP2J2.

Mots clés : Hémoprotéines, monooxygénases, terfénadine, ébastine, docking sous contraintes douces, époxydation de l'acide arachidonique.

Abstract :

This manuscript deals with the functional and structural study of human cytochrome P450 2J2 (CYP2J2), an enzyme mainly expressed in cardiovascular tissues, whose biological roles are not well-known. We used terfenadone, regioselectively oxydized by CYP2J2, as a starting point for design and synthesis of several compounds, which revealed to be affine and selective inhibitors of this P450. In particular, one affine and selective inhibitor (Ki = 160 nM) and two efficient mechanism-based inactivators (kinact/Ki 3000 L/mol/s) of CYP2J2 were identified. The study of the CYP2J2-catalyzed oxidation of some of these compounds revealed a surprising regioselectivity, favoring a less reactive position, regarding the reactivity towards oxidation. The characterization of the active site and the identification of important residues for terfenadone derivatives recognition by CYP2J2 was achieved using an homology 3D model of this enzyme, and docking of several substrates in the active site. Finally, a preliminary study of the potential biological roles of CYP2J2 was performed by looking at the inhibitory effect of several compounds involved in the vascular relaxation pathways. In conclusion, this work provides the characterization of the first biochemical tools to study the biological roles of CYP2J2, the first description of the active site topology and a study on CYP2J2 biological roles.

Keywords : Hemeproteins, monooxygenases, terfenadine, ebastine, soft-restrained dynamic docking, arachidonic acid epoxidation.

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologique et Toxicologiques de l'Université Paris Descartes. Je tiens à en remercier ses deux directeurs successifs, Daniel Mansuy et Isabelle Artaud, pour m'avoir accueilli au sein de leur unité.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail : Madame Danièle Werck, Directrice de Recherche à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, Monsieur Jean-Pierre Salaün, Directeur de Recherche à l'Université de Bretagne Occidentale de Brest et Monsieur Arnaud Ducruix, Professeur à l'Université Paris Descartes. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur François André, Chargé de Recherche au C.E.A. de Saclay, pour avoir accepté de faire partie de ce jury, pour m'avoir initié à la modélisation des cytochromes P450, pour sa gentillesse et son aide permanente, et pour les corrections apportées à ce manuscrit.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Daniel Mansuy, pour avoir dirigé ce travail, pour sa disponibilité ainsi que pour les discussions et réflexions qui ont pu faire avancer ce travail.

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans l'encadrement quotidien de Patrick Dansette, qui m'a fait partager sa passion des P450s et de la science en général. Ses connaissances (notamment bibliographiques), son aptitude à trouver une solution à tout problème (notamment technique) ainsi que sa bonne humeur (notamment ses plaisanteries) ont contribué à faire avancer rapidement ce travail dans une ambiance très agréable. Je remercie Sylvie Dijols, qui a synthétisé la grande majorité des dérivés de terfénadone ou d'ébastine présentés dans ce manuscrit. Un grand merci également à Didier Buisson et à son étudiante Amane El Ouaradi pour nous avoir fourni d'autres dérivés et pour toutes les discussions que nous avons eu.

Je voudrais remercier tous les membres de l'UMR 8601 que j'ai pu croiser dans les couloirs au cours de ces années. Je remercie particulièrement l'équipe biochimie et notamment Murielle, Adélaïde, Bruno, Marie-Agnès, Jean-Luc, Maryse, Yves, Claude et Armelle. Un grand merci également aux différents stagiaires que j'ai pu encadrer durant cette thèse : Julie, Elodie, Viviane, Nourith et Benoît.

Un grand merci à l'équipe "P450 et détoxification" du CEA de Saclay pour leur accueil : Frédérique, Véronique, Lionel, Thiên Ân et Marcel.

Je tiens à remercier Yves Lemerrer, Diana Over et Karine Lebarch pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à l'Université. Je remercie également tous les enseignants et techniciens que j'ai pu croiser lors des longues heures de cours, de préparation ou de correction.

Je voudrais remercier ici les personnes grâce à qui ces années (dans et hors du laboratoire) ont été des moments agréables de vie et d'échanges. Je remercie notamment Isabelle, Elodie, Isabelle (pour m'avoir supporté comme voisin de bureau), Constance, Magali, Sylvain (pour ses drôles de mails) et David, ainsi qu'à leur moitié respective...

Je voudrais remercier également ma famille, particulièrement mes parents, pour leur aide et leur soutien exemplaire. Enfin, je remercie du fond du coeur ma prof d'anglais préférée, Anne Sophie, pour son soutien de tous les instants, sa patience (il en faut), ses encouragements constants ainsi que pour les corrections minutieuses qu'elle a apportées à ce manuscrit.

TABLE DES MATIÈRES

Résumés **3**

Remerciements **5**

I Introduction **11**

I-1 Introduction générale sur les cytochromes P450. 13

I-1.1 Présentation des cytochromes P450. 13

I-1.2 Propriétés chimiques des P450s. 18

I-1.3 Structure des cytochromes P450. 24

I-1.4 Les cytochromes P450 humains. 34

I-2 Le cytochrome P450 2J2. 43

I-2.1 La sous-famille 2J. 43

I-2.2 Implications du CYP 2J2 dans certaines pathologies. 45

I-3 Les époxydes d'acide arachidonique. 48

I-3.1 Formation des EETs - les cytochromes P450 vasculaires. 49

I-3.2 Métabolisme et devenir des EETs. 50

I-3.3 Rôles des EETs. 51

I-3.4 La relaxation vasculaire. 51

I-4 Objectifs de cette thèse 56

II Nouveaux substrats du CYP 2J2 **57**

II-1 Recherche de substrats spécifiques du CYP 2J2. 59

II-2 Etude de la spécificité de l'ébastine, de la terfénadone et de l'astémizole vis-à-vis du CYP 2J2. 61

II-3 Article 1 : *Specific and Inhibitory Monoclonal Antibodies Against CYP 2J2 Define the Metabolism of Ebastine, Terfenadone and Astemizole in Human Tissues* 62

II-4 Conclusions de cette étude. 71

III Inhibiteurs du CYP 2J2 **75**

III-1 Vers de nouveaux inhibiteurs du CYP 2J2. 78

III-1.1 Présentation de l'article. 78

III-1.2 Article 2 : *Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human CYP 2J2* 78

III-1.3 Conclusions. 83

III-2 Synthèse et caractérisation d'inhibiteurs du CYP 2J2. 83

III-2.1 Déterminants importants pour une inhibition efficace et sélective du CYP 2J2. 83

III-2.2 Schémas de synthèse. 83

III-2.3 Inhibition du CYP 2J2 par les dérivés de la terfénadone et de l'ébastine. . . . 86

III-2.4 Sélectivité des inhibiteurs pour le CYP 2J2 par rapport aux autres P450s vasculaires. 88

III-2.5 Etude du mode d'inhibition du composé **4**. 90

III-2.6 Etude du mode d'inhibition du CYP 2J2 par le composé **14**. 92

III-2.7 Etude du mode d'inhibition du CYP 2J2 par les composés **5**, **12** et **13**. 93

III-2.8 Conclusion. 101

III-2.9 Article 3 : *Selective, competitive and mechanism-based inhibitors of human cytochrome P450 2J2* 103

IV Régiosélectivité d'oxydation et topologie du site actif **119**

IV-1 Oxydation des dérivés de la terfénadone par le CYP 2J2. 121

IV-1.1 Activités hydroxylases catalysées par le CYP 2J2. 121

IV-1.2 Régiosélectivité de l'oxydation des composés **3** à **5**. 124

IV-1.3 Importance de la cétone en *para* du groupe R dans la reconnaissance et la régiosélectivité d'hydroxylation des composés **3** à **5** par le CYP 2J2. 128

IV-1.4 Discussion. 128

IV-2 Construction et utilisation d'un modèle 3D du CYP 2J2. 130

IV-2.1 Construction d'un modèle 3D du CYP 2J2 par homologie. 130

IV-3 *Docking* des dérivés de la terfénadone dans le site actif du modèle de CYP 2J2. . . . 142

IV-3.1 Choix de la méthode de *docking* sous contraintes douces. 142

IV-3.2 Choix du canal d'entrée des substrats. 143

IV-3.3 Description des complexes enzyme-substrat obtenus. 145

IV-4 Conclusion. 149

IV-5 Article 4 : *Unusual regioselectivity and active site topology of human cytochrome P450 2J2* 151

V CYP 2J2 et relaxation vasculaire **163**

V-1 Effets des dérivés issus de la voie de biosynthèse de NO sur les CYP 2C8, 2C9 et 2J2. 165

V-2 Effets des acides arachidonique et linoléique. 167

V-3 Effets des dérivés de la cascade arachidonique sur les CYP 2C8, 2C9 et 2J2. 168

V-4 Discussion et conclusion. 170

VI Conclusion Générale **175**

VII Protocoles expérimentaux **179**

VII-1 Méthodes Biochimiques. 181

VII-1.1 Produits et enzymes employées. 181

VII-1.2 Conditions d'incubation. 184

VII-2 Méthodes Analytiques. 187

VII-2.1 Analyse des activités enzymatiques par CLHP-UV. 187

VII-2.2 Analyse par fluorimétrie de l'activité O-débenzylation de la benzyloxyrésorufine. 190

VII-2.3 CLHP-SM. 191

VII-2.4 Spectrophotométrie UV. 192

VII-2.5 Mesure de pouvoir inhibiteur. 194

VII-3 Méthodes Bioinformatiques. 196

VII-3.1 Modélisation par homologie - Optimisation du modèle. 196

VII-3.2 Calcul de volume du site actif. 197

VII-3.3 Protocole de *docking* dynamique sous contraintes. 198

Annexes **201**

A Article 5 : *Rabbit aorta converts 15-HPETE to trihydroxyeicosatrienoic acids : potential role of cytochrome P450* 203

B Analyse par HPLC/MS 215

B. 1 Composé **2** 215

B. 2 Composé **4** 216

B. 3 Composé **5** 217

B. 4 Composé **17** 219

C Construction du modèle de CYP2J2 220

C. 1 Fichier d'évènements créé par Swiss-Model 220

C. 2 Validation par WHATCHECK du modèle issu de Swiss-Model 221

Références Bibliographiques **223**

CHAPITRE I
INTRODUCTION

I-1 Introduction générale sur les cytochromes P450.

I-1.1 Présentation des cytochromes P450.

I-1.1.1 Historique de la découverte des P450s.

(a) Découverte et développement de l'étude du métabolisme des xénobiotiques.

Les débuts de l'étude du métabolisme des xénobiotiques sont profondément liés à ceux de la chimie organique *(Murphy, 2001).* Dans la première moitié du XIX^{e} siècle, F. Wölher fut le premier à démontrer l'utilité potentielle de la chimie organique en décrivant la synthèse totale de l'urée. Cette étude l'amena également à comprendre les transformations biochimiques des composés exogènes qui se produisent dans les organismes vivants. A la suite de ses travaux, la première étude de métabolisme chez l'homme fut réalisée par A.Ure en 1841 *(Ure, 1841),* qui montra la conversion de l'acide benzoïque en acide hippurique. Ce résultat a ensuite été confirmé par W. Keller en 1842 *(Keller, 1842),* qui démontra la formation d'un adduit hydrophile entre l'acide benzoïque et un composé endogène, la glycine (Figure I.1).

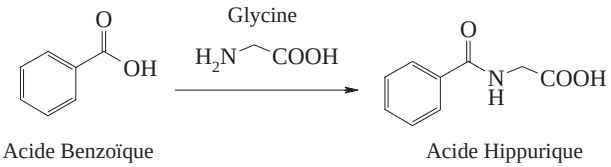


Figure I.1 – **Détoxification de l'acide benzoïque chez l'homme**.

L'étude menée en 1867 par O. Schultzen et B. Naunyn sur la tranformation de composés dérivés du benzène chez le chien démontra la capacité de l'organisme à oxyder ces dérivés ingérés *(Schultzen et Naunyn, 1867).* Par la suite, en 1876, E. Baumann détecta la présence de sulfates dérivés du phénol et de l'indole dans les urines d'un chien *(Baumann, 1876).* Une étude similaire menée par O. Schmiedeberg et H. Meyer démontra que le camphre était éliminé dans les urines sous forme d'un adduit d'acide glucuronique *(Schmiedeberg et Meyer, 1879).*

Toutes ces observations ont mené R.T. Williams à énoncer les principes fondamentaux de la détoxification des xénobiotiques par les organismes vivants *(Williams, 1947).* Celle-ci s'effectue en deux étapes chimiquement différentes (figure I.2) :

- Une première phase de **fonctionnalisation** (ou **phase I**) du composé endogène permet d'introduire une fonction hydrophile. Cette fonction est ajoutée par une oxydation, mais dans certains cas, elle peut apparaître à la suite d'une hydrolyse ou d'une réduction.
- La seconde phase de **conjugaison** (ou **phase II**) consiste à former un adduit avec un composé très hydrophile, comme l'ion sulfate, le glutathion, ou l'acide glucuronique. Le composé conjugué, beaucoup plus hydrosoluble, peut ensuite être excrété de l'organisme par la voie urinaire ou biliaire.

La position intermédiaire du foie entre l'intestin et la circulation systémique a orienté l'étude du métabolisme vers cet organe. Dans cette optique, G. Müller et J. Miller démontrèrent *in vitro* l'implication des cellules hépatiques du rat dans la transformation du dimethylaminoazobenzène *(Mueller et*

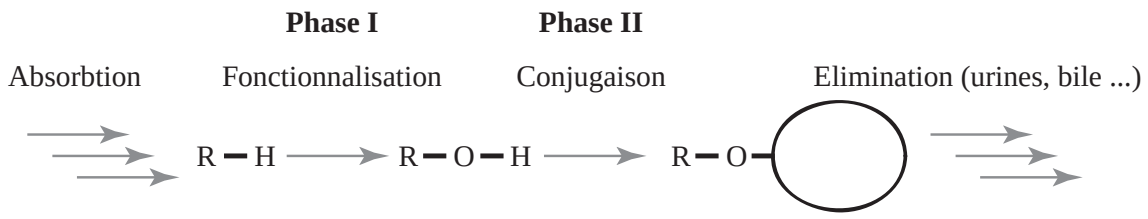


Figure I.2 – **Schéma du mécanisme de détoxification des xénobiotiques**.

Miller, 1949). A la suite de ces travaux, J. Axelrod et B. Brodie montrèrent que les enzymes membranaires hépatiques pouvaient convertir des xénobiotiques, ces réactions ne pouvant se produire qu'en présence de NADPH et d'oxygène moléculaire *(Brodie et al., 1955)*.

(b) Identification et caractérisation des cytochromes P450.

En 1958, M. Klingenberg et D. Garfinkel mirent en évidence un pigment dans des fractions microsomales hépatiques de rat et de cochon qui, réduit par le dithionite ou le NADPH, présentait une absorption caractéristique à 450 nm en présence de monoxyde de carbone *(Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958)*. Puis les travaux de T. Omura et R. Sato permirent d'élucider la structure biochimique de ces pigments, en montrant qu'il s'agissait d'hémoprotéines, appelées par la suite « cytochromes P450 » *(Omura et Sato, 1962, 1964b,a)*. Au début des années 1960, l'implication des cytochromes P450 dans la biotransformation des stéroïdes *(Estabrook et al., 1963)* puis dans l'oxydation des composés exogènes *(Cooper et al., 1965)* fut établie.

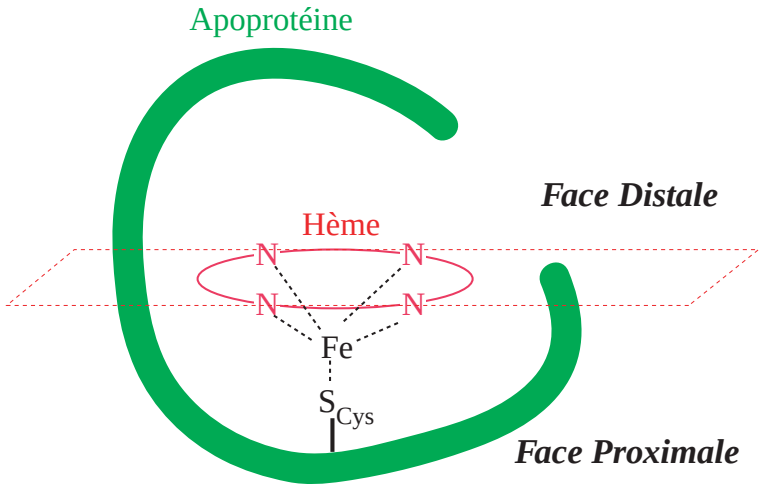


Figure I.3 – **Représentation schématique d'un cytochrome P450**.

Dès lors, durant les trois décennies qui ont séparé la première purification d'un P450 en 1970 *(Yu et Gunsalus, 1970)* de la première résolution d'une structure d'un P450 de mammifère en 2000 *(Williams et al., 2000)*, la complexité et la diversité de la superfamille des cytochromes P450 a pu être appréhendée. Ainsi, plus de 6400 gènes codant pour des cytochromes P450 ont été répertoriés en octobre 2006 dans un nombre très important d'organismes vivants : chez les bactéries, dans le monde végétal et animal.

Tous les P450s identifiés jusqu'à présent sont des hémoprotéines constituées d'un hème relié à l'apoprotéine par un groupement cystéinate complexant le fer de ce groupe prosthétique (Figure I.3).

– L'apoprotéine est composée d'une chaîne polypeptidique de masse moléculaire comprise entre 45 et 60 kDa. La diversité des P450s est naturellement liée à la séquence primaire en acides aminés de cette chaîne protéique.
– L'hème est constitué d'une protoporphyrine IX de Fer (figure I.4). Au sein des P450s, ce métal est lié aux quatre azotes pyrroliques de la porphyrine et au soufre de la cystéine axiale. Le fer peut être hexacoordiné, le sixième ligand pouvant être H_2O, CO, ou une autre molécule. Dans le cytochrome P450, le plan de l'hème définit deux régions : la face **proximale** située du côté du ligand cystéinate et la face **distale** contenant le site actif de l'enzyme.

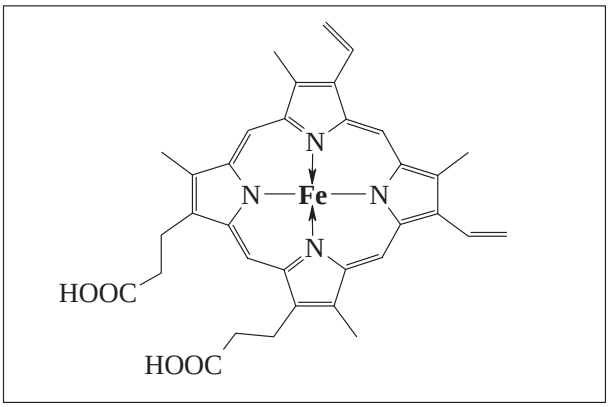


Figure I.4 – **Protoporphyrine IX de fer constituant l'hème des cytochromes P450**.

I-1.1.2 Diversité des cytochromes P450.

(a) Une multiplicité de gènes.

Le nombre de génomes séquencés augmentant exponentiellement depuis environ 10 ans, plus de 6400 gènes codants pour des cytochromes P450 ont été identifiés dans l'ensemble des organismes vivants. Il faut noter que parmi ces 6400 gènes, près de 1300 gènes codants pour des P450s ont été répertoriés en 2006. Une base de données regroupant toutes les séquences est régulièrement mise à jour sur le site de D.R. Nelson (*http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html*). De nombreux organismes vivants expriment des gènes de P450s. On retrouve ainsi des représentants de cette superfamille chez les bactéries, les champignons, les végétaux et les animaux. Le nombre de gènes codant pour des P450s est très variable selon l'espèce considérée ; on en dénombre ainsi 57 chez l'homme tandis que le riz en contient plus de 300 *(Ingelman-Sundberg, 2005)*. Dans les cas des procaryotes, les P450s sont des protéines cytosoliques, tandis que chez les eucaryotes, les P450s sont membranaires, localisés dans différents compartiments cellulaires. On distingue les cytochromes P450 mitochondriaux, les cytochromes P450 microsomaux, fixés aux membranes du réticulum endoplasmique, et les cytochromes P450 plastidiaux chez les végétaux.

Sur la base d'alignements de séquences et d'arbres phylogénétiques d'évolution, D. Nelson a émis l'hypothèse d'un gêne ancestral commun qui serait à l'origine de tous les P450s *(Nelson, 1999)*. Ce

gène commun, apparu il y a environ 3,5 milliards d'années chez les bactéries, serait très proche du seul P450 présent dans tous les organismes : le CYP 51. Ce P450 catalyse la 14-α-déméthylation du lanostérol, intermédiaire qui intervient tôt dans la chaîne de synthèse des stérols. La complexification de la biosynthèse des stérols pourrait donc être liée à la diversification de ce CYP, au fur et à mesure de l'évolution. D'autre part, l'apparition de menaces exogènes dans le monde végétal ou animal explique également la différentiation de ce CYP51 vers d'autres cytochromes P450 spécialisés dans la détoxification des xénobiotiques *(Qi et al., 2006).*

Malgré l'importante diversité génique des cytochromes P450, cette superfamille est caractérisée par deux séquences protéiques consensus (figure I.5) :

– Une première séquence, située du côté proximal de l'hème **FxxGx(R/H)xCxG**. Appelée « Cys-Pocket », elle contient la cystéine ligand du fer et est considérée comme la signature peptidique de la superfamille des P450s. Cette séquence participe au maintien de l'hème au sein de l'apoprotéine (voir partie I-1.3).
– Une seconde séquence, du côté distal **(G/A)Gx(E/D)T**, moins bien conservée au sein des P450s, qui joue un rôle dans l'activation de l'oxygène moléculaire lors de la catalyse (voir paragraphe I-1.2.2).

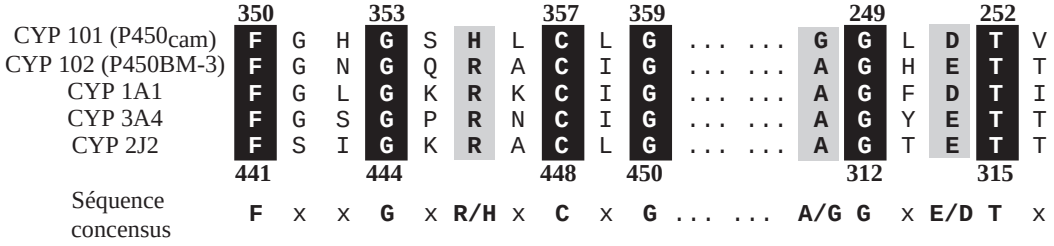


Figure I.5 – **Séquences concensus caractéristiques des cytochromes P450**.

Du fait du nombre important de P450s exprimés dans le monde vivant, une nomenclature en famille et sous-famille basée sur l'identité de séquence a été élaborée. Pour que deux P450s soient membres d'une même famille, leur identité de séquence doit être de plus de 40 % ; pour une même sous-famille, elle doit être supérieure à 55 %. La nomenclature veut que la famille soit indiquée par un chiffre arabe suivi d'une lettre correspondant à la sous-famille, puis un chiffre identifiant le P450 individuellement. Ainsi, le cytochrome P450 dénommé CYP 2J2 appartient à la famille 2, sous-famille J, et est le second représentant de cette sous-famille.

(b) Une diversité des réactions catalysées.

Une des particularités des cytochromes P450 est leur capacité à catalyser une multitude de réactions de monooxygénation (figure I.6), dont l'hydroxylation est la plus répandue. Ces réactions de monoxygénation nécessitent la présence d'oxygène moléculaire et d'un donneur d'électrons et de protons. Par ailleurs, des réactions de déshydratation, des isomérisations et des réductions ont aussi été observées *(Ortiz de Montellano, 2005; Guengerich, 2001; Mansuy et Battioni, 2000).*

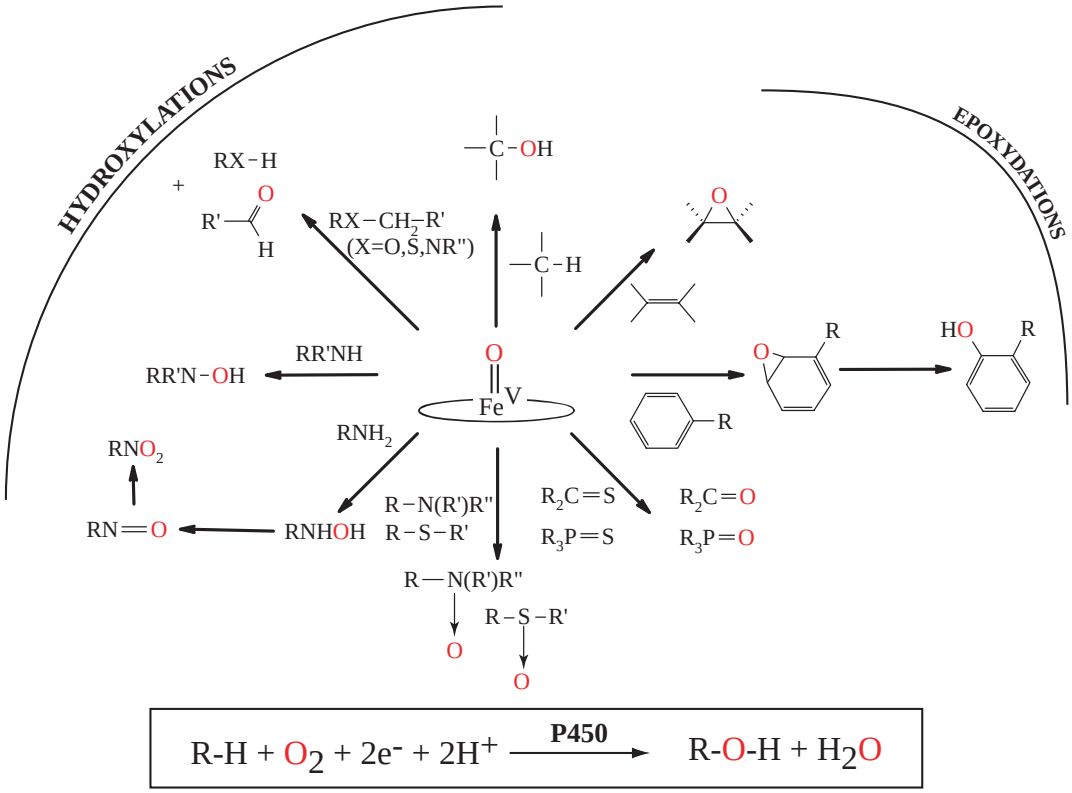


Figure I.6 – **Réactions d'oxydation généralement catalysées par les cytochromes P450**. D'après *Mansuy et Battioni, 2000.*

(c) Des rôles variés.

Cette variété de réactions catalysées permet aux P450s de jouer un rôle important dans la transformation des molécules endogènes et exogènes. Les cytochromes P450 ne jouent pas le même rôle selon les organismes dans lesquels ils sont exprimés.

(c)-i La métabolisation des xénobiotiques.

Les cytochromes P450 sont les principales enzymes impliquées dans la phase I du métabolisme des xénobiotiques. Ils participent à l'élimination des composés exogènes comme les médicaments, les toxines ou les polluants en complétant l'action défensive du système immunitaire destiné à prendre en charge les macromolécules. Dans certains cas, certains xénobiotiques peuvent devenir source de toxicité car les P450s forment un métabolite réactif électrophile capable d'alkyler d'autres protéines cellulaires (voir partie I-1.4.3).

(c)-ii Le rôle des P450s dans la biosynthèse et la biodégradation des composés endogènes.

Chez les procaryotes, certains cytochromes P450 participent à la biosynthèse de composés endogènes, comme les stérols ou des antibiotiques assurant la défense du microorganisme. Chez les eucaryotes, la synthèse des stérols nécessaires aux membranes plasmatiques fait également intervenir des cytochromes P450 (cholestérol, ergostérol) ; la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, des eïcosanoïdes, des rétinoïdes ou de certaines vitamines impliquent des P450s *(Guengerich, 2005).*

(d) Une gamme de substrats étendue.

Les cytochromes P450 catalysent l'oxydation d'un très grand nombre de substrats. Les cytochromes P450 participant à des chaînes de biosynthèse endogènes sont spécifiques d'un seul substrat, tandis que les P450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques montrent une très faible spécificité de substrat. Ces derniers sont capables de métaboliser des substrats de polarité ou de taille très variables. L'exemple type est le cytochrome P450 humain 3A4, capable de métaboliser 50% des médicaments prescrits chez l'homme *(Rendic, 2002)*. D'autre part, il est à noter qu'un substrat peut être oxydé différemment par un seul P450, et que la même activité d'oxydation d'un substrat peut être catalysée par plusieurs P450s.

I-1.2 Propriétés chimiques des P450s.

I-1.2.1 Interactions entre le P450 et un composé fixé au sein du site actif.

Le fer peut accepter une coordinence de 6. Dans le cas du cytochrome P450, le fer est pentacoordiné par les 4 azotes pyrroliques de l'hème et par le thiolate de la cystéine. Il peut donc accepter un sixième ligand, qui peut être une molécule d'eau ou un atome coordinant d'un composé fixé dans le site actif. Ces variations dans l'état de coordination du fer se traduisent par des signatures spectrales caractéristiques dans le domaine UV-visible (figure I.7) :

A l'état natif, le Fe^{III} de l'hème existe en équilibre sous deux états de spin, dépendant de son état de coordination :

• un état de bas spin $S = \frac{1}{2}$, dans lequel le fer est hexacoordiné et dans le plan de l'hème. Le sixième ligand est généralement une molécule d'eau. Le maximum d'absorption de cette espèce Fe^{III} est situé aux environs de 420 nm.

• un état de haut spin $S = \frac{5}{2}$ correspond à un Fe^{III} pentacoordiné situé en dehors du plan de l'hème. Cette espèce a un maximum d'absorption à 390 nm.

En présence d'un composé exogène qui se fixe au sein du site actif, trois cas se présentent :

• Lorsque le composé hydrophobe rentre dans le site actif, il chasse la molécule d'eau coordinant le fer dans l'état bas spin. Le fer^{III} se retrouve donc à l'état haut spin, avec un maximum d'absorption à 390 nm. Cette interaction est une **interaction de type I** dont le spectre différentiel est constitué d'un pic à 390 nm et d'une vallée à 420 nm.

• Si ce composé porte un atome d'oxygène accessible au fer, comme une fonction alcool ou éther, cet oxygène peut complexer le fer pentacoordiné, et donner une **interaction de type I inversé**. On retrouve ainsi le Fe^{III} sous forme de bas spin avec un pic d'absorption en UV à 420 nm. Le spectre différentiel résultant comporte alors un pic à 420 nm et une vallée à 390 nm. Il est à noter que dans certains cas, l'arrivée d'un substrat dans le site actif peut favoriser la fixation d'une molécule d'eau comme sixième ligand du fer, et donner également une interaction de type I inversée.

• Une **interaction de type II** est observée dans le cas où le composé exogène comporte un atome d'azote ou de soufre pouvant complexer le Fe^{III}. Le Fe^{III} absorbe alors entre 425 et

435 nm, et le spectre différentiel montre un minimum vers 390-410 nm et un maximum vers 425-435 nm.

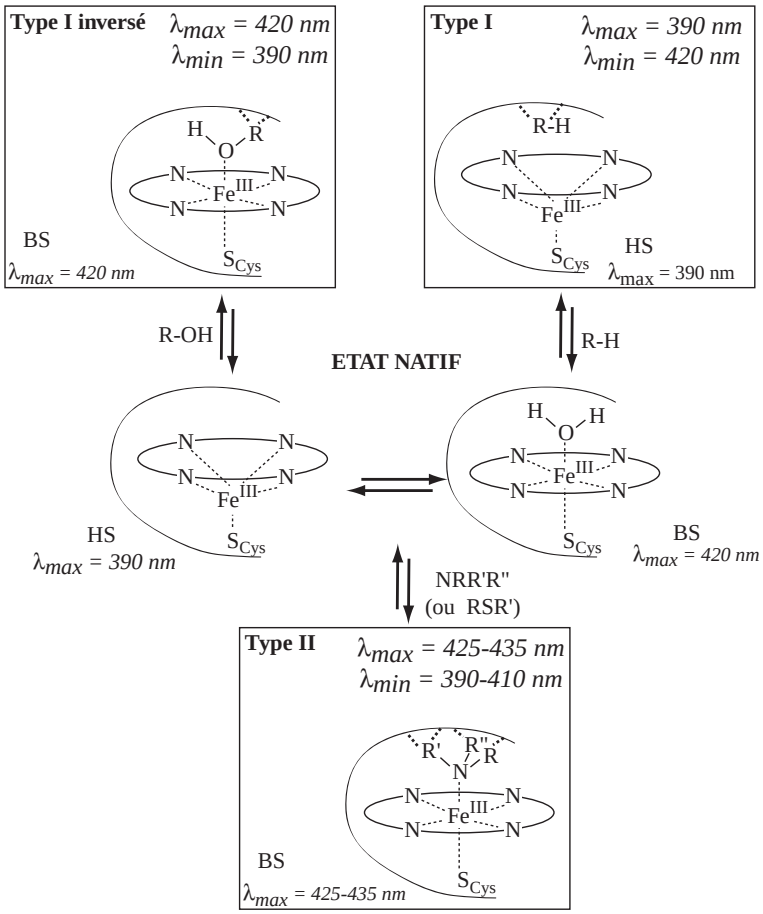


Figure I.7 – **Spectres différentiels des différentes interactions observées lors de la fixation d'un composé dans le site actif *(Mansuy et al., 1989)***. HS : Haut Spin ; BS : Bas Spin

I-1.2.2 Cycle catalytique de la monooxygénation des substrats par les cytochromes P450.

1. Le cycle catalytique des cytochromes P450 est initié par la fixation du substrat au sein du site actif, ce qui entraîne dans le cas de l'état natif bas spin le déplacement de la molécule d'eau distale et favorise la position pentacoordinée haut spin du complexe ferrique Fe^{III}.
2. Cette fixation du ligand induit une augmentation du potentiel du couple Fe^{III}/Fe^{II}, permettant le transfert d'un électron qui peut réduire le fer en complexe ferreux Fe^{II}. Dans certains cas, il semblerait que le transfert de l'électron puisse se produire sans fixation d'un composé dans le site actif *(Guengerich et Johnson, 1997).*
3. La réduction du fer est suivie par la fixation de l'oxygène moléculaire sur le fer, donnant le complexe ferreux $Fe^{II} \leftarrow O_2$.
4. Le transfert d'un second électron vers ce complexe réduit l'oxygène en formant l'entité peroxy-ferrique Fe^{III}-OO^{-}, qui par protonation, donne le complexe hydroperoxo Fe^{III}-OOH.
5. La rupture hétérolytique de la liaison O-O est provoquée par une seconde protonation, formant de l'eau et le composé fer-oxo formellement écrit Fe^{V}=O.

6. Ce composé, hautement oxydant, peut transférer son atome d'oxygène au substrat.
7. Le métabolite sort du site actif.

Il est à noter que dans certains cas, l'oxydation du substrat peut être réalisée par l'espèce hydroperoxo Fe^{III}-OOH. Ces résultats ont été initiés par les travaux de A. Vaz et montrent que certaines époxydations d'oléfines sont réalisées par cette entité, et non par le fer-oxo Fe^{V}=O *(Vaz et al., 1998)*.

L'utilisation d'agents oxydant donneurs d'atome d'oxygène, tels que l'iodosobenzène, les peracides, les hydroperoxydes, les anions ClO_2^- ou IO_4^- permet d'obtenir directement l'espèce réactive fer-oxo à partir de l'état natif. On parle ainsi de cycle court des cytochromes P450.

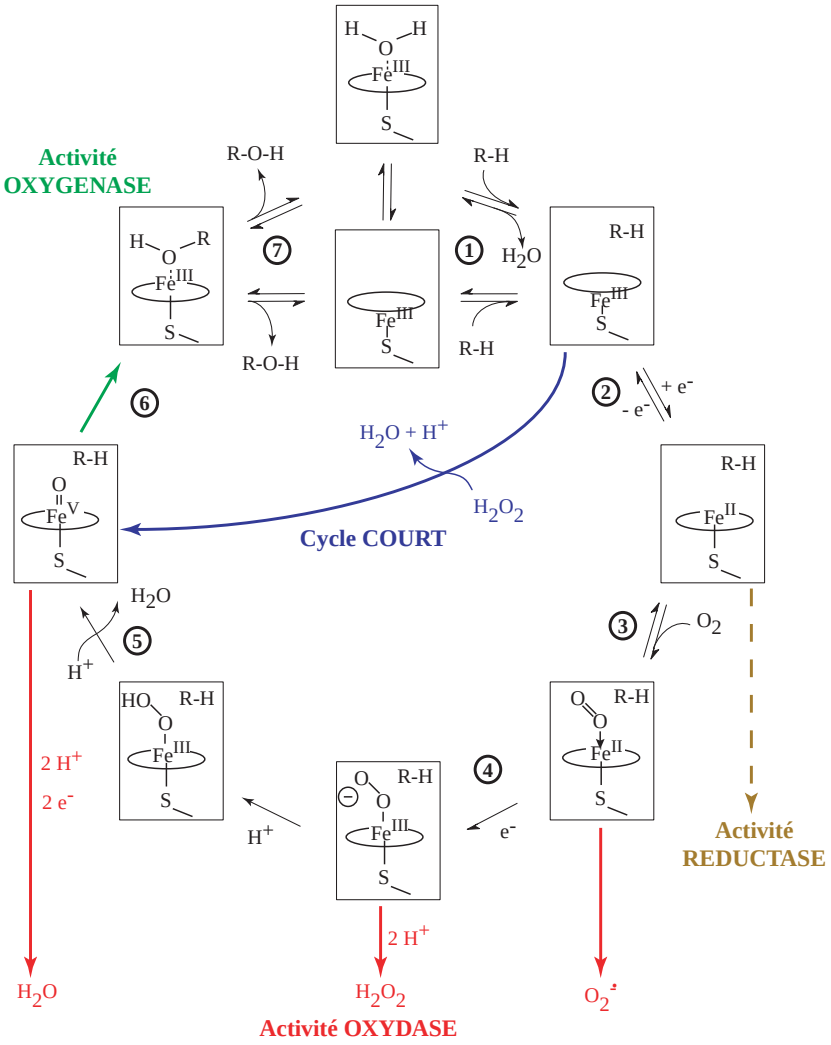


Figure I.8 – **Cycle catalytique des cytochromes P450** ***(Makris et al., 2005; Mansuy et Battioni, 2000)***. Le cycle court obtenu par addition d'un composé donneur d'atome d'oxygène est indiqué en bleu ; les voies non-productives ou abortives en rouge et la voie réductase en marron.

(a) Voies abortives.

Idéalement, la consommation d'une molécule de NADPH doit s'accompagner de l'oxygénation d'une molécule de substrat, comme dans le cas du P450 bactérien $P450_{cam}$ ou des P450s spécifiques des voies de biosynthèse endogène. Cependant, dans le cas des P450s impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques, ce couplage n'est pas aussi efficace et des voies secondaires de transferts

d'électrons, dites « abortives », peuvent se produire, ce qui se traduit par une formation du complexe Fe^{III} sans oxydation du substrat. Ce découplage entre transfert d'électrons et transfert de l'atome d'oxygène peut apparaître au niveau de plusieurs étapes du cycle catalytique :

– Le complexe ferreux $Fe^{II} \leftarrow O_2$ peut se décomposer en formant l'ion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et le complexe ferrique Fe^{III}. Cet ion superoxyde peut alors se dismuter pour donner du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène moléculaire :

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow \mathbf{H_2O_2} + O_2$$

– L'addition d'un proton sur l'atome d'oxygène qui est ligand du fer dans les complexes peroxyferrique Fe^{III}-OO^- ou hydroperoxo Fe^{III}-OOH se traduit par la formation de Fe^{III} et d'une molécule de peroxyde d'hydrogène :

$$Fe^{III}\text{-}OO^- + H^+ \longrightarrow Fe^{III}\text{-}\overset{H}{\underset{|}{O}}O^- \xrightarrow{H^+} \mathbf{H_2O_2} + Fe^{III}$$

$$Fe^{III}\text{-}OOH + H^+ \longrightarrow Fe^{III}\text{-}\overset{H}{\underset{|}{O}}OH \longrightarrow \mathbf{H_2O_2} + Fe^{III}$$

– L'entité fer-oxo Fe^V=O peut redonner également l'état natif Fe^{III} après consommation de deux protons et de deux électrons :

$$Fe^V = O + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \mathbf{H_2O} + Fe^{III}$$

L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène libérés constituent une source potentielle de stress oxydant. Cette activité **oxydase** des P450s est généralement plus importante que l'activité catalytique **oxygénase** présentée précédemment dans le cas des P450s microsomaux, mais ce découplage dépend de paramètres qui influent sur la vitesse de transfert des électrons ou des protons, comme l'accessibilité de l'eau au site actif, un positionnement du substrat trop éloigné du fer, l'absence de sites suffisamment réactifs sur le substrat *(Mueller et al., 1995).*

(b) Etude de l'existence des intermédiaires du cycle catalytique.

Le cycle catalytique des cytochromes P450 a été étudié en détail dans le cas du $P450_{cam}$ et de certains de ses mutants, qui catalysent l'hydroxylation régio- et stéréo- sélective du camphre.

– Les premiers intermédiaires du cycle catalytique des P450s (les deux états natifs, Fe^{III}/camphre et Fe^{II}/camphre) ainsi que le dernier complexe (Fe^{III}/hydroxycamphre) ont été caractérisés par de nombreuses études cristallographiques et spectroscopiques *(Makris et al., 2005).* On observe très peu de différences structurales entre les deux composés Fe^{III}/camphre et Fe^{II}/camphre *(Schlichting et al., 2000).*
– La structure du complexe Fe^{II}-O_2, résolue par cryo-cristallographie à 100 K *(Schlichting et al., 2000),* révèle un déplacement du camphre, l'apparition de molécules d'eau, et la stabilisation de l'oxygène par des liaisons hydrogènes auxquelles participent certains acides aminés du site

actif (Asp251 et Thr252) (figure I.9).

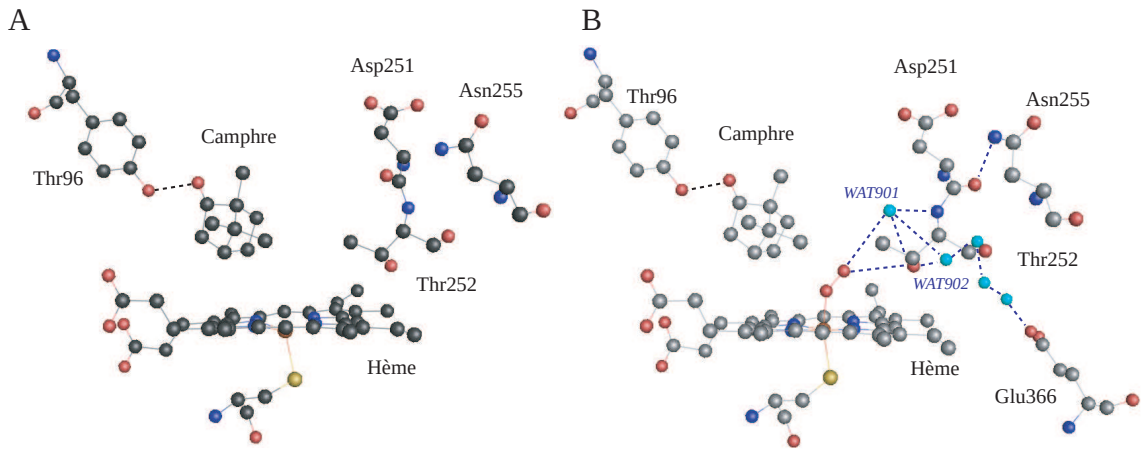


Figure I.9 – **Comparaison entre les structures du camphre Fe^{II} (A) et $Fe^{II} \leftarrow O_2$ (B), d'après *Schlichting et al., 2000***. A la suite de la fixation de l'oxygène moléculaire, le groupe carbonyle de Asp251 subit une rotation, entraînant un déplacement de la chaîne latérale de Thr252 qui peut alors former une liaison hydrogène avec le dioxygène. La présence de molécules d'eau (représentées en bleu clair) se traduit par une structuration du site actif due à une chaîne de liaison hydrogène.

– Il n'y a pas de preuves cristallographiques bien définies de l'existence des complexes peroxo-, hydroperoxy- et oxo- du fer. Cependant, l'équipe de B. Hoffmann a pu caractériser par spectroscopies ENDOR et RPE les complexes peroxo- et hydroperoxy-. Pour cela, l'irradiation par rayons γ des échantillons à très basse température (77 K et 6K) a été employée pour ne réaliser qu'une étape du cycle catalytique à la fois et observer les états obtenus *(Davydov et al., 2001)*. L'espèce Fe^{V}=O n'a pas pu être observée, car la transformation du complexe Fe^{III}-OOH produit directement l'espèce Fe^{III}/hydroxycamphre, sans passer par le fer-oxo.

(c) Mécanisme d'activation de l'oxygène.

La structure tri-dimensionnelle de l'intermédiaire $Fe^{II} \leftarrow O_2$ révèle l'importance de la poche distale dans le transfert des protons et dans l'activation de l'oxygène *(Schlichting et al., 2000)*. Des changements conformationnels du squelette peptidique et des chaînes latérales autour du site actif se produisent lors de la fixation du dioxygène, entraînant l'apparition d'un réseau de liaisons hydrogènes. Les résidus Asp251 et Thr252 semblent jouer un rôle important dans le mécanisme d'activation de l'oxygène. Ainsi, des études d'effets isotopiques sur des mutants D251N montrent l'importance du **rôle structural d'Asp251** dans le réseau de molécules d'eau évoqué précédemment mais également dans la coupure hétérolytique de la liaison O-O *(Deprez et al., 1994; Gerber et Sligar, 1994)*. Les études de RPE et ENDOR cryogéniques sur le mutant T252A ont montré l'existence de l'espèce Fe^{III}-OOH sans observer l'hydroxylation du substrat *(Davydov et al., 2001)*. Ce résultat montre donc que dans le cas du $P450_{cam}$, la thréonine 252 est impliquée dans le transfert du second proton du cycle catalytique.

(d) Le mécanisme du P450cam comme paradigme pour tous les P450s ?

Le mécanisme catalytique présenté en figure I.8 se retrouve dans toutes les monooxygénases à P450. Cependant, le mode d'activation de l'oxygène semble différer selon les P450s, les protons nécessaires à la catalyse pouvant être fournis par les résidus du P450, mais également par une molécule d'eau ou même par le substrat lui-même. Ainsi, D.F. Lewis a montré qu'une mutation de la thréonine correspondant à Thr252 du $P450_{cam}$ avait pour conséquence une réduction très importante de l'activité des P450s de la famille 2 *(Lewis, 1998)*. De plus, des P450s ne possédant pas cette thréonine possèdent une activité catalytique *(Hiroya et al., 1994; Cupp-Vickery et Poulos, 1995)*. Enfin, le transfert des protons dans le $P450_{cam}$ semblent dépendre très fortement de la structure des substrats fixés dans le site actif, comme cela a été montré par l'équipe de B. Hoffmann *(Davydov et al., 2005)*.

I-1.2.3 La chaîne de transfert d'électrons.

Les cytochromes P450 catalysant principalement des réactions de monooxygénation, il est nécessaire d'apporter des électrons au substrat. Ces électrons sont fournis par le NADPH ou le NADH. Cependant, pour les transmettre jusqu'à l'hème, lieu de la catalyse, plusieurs protéines peuvent être impliquées dans le transfert d'électrons. On distingue deux classes majoritaires de systèmes de transfert d'électrons *(Paine et al., 2005)* (voir figure I.10). Deux autres classes sont également rencontrées, mais beaucoup plus rarement.

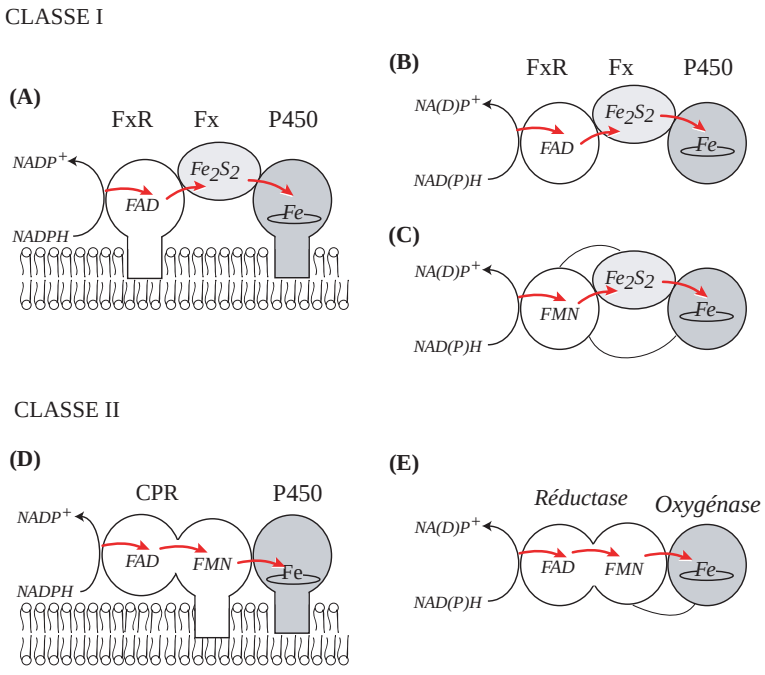


Figure I.10 – **Partenaires de transfert d'électrons des cytochromes P450 d'après *Paine et al., 2005***. La classe I comprend les P450s mitochondriaux (A), la majorité des P450s solubles (B) et certains systèmes fusionnés comme le CYP RhF (C). La classe II comprend les P450s du réticulum endoplasmique (D) et les P450s qui incluent une réductase à deux flavines comme le CYP BM-3 (E). Fx : ferredoxine, FxR : ferredoxine réductase, CPR : cytochrome P450 réductase.

- La **classe I** fait intervenir dans la chaîne de transfert d'électrons des enzymes à centre fer-soufre. Les électrons du NAD(P)H sont prélevés par une ferredoxine réductase à flavine FAD puis

transmis à une ferredoxine à centre fer-soufre Fe_2S_2. Cette ferredoxine transfère ensuite les électrons au P450 pour permettre la catalyse. Cette classe contient la très grande majorité des P450s bactériens et les P450s mitochondriaux. Il conviendrait d'ajouter à cette classe des nouveaux systèmes identifiés récemment comme le P450RhF *(Roberts et al., 2002)*, qui est une protéine de fusion contenant une réductase à flavine FMN, une protéine type-ferredoxine à centre fer-soufre et le cytochrome P450.

- La **classe II** est constituée par les sytèmes qui contiennent une réductase à deux flavines (FAD et FMN). Ici, cette réductase est le seul intermédiaire entre le NADPH et le P450. Cette classe regroupe les P450s microsomaux dont la réductase, appelée Cytochrome P450 Réductase (CPR), est ancrée sur la membrane du réticulum endoplasmique, proche du P450. Un second système, qui n'est pas spécifique des P450s, peut également participer au transfert d'électrons vers le P450. Les électrons du NADH sont transférés via la cytochrome b_5 réductase vers le cytochrome b_5, qui transfère ensuite les électrons vers le P450 *(Porter, 2002)*. Du fait de la colocalisation de ces enzymes avec la P450 réductase sur la membrane, des transferts d'électrons « croisés » entre ces deux systèmes peuvent également être observés. Certains P450s microbiens tels que le cytochrome P450 BM3 issu de *Bacillus Megaterium* appartient à cette classe, car ce P450 est une protéine de fusion entre le P450 et une réductase à deux flavines.

D'autres P450s catalysant des isomérisations ou des déshydratations ne nécessitent pas d'apport d'électrons extérieurs ou d'oxygène moléculaire. Les substrats transformés sont généralement riches en électrons, comme des hydroperoxydes ou des endoperoxydes. Bien qu'aucun système de transfert d'électrons ne soit présent, on définit tout de même la **classe III**, qui comprend ces systèmes.

Le $P450_{nor}$ catalyse la réduction du monoxyde d'azote NO et reçoit ses électrons directement du NADH, sans protéine intermédiaire *(Takaya et al., 1999)*. Ce P450 est le seul représentant de la **classe IV**.

I-1.3 Structure des cytochromes P450.

Entre la première structure de P450 soluble publiée en 1985 *(Poulos et al., 1985)* et la structure du CYP 1A2 humain résolue début 2007 *(Sansen et al., 2007)*, près de 150 structures tri-dimensionnelles de P450s résolues par cristallographie ont été déposées à la Protein Data Bank (accessible à l'adresse *http://www.rcsb.org*). Elles concernent 18 P450s solubles (dont 1 de champignon) et 9 P450s microsomaux de mammifères (dont 7 humains).

Le premier P450 cristallisé dont la structure aux rayons X a été résolue est le cytochrome $P450_{cam}$ (CYP 101), issu de la bactérie *Pseudomonas putida* et catalysant l'hydroxylation régio- et stéréosélective du camphre en 5-exo-hydroxycamphre *(Poulos et al., 1987)*. Cette structure haute résolution est restée un paradigme pour l'étude de la relation structure-fonction des P450s pendant plusieurs années, jusqu'à la résolution d'autres structures de P450s solubles, dont les principales sont répertoriées dans le tableau I.1.

CYP	Organisme	Entrée PDB	Res. (Å)	Références
CYP 101 (P450$_{cam}$)	*Pseudomonas putida*	(55 structures) dont 2CCP	1,63	*(Poulos et al., 1987)*
CYP 102 (P450BM3)	*Bacillus megaterium*	(15 structures) dont 2HPD	2	*(Ravichandran et al., 1993)*
CYP Terp	*Pseudomonas*	1CPT	2,3	*(Hasemann et al., 1994)*
CYP 55A1 (P450nor)	*Fusarium oxysporum* (Champignon)	(9 structures) dont 1ROM	2	*(Park et al., 1997)*
CYP 107 (P450EryF)	*Saccharopolyspora* erythraea	(9 structures) dont 1EGY	2,35	*(Cupp-Vickery et al., 2000)*
CYP 119	*Thermus thermophilus ?*	(5 structures) dont 1F4T	1,9	*(Yano et al., 2000)*
CYP 51	*Myobacterium tuberculosis*	(5 structures) dont 1EA1	2,2	*(Podust et al., 2001)*
P450OxyB	*Amycolatopsis orientalis*	(3 structures) dont 1LFK	1,7	*(Zerbe et al., 2002)*
CYP EpoK	*Polyangium Cellulosum*	(2 structures) dont 1Q5E	2,7	*(Nagano et al., 2003)*
CYP 121	*Mycobacterium tuberculosis*	(2 structures) dont 1N40	1,1	*(Leys et al., 2003)*
P450OxyC	*Amycolatopsis orientalis*	1UED	1,9	*(Pylypenko et al., 2003)*
CYP 152A1	*Bacillus subtilis*	1IZO	1,9	*(Lee et al., 2003)*
CYP 175A1	*Thermus thermophilus*	1N97	1,9	*(Yano et al., 2003)*
CYP 154C1	*Streptomyces coelicolor A3(2)*	1GWI	1,9	*(Podust et al., 2003)*
CYP 151A1	*Streptomyces coelicolor*	1ODO	1,9	*(Podust et al., 2004)*
CYPst	*Sulfolobus tokodaii*	1UE8	3,0	*(Oku et al., 2004)*
CYP 158A2	*Streptomyces coelicolor A3(2)*	(5 structures) dont 1S1F	1,5	*(Zhao et al., 2005a)*

Tableau I.1 – **Principales structures tridimensionnelles des P450s de microorganismes déposées à la Protein Data Bank**.

Du fait de la difficulté à cristalliser les P450s membranaires, il a fallu attendre 2000 pour que la première structure d'un P450 de mammifère soit publiée *(Williams et al., 2000).* Afin de permettre une meilleure cristallisation du P450, la protéine a subi plusieurs mutations et la délétion de sa partie transmembranaire N-terminale. C'est ainsi que la structure d'un mutant du CYP 2C5 de lapin, le CYP 2C5/3LVdH, a pu être résolue. A la suite de ce travail, les structures d'autres P450s de mammifères ont été résolues et sont présentées dans le tableau I.2.

CYP	Organisme	Entrée PDB	Substrat /Inhibiteur	Résolution (Å)	Référence
CYP 1A2	Homme	2HI4	-	1,95	*(Sansen et al., 2007)*
CYP 2A6	Homme	1Z10	Coumarine	1,9	*(Yano et al., 2005)*
		1Z11	Methoxalène	2,05	*(Yano et al., 2005)*
		2FDU	DPFM	1,85	*(Yano et al., 2006)*
		2FDV	MPFM	1,65	*(Yano et al., 2006)*
		2FDW	PFM	2,05	*(Yano et al., 2006)*
		2FDY	Adrithiol	1,95	*(Yano et al., 2006)*
CYP 2B4	Lapin	1PO5	-	1,6	*(Scott et al., 2003)*
		1SUO	CPI	1,9	*(Scott et al., 2004)*
		2BDM	Bifonazole	2,3	*(Zhao et Halpert, 2006a)*
CYP 2C5	Lapin	1DT6	-	3	*(Williams et al., 2000)*
		1N6B	DMZ	2,3	*(Wester et al., 2003a)*
		1NR6	Diclofenac	2,1	*(Wester et al., 2003b)*
CYP 2C8	Homme	1PQ2	-	3	*(Schoch et al., 2004)*
CYP 2C9	Homme	1OG5	-	2,6	*(Williams et al., 2003)*
		1OG2	Warfarine	2,6	*(Williams et al., 2003)*
		1R9O	Flurbiprofène	2	*(Wester et al., 2004)*
CYP 2D6	Homme	2F9Q	-	3	*(Rowland et al., 2005)*
CYP 3A4	Homme	1W0E	-	2,7	*(Williams et al., 2004)*
		1W0F	Progestérone	2,7	*(Williams et al., 2004)*
		1W0G	Métyrapone	2,8	*(Williams et al., 2004)*
		1TQN	-	2,1	*(Yano et al., 2004)*
		2J0C	Kétoconazole	2,80	*(Ekroos et Sjogren, 2006)*
		2J0D	Erythromycine	2,75	*(Ekroos et Sjogren, 2006)*
CYP 8A1	Homme	2IAG	-	2,15	*(Chiang et al., 2006)*

Tableau I.2 – **Structures tridimensionnelles des P450s de mammifères déposées à la Protein Data Bank**. CPI : 4-Chlorophénylimidazole ; DPFM : N-dimethyl(5-(pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine ; MPFM : N-methyl(5-(pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine ; PFM : (5-(pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine ; DMZ : 4-methyl-N-methyl-N(2-phenyl-2H-pyrazol-3-yl)benzenesulfonamide.

I-1.3.1 Structure générale.

Suffisamment de structures ont été résolues pour affirmer que le repliement général et la topographie des P450s sont globalement identiques (voir figure I.11) pour tous les P450, solubles, membranaires, de classe I, II, III ou IV, malgré une faible identité de séquence. Par ailleurs, ce repliement semble être spécifique aux P450s, car à ce jour, aucune autre protéine non-P450 ne le partage. Les structures ont une forme de prisme triangulaire dont la hauteur mesure environ 60 Å et la base 30 Å. Un schéma topographique du P450 BM-3 est représenté en figure I.12 *(Graham et Peterson, 1999)*. Les éléments de structures secondaires suivent la nomenclature donnée par Poulos en 1985 *(Poulos et al., 1985)*, avec de légères modifications, au fur et à mesure de la découverte de nouvelles structures secondaires dans d'autres P450s. Les hélices α sont identifiées par des lettres majuscules tandis que les feuillets β sont désignées par des chiffres de 1 a 5. Deux régions se distinguent dans ces structures : une région riche en hélices α bien structurée (à droite, figure I.12) et une seconde région constituée principalement de feuillets β et de boucles, donc plus flexible (à gauche et en haut, figure I.12).

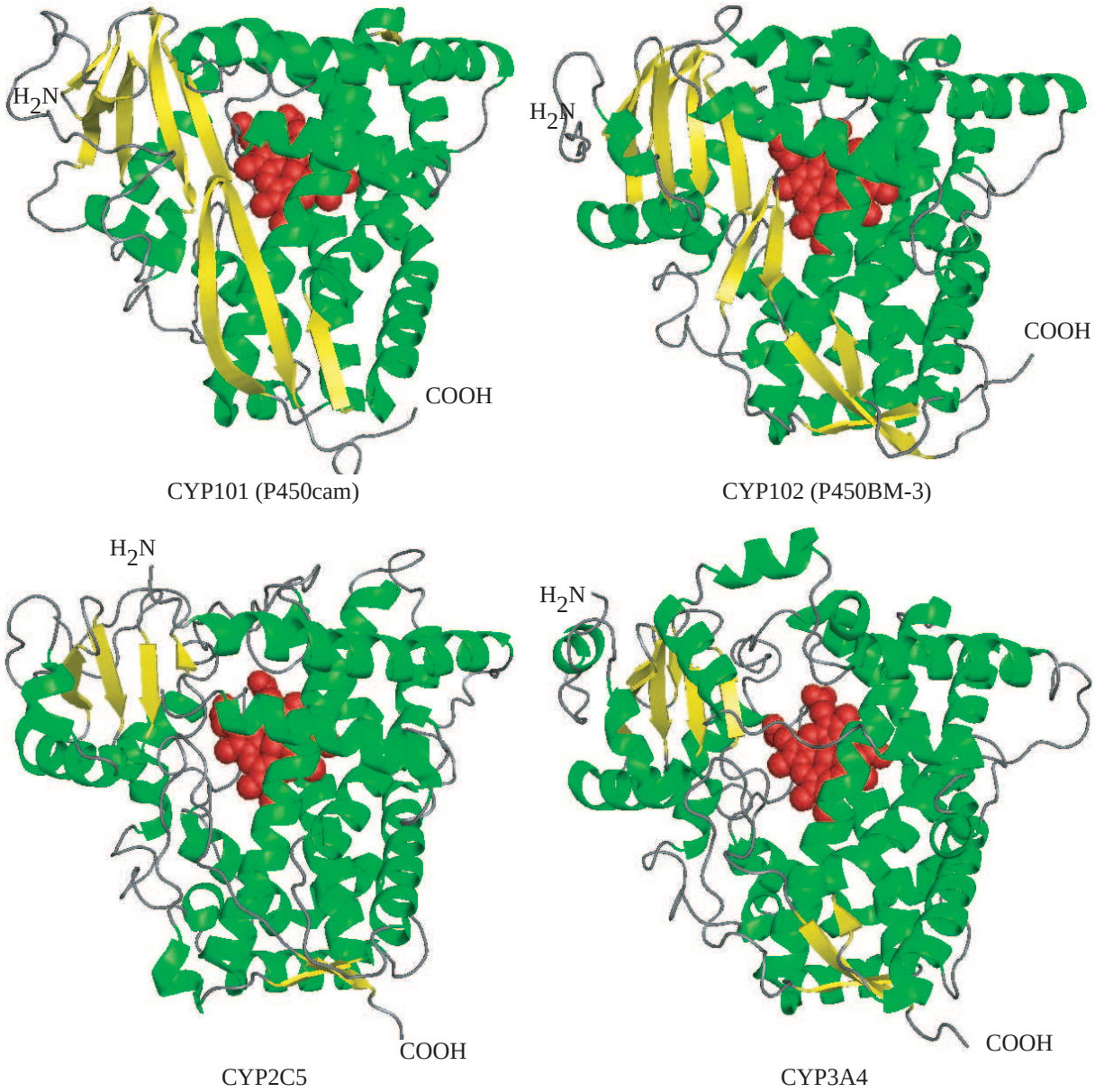


Figure I.11 – **Exemples représentatifs de structures tridimensionnelles illustrant le repliement similaire des P450s**. Les hélices sont représentées en rubans verts, les feuillets sous forme de flèches jaunes, l'hème en représentation de Van der Waals en rouge.

Les régions structurales les plus conservées dans toutes les structures sont celles qui participent à la chimie d'activation de l'oxygène par le complèxe hème-thiolate. La première contient une partie de l'hélice L et la cystéine proximale. Afin d'assurer une stabilisation du ligand cystéinate, une structuration particulière de la boucle contenant la cystéine (Cys-pocket) est observée dans toutes les structures. La seconde région relativement bien conservée est située du côté distal de l'hème, et fait partie de l'hélice I. La thréonine 252 (numérotation du $P450_{cam}$) participant à l'activation de l'oxygène moléculaire (voir partie I-1.2.2) en fait également partie.

Les parties les plus variables dans les structures sont celles qui forment la cavité distale au dessus de l'hème, dont le site actif et les canaux potentiels d'accès des substrats comme les hélices B', F, G et la boucle F-G (ou les hélices F' et G' chez les P450s membranaires).

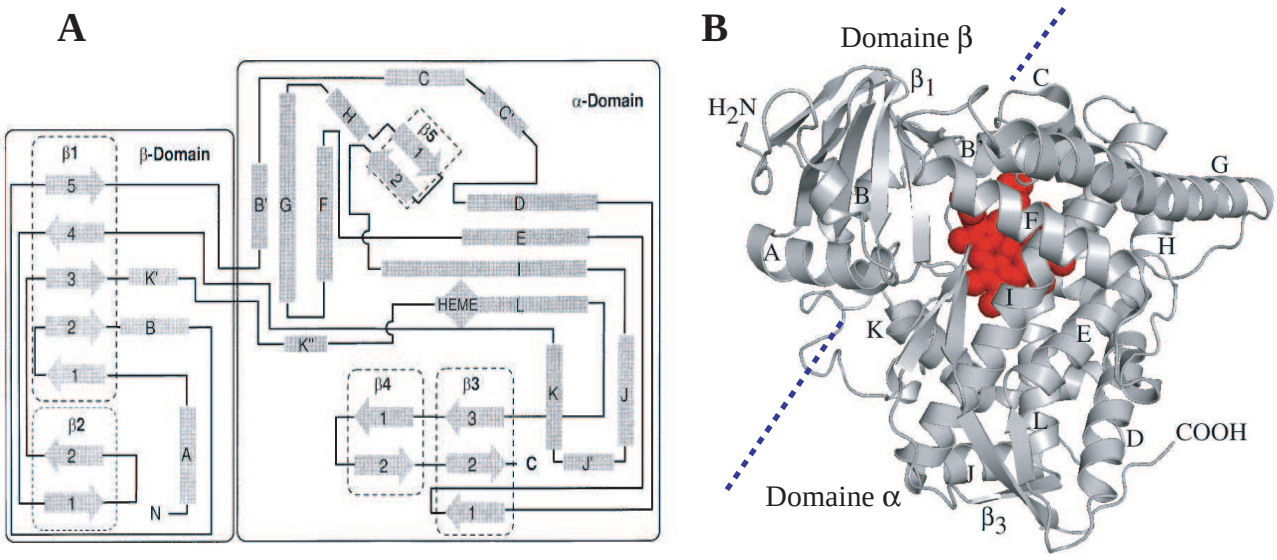


Figure I.12 – **(A) Topologie et éléments de structures secondaires du cytochrome P450 BM-3 d'après *Graham et Peterson, 1999* ; (B) Structure tridimensionnelle du P450 BM-3**. Les hélices C', J', K' et K" ainsi que les feuillets 2, 4 et 5 ne sont pas indiquées sur la structure tridimensionnelle pour plus de clarté.

(a) Le site actif de fixation des substrats.

Le site actif est généralement constitué d'une cavité hydrophobe, bordée par les hélices F, G et I, la boucle B-C, la boucle C-terminale et la boucle située après l'hélice K. Les P450s membranaires se différencient des P450s bactériens par la structuration en une ou deux hélices de la boucle F-G. Ces hélices, notées F' et G', forment le toit du site actif, comme la boucle F-G chez les P450s cytosolubles. De façon générale, les éléments structuraux bordant le site actif des P450s solubles et membranaires sont les mêmes. Cependant, l'arrangement spatial de ces hélices ou boucles est différent, mis à part le positionnement de l'hélice I comme le montre la figure I.13.

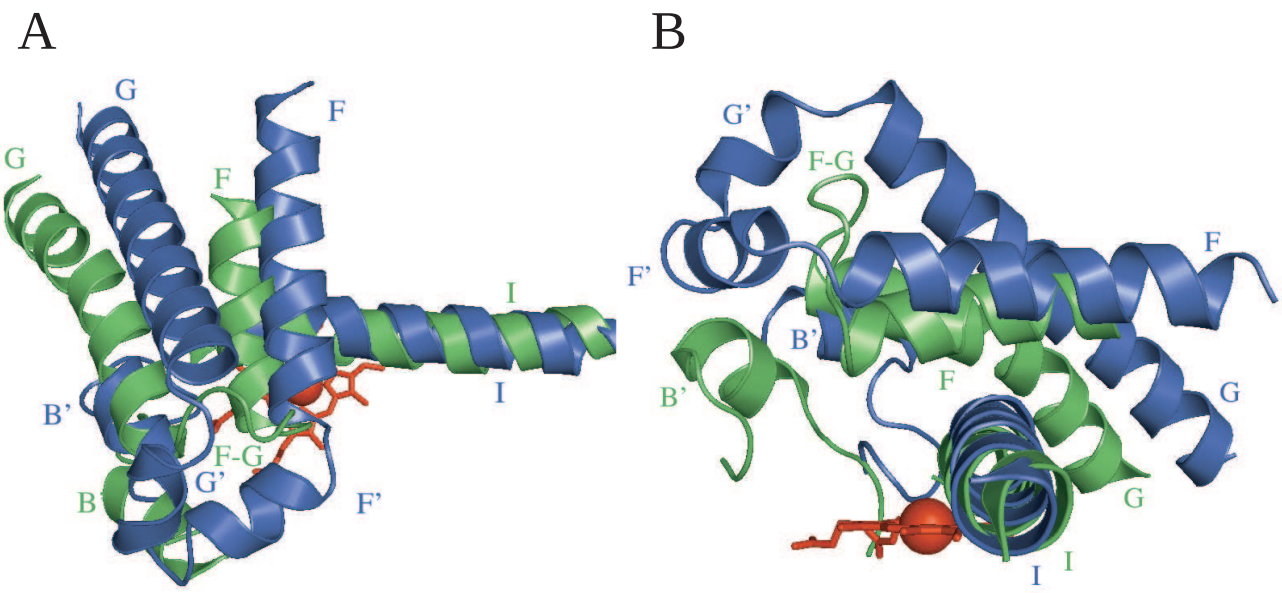


Figure I.13 – **Comparaison des structures secondaires bordant la cavité du P450$_{cam}$ (en vert) et CYP 2C8 (en bleu), en vue perpendiculaire (A) ou coplanaire (B) par rapport à l'hème**. L'hème est représenté en bâtons rouge, le fer sous forme de sphère de Van der Waals.

En se basant sur la structure tri-dimensionnelle du P450$_{cam}$ et sur les alignements de séquences des CYP membranaires de la famille 2, O. Gotoh a prédit la position de six régions d'interactions possibles entre le substrat et l'apoprotéine *(Gotoh, 1992).* Appelées SRS (« Substrate Recognition Site »), ces zones sont réparties tout au long de la séquence des P450s et correspondent à des zones fortement variables en termes de séquence. La reconnaissance d'une grande variété de substrats par les P450s pourrait être expliquée par différents positionnements des éléments structuraux bordant le site actif, mais également par la variabilité des séquences au sein des zones en interaction avec les substrats.

(b) Interaction avec la cytochrome P450 réductase.

Les structures résolues par rayons X ou par RMN de la putidarédoxine de *Pseudomonas putida* (couplée au P450$_{cam}$) révèlent que de nombreux résidus chargés négativement sont présents sur la surface de cette protéine. Ainsi, l'interaction principale entre le P450$_{cam}$ et sa protéine de transfert d'électrons serait électrostatique et ferait intervenir les résidus positivement chargés du P450. L'étude par cristallographie du P450 BM-3, protéine de fusion entre la cytochrome P450 réductase (CPR) et le P450 confirme cette hypothèse et montre que la surface proximale du P450, est en contact avec la CPR. Cette surface est définie par les hélices B, C et K.

La résolution tridimensionnelle de la totalité de la cytochrome P450 réductase de rat *(Wang et al., 1997)*, puis la résolution partielle de la CPR humaine *(Zhao et al., 1999)* ont permis de mieux comprendre les interactions entre les P450s de classe II et la CPR. Tout comme celle des P450s membranaires, la cristallisation des CPRs n'est possible qu'en supprimant la partie N-terminale hydrophobe transmembranaire. Des études enzymologiques ont montré que chez les mammifères, la CPR solubilisée (sans domaine transmembranaire) ne peut plus se coupler avec les P450s membranaires, ce qui démontre l'importance de la membrane dans l'orientation spatiale correcte des deux enzymes entre

elles *(Paine et al., 2005).* De plus, la surface d'interaction supposée entre le P450 microsomal et la réductase semble être la même que celle décrite pour les P450s solubles.

I-1.3.2 Structures de complexes P450-substrats - l'exemple du CYP 2C5.

Parmi les 25 structures de P450s de mammifères résolues, 16 ont été résolues en présence d'un substrat ou d'un inhibiteur. Les premières structures ont été publiées au début de ma thèse en 2003 à la suite d'une collaboration entre les équipes de E.F. Johnson et D. Mansuy. La recherche systématique de nouveaux substrats des CYP 2C a permis d'isoler deux composés substrats du 2C5 de lapin et des CYP 2C humains : le diclofénac et le 4-methyl-N-methyl-N(2-phenyl-2H-pyrazol-3-yl)benzenesulfonamide (DMZ) *(Marques-Soares et al., 2003).* Ces deux composés de taille et de polarité différentes ont été co-cristallisés avec le CYP 2C5/3LVdH et ont conduit aux deux premières structures de complexes P450-substrat de mammifères.

SRS	Résidus en contact		
	communs aux deux substrats	spécifiques du DMZ	spécifiques du Diclofenac
SRS 1	L103, A113, A114	V106	V100
SRS 2	N204, V205	L201	-
SRS 3	-	A237, I240	-
SRS 4	D290, G293, A294, T298	S289	-
SRS 5	L359, L363	-	-
SRS 6	F473, V474	-	-

Tableau I.3 – **Résidus du site actif du CYP 2C5 en contact avec le DMZ *(Wester et al., 2003a)* et le diclofénac *(Wester et al., 2003b)***. Les résidus sont classés en fonction de leur appartenance à des sites de reconnaissance des substrats (SRS), définis selon *Gotoh, 1992.*

Les résidus du 2C5 en contact avec le DMZ ou le diclofenac sont quasiment les mêmes (voir tableau I.3), et ne présentent pas de différence majeure de polarité. Lorsqu'un substrat se fixe au sein de son site actif, le CYP 2C5 montre une adaptabilité importante des éléments structuraux bordant la cavité du site actif en fonction de la taille et de la polarité du composé (figure I.14) :

- La présence dans le site actif d'un composé faiblement polaire comme le DMZ correspond à une conformation fermée du P450. Afin de chasser l'eau présente dans la cavité du site actif et d'éviter les interactions défavorables avec le substrat, la protéine se contracte autour du substrat, le déplacement observé d'hélices permettant de boucher les canaux par lesquels pourraient rentrer des molécules d'eau. Les deux hélices F et G se rapprochent de l'hème par translation perpendiculaire par rapport à l'axe de l'hélice I. D'autre part, la boucle B-C se structure pour former une petite hélice B', qui permet d'optimiser les contacts de type hydrophobe avec le substrat.
- Globalement, les modifications du site actif du CYP2C5 induites par la fixation du diclofénac sont analogues à celles observées avec le DMZ (compaction autour du substrat, structuration de la boucle B', fermeture des différents canaux). Cependant, le diclofénac est plus petit que le DMZ, et il porte une fonction chargée (acide carboxylique) qui pointe vers l'extrémité d'un canal. Ce canal, ouvert vers l'extérieur de la protéine, est comblé par un réseau de molécules d'eau.

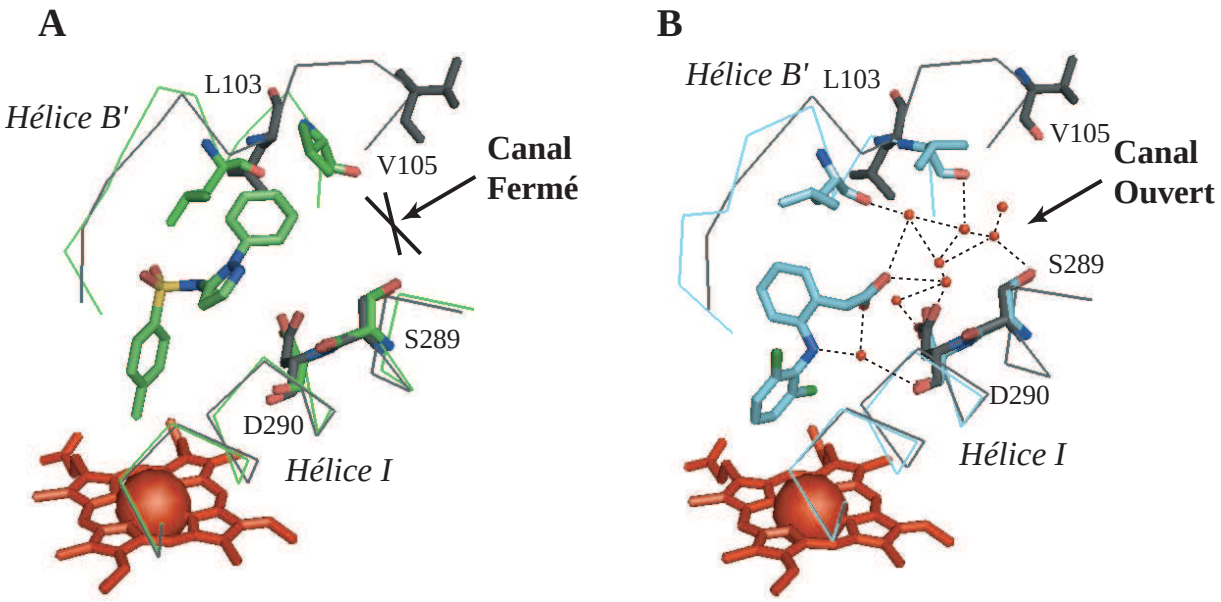


Figure I.14 – **Adaptations conformationnelles du site acif du CYP 2C5/3LVdH lors de la fixation du DMZ (A) ou du diclofénac (B), d'après *Wester et al., 2003a,b***. Les résidus correspondants du CYP 2C5/3LVdH sans substrat sont représentés en gris.

I-1.3.3 Dynamique conformationnelle d'accès au site actif.

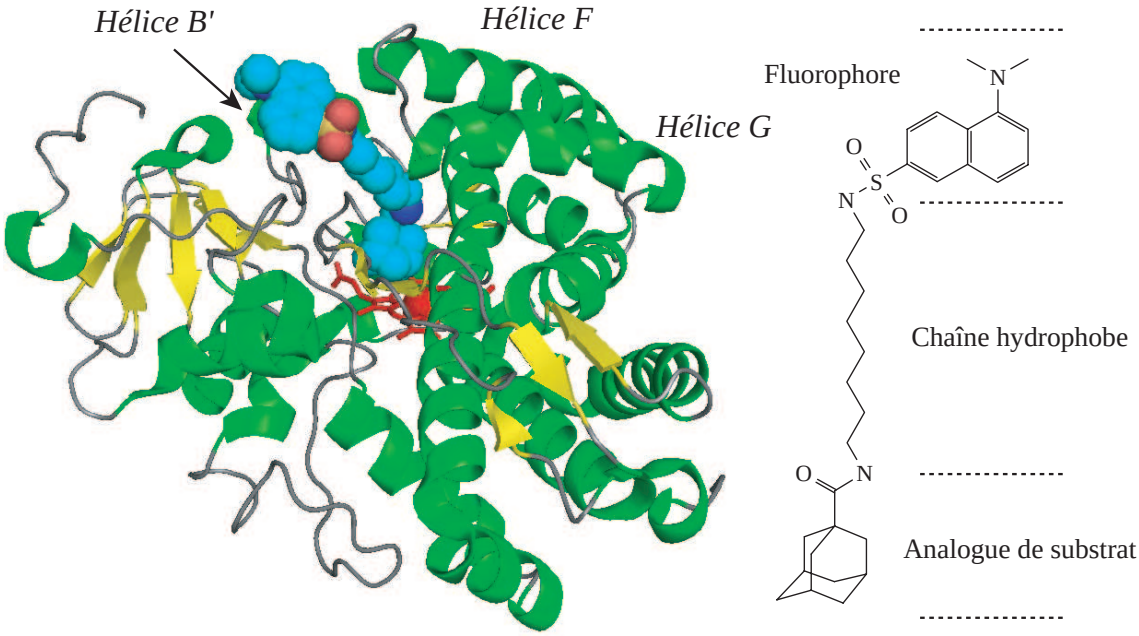


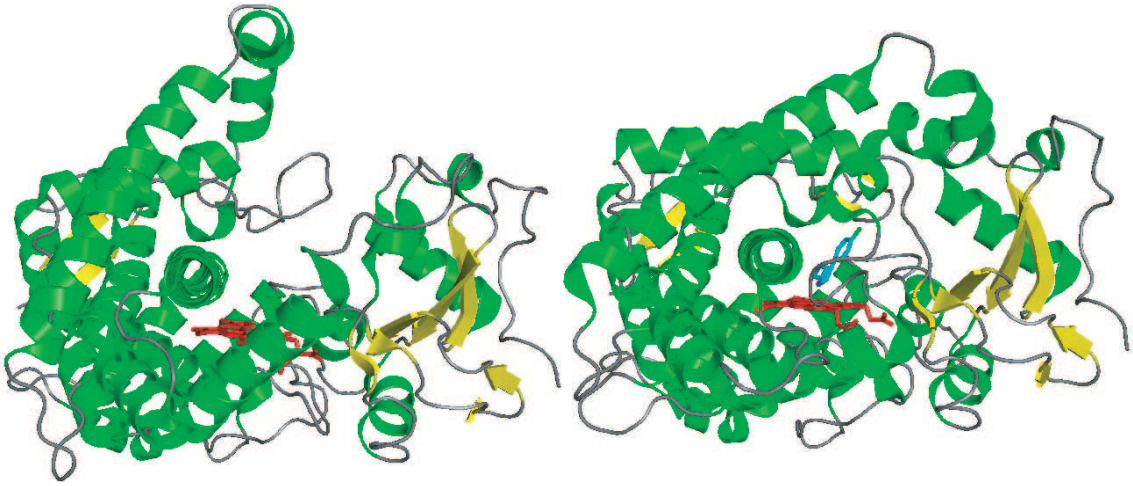
Figure I.15 – **Analogue du camphre complexé au P450cam (PDB 1LWL) d'après *Dunn et al., 2002***. L'analogue de substrat est représenté en sphères au centre du site actif. Du fait de sa longueur importante, le substrat occupe tout un canal d'accès, avec la partie fluorescente à l'extérieur de l'enveloppe protéique.

La résolution de la structure tridimensionnelle du $P450_{cam}$ complexé avec le camphre a révélé un site actif des P450s profondément enfoui au sein de la protéine *(Poulos et al., 1987)*. Dès lors, la question de l'accessibilité des substrats à ce site actif s'est posée. Globalement très proches, les structures du $P450_{cam}$ avec et sans camphre ne présentent pas de canal parfaitement défini. Cependant, les facteurs thermiques des structures RX montrent une flexibilité possible des hélices B', F

et G. Poulos et al. ont ainsi proposé que l'hélice B' soit très flexible et puisse permettre l'entrée du substrat *(Poulos et al., 1987)*. Plusieurs études ont contribué à valider cette hypothèse, et le résultat qui confirme le mieux ce point de vue est la cristallisation du $P450_{cam}$ avec un analogue du camphre, possédant une longue chaîne avec une sonde fluorescente à son extrémité *(Dunn et al., 2002)* (voir figure I.15). Ce composé occupe tout un canal d'accès, qui se forme par déplacement de l'hélice B' et de la boucle F-G. Plusieurs autres travaux sur les P450s solubles ont confirmé ce résultat tout en apportant des preuves de la présence d'autres canaux possibles dans certains P450s, selon le substrat considéré *(Poulos et Johnson, 2005; Cojocaru et al., 2007)*.

Contrairement aux P450s cytosolubles, les P450s microsomaux ont une boucle F-G beaucoup plus longue qui se structure généralement en deux courtes hélices F' et G'. Cette région interagit beaucoup plus avec la région en feuillets β de la partie N-terminale, limitant les possibilités d'ouverture évoquées précédemment chez les P450s solubles. Cependant, l'hélice B' est encore très flexible, elle peut donc jouer un rôle dans l'ouverture d'un canal d'accès des substrats.

Au vu des structures du CYP 2C5/3LVdH, E.F Johnson a proposé un canal d'accès des substrats dont l'entrée serait délimitée par les hélices B', I et G et par la boucle B'-C *(Wester et al., 2003a)*. Cependant, d'autres structures de P450s de mammifères ont révélé l'existence de plusieurs canaux visibles. La structure la plus éloquente est celle du CYP 2B4 de lapin sans substrat *(Scott et al., 2003)*. Celle-ci présente une large ouverture entre les hélices F et G d'une part et l'hélice B' d'autre part. Il est à noter que l'ouverture de ce canal est telle qu'une histidine d'un autre monomère de CYP 2B4 vient complexer le fer. D'autre part, une autre structure du CYP 2B4 complexée avec un petit substrat (4-chlorophenylimidazole) montre la très grande flexibilité de la protéine dans cette région *(Scott et al., 2004; Zhao et al., 2006b)* (Figure I.16).



2B4 sans substrat — 2B4 complexé avec le 4-Chlorophenylimidazole

Figure I.16 – **Structures du CYP 2B4 sans substrat (PDB 1PO5) et complexé avec le 4-Chlorophenylimidazole (PDB 1SUO)**. Dans la structure sans ligand, les hélices F et G sont éloignées du plan de l'hème et la boucle B-C n'est plus structurée en hélice, comme dans la seconde structure. D'après *Scott et al., 2004; Zhao et al., 2006b.*

Des analyses par dynamique moléculaire d'expulsion de substrat menées par l'équipe de R.C. Wade ont permis de compléter ces hypothèses en démontrant la présence possible d'autres canaux dont l'ouverture dépend du substrat considéré *(Ludemann et al., 2000; Winn et al., 2002; Wade et al.,*

2004; Schleinkofer et al., 2005; Cojocaru et al., 2007).

I-1.3.4 Les modèles de P450s.

La modélisation par homologie est devenue un outil très utilisé dans l'étude des cytochromes P450. Il y a en effet trop de P450s pour espérer que toutes ces protéines soient rapidement cristallisées avec et sans substrat. Cependant, la modélisation par homologie doit relever un important défi. Toutes les structures connues à l'heure actuelle montrent que les parties les plus variables, donc difficiles à modéliser par homologie, sont les parties les plus importantes pour la reconnaissance des substrats par les P450s.

Depuis la cristallisation du premier P450 en 1985, de nombreuses équipes ont essayé de construire des modèles par homologie de P450s, notamment des P450s humains. La résolution de la structure du CYP 2C5/3LVdH a ouvert la porte à un meilleur affinement des modèles des P450s de mammifères et certains ont modélisé nombre de P450s humains à partir de cette seule structure *(Lewis, 1998, 2002).* Toutefois, à l'heure actuelle, la diversité des structures de P450s de la famille 2 (2A6, 2B4, 2C5, 2C8, 2C9 et 2D6) disponibles permet d'espérer construire des modèles plus précis de P450s de la famille 2.

Plusieurs méthodes de modélisation par homologie ont été employées pour modéliser les cytochromes P450, dont certaines ont été utilisées dans l'équipe de D. Mansuy.

Modélisation par alignements de séquences D.F. Lewis a utilisé cette méthode pour construire plusieurs modèles de P450s de la famille 1, 2 ou 3 *(Lewis, 2002).* Après un alignement des deux séquences basé sur l'homologie entre le P450 à modéliser et la structure initiale (appelée *template*), le modèle est construit en se basant sur cette séquence seule. Cette méthode présente deux principaux défauts. Tout d'abord, elle utilise une structure initiale unique, ce qui donne généralement un modèle très proche du *template*. Puis l'alignement est réalisé en se basant sur la structure primaire en acides aminés du *template* et du P450 à modéliser, sans prendre en compte les éléments structuraux tridimensionnels du *template*.

La mutagénèse virtuelle. Utilisée par C. Marques pour modéliser les CYP 2C8 et 2C9 *(Melet et al., 2003; Melet, 2004),* cette méthode est très proche de la précédente, car elle utilise comme *template* la structure du CYP 2C5/3LVdH. On mute successivement tous les résidus pour arriver à la séquence du P450 désiré. Dans ce cas, l'identité de séquence très grande entre le CYP 2C5 et le CYP 2C8 (ou CYP 2C9) est suffisante pour considérer que les deux structures le seront également, et de ce fait, les erreurs de construction du modèle induites par la première méthode sont considérablement réduites. Cependant, dans des cas où l'homologie de séquence est inférieure à 80 %, cette méthode est peu envisageable, car l'approximation d'une structure proche avec le *template* n'est plus valable.

La modélisation par alignements de blocs structuraux Cette méthode est de loin la plus efficace pour modéliser une protéine dont l'homologie avec les structures *templates* est inférieure à 50 %. P. Jean, au sein de l'équipe de D. Mansuy et en collaboration avec l'équipe de J. Potier et A. Viari de l'A.B.I à l'Institut Curie, a mis au point cette méthode afin de modéliser les CYPs *(Jean et al., 1997).* A la différence des deux autres techniques, la première étape consiste à

aligner **par éléments structuraux** plusieurs *templates*, pour définir des zones fixes en terme de structure (généralement, les hélices ou les feuillets). Ces zones, appelées Blocs de Structure Commune, sont utilisées pour être alignées avec la séquence du P450 à modéliser. Ainsi, cette méthode s'affranchit de l'utilisation d'une seule structure et évite d'obtenir un modèle trop proche des *templates* initiaux.

I-1.4 Les cytochromes P450 humains.

I-1.4.1 Les 57 isoformes humaines de cytochromes P450.

P450	Tissus d'expression principaux	Localisation cellulaire	Activité caractéristique
1A1	Poumon	RE	3-Hydroxylation du benzo[a]pyrène
1A2	Foie	RE	N-Déméthylation de la caféine
1B1	Poumon et Rein	RE	4-hydroxylation du 17β-estradiol
2A6	Foie et poumon	RE	7-hydroxylation de la coumarine
2A7			
2A13	Muqueuse nasale	RE	Activation de la NNK[1]
2B6	Foie et poumon	RE	N-déméthylation de la (S)-mephenytoine
2C8	Foie et vaisseaux	RE	6α-hydroxylation du taxol
2C9	Foie	RE	4'-hydroxylation du diclofénac
2C18	Foie	RE	
2C19	Foie	RE	4-hydroxylation de la (S)-mephenytoine
2D6	Foie	RE	4-hydroxylation de la debrisoquine
2E1	Foie et poumon	RE	6-hydroxylation de la chlorzoxazone
2F1	Poumon	RE	3-méthylindole
2J2	Coeur	RE	Hydroxylation de l'ébastine
2R1			
2S1	Poumon	RE	
2U1	Cerveau et thymus	RE	ω-hydroxylation d'acides gras
2W1			
3A4	Foie et intestin	RE	6β-hydroxylation de la testostérone
3A5	Foie et poumon		6β-hydroxylation de la testostérone
3A7	Foie fœtal		6β-hydroxylation de la testostérone
3A43	ARNm détecté dans les gonades	(RE)	
4A11	Foie	RE	ω-hydroxylation d'acides gras
4A22		RE	
4B1	Poumon	RE	ω-hydroxylation de l'acide laurique
4F2	Foie	RE	ω-hydroxylation du leucotriène B
4F3	Neutrophiles	RE	ω-hydroxylation du leucotriène B_4
4F8	Vésicules séminales	RE	ω-2-hydroxylation de prostaglandines

Suite page suivante

[1] 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

Tableau I.4*(suite)*

4F11	Foie	RE	
4F12	Foie	RE	Hydroxylation de l'ébastine
4F22			
4V2			Oxydation d'acides gras
4X1	Cerveau		Oxydation d'acides gras
4Z1			
5A1	Plaquettes	RE	Synthèse du thromboxane A_2
7A1	Foie	RE	7α-hydroxylation du cholestérol
7B1	Cerveau	RE	7α-hydroxylation de la déhydroepiandrostérone
8A1	Aorte	RE	Synthèse de la prostacycline
8B1	Foie	RE	
11A1	Glandes adrénales	M	Coupure de chaine latérale du cholestérol
11B1	Glandes adrénales	M	11-hydroxylation du 11-deoxycortisol
11B2	Glandes adrénales	M	18-hydroxylation de la corticostérone
17A1	Tissus stéroidogènes	RE	17α-hydroxylation de stéroïdes
19A1	Tissus stéroidogènes	RE	
20A1			
21A2	Tissus stéroidogènes	RE	21-hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone
24A1	Rein	M	24-hydroxylation de la 25-hydroxyvitamine D_3
26A1		RE	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
26B1	Cerveau	RE	4-hydroxylation de l'acide rétinoïque
26C1			
27A1	Foie	M	27-hydroxylation de stérols
27B1	Rein	M	1-hydroxylation de la vitamine D_3
27C1			
39A1	Foie	RE	7-hydroxylation du 24-hydroxycholestérol
46A1	Cerveau	RE	24-hydroxylation du cholestérol
51A1	Foie	RE	14α-deméthylation du lanostérol

Tableau I.4: **Les 57 cytochromes P450 humains et leur localisation d'après *Guengerich, 2005.* RE : Réticulum endoplasmique ; M : Mitochondrie**.

La description du génome humain en 2001 a permis de déterminer le nombre total de gènes codant pour des P450s, qui est de 57. La liste complète est présentée dans le tableau I.4 avec leur distribution tissulaire (pour les P450s caractérisés). Parmi ces P450s, 37 (ou 38) sont exprimés dans le réticulum endoplasmique, et seulement 6 sont mitochondriaux. Parmi les P450s dont l'activité catalytique et le rôle biologique sont bien caractérisés, on dénombre 20 P450s impliqués dans la chaîne de biosynthèse et de dégradation des stérols, des vitamines et des eïcosanoïdes, et 15 qui participent à la détoxification des xénobiotiques (Tableau I.5). Parmi les autres P450s dont le rôle biologique reste incertain ou inconnu, on distingue ceux qui semblent être impliqués dans la métabolisation des eicosanoïdes et

ceux qui catalysent l'oxygénation des acides gras. Les P450s dont l'existence est connue par l'analyse du génome humain, mais dont l'étude est incomplète ou inexistante, sont appelés « P450s orphelins » et apparaissent dans ce dernier groupe.

Rôle endogène			**Métabolisation des**	**Rôle biologique inconnu ou incertain**		
Stérols	Vitamines	Eïcosanoïdes	**Xénobiotiques**	Acides gras	Eïcosanoïdes	Orphelins
1B1	24A1	5A1	1A1	2J2	4F2	2A7
7A1	26A1	8A1	1A2	4A11	4F3	2R1
7B1	26B1		2A6	4B1	4F8	2S1
8B1	27B1		2A13	4F12		2U1
11A1			2B6			2W1
11B1			2C8			3A43
11B2			2C9			4A22
17A1			2C18			4F11
19A1			2C19			4F22
21A2			2D6			4V2
27A1			2E1			4X1
39A1			2F1			4Z1
46A1			3A4			20A1
51A1			3A5			26C1
			3A7			27C1

Tableau I.5 – **Classification des P450s humains basée sur la classe de leur substrat principal *(Guengerich, 2005)***. Cette classification est arbitraire, et certains P450s pourraient apparaître dans plusieurs colonnes.

I-1.4.2 Les P450s impliqués dans les voies endogènes.

La plupart des P450s participant à la chaîne de biosynthèse du cholestérol, des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes (figure I.17-**A** et **B**) sont indispensables pour l'organisme. Les polymorphismes génétiques de ces P450s conduisant à des formes inactives ou moins actives entraînent généralement des maladies très graves et leur taux d'expression inter-individuel reste quasiment constant *(Pikuleva, 2006).* On retrouve ces P450s dans les organes stéroïdogènes.

La synthèse et la dégradation de la 1-α-25-dihydroxyvitamine D_3, ligand du récepteur de la vitamine D_3 sont principalement catalysées par quatre isoformes de P450s, dont 3 sont mitochondriales (figure I.17-**C**). Cette voie de signalisation est responsable du transport des ions Ca^{2+}, des os vers le transit intestinal *(Nebert et Russell, 2002).*

Contrairement aux deux autres voies de biosynthèse évoquées précédement, la chaîne de biosynthèse et de dégradation des eïsosanoïdes est partiellement connue (figure I.17-**D**). Les cytochromes P450 impliqués dans la synthèse de la prostacycline, du tromboxane A_2 et du 12-HHT ont été identifiés, mais les isoformes impliquées dans d'autres voies de synthèse de cette cascade arachidonique n'ont pas été complètement identifiés. Ainsi, de nombreuses isoformes de P450s catalysent l'époxydation de l'acide arachidonique (voir partie I-3). Les produits issus de cette cascade sont impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques, notamment au niveau vasculaire.

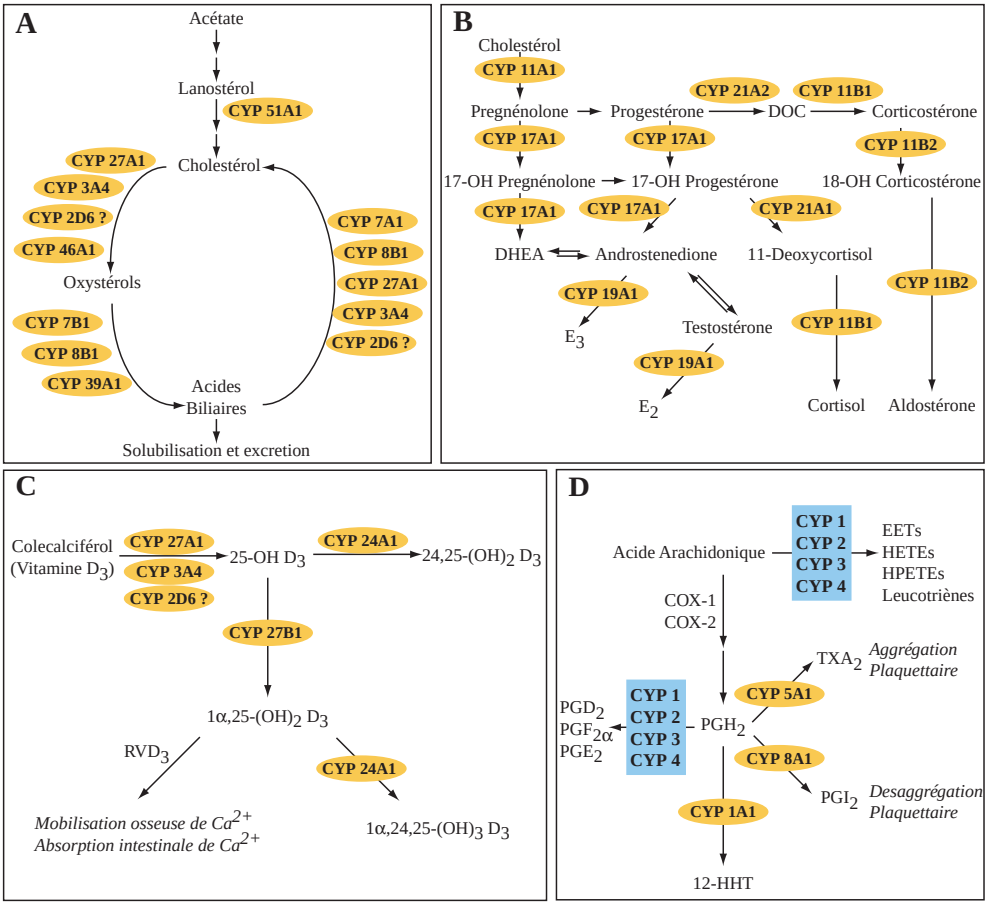


Figure I.17 – **Cytochromes P450 impliqués dans la biosynthèse des acides biliaires (A) et des hormones stéroïdiennes (B), dans la transformation de la vitamine D_3 (C) et des eïcosanoïdes (D).** D'après *Nebert et Russell, 2002.* Les étapes pour lesquelles les isoformes responsables n'ont pas été identifiées sont indiquées par des rectangles bleus. DOC : déoxycorticostérone, DHEA : déhydroépiandrostérone, E_3 : oestriol, E_2 : oestradiol ; RVD_3 : Récepteur de la vitamine D_3 ; EETs : époxydes d'acide arachidonique, HETEs : hydroxydes d'acide arachidonique, HPETEs : hydroperoxydes d'acide arachidonique, COX : cyclooxygénase, PGH_2 : prostaglandine H_2, PGD_2 : prostaglandine D_2, $PGF_{2\alpha}$: prostaglandine $F_{2\alpha}$, PGE_2 : prostaglandine E_2, 12-HHT : acide 12(S)-12-hydroxy-5,8,10-heptadecatriènoïque, TXA_2 : thromboxane A_2, PGI_2 : prostacycline.

I-1.4.3 Importance pharmacologique des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.

Contrairement aux P450s impliqués dans la chaîne de biosynthèse des stéroïdes, les P450s qui participent à la détoxification des xénobiotiques sont présents dans les organes de filtration ou de stockage (le foie ou le rein), mais également d'autres organes qui peuvent être des voies d'accès des xénobiotiques dans l'organisme (appareil intestinal, respiratoire, ou peau) *(Ding et Kaminsky, 2003).*

Du fait de leur participation à la phase I de détoxification des xénobiotiques, les cytochromes P450 jouent un rôle pharmaco-toxicologique très important.

- La vitesse d'élimination des médicaments de l'organisme est conditionnée par la vitesse de leur transformation par les cytochromes P450. Ce métabolisme peut varier en fonction de facteurs génétiques (polymorphisme des cytochromes P450), ou environnementaux (induction, inhibition), et ainsi constituer une cause possible d'inefficacité thérapeutique ou même de toxicité *(Ingelman-Sundberg, 2002).*
- D'autre part, l'oxydation des xénobiotiques est parfois à l'origine de la formation de métabolites réactifs, potentiellement toxiques pour l'organisme *(Park et al., 2005).*

(a) Le métabolisme des médicaments par les cytochromes P450.

Les médicaments sont majoritairement métabolisés dans le foie, organe de détoxification principal des xénobiotiques. La quantité de cytochromes P450 hépatiques est très importante (environ 18000 nmoles en moyenne pour un foie de 1,5 kg *(Kaminsky et al., 1984)*). Leur répartition par isoenzyme est indiquée figure I.18. Il est à noter que contrairement aux cytochromes P450 impliqués dans les oxydations de composés endogènes, la variabilité inter-individuelle d'expression de ces isoenzymes est très importante (voir plus loin). La contribution relative des différents cytochromes P450 au métabolisme des médicaments est à peu près proportionnelle à leur abondance relative dans le foie, excepté pour les CYP 1A et le CYP 2D6. Approximativement 75% des médicaments sont métabolisés par seulement trois CYP hépatiques (figure I.18) : les CYP 3A4, CYP 2D6 et CYP 2C9 *(Rendic, 2002).*

D'autres organes sont également le lieu d'un métabolisme secondaire mais néanmoins important, car les cytochromes P450 exprimés dans ces tissus contribuent non seulement à l'élimination, mais influencent également les concentrations tissulaires des agents thérapeutiques. Ainsi, l'intestin serait le lieu principal du métabolisme extra-hépatique. Le profil de répartition des cytochromes P450 intestinaux est également présenté dans la figure I.18. Le CYP 3A4 est en proportion beaucoup plus importante, mais d'autres P450s sont relativement plus présents que dans les tissus hépatiques, comme le CYP 2J2, tandis que d'autres CYP présents dans le foie ne sont pas détectés dans l'intestin, tels que les CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, et 2E1 *(Paine et al., 2006).* Bien que la quantité totale de cytochromes P450 exprimés dans l'intestin soit environ 100 fois plus faible que celle du foie, certaines études ont montré que le métabolisme intestinal pouvait contribuer de façon significative et parfois égale au métabolisme hépatique, comme dans le cas de la cyclosporine, du midazolam ou du verapamil *(Kolars et al., 1991; Paine et al., 1996; von Richter et al., 2001).*

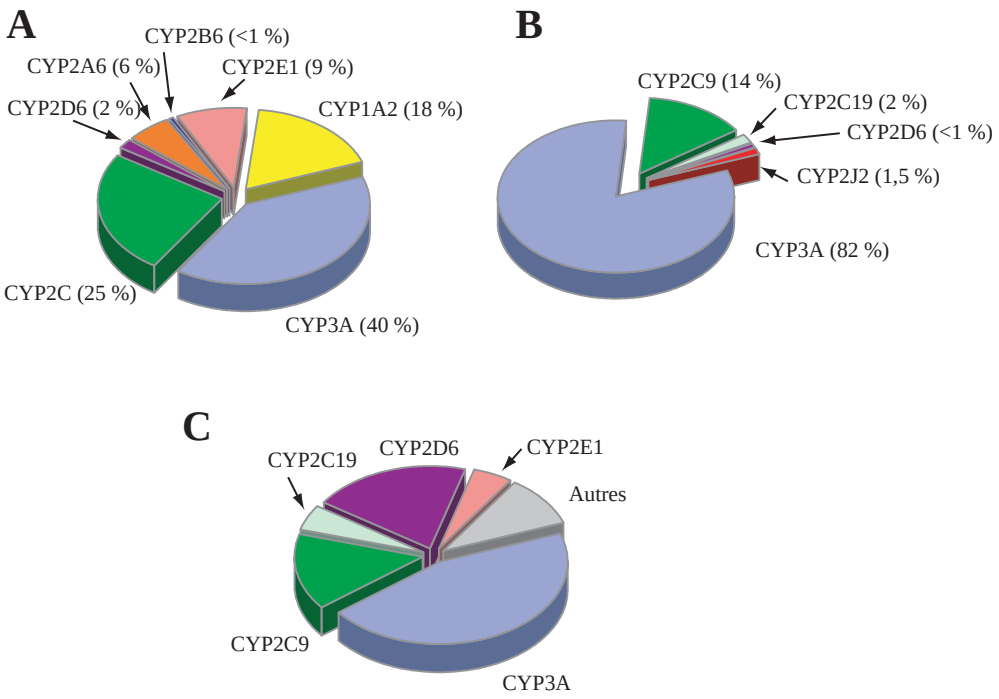


Figure I.18 – **Proportions des différentes isoformes de cytochromes P450 présentes dans le foie (A) *(Guengerich, 2005)* et l'intestin (B) humains *(Paine et al., 2006)*. Contribution des différents P450s au métabolisme hépatique des médicaments (C) d'après *Guengerich, 2005***.

Les tissus du système respiratoire, qui sont exposés à la fois aux xénobiotiques inhalés et aux pathogènes transmis par le sang, sont une cible importante en toxicologie environnementale. De nombreux P450s sont exprimés dans le poumon, comme les CYP 1A, 2A6, 3A4, 2C, 2D6, ou même 2J2, d'autres étant plus spécifiquement exprimés dans ce tissu, comme les CYP 2A13, 2S1 ou 4B1 *(Ding et Kaminsky, 2003)*. Le poumon semble être le lieu d'entrée dans l'organisme pour de nombreux pro-carcinogènes, comme les hydrocarbones aromatiques présents dans la fumée de cigarette, métabolisés par les CYP 1A ou 2A.

(b) Les causes de variations inter-individuelles du métabolisme des médicaments.

L'activité des cytochromes P450 dans le tissu hépatique est fortement dépendante de deux paramètres, l'un génétique (polymorphisme), et l'autre exogène (induction et inhibition). Cette variabilité peut être la cause d'une accumulation trop importante ou d'une élimination trop rapide du médicament, pouvant entraîner des effets indésirables et/ou toxiques.

(b)-i Les facteurs génétiques.

Les gènes codant pour les P450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques peuvent avoir des mutations allèliques, qui sont appelées **polymorphismes** si leur fréquence est supérieure à 1% de la population. Ces variations du gène peuvent conduire à des variations d'expression du CYP correspondant, ainsi qu'à des variations de leur activité catalytique. Ainsi, de nombreux polymorphismes de P450s définissent deux phénotypes, appelés « métaboliseur lent » et « métaboliseur rapide », pour un médicament donné. Les métaboliseurs rapides éliminent plus vite le médicament et diminuent son

efficacité thérapeutique, tandis que les métaboliseurs lents accumulent le médicament, qui peut devenir toxique quand sa concentration dépasse un certain seuil. La communauté scientifique et médicale est maintenant bien consciente qu'une thérapie rationnelle peut émerger en prenant en considération ces variations de métabolisme inter-individuelles *(Evans et Relling, 1999).*

(b)-ii Les interactions médicamenteuses.

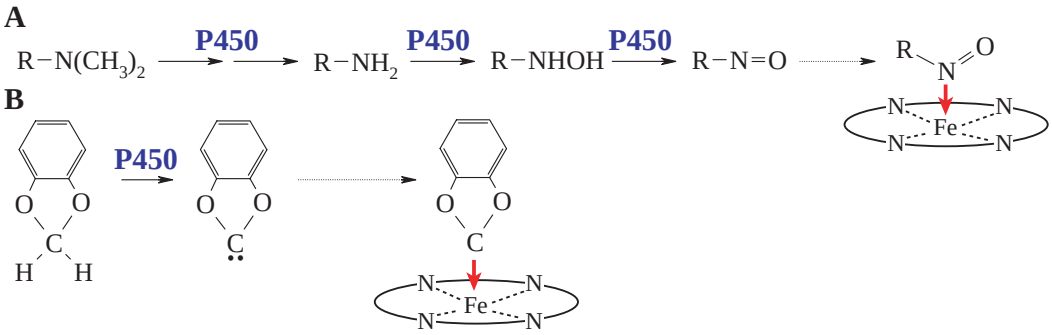
Un médicament peut entraîner une **inhibition** de l'activité catalytique de certains P450s, ou une **induction** de l'expression de certains P450s. Si un second médicament est métabolisé par ces P450s dont l'activité est modifiée, son métabolisme pourra être fortement perturbé. La prise simultanée de tels médicaments peut entraîner des interactions du métabolisme ou **interactions médicamenteuses** dont les effets peuvent être une inefficacité thérapeutique, ou une toxicité vis-à-vis de l'organisme.

Inhibition des P450s *(Correira et Ortiz de Montellano, 2005).*

Certains composés sont inhibiteurs des P450s, et diminuent leur activité catalytique vis-à-vis d'un substrat. On distingue deux types d'inhibiteurs : les inhibiteurs réversibles et les inhibiteurs irréversibles.

– **Les inhibiteurs réversibles.** Ces composés diminuent l'activité enzymatique en se fixant soit au niveau du site actif en entrant en compétition avec le substrat, soit dans un autre site de l'enzyme en modifiant sa structure ce qui peut entraîner une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Généralement, les inhibiteurs de P450s sont des inhibiteurs compétitifs, qui prennent la place du substrat au sein du site actif, par des interactions non-covalentes (hydrophobes, ioniques, complexes avec le fer, ...).
– **Les inhibiteurs irréversibles** *(Fontana et al., 2005).* Certains inhibiteurs peuvent être oxydés par les P450s en métabolites réactifs qui se fixent de façon covalente dans le site actif de ces cytochromes P450. On parle donc d'inhibition irréversible et d'**inhibiteur suicide**. L'inhibiteur peut se fixer soit à l'hème, soit à l'apoprotéine. Quelques exemples de groupes connus comme inactivant des CYPs sont présentés figure I.19, ainsi que leur mécanisme d'inactivation de ces P450s. On distingue notamment :
    • les alkylamines transformées en nitrosoalcanes *(Mansuy et al., 1978),* se liant de façon quasi-covalente au fer de l'hème,
    • les composés comportant un groupe méthylène-dioxyarène, pouvant former un complexe fer-carbène *(Mansuy et Ullrich, 1975),*
    • les alcènes ou alcynes terminaux capables de N-alkyler l'hème du P450 *(Ortiz de Montellano et Mico, 1980),*
    • les cycles thiophéniques oxydés en sulfoxydes de thiophènes capables d'alkyler l'apoprotéine *(Lopez-Garcia et al., 1994).*

- Fixation quasi-covalente à l'hème



- Alkylation de l'hème ou de la protéine

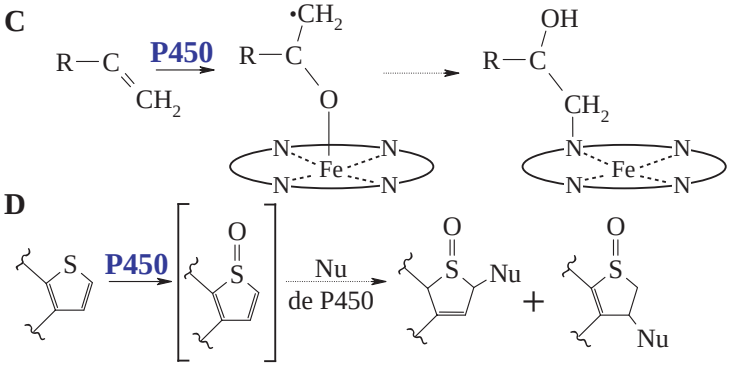


Figure I.19 – **Mécanisme d'inactivation des cytochromes P450 par certains substrats suicides**. Les motifs inactivants présentés correspondent aux amines (**A**), aux cycles benzodioxoles (**B**), aux oléfines terminales (**C**) et aux thiophènes (**D**).

De nombreux exemples d'interactions médicamenteuses impliquant des cytochromes P450 ont été étudiés. La terfénadine est une de ces molécules dont la vente a été interdite suite à de telles interactions observées cliniquement. Cet anti-histaminique non sédatif est en effet métabolisé dans le foie par le CYP 3A4 *(Yun et al., 1993)*. Mais la prise simultanée de ce médicament avec d'autres traitements, comme le kétoconazole (antiparasitaire) ou l'érythromycine (antibiotique), entraîne des complications cardiaques importantes (torsades de pointes) *(Monahan et al., 1990)*. Des études ultérieures ont démontré que la présence de kétoconazole, inhibiteur du CYP 3A4, diminuait fortement le métabolisme de la terfénadine, ce qui avait pour effet d'augmenter sa concentration plasmatique et de provoquer des toxicités cardiaques et vasculaires *(Wang et al., 2002)*. Ainsi, la commercialisation de ce médicament a été arrêtée suite à de tels accidents pour être remplacée par son métabolite actif, la fexofénadine ; ceci illustre les conséquences parfois dramatiques des interactions médicamenteuses.

Induction de l'expression des P450s

Lorsqu'un organisme est exposé à certains xénobiotiques, on peut observer une augmentation de certains P450s, en particulier ceux qui sont impliqués dans leur métabolisme. Ces composés, appelés **inducteurs**, activent des facteurs de transcription des cytochromes P450. On distingue généralement 4 types d'inducteurs, en fonction de leur classe chimique ou du récepteur activé (tableau I.6).

Lorsqu'un médicament est inducteur de P450s, la prise simultanée d'autres médicaments peut entraîner des interactions médicamenteuses importantes. En effet, si l'un des médicaments est méta-

bolisé par un P450 induit, sa métabolisation sera plus rapide. Ceci a pour effet d'abaisser sa concentration plasmatique et de diminuer son efficacité thérapeutique.

Classe d'inducteur	Origine	Exemples	P450 induits
Hydrocarbures polyaromatiques	Tabac, Viande grillée Expositions accidentelles	Benzo(a)pyrène, dioxine 3-Méthylcholanthrène	CYP 1A1, CYP 1A2
Barbituriques	Médicaments, DDT	Diphénylhydantoine	CYP 2C, CYP 3A4
Ligands des PXR	Certains stéroïdes et antibiotiques	Rifampicine	CYP 3A4
Inducteurs du CYP 2E1	Ethanol, isoniazide	Ethanol	CYP 2E1

Tableau I.6 – **Principaux inducteurs des cytochromes P450 humains. D'après *Guengerich, 2005***.
PXR : Pregnane X-Receptor

I-1.4.4 Les P450s de rôle incertain ou inconnu.

Contrairement aux P450s métabolisant les xénobiotiques ou à ceux impliqués dans les chaînes de biosynthèse endogènes décrits précédemment, le rôle biologique de près de la moitié des P450s humains (24 sur 57) révélés par le décryptage du génome humain, demeure inconnu.

Certains sont capables d'oxyder des composés endogènes (notamment ceux de la cascade arachidonique), mais leur participation exacte aux cascades de biosynthèse correspondantes n'est pas identifiée. Il est en effet difficile de leur attribuer un rôle particulier, du fait d'une localisation tissulaire inhabituelle ou d'une très faible expression. On peut citer en exemple le CYP 4F12 qui est très peu exprimé dans le foie, mais qui est capable d'hydroxyler l'acide arachidonique *(Bylund et al., 2001)* et qui est également impliqué dans le métabolisme d'un médicament, l'ébastine *(Hashizume et al., 2002).*

Les autres P450s dont le rôle biologique est inconnu n'ont bien souvent pas été caractérisés. On parle de « P450s orphelins », terminologie discutable, qui souligne simplement que l'existence de ces P450s est révélée par le génome, mais que leur fonction biologique n'est pas connue. Les CYP 4F22 ou 4V2 font notamment partie de cette catégorie.

Bien que leur taux d'expression soit très faible en comparaison aux autres isoformes, tous ces P450s doivent jouer un rôle important au sein de l'organisme humain, fait démontré par de nombreuses études de polymorphismes, corrélés avec des pathologies souvent sérieuses *(Lin et al., 2005; Spiecker et al., 2004).*

Les cytochromes P450 sont des enzymes qui catalysent diverses étapes de la biosynthèse ou de la dégradation de composés endogènes, mais qui participent également à la détoxification des xénobiotiques. La prévision du métabolisme des médicaments peut être réalisée en partie grâce à l'étude des cytochromes P450. Les tests in vitro *sur enzymes recombinantes, sur cellules hépatiques ou intestinales ou sur microsomes humains constituent un moyen d'étude rapide, moins onéreux et plus facile à mettre en oeuvre que les tests* in vivo *sur animaux. D'autre part, les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de composés endogènes sont essentiels pour l'organisme, une faible variation*

d'activité pouvant entraîner des conséquences importantes en termes de pathologies graves pour le patient.

Historiquement, l'équipe de D. Mansuy a travaillé principalement sur l'étude de la sous-famille 2C, importante dans le métabolisme hépatique des médicaments. Dans cette sous-famille, le dernier P450 humain étudié au laboratoire a été le CYP 2C8. Ce cytochrome P450, exprimé notamment dans les vaisseaux, semble jouer un rôle physiologique important dans les tissus vasculaires. D'autres P450s, comme le CYP 2J2, qui fait partie des P450s dont le rôle biologique est très mal connu, pourrait aussi jouer un rôle important dans les tissus vasculaires. Il a été l'objet de ce travail de thèse.

I-2 Le cytochrome P450 2J2.

I-2.1 La sous-famille 2J.

Le premier représentant de la sous famille 2J a été identifié au début des années 90 par l'équipe de Y. Fujii-Kuriyama *(Kikuta et al., 1991),* dans l'intestin grêle du lapin. Depuis, la très grande majorité des isoenzymes de cette sous-famille a été caractérisée et clonée par l'équipe de D.C. Zeldin *(Scarborough et al., 1999).* Cette sous-famille a la particularité d'être exprimée majoritairement dans les tissus extra-hépatiques, notamment les tissus vasculaires, le poumon et le système gastro-intestinal. Elle pourrait donc être impliquée dans le métabolisme extra-hépatique des xénobiotiques.

I-2.1.1 Représentants de la sous-famille 2J.

Grâce au séquençage du génome chez plusieurs organismes, une trentaine de gènes susceptibles de coder un cytochrome P450 de la sous-famille 2J ont été identifiés, majoritairement chez la souris et le rat, mais également chez l'homme, le lapin, le poulet et le boeuf *(Scarborough et al., 1999; Grasso et al., 2005).* Seule une dizaine de protéines correspondantes ont été clonées, et parfois localisées dans l'organisme (voir tableau I.7). Chez l'homme, l'analyse du génome indique qu'il n'existe qu'un seul gène codant pour un représentant de la sous-famille 2J.

Isoenzyme	Organisme	Localisation principale	référence
CYP 2J1	Lapin	Intestin	*(Kikuta et al., 1991; Koike et al., 1997)*
CYP 2J2	Homme	Coeur	*(Wu et al., 1996)*
CYP 2J3	Rat	Foie, coeur	*(Wu et al., 1997)*
CYP 2J4	Rat	Intestin, poumon	*(Zhang et al., 1997)*
CYP 2J5	Souris	Rein	*(Ma et al., 1999)*
CYP 2J6	Souris	*n.d.*	*(Ma et al., 2002)*
CYP 2J7/2J8	Souris	*n.d.*	*Zeldin et al., non publié*
CYP 2J9	Souris	Cerveau	*(Qu et al., 2001)*
CYP 2J10	Rat	Rein	*(Yu et al., 2000)*
CYP 2J13	Souris	*n.d.*	*(Katayama et al., 2005)*

Tableau I.7 – **Cytochromes P450 de la sous-famille 2J ayant fait l'objet d'une caractérisation totale ou partielle**. *n.d.* : non déterminé.

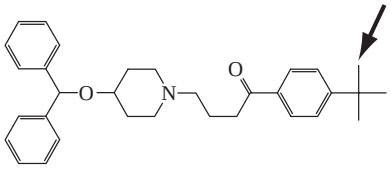
I-2.1.2 Le cytochrome P450 2J2.

(a) Localisation et distribution tissulaire chez l'homme.

Le CYP 2J2 est le seul P450 humain qui soit exprimé majoritairement dans le coeur (principalement dans les myocytes cardiaques et les cellules endothéliales). On retrouve également cette isoforme dans l'endothélium des artères coronaires de petite et grande taille, et on en détecte une faible quantité dans les cellules musculaires lisses *(Wu et al., 1996; Node et al., 1999).* On retrouve également ce cytochrome P450 dans une moindre mesure dans le poumon, le rein, le foie, les cellules musculaires non cardiaques, le système digestif et les cellules épithéliales *(Zeldin et al., 1996; Wu et al., 1996; Zeldin et al., 1997a,b; Du et al., 2004; Enayetallah et al., 2004).*

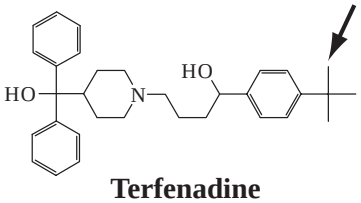
(b) Métabolisme des composés endogènes et exogènes par le CYP 2J2.

Du fait de sa localisation principalement vasculaire, le CYP 2J2 doit avoir un rôle différent de la détoxification des xénobiotiques. En effet, les tissus vasculaires ne sont ni un organe de stockage, comme le foie, ou de filtrage, comme le rein. On ne connaît pas à l'heure actuelle son rôle exact dans les vaisseaux, mais on sait néanmoins qu'il est capable d'époxyder les acides arachidonique et linoléique dont le rôle vasculaire est important (voir partie I-3) *(King et al., 2002; Wu et al., 1996).*



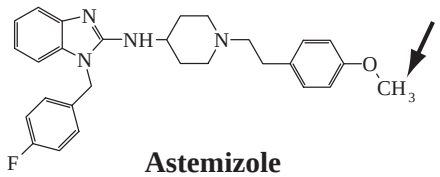
Ebastine

K_m = 1 µM, V_{max} = 35 min^{-1}



Terfenadine

K_m = 0,4 µM, V_{max} = 20 min^{-1}



Astemizole

K_m = 1 µM, V_{max}= 1,1 min^{-1}

Figure I.20 – **Xénobiotiques transformés par le CYP 2J2**. Le site de métabolisation est indiqué par une flèche. L'ébastine et la terfenadine sont hydroxylées, l'astémizole subit une O-déméthylation.

Dans les autres tissus où le CYP 2J2 est exprimé, notamment l'intestin, il a été montré qu'il participait au métabolisme intestinal de plusieurs médicaments. Au début de ma thèse, trois antihistaminiques (l'ébastine, l'astémizole et la terfenadine) avaient été identifiés comme substrats efficacement transformés par le CYP 2J2 dans l'intestin humain *(Hashizume et al., 2002; Matsumoto et al., 2003; Patten et al., 2003).* Les constantes cinétiques de métabolisation ainsi que les sites d'oxydations de ces composés sont indiqués figure I.20.

(c) Régulation de la transcription du gène du CYP 2J2.

Le cytochrome P450 2J2 est codé par le gène *cyp2J2* du chromosome 1. Ce cytochrome P450, long de 502 résidus, a une masse moléculaire de 58 kDa *(Wu et al., 1996)*. Le gène possède à son extrémité 5' un site de fixation de la protéine cJun qui active sa transcription *(Marden et Murray, 2005)*. A la suite d'une hypoxie, la libération de la protéine cFos *(Webster et al., 1994)* qui se dimérise avec cJun pour former la Protéine Activatrice-1 (AP-1), a pour effet de diminuer fortement la transcription du CYP 2J2 *(Marden et al., 2003)*. Le rôle exact de cette régulation n'est pas encore connu.

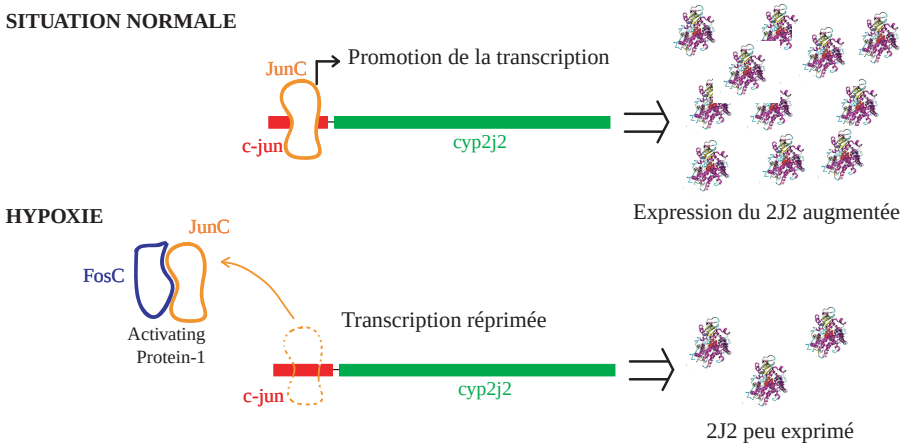


Figure I.21 – **Activation de la transcription du CYP 2J2 par la protéine junC**.

Contrairement aux autres P450s vasculaires participant à l'époxygénation de l'acide arachidonique (CYP 2C8 et 2C9, voir I-3), l'expression du CYP 2J2 semble être constitutive *(Wu et al., 1996; Spiecker et al., 2004)* et n'est pas induite par le cortisol, la nifédipine, les statines ou la β-naphtoflavone *(Fisslthaler et al., 2000; Bauersachs et al., 2002; Fisslthaler et al., 2003; Spiecker et al., 2004)*.

(d) Polymorphismes du CYP 2J2.

D'après le site de nomenclature officielle des P450s *http://www.cypalleles.ki.se*, une dizaine de variants alléliques du CYP 2J2 ont été identifiés. A ces variants s'ajoutent d'autres allèles qui ont été identifiés mais qui ne sont pas répertoriés dans cette base (voir tableau I.8). La quasi totalité des allèles codent pour des mutants fonctionnels du CYP 2J2. A ce jour, peu d'études rigoureuses de l'influence des polymorphismes sur la variation d'activité enzymatique ont été menées.

I-2.2 Implications du CYP 2J2 dans certaines pathologies.

I-2.2.1 CYP 2J2 et système vasculaire.

Du fait de sa localisation principalement vasculaire, plusieurs équipes de recherches se sont intéressées au rôle que pourrait jouer le CYP 2J2 dans les vaisseaux. Les relations observées entre pathologies cardio-vasculaires et variation de l'activité ou de l'expression du CYP 2J2 sont une forte indication de cette implication.

Allèle	Mutation (ADN^c)	Mutation (protéine)	Activité enzymatique	Références	Localisation
CYP 2J2*1	-	-	Normale	-	-
CYP 2J2*2	A427G	**T143A**	AA/AL réduites	*(King et al., 2002)*	Hélice C
CYP 2J2*3	C472T	**R158C**	AA/AL réduites	*(King et al., 2002)*	Hélice D
CYP 2J2*4	T575A	**I192N**	AA réduite	*(King et al., 2002)*	Hélice E
CYP 2J2*5	G1042A	**D342N**	Normale (AA/AL)	*(King et al., 2002)*	Hélice J
CYP 2J2*6	A1210T	**N404Y**	AA/LL réduites	*(King et al., 2002)*	Hélice K'
CYP 2J2*7	*G-50T*	-	Transcription réduite	*(King et al., 2002)* *(Spiecker et al., 2004)*	-
CYP 2J2*8	G934A	**G312R**	Réduites (Ebastine/Astémizole)	*(Lee et al., 2005)*	Hélice I
CYP 2J2*9	C1052T	**P351L**	Normales (Ebastine/Astémizole)	*(Lee et al., 2005)*	Boucle J-J'
CYP 2J2*10	C344T	**P115L**	Pas d'hème	*(Gaedigk et al., 2006)*	Boucle B'
Mutants non répertoriés					
-	-	**R49S**	-	*(Dreisbach et al., 2005)*	Feuillet β_{1-1}
-	-	**V113M**	-	*(Dreisbach et al., 2005)*	Hélice B'
-	-	**N124S**	-	*(Dreisbach et al., 2005)*	Boucle B-B'

Tableau I.8 – **Polymorphismes du CYP 2J2**. Les trois dernières mutations ont été publiées sans être répertoriées dans la base de données des variants alléliques des P450s humains. Les positions dans les éléments structuraux sont déterminées par alignement de séquences avec les CYP de la famille 2 dont les structures ont été publiées. Une mutation du gène sur le promoteur du site entraîne une faible transcription de l'ADN génomique (mutant CYP 2J2*7). Ce polymorphisme interviendrait sur le site de fixation de la protéine c-Jun, l'empêcherait de se fixer, et diminuerait la transcription du gène. AA : acide arachidonique ; AL : acide linoléique.

(a) Polymorphismes du CYP 2J2 et complications cardiaques.

Peu d'études ont été menées sur la corrélation entre des pathologies cardio-vasculaires et la présence éventuelle d'un allèle du CYP 2J2 dans une population donnée. Le variant 2J2*7 (fixation de c-Jun) est étudié dans la majorité des cas. Ce polymorphisme est corrélé à l'hypertension ou à des pathologies coronariennes dans des populations de type caucasienne, mais aucune corrélation particulière n'est relevée pour les populations afro-américaines *(Spiecker et al., 2004; King et al., 2005; Dreisbach et al., 2005).*

(b) Influence des pathologies liées aux vaisseaux sur l'expression du CYP 2J2.

Pathologie	*Organisme*	Organe/Tissu	Expression du CYP 2J	Références
Hypertension	*Rat*	Cortex et médullaire (Rein)	↑	*(Yu et al., 2000)*
		Vasculature rénale	↓	*(Kaergel et al., 2002)*
		Rein	↓	*(Zhao et al., 2003)*
Hypoxie	*Boeuf*	BAEC	↓	*(Yang et al., 2001)*
	Homme	Cellules HepG2	↓	*(Marden et al., 2003)*
Varices	*Homme*	Veines Saphènes	↑	*(Bertrand-Thiebault et al., 2004)*

Tableau I.9 – **Influence de certaines pathologies cardio-vasculaires sur l'expression du CYP 2J2**. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; BAEC : Cellules Endotheliales Bovines Aortiques

Quelques études ont montré la variation d'expression du CYP 2J2 lors d'une pathologie telle que l'hypertension ou une hypoxie-réoxygénation (qui peut apparaître lors d'une transplantation d'organe). Par ailleurs, la majorité de ces travaux concerne les orthologues du CYP 2J2 d'autres animaux (CYP 2J3 chez le rat, ou CYP 2J de boeuf). Le tableau I.9 répertorie les différentes pathologies qui peuvent faire évoluer l'expression du CYP 2J2 ou de ses orthologues.

(c) Influence d'une surexpression du CYP 2J2 sur des phénomènes physiologiques - Rôles des époxydes d'acide arachidonique.

Plusieurs équipes ont surexprimé le CYP 2J2 dans des cellules endothéliales animales, et ont étudié l'effet de cette surexpression sur des phénomènes physiologiques *(Spiecker et Liao, 2005, 2006)*. Il ressort de ces travaux que le CYP 2J2 est capable de **protéger les tissus vasculaires** à la suite d'une hypoxie-réoxygénation ou d'une ischémie-reperfusion *(Yang et al., 2001; Seubert et al., 2004)*. D'autre part, le CYP 2J2 semble fortement influer sur les phénomènes liés à **l'athérosclérose**, car cette enzyme possède des activités anti-thrombotiques (induction de l'enzyme thrombolytique « tissue type plasminogem activator ») *(Node et al., 2001)* et anti-inflammatoires (inhibition de l'expression de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) et de la formation du facteur proinflammatoire NF-κB) *(Node et al., 1999)*. Enfin, une surexpression du CYP 2J2 inhibe la migration des cellules musculaires lisses *(Sun et al., 2002)*, induit l'expression de la NO-synthase endothéliale *(Wang et al., 2003)*, augmente les courants calciques de type L *(Xiao et al., 2004)* et empêche l'apoptose des cellules endothéliales induites par le facteur TNF-α *(Yang et al., 2007)*. Une étude plus récente montre que la surexpression du CYP 2J2 active les canaux potassiques sensibles à l'ATP, très importants dans les mécanismes physiologiques cardiaques et vasculaires *(Lu et al., 2005)*.

Les études menées sur cette influence possible d'une surexpression du CYP 2J2 sur des pathologies ont également montré une relation forte avec la présence d'époxydes d'acides arachidoniques (EET). Le CYP 2J2 est en effet capable d'époxyder l'acide arachidonique pour former les EETs, ce qui permet de penser que le rôle vasculaire du CYP 2J2 puisse être lié aux EETs, dans la mesure où ces époxydes jouent un rôle très important de médiateurs au niveau vasculaire (voir partie I-3). Ainsi, tous les effets observés lors d'une surexpression du CYP 2J2 présentés dans le paragraphe précédent l'ont été également par injection d'EET (notamment de l'isomère 11,12-EET).

I-2.2.2 CYP 2J2 et cancer.

Récemment, deux études ont montré l'implication forte du CYP 2J2 dans certaines tumeurs humaines de type carcinomes *(Jiang et al., 2005; Enayetallah et al., 2006)*. En effet, cette enzyme est surexprimée dans de nombreux carcinomes et dans des cultures de lignées cellulaires tumorales. D'autre part, l'inhibition du CYP 2J2 par des ARN interférents ou par un inhibiteur de l'époxygénation de l'acide arachidonique permet de diminuer la croissance cellulaire, mais également la taille de tumeurs greffées *ex-vivo*. Le CYP 2J2 serait donc impliqué dans le phénotype néoplastique des carcinomes. Ce groupe a également montré que la surexpression du 2J2 dans des cellules endothéliales bovines augmente **la croissance et la migration cellulaire**, mais également **l'angiogénèse** *in vivo (Wang*

et al., 2005). Cette participation au phénomène d'angiogénèse lors des cancers est également liée à la formation des EETs.

Toutes les implications biologiques du CYP 2J2 présentées précédemment sont reliées à la formation et à la présence des époxydes d'acide arachidonique, dont le CYP 2J2 catalyse la biosynthèse. Pour comprendre le rôle que pourrait jouer le CYP 2J2 au sein du vaisseau, il est donc nécessaire de décrire plus précisément l'origine et le rôle de ces époxydes.

I-3 Les époxydes d'acide arachidonique.

L'acide arachidonique est un acide gras composé d'une chaîne carbonée de 20 carbones comportant 4 doubles liaisons, qui fait partie de la classe des ω_6, du fait de la position de sa dernière insaturation. Il peut être incorporé dans les membranes sous forme de phospholipides, mais également être métabolisé par plusieurs enzymes. Cette suite de réactions biochimiques, appelée **cascade arachidonique**, représentée en figure I.22, fait intervenir trois classes d'enzymes : les lipoxygénases qui sont à l'origine des leucotriènes, les cyclooxygénases qui synthétisent les prostaglandines, et les cytochromes P450 qui catalysent la formation des acides epoxyeïcosatriènoïques (EET), mais également des acides hydroxyeïcosatrièneoïques (HETE).

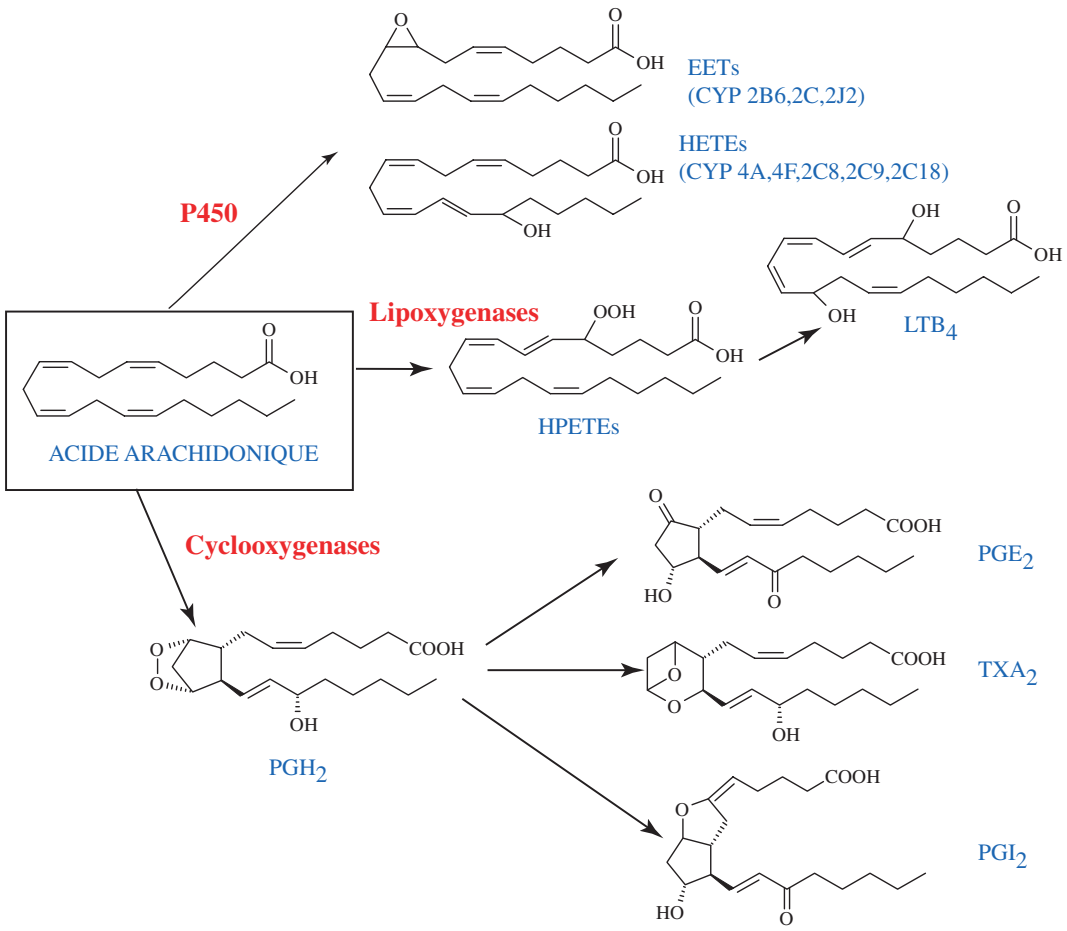


Figure I.22 – **Voies de métabolisation de l'acide arachidonique**.

I-3.1 Formation des EETs - les cytochromes P450 vasculaires.

Les P450s humains sont généralement capables de catalyser une monoxygénation de l'acide arachidonique. Cependant, du fait des quatre insaturations de cet acide, la réaction enzymatique peut conduire à un alcool, ou à un époxyde. Le tableau I.10 répertorie les P450s humains pouvant oxyder l'acide arachidonique.

Isoforme	*Epoxygénases*		*ω / ω-1 Hydroxylases*		*Autres Hydroxylations*	
	Produits	Localisation	Produits	Localisation	Produits	Localisation
1A2	EETs	F, P			7-, 10-, 13-HETE	F
2B6	EETs	F				
2C8	EETs	F, P, V			11-, 13-, 15-HETE	F
2C9	EETs	F, P, V			12-, 13-HETE	F
2C19	EETs	F			13-HETE	F
2J2	EETs	C, V, R, SGI				
3A4					7-, 10-, 13-HETE	F
4A11			19-, 20-HETE	F, R		
4F2			20-HETE	F, R		
4F3			HydroxyLTB$_4$	L		
4F8					18-HETE	F, AR
4F12			nd	F, R	18-HETE	F, R, SGI, C

Tableau I.10 – **P450s humains impliqués dans la métabolisation de l'acide arachidonique, d'après *Roman, 2002***. F, Foie ; P, Poumon ; V, Vaisseaux ; C, Coeur ; R, Rein ; SGI, Système Gastro-intestinal ; AR, Appareil Reproductif.

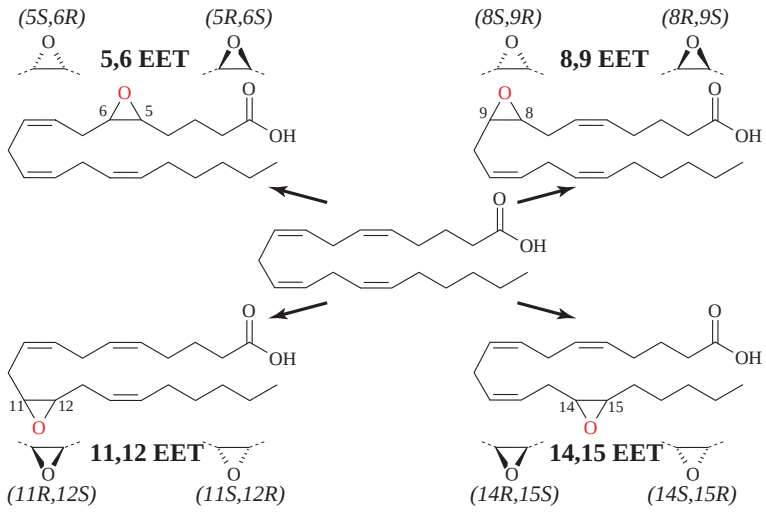


Figure I.23 – **Formule développée des régioisomères et des stéréoisomères des époxydes d'acide arachidonique**.

Dans les tissus vasculaires humains, les cytochromes P450 1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1, 2J2 et 3A4 ont été détectés par immunohistochimie *(Hoebel et al., 1998; Borlak et al., 2003; Enayetallah et al., 2004; Furukawa et al., 2004; Elbekai et El-Kadi, 2006; Delozier et al., 2007).* Quelques travaux montrent également de façon concordante des taux d'ARNm importants pour ces P450s ainsi que pour d'autres comme le CYP 2A6 ou 2D6 *(Lin et al., 1996; Fisslthaler et al., 1999, 2000; Thum et Borlak, 2000; Borlak et al., 2003).* Il est à noter que toutes ces études ne mettent pas en évidence

tous ces P450s en même temps, ceci étant dû au prélèvement de tissus vasculaires différents, dans des conditions physiologiques qui peuvent être différentes. Ceci indique la disparité d'expression des P450s dans les vaisseaux humains.

La formation des époxydes d'acide arachidonique dans les vaisseaux est principalement catalysée par les CYP 2C8, 2C9 et 2J2, qui seront appelés par le suite **P450s époxygénases**. Cependant, la proportion des régio- et stéréo-isomères des époxydes extraits du coeur est plus proche de celle obtenue en incubant le CYP 2J2 en présence d'acide arachidonique (voir la figure I.23 et le tableau I.11). L'époxyde 5,6-EET n'est pas détecté dans le coeur humain, mais du fait de sa très grande instabilité, il peut être dégradé rapidement par d'autres mécanismes, ce qui diminue sa concentration *(Wu et al., 1996).* Ainsi, contrairement au tissu hépatique où le CYP 2C8 semble être l'acide arachidonique epoxygenase majoritaire, le **CYP 2J2 serait le principal P450 responsable de la formation des EETs au niveau vasculaire** *(Zeldin, 2001).*

	5,6-EET	8,9-EET		11,12-EET		14,15-EET	
		(R,S)	*(S,R)*	*(R,S)*	*(S,R)*	*(R,S)*	*(S,R)*
Coeur humain	-	**37 %** *(43)*	*(57)*	**24 %** *(44 %)*	*(56 %)*	**39 %** *(67 %)*	*(33 %)*
CYP 2C8	-	n.d.		**52 %** *(82 %)*	*(18 %)*	**48 %** *(82 %)*	*(18 %)*
CYP 2C9	-	**14 %** *n.d.*	*n.d.*	**26 %** *(70 %)*	*(30 %)*	**60 %** *(63 %)*	*(37 %)*
CYP 2J2	**21 %**	**24 %** *(47 %)*	*(53 %)*	**18 %** *(49 %)*	*(51 %)*	**37 %** *(76 %)*	*(24 %)*

Tableau I.11 – **Proportion des régioisomères et des stéréoisomères des époxydes d'acide arachidonique détectés dans le coeur humain *(Wu et al., 1996)* et formés par les cytochromes P450 2C8, 2C9 et 2J2 *(Daikh et al., 1994; Zeldin et al., 1995; Wu et al., 1996)***. L'isomère 5,6-EET est très instable ; son absence dans le coeur humain pourrait donc être due à une transformation ultérieure. Les CYPs 2C8 et 2C9 ne semblent pas réellement former cet isomère. *n.d.* : non détecté.

I-3.2 Métabolisme et devenir des EETs.

Les EETs formés par les CYPs peuvent subir plusieurs voies de métabolisation :

– *Incorporation sous forme de phospholipides.* La phosphatidylcholine est capable de former avec les EETs un phospholipide qui s'incorpore à la membrane cellulaire des cellules vasculaires *(Spector et Norris, 2007).* Ceci constitue un réservoir d'époxydes qui peuvent être libérés rapidement par action de la phospholipase A_2.

– *Action de l'époxyde hydrolase.* La transformation principale que peuvent subir les EETs dans de nombreuse cellules est l'hydrolyse en acide dihydroxyeicosatriènoïque (DHET). Cette réaction est catalysée par les époxydes hydrolases solubles (sEH) et se produit très rapidement. Généralement, les DHETs sont considérés comme étant les produits de dégradation des EETs *(Spector et Norris, 2007).* Leur activité est relativement semblable aux EETs, mais de façon beaucoup plus réduite.

– *Oxydation des EETs.* Les EETs peuvent également subir une ω-hydroxylation qui semble être une autre voie de dégradation des EETs. Cette étape, catalysée notamment par les CYP 4F, forme des nouveaux médiateurs chimiques pouvant se lier aux récepteurs activés par les proliférateurs du peroxisome α (PPARα) *(Cowart et al., 2002; Le Quere et al., 2004).*

I-3.3 Rôles des EETs.

De nombreuses études montrent l'implication très importante des EETs dans les cascades de signalisation des cellules des tissus vasculaires. Outre les effets anti-inflammatoires et anti-thrombotiques présentés précédemment (voir partie I-2.2.1), les EETs sont également des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. L'ensemble de ces effets confère aux EETs un rôle très important dans la protection vasculaire contre l'athéroscérose *(Dhanasekaran et al., 2006; Seubert et al., 2007; Spector et Norris, 2007).*

Par ailleurs, la propriété la plus étudiée des époxydes d'acide arachidonique est leur participation probable au phénomène de relaxation vasculaire *(Campbell et al., 1996; Campbell et Falck, 2007).*

I-3.4 La relaxation vasculaire.

I-3.4.1 Les mécanismes mis en jeu lors de la relaxation vasculaire.

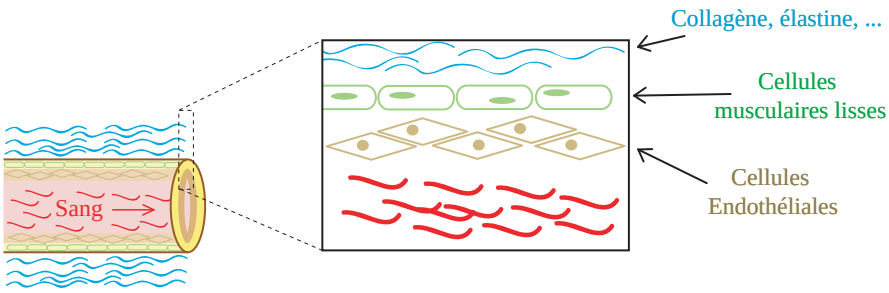


Figure I.24 – **Représentation schématique d'un vaisseau**.

Les phénomènes de relaxation vasculaire font intervenir principalement deux types de cellules constituant la paroi vasculaire : les cellules endotheliales (formant l'endothélium) et les cellules musculaires lisses (figure I.24). Lorsque l'endothelium est stimulé par une force de cisaillement ou la fixation d'un agoniste sur son récepteur, une cascade de signalisation induit la formation de médiateurs qui vont diffuser de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse. L'information qui arrive à cette dernière provoque sa dilatation et ainsi relaxe le vaisseau *(Busse et al., 2002; Feletou et Vanhoutte, 2006).*

(a) La prostacycline.

Le premier médiateur de la relaxation vasculaire a été identifié dans les années 70 *(Moncada et al., 1976).* Le stimulus provoque l'activation de la phospholipase A_2 qui libère de l'acide arachidonique dans la cellule. Cet acide est ensuite transformé en prostacycline PGI_2 par action de la cyclooxygénase

(COX) puis de la prostacycline synthase (voir figure I.22). Cette prostaglandine diffuse ensuite vers la cellule musculaire lisse et se fixe sur un récepteur couplé à une protéine G_s. Ceci a pour effet d'augmenter la concentration en AMP cyclique, ce qui entraîne la relaxation du muscle.

(b) L'endothelium Derived Relaxing Factor - NO.

En 1980, un second mécanisme de relaxation dépendant de l'endothélium a été mis en évidence *(Furchgott et Zawadzki, 1980).* Le médiateur de cette relaxation, ou **Endothelium Derived Relaxing Factor** (EDRF) s'est avéré sept ans plus tard être le monoxyde d'azote NO *(Palmer et al., 1987).* Synthétisé par les NO-synthases endothéliales (eNOS), il diffuse également de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse et active la guanylyl cyclase soluble. Le GMP cyclique formé conduit ensuite à la dilatation vasculaire.

(c) Un troisième phénomène ?

Le phénomène de l'**Endothelium Derived Hyperpolarization**, ou EDH est classiquement décrit comme le mécanisme de relaxation vasculaire qui intervient lorsque les deux autres voies de relaxation (EDRF et prostacycline) sont inhibées.

Une stimulation par un agoniste ou une force de cisaillement peut impliquer une hyperpolarisation dépendant de l'endothélium de la membrane des cellules musculaires lisses *(Bolton et Clapp, 1986; Beny et Brunet, 1988; Chen et al., 1988; Feletou et Vanhoutte, 1988).* Des études in vivo montrent l'importance de cette 3ème voie de relaxation. En effet, des souris n'exprimant pas la eNOS et/ou la COX-1, ont des vaisseaux pouvant relaxer, car l'EDH représente alors le seul phénomène vasorelaxant *(Brandes et al., 2000; Huang et al., 2000, 2001).* Il est à noter que la part de relaxation dépendante de l'EDH est inversement proportionnelle à la taille des vaisseaux *(Nagao et al., 1992; Shimokawa et al., 1996).*

L'ensemble des voies physiologiques impliquées dans le phénomène EDH n'est pas encore totalement déterminé. L'EDH semble cependant hyperpolariser la membrane des cellules musculaires lisses en ouvrant les canaux potassiques de cette membrane (les canaux calcium-dépendants) *(Zygmunt et Hogestatt, 1996; Petersson et al., 1997).*

I-3.4.2 Les mécanismes sous-jacents à l'EDH.

Les différents mécanismes identifiés comme pouvant expliquer l'effet EDH peuvent être classés en deux catégories : un transfert direct de polarisation par contact cellulaire ou la diffusion d'un médiateur de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse.

*(a) Les jonctions communicantes (*gap junctions*).*

Les cytoplasmes d'une grande majorité de cellules (dont font partie les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales) sont directement interconnectés par des canaux appelés jonctions communicantes (ou *gap junctions* en anglais). Formés par six monomères de connexines, ces canaux peuvent laisser passer de petites molécules, mais également des ions. Or, il a été montré que de tels

canaux connectent non seulement les cellules endothéliales entre elles, et les cellules musculaires lisses entre elles, mais également les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses *(Christ et al., 1996)*. Ainsi, un chemin de faible résistance électrique existe entre ces deux couches cellulaires et pourrait ainsi concourir à la propagation d'une hyperpolarisation. D'autre part, le nombre de ces connexions est inversement proportionnel à la taille des vaisseaux *(Sandow et Hill, 2000)*, tout comme la relaxation transmise par l'EDH *(Shimokawa et al., 1996)*, ce qui suggère une relation possible entre EDH et jonctions communicantes. Ceci est confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs de ces gap junctions qui semblent inhiber fortement la relaxation de type EDH *(Coleman et al., 2001; Griffith, 2004)*.

(b) L'Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor.

Outre le mécanisme de transfert de polarité par contact entre cellules endothéliales et musculaires lisses, de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication d'un médiateur diffusant de l'endothélium aux cellules musculaires lisses, pouvant provoquer une hyperpolarisation de la membrane. Ce médiateur de l'EDH est désigné par **Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor**, ou **EDHF**.

(b)-i Les ions Potassium K^+.

La stimulation des cellules endothéliales a également pour effet d'ouvrir les canaux potassiques de la cellule endothéliale. Ces ions K^+, libérés dans l'espace myo-endothélial, forment un "nuage" ionique qui peut activer la pompe Na^+/K^+-ATPase et les canaux potassiques de régulation de type *inward rectifiers (IR)*. Ainsi, cet afflux d'ions K^+ serait lui même déclencheur de l'hyperpolarisation induite par l'ouverture des canaux potassiques de la cellule musculaire lisse *(Edwards et al., 1998)*. Mais l'idée de K^+ comme unique EDHF a été rejetée par plusieurs travaux *(Lacy et al., 2000; Doughty et al., 2000)*.

(b)-ii Les métabolites d'acide arachidonique.

Les époxydes d'acide arachidonique (EETs).

Parmi la multitude de rôles physiologiques que les époxydes d'acide arachidonique jouent *in vivo*, leur participation à l'homéostasie vasculaire est l'une des plus étudiée.

Les différentes preuves montrant qu'un métabolite d'acide arachidonique issu des P450s pouvait jouer le rôle d'EDHF ont été apportés chez le boeuf *(Hecker et al., 1994; Campbell et al., 1996)*, le porc *(Hecker et al., 1994; Popp et al., 1996)*, le rat *(Bauersachs et al., 1994)*, le chien *(Widmann et al., 1998)* mais également chez l'homme *(Roman, 2002; Campbell et Falck, 2007)*. L'hypothèse des époxydes d'acide arachidonique est étayée par différentes observations :

- Les EETs sont produits par l'endothélium *(Fisslthaler et al., 1999; Campbell et al., 1996; Rosolowsky et Campbell, 1996)*.
- Les EETs et leur métabolites dilatent les vaisseaux en hyperpolarisant la membrane des cellules musculaires lisses *(Campbell et al., 1996; Gebremedhin et al., 1998; Fulton et al., 1998; Fisslthaler et al., 1999)*.

– L'inhibition des P450s époxygénases par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou d'oligonucléotides antisens bloque la relaxation de type EDHF *(Fisslthaler et al., 1999; Bolz et al., 2000; Taddei et al., 2006).*
– La relaxation par hyperpolarisation est inhibée par un antagoniste du 14,15-EET *(Gauthier et al., 2002).*
– L'induction de l'expression endothéliale des CYP 2C, P450s époxygénases, augmente fortement la relaxation médiée par l'EDHF *(Popp et al., 1996; Fisslthaler et al., 1999).*

Cependant, ces observations n'excluent pas un rôle potentiel des EETs stockés sous forme de phospholipides. Ainsi, les P450s époxygénases interviendraient lorsque de tels stocks seraient épuisés *(VanRollins et al., 1996; Weintraub et al., 1997; Spector et al., 2004).* Une autre hypothèse permettant d'expliquer la profusion de résultats quand à l'implication des EETs dans la voie de relaxation serait que les EETs pourraient être des **messagers secondaires**, impliqués dans l'amplification et la transmission de l'EDH, sans être réellement l'EDHF *(Fleming, 2004).* L'activation des canaux calciques TRPV4 sur les cellules endothéliales serait à l'origine d'une hyperpolarisation endothéliale susceptible d'être transmise aux cellules musculaires lisses (notamment par les jonctions communicantes, voir plus haut) *(Watanabe et al., 2003).*

Les triols d'acide arachidonique.

L'oxydation de l'acide arachidonique en hydropéroxyde (voie lipoxygénase) ou en époxyde (voie epoxygénase) peut mener, après isomérisation et hydroxylation des hydropéroxydes ou hydrolyse et hydroxylation des époxydes, à la formation de triols d'acide arachidonique vasorelaxants. En effet, ces dérivés peuvent dilater les vaisseaux par un mécanisme qui fait intervenir l'ouverture des canaux potassiques *(Pfister et al., 1996, 1998; Faraci et al., 2001).* Un de ces composés, l'acide 11,12,15-trihydroxyeicosatrienoïque posséde toutes les caractérisques pour être condidéré comme un médiateur des relaxations de type EDHF dans l'aorte de lapin *(Campbell et al., 2003; Pfister et al., 2003a).*

(c) Le péroxyde d'hydrogène.

Dans le cas des artères coronaires (porc) et mésentériques (homme et souris), le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 a été proposé comme médiateur possible pouvant jouer le rôle d'EDHF *(Matoba et al., 2000, 2002, 2003; Shimokawa et Matoba, 2004).* Cependant, cette hypothèse est mise à mal par l'utilisation souvent hasardeuse de la catalase (consommatrice de H_2O_2) en termes de concentrations et de temps d'incubation, qui donne des résultats contradictoires sur l'importance de H_2O_2 dans des études comparables.

La variabilité des conditions expérimentales dans lesquelles sont réalisées ces études est souvent évoquée pour expliquer la multitude de résultats contradictoires sur l'identification l'EDHF (voir figure I.25) *(Campbell et al., 2002; Busse et al., 2002; Griffith, 2004; Sandow, 2004).* Ainsi, les types de vaisseaux étudiés, l'espèce et le sexe considérés et les conditions physiologiques des tissus prélevés sont autant de paramètres qui semblent influencer le mécanisme de type EDHF observé.

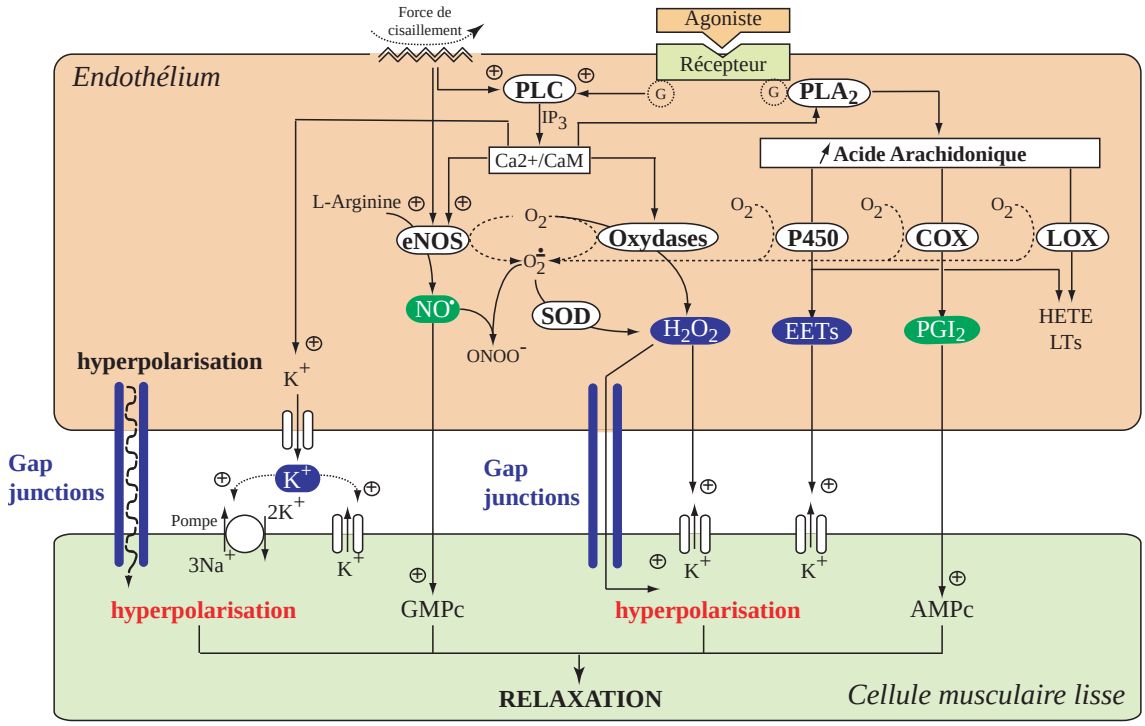


Figure I.25 – **Schéma récapitulatif des différents mécanismes menant à la relaxation vasculaire**. Les deux médiateurs des deux voies de relaxation identifiés sont indiqués en vert : prostacycline (PGI_2) et EDRF (NO). Les principaux composés proposés comme médiateur de la relaxation de type EDH sont en bleu : peroxyde d'hydrogène H_2O_2, potassium K^+ et époxydes d'acide arachidonique EETs. PLA_2 : Phospholipase A_2 ; PLC : Phospholipase C ; phospholipase A2 (PLA2) ; IP_3 : Inositol 1,4,5-trisphosphate ; CaM : Calmodulline ; eNOS : NO-synthase endothéliale ; COX : Cyclooxygénases ; LOX : Lipoxygénases ; LT : Leucotriènes ; HETEs : acide hydroxyeïcosatetraènoïques ; GMPc : Guanosine monophosphate cyclique ; AMPc : Adénosine moniphosphate cyclique.

Les époxydes d'acide arachidonique sont des médiateurs très importants de certaines cascades de signalisation intracellulaires dans les vaisseaux, notamment les mécanismes de vasodilatation, à travers le phénomène de l'EDHF. Les cytochromes P450 époxygénases, qui catalysent leur formation, sont donc des enzymes qui jouent un rôle très important dans la régulation de ces médiateurs. Les trois cytochromes P450 2C8, 2C9 et 2J2 semblent être les P450s les plus impliqués dans la synthèse et la régulation des EETs au niveau vasculaire. Cependant, il existe à l'heure actuelle peu d'études sur le rôle particulier que joue chacune des isoformes de P450s époxygénases, par manque d'outils sélectifs.

I-4 Objectifs de cette thèse

Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur le CYP 2J2, si on le compare à d'autres cytochromes P450 humains de découverte moins récente, comme les CYP 3A4, 2C9 ou 2D6. Ses rôles biologiques sont encore mal définis même si son implication dans la biosynthèse des EETs et dans la protection des cellules du système cardiovasculaire vis-à-vis des agressions oxydantes commence à être bien documentée. Pour aller plus loin dans l'étude de ses rôles biologiques chez l'homme, il est nécessaire de posséder des outils sélectifs, comme des substrats et des inhibiteurs spécifiques du CYP 2J2. Or, au début de mon travail de thèse, on ne connaissait pas d'inhibiteurs sélectifs de ce P450, et on ne disposait que d'un nombre restreint de substrats. D'une manière plus générale, rien n'était décrit sur la topologie du site actif du CYP 2J2.

Le but général de cette thèse a donc été :

a) d'obtenir des inhibiteurs sélectifs du CYP 2J2 ;

b) de mettre au point des substrats à haute affinité de ce P450, et d'en étudier l'oxydation ;

c) de déterminer la topologie de son site actif, entre autres pour savoir quels types de molécules endogènes il était capable de reconnaître.

Le chapitre **II** de la thèse concerne la recherche préliminaire de substrats du CYP 2J2.

La partie **III** présente la mise au point d'inhibiteurs sélectifs, de type compétitif ou irréversible.

Le chapitre **IV** montre la mise en évidence de la régiosélectivité particulière de ce P450, ainsi que la détermination de la topologie de son site actif.

Le chapitre **V** présente une première approche des interactions possibles du CYP 2J2 avec des composés impliqués dans les voies de relaxation vasculaire.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE NOUVEAUX SUBSTRATS SPÉCIFIQUES DU CYTOCHROME P450 2J2

II-1 Recherche de substrats spécifiques du CYP 2J2.

Ce travail a été initié lors de mon stage de D.E.A. réalisé au laboratoire, dont l'un des objectifs a été d'identifier de nouveaux substrats et de nouvelles activités du CYP 2J2. Avant le début de cette thèse, un seul substrat efficacement métabolisé par le CYP 2J2 était décrit dans la littérature. Il s'agit de l'ébastine *(Hashizume et al., 2002)*. Deux autres substrats, l'astémizole *(Matsumoto et al., 2003)* et la terfénadine *(Stresser et al., 2004)* ont été décrits au début de cette thèse. Ces trois composés sont des anti-histaminiques H1 non-sédatifs, mais seule l'ébastine (Kestin®) est encore commercialisée actuellement ; des interactions médicamenteuses pouvant entraîner des complications cardiaques importantes dans le cas de l'astémizole ou de la terfénadine ont entraîné le retrait de ces molécules (voir partie I-1.4.3 de l'introduction). Les structures chimiques de ces différents composés ainsi que les constantes cinétiques de leur métabolisation par le CYP 2J2 ont été présentées précédemment (figure I.20).

Les constantes de Michaelis K_m de l'hydroxylation de ces substrats par le CYP 2J2 sont de l'ordre de 1 μM, ce qui indique une bonne affinité de ces substrats pour le CYP 2J2. Ces composés ont donc été pour nous un point de départ intéressant pour chercher de nouveaux substrats en se basant sur leur structure chimique.

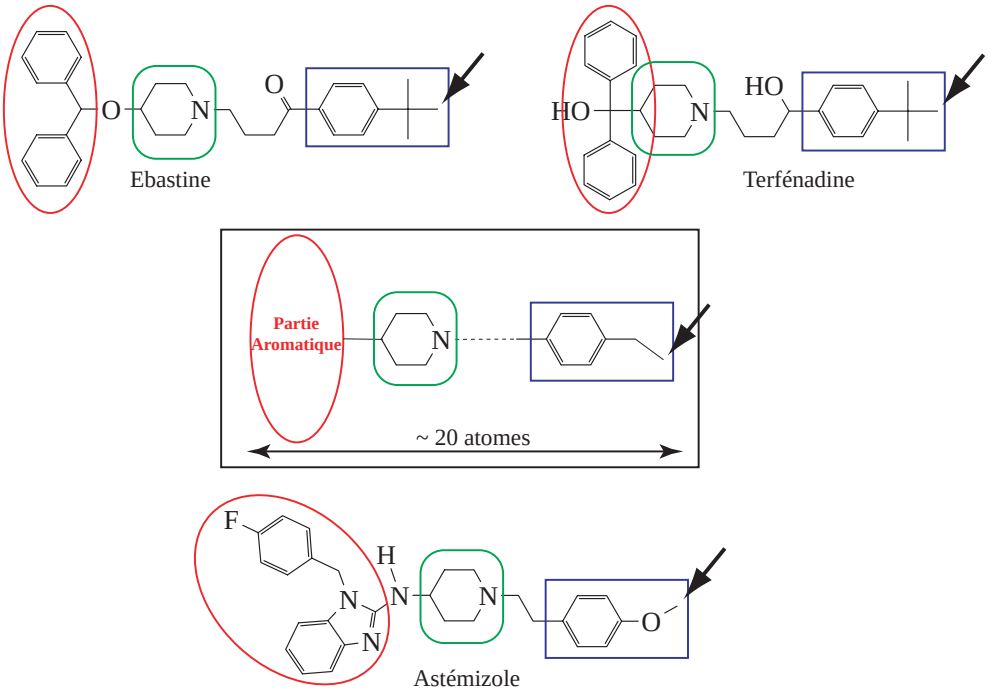


Figure II.1 – **Eléments structuraux communs aux trois substrats du CYP 2J2 publiés au début de cette thèse**. Le site d'hydroxylation est indiqué par une flèche.

Une comparaison rapide de la structure de ces trois substrats révèle plusieurs points communs : une structure plutôt linéaire longue d'une vingtaine d'atomes, un noyau pipéridine en son centre, des groupes aromatiques du côté opposé au site d'oxydation, et un noyau phényle situé à 2 carbones de ce site (figure II.1). Bien que cette analyse soit préliminaire et globale, elle nous a permis néanmoins de sélectionner une série de composés pour être testés en tant que nouveaux substrats. Cette recherche a été menée de deux façons différentes (figure II.2) :

– Deux composés ont été directement obtenus par réaction de réduction sur l'ébastine (qui forme l'ébastine réduite) ou d'oxydation de la terfénadine (**terfénadone**).
– Les autres composés ont été obtenus commercialement, en se basant sur la structure de base générale décrite précédemment.

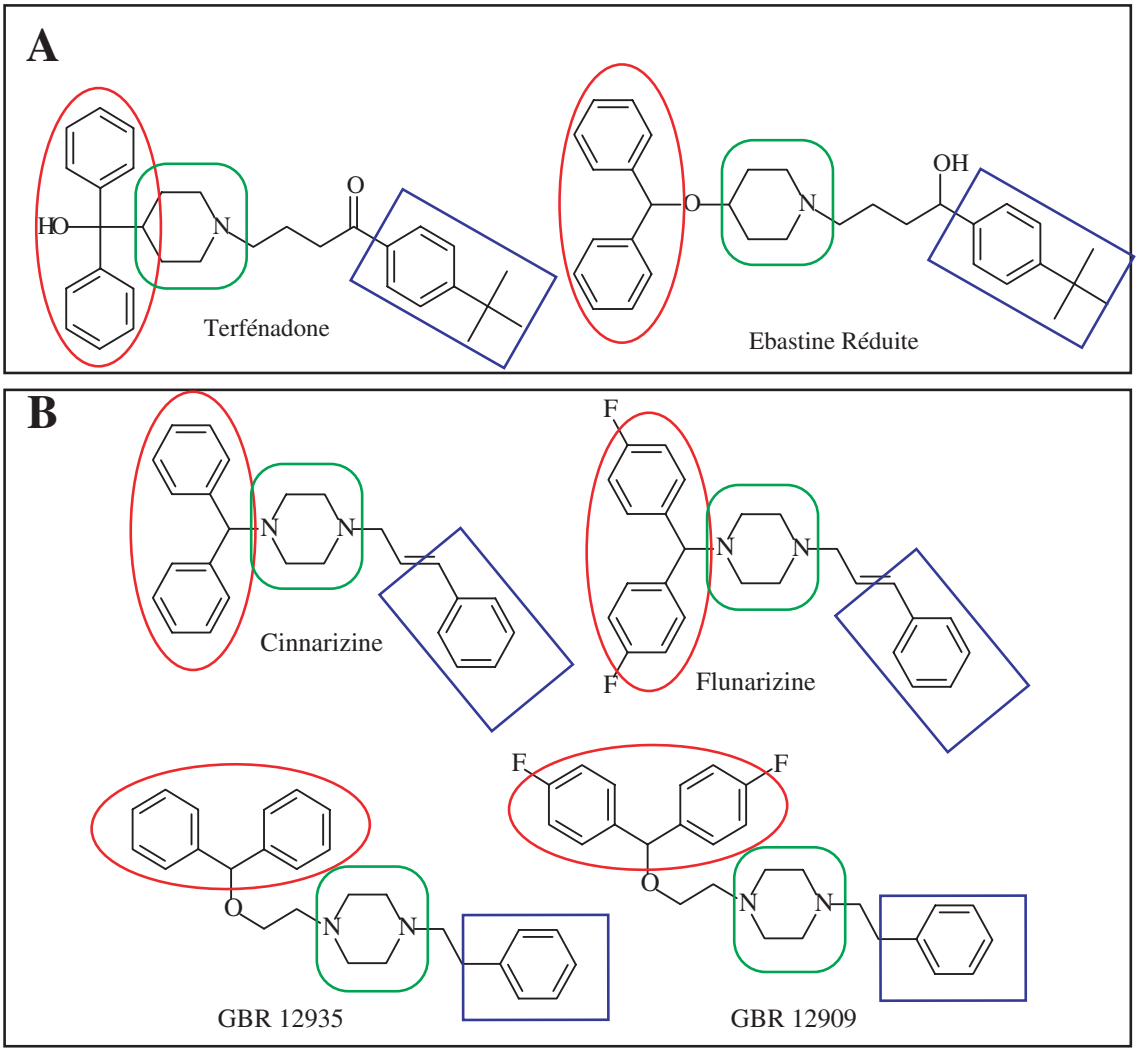


Figure II.2 – **Composés testés dérivés de l'ébastine ou de la terfénadine (A) ou proches du motif commun aux substrats de CYP 2J2 décrits dans la littérature (B) (cf figure I.20)**.

L'oxydation de ces composés par des microsomes de cellules d'insectes (*Sf9*) exprimant le CYP 2J2 recombinant et la CYP-réductase humaine en présence de NADPH a été suivie par Chromatographie Liquide à Haute Pression (CLHP) couplée à une détection par spectrométrie de masse (SM) pour étudier l'apparition de produits et déterminer leur structure. Les activités enzymatiques de métabolisation mesurées sont représentées en figure II.3. L'analyse par CHLP couplée à une spectrométrie de masse tandem (SM^2) des métabolites de la terfénadone et de l'ébastine réduite a révélé que leur hydroxylation a lieu au niveau du groupe *ter*-butyle, comme cela est observé pour l'ébastine et la terfenadine. Les métabolites des autres composés (cinnarizine, flunarizine, GBR12909 et GBR12935) n'ont pu être identifiés, du fait de la faible quantité formée. Cependant, leur spectre de masse indique une masse molaire égale à celle du substrat augmentée de 16 (un atome d'oxygène), ce qui suggère qu'ils dérivent d'une hydroxylation de ces composés.

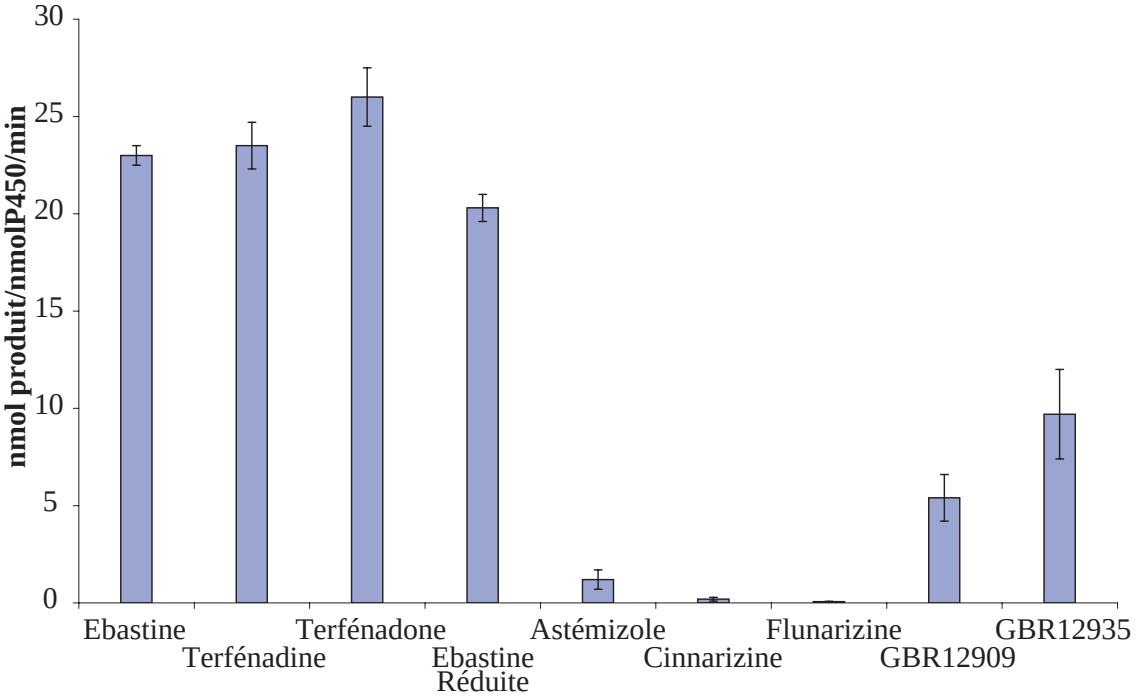


Figure II.3 – **Activités enzymatiques de métabolisation des molécules testées comme nouveaux substrats**. Les activités représentées ont été mesurées pour une concentration de 20μM de substrat et un temps d'incubation de 30 minutes. Les valeurs obtenues sont la moyenne de 3 expériences distinctes, les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

Le graphique II.3 montre que la terfénadone et l'ébastine réduite sont aussi des substrats efficacement métabolisés par le CYP 2J2. Ainsi, ces composés peuvent servir de base stucturale pour la conception de nouveaux inhibiteurs ou de substrats du CYP 2J2 humain. Dans la continuité de ce travail préliminaire, nous avons étudié la spécificité de ces substrats vis-à-vis du CYP 2J2 comparé aux autres P450s humains impliqués dans le métabolisme des médicaments. L'ébastine et la terfénadone ont été choisies comme substrats pour ces études, car contrairement à la terfénadine et à l'ébastine réduite, la présence d'un bon chromophore (le groupe Ph-CO) rend la détection par spectrophotométrie UV plus facile. Expérimentalement, il est donc plus pratique d'utiliser ces composés. Nous avons également choisi d'étudier l'astémizole, qui est également facilement détectable par spectrophotométrie UV.

II-2 Etude de la spécificité de l'ébastine, de la terfénadone et de l'astémizole vis-à-vis du CYP 2J2.

Nous nous sommes efforcés de répondre aux deux questions suivantes :

a) ces trois substrats ne sont-ils hydroxylés que par le CYP 2J2, ou sont-ils aussi hydroxylés par les principaux P450s humains impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ? Pour ce faire, nous avons étudié la transformation de ces substrats par le CYP 2J2 et par les 15 P450s humains disponibles sous forme recombinante, exprimés dans le même système (cellules d'insectes infectées

par un baculovirus).

b) l'hydroxylation de ces substrats par des microsomes hépatiques ou intestinaux humains est-elle majoritairement dépendante du CYP 2J2 ou d'autres P450s ? Pour cela, nous avons suivi l'hydroxylation de ces substrats par ces microsomes en présence de divers anticorps monoclonaux dirigés contre le CYP 2J2 et les autres P450s humains.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de H.V. Gelboin (National Cancer Institute, NIH, U.S.A.) qui nous a fourni les anticorps monoclonaux anti-2J2 et les 15 principaux cytochromes P450 humains impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5 et 4A11) exprimés dans des cellules d'insectes infectées par le baculovirus. Nous avons également testé le CYP 4F12, dont l'hydroxylation de l'ébastine avait été observée précédemment *(Hashizume et al., 2002).*

Le groupe de H.V. Gelboin a également mis au point une banque d'anticorps monoclonaux (Monoclonal Antibodies ou *MAbs*) anti-P450s qui peuvent être utilisés pour détecter facilement la présence éventuelle d'une isoforme de cytochrome P450 dans un tissu donné. De plus, ils permettent d'étudier la participation d'une isoforme de P450 à un phénomène physiologique comme le métabolisme d'un médicament. D'une manière générale, les anticorps monoclonaux sont susceptibles d'être plus spécifiques d'une isoforme, car contrairement aux anticorps polyclonaux, les MAbs ne reconnaissent qu'un seul épitope. Cette banque d'anticorps est constituée d'anticorps spécifiques vis-à-vis des CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, de la famille 2C, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4/5 *(Fujino et al., 1982; Gelboin et al., 1995, 1996; Krausz et al., 1997; Yang et al., 1998; Sai et al., 1999; Krausz et al., 2001).* En utilisant de tels anticorps, cette équipe a pu déterminer la contribution de chacun de ces P450s dans le métabolisme hépatique du diazépam ou de l'imipramine *(Yang et al., 1999).*

Dans le cadre de cette collaboration, nous avons participé à la caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-CYP 2J2, en démontrant l'inhibition de l'activité catalytique de cette isoforme par ces anticorps, et en utilisant ces anticorps pour étudier le métabolisme de l'ébastine, de la terfénadone et de l'astémizole dans les tissus humains. Ce travail a donné lieu à un article soumis pour publication, présenté ci-dessous.

II-3 Article 1

Article présenté :

K.W. Krausz, **P. Lafite**, D.C. Zeldin, P.M. Dansette, D. Mansuy and H. V. Gelboin., *"Specific and Inhibitory Monoclonal Antibodies Against CYP 2J2 Define the Metabolism of Ebastine, Terfenadone and Astemizole in Human Tissues".* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, *soumis pour publication.*

SPECIFIC AND INHIBITORY MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST P450 2J2 DEFINE THE METABOLISM OF EBASTINE, TERFENADONE AND ASTEMIZOLE IN HUMAN TISSUES.

KRISTOPHER W. KRAUSZ[1], PIERRE LAFITE[2], DARRYL C. ZELDIN[3], PATRICK M. DANSETTE[2], DANIEL MANSUY[2] AND HARRY V. GELBOIN[1].

[1] *Laboratory of Metabolism, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*

[2] *Universite Rene Descartes, CNRS UMR8601, Paris CXO6, France*

[3] *Laboratory of Pulmonary Pathology, National Institutes of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, USA*

ABSTRACT :

Hybridomas were isolated that produce 3 monoclonal antibodies (MAbs) that are specific and highly inhibitory to human P450 2J2. MAb 6-2-16-1 and MAb 6-5-20-8 exhibited specific and potent inhibitory activity (85-95%) to P450 2J2 metabolism of arachidonic acid (AA), ebastine, terfenadone and astemizole. MAb 5-3-2-2 was not inhibitory, but yielded a strong Western blot. The inhibitory MAbs were used to determine the metabolic contribution of P450 2J2 to the metabolism of AA, ebastine, terfenadone and astemizole in human liver and intestinal microsomes. The single or combinatorial use of the anti-2J2 MAbs, together with a panel of inhibitory MAbs previously developed can provide the reaction phenotype of a drug, xenobiotic or endobiotic in human tissue microsomes. MAb directed reaction phenotyping revealed that P450 2J2 contributes less than 10% to total AA metabolism in human liver, where as P450 2J2 contributed up to 40% of ebastine and terfenadone hydroxylation in human liver and 40% ebastine and 60% terfenadone hydroxylation in human intestinal microsomes. P450 2J2 did not contribute to the N-dealkylation of either compound. MAb directed reaction phenotyping of astemizole revealed no significant contribution of P450 2J2 to its metabolism in either liver or intestine.

The Cytochromes P450 are a superfamily of enzymes that metabolize a wide range of compounds icluding drugs, carcinogens, xenobiotocs, and endobiotics such a steroids, hormones, and fatty acids (Guengerich, 2005). They metabolize over 80% of marketed drugs, making them both clinically relevant and extremely important in pre-clinical drug development. Inhibition, inactivation, and activation of these enzymes may cause toxicity, drug-drug interactions and/or altered therapeutic efficacy. Cytochrome P450 2J2 has been described in the metabolism of arachidonic acid (AA) to three types of eicosanoid products; midchain HETEs, w-terminal HETEs, and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) (Zeldin, 2001). The latter have been shown to play an important potent effect on vascular and bronchial smooth muscle tone and ionic transport (Kroetz and Zeldin, 2002). Additionally, the EETs have been shown to play roles in cellular proliferation, inflammation, homeostasis, and a variety of intercellular signaling pathways, and in kidney and cardiovascular functions (Spiecker et al., 2004). Recently, P450 2J2 has been demonstrated to metabolize the drugs ebastine (Hashizume et al., 1998) and astemizole (Matsumoto et al., 2003). Moreover, terfenadone derivatives have been reported as high-affinity and specific inhibitors of CYP 2J2 (Lafite et al., 2006). Additionally, P450 2J2 activity has been demonstrated in intestinal microsomes, implicating its potential role in first pass metabolism of drugs (Matsumoto et al., 2003).

We describe the production and characterization of specific and highly inhibitory monoclonal antibodies (MAbs) against human P450 2J2, which can be used to determine the contribution of P450 2J2 to the metabolism of drugs, xenobiotics and endobiotics. These MAbs complement the comprehensive library (Gelboin and Krausz, 2006) of specific MAbs to the major human P450s which can be used to determine the role of individual P450s in the in vitro metabolism of drugs, other xenobiotics and endobiotics in a mixed enzyme system.

Materials and methods

Chemicals and microsomes. Ebastine was provided by Pharmafarm (Paris, France), astemizole was purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Terfenadone was synthesised as described previously (Lafite et al., 2006). All organic solvents were purchased from SDS (Peypin, France) or Sigma (St. Louis, MO) and were of HPLC grade. NADP and NADPH regenerating system (glucose-6-phosphate (G6P) and glucose-6-phosphate-deshydrogenase (G6PDH) were obtained from Boehringer-Mannheim (Mannheim, Germany). Human liver samples were provided by the Cooperative Human Tissue Network (CHTN) which is funded by the National Cancer Institute. Microsomes from human liver were prepared as described (Alvares et al., 1970) and total P450 content measured by difference spectra (Omura and Sato, 1964). Protein content was measured with BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) using BSA as a standard. Human intestine microsomes were obtained from Biopredic (Rennes, France), and were stored at –80°C before use. The CDNA expressed human P450

TABLE 1

Binding specificity of MAbs anti-2J2 as measured by ELISA. Culture fluid containing MAbs from hybridomas specified were assayed with a panel of expressed P450s. The values represent optical density at wavelength of 405nm.

mAb/P450	1A1	1A2	1B1	2A6	2B6	2C8	2C9	2C9*2	2C18	2C19	2D6	2E1	2J2	3A4	3A5	CONT
6-6-20-8	0.06	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.08	0.05	0.02	0.02	1.72	0.08	0.05	0.1
6-2-16-1	0.04	0.02	0.03	0.02	0.03	0.04	0.01	0.03	0.09	0.02	0.04	0.02	1.35	0.06	0.03	0.08
5-3-2-2	0.04	0.1	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.08	0.03	0.02	0.02	1.67	0.03	0.03	0.07

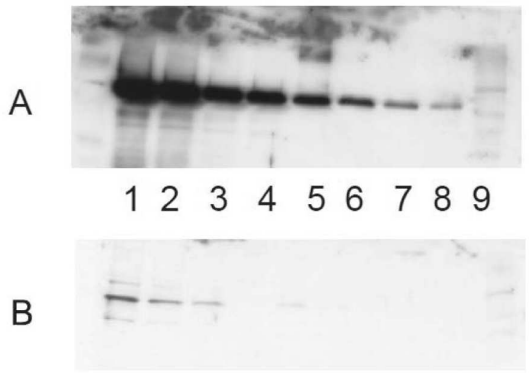


FIG 1. *Immunoblotting analysis of expressed P450 2J2 with MAbs 5-3-2-2(A) and MAb 6-5-20-8(B).*

Expressed P450 2J2 enzyme was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with MAb. Both blots were loaded as follows: Lane 1-8: 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, and 0.0312 pmole of expressed 2J2, respectively. Blot was developed using Chemiluminesence.

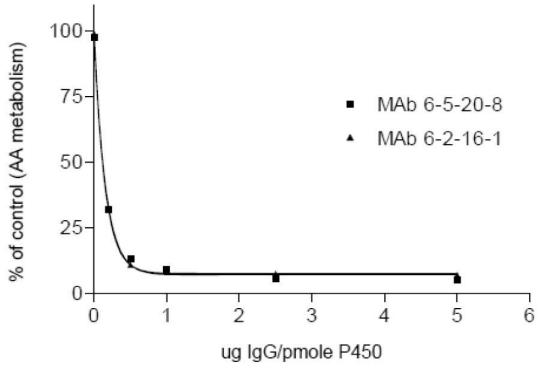


FIG. 2. *Inhibition of expressed P450 2J2 metabolism of arachidonic acid.*

MAbs were incubated with expressed P450 2J2 and AA and products analyzed by HPLC as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentage of control with a control MAb.

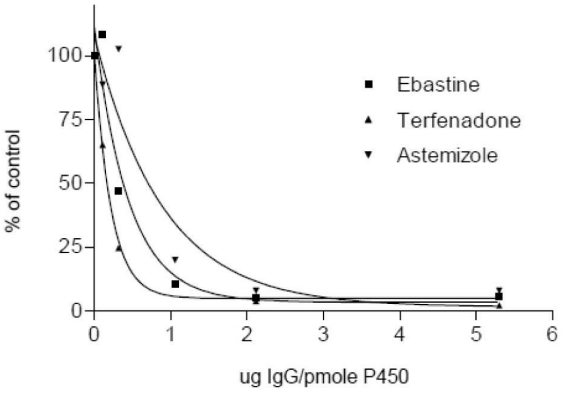


FIG. 3. *Inhibition of expressed P450 2J2 metabolism of ebastine, terfenadone and astemizole by MAb 6-5-20-8.*

MAbs were incubated with expressed P450 2J2 and compound indicated and products analyzed by LCMS as described in Materials and Methods. Data are the mean values of triplicate studies and are expressed as percentage of control with a control MAb.

enzymes used for immuno- assays and metabolic assays were obtained as Supersomes (BD Discovery Labware, Woburn, MA), and/or Baculosomes (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Incubation procedure. The reaction mixture consisted of substrate (50 µM), microsomes (human intestine, 30 µg ; human liver, 9.5-10 pmol of P450 ; recombinant P450, 2.5 pmol), antibodies (0-1 µg protein/pmol P450 for hepatic microsomes, 0-2 µg protein/µg protein for intestinal microsomes and 0-5 µg protein/pmol P450 for recombinant CYP2J2), and NADPH regenerating system (NADP 1 mM, G6P 10 mM and G6PDH 2 u/mL) in a final volume of 200 µL of 0.1 M potassium phosphate/0.1 mM EDTA buffer (pH=7.4). Anti-lysosyme MAbHy Hel-9 (Newman et al., 1992), with an amount equivalent to specific MAbs, was used as a control for non specific binding.

Microsomes were preincubated for 30 minutes at 0°C with monoclonal antibodies. A pre-mixture containing substrate and NADPH regenerating system was preincubated for 3-4 minutes to generate NADPH. The reaction was started by mixing of the two preincubations. It was stopped after incubation at 37°C for 30 minutes by the addition of 100µL of acetonitrile/acetic acid solution (9/1). The internal standard (ebastine or terfenadone) was added at a final concentration of 5µM. The solution was centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes and the supernatant was injected on HPLC/MS system.

HPLC/MS analysis. The apparatus HPLC/MS analysis consisted of a Surveyor HPLC system and LCQ Advantage-ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, Les Ulis, France). The column used was a Kromasil C18 (150 × 2.1 mm, 3.5µ) (AIT, Marly, France). The mobile phase consisted of water/acetonitrile/formic acid (80/20/1) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99/1) (solvent B), at a flow rate of 200 µL/min. Elution was performed with a linear gradient from 0% of B to 70 % in 13 minutes, followed by a gradient to 100% of B in 4 minutes, ended by 4 minutes at 100 %. The MS ionisation was carried out using an ESI source in positive mode, with a capillary temperature at 275°C, a capillary voltage of 41V and a spray voltage of 5 kV. Ions were detected by MS/MS monitoring ebastine and terfenadone : 470→203 ; hydroxy-ebastine and hydroxy-terfenadone : 486→219 ; N-dealkylebastine and dealkylterfenadone: 268 → 250. Single ion monitoring was employed for astemizole : 459 ; desmethylastemizole : 445 ; norastemizole : 325 ; hydroxyastemizole : 475.

Each activity value was calculated using authentic metabolites for ebastine and terfenadone. The results are the mean values of triplicate studies.

AA metabolic incubations were carried out using [1-14 C]AA and products analyzed by reverse-phase HPLC as previously described (Wu et al., 1996; Xiao et al., 2004).

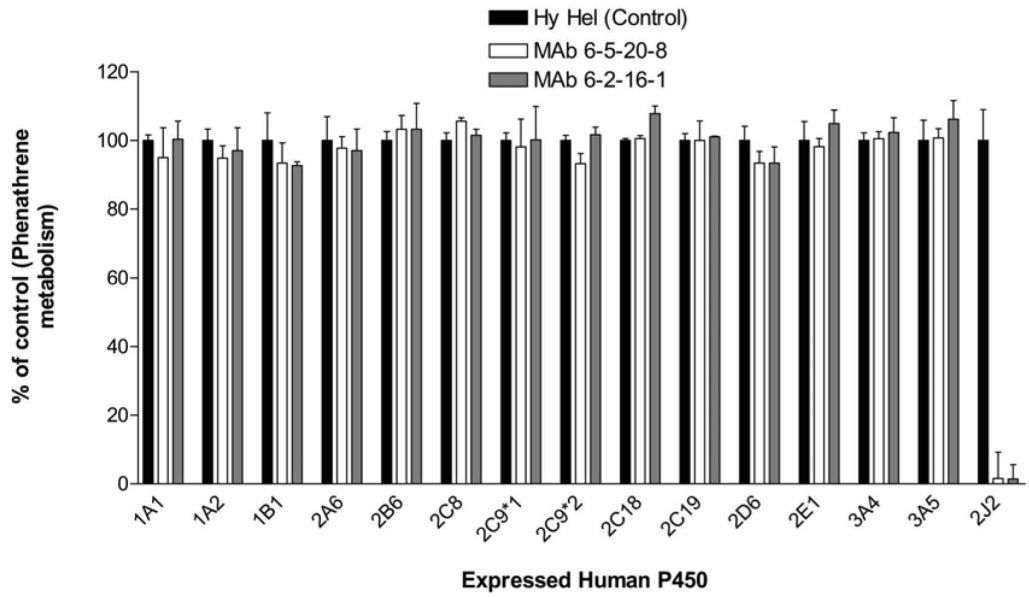


FIG. 4. Specificity *of MAb 6-5-20-8 and MAb 6-2-16-1 inhibition of P450 2J2: lack of inhibition of 12 other human P450s.*

MAbs were incubated with expressed P450 2J2 and phenathrene with products analysed by HPLC. Formation of 9,10 diol was measured for all P450s except 2A6, where 9-phenol formation was measured. Data are the mean ± S.D. of triplicate incubations and are expressed as percentage of control with a control Mab

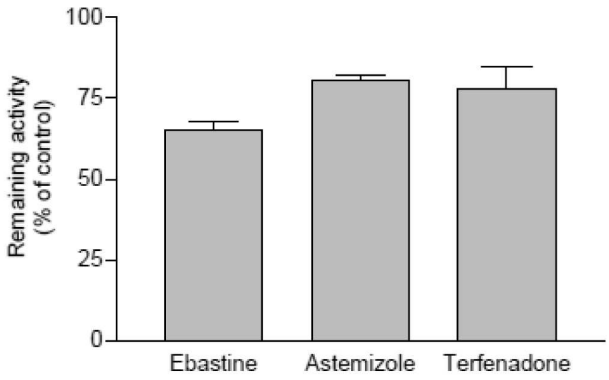


FIG. 5. *Inhibition of CYP 2J2 activity in human liver microsomes by MAb 6-5-20-8.*

MAbs were incubated with HLM and compound indicated and products analyzed by LCMS as described in Materials and Methods. Data are the mean ± S.D. of duplicate incubations with 3 individual HLMs and are expressed as percentage of control (remaining activity) with a control MAb.

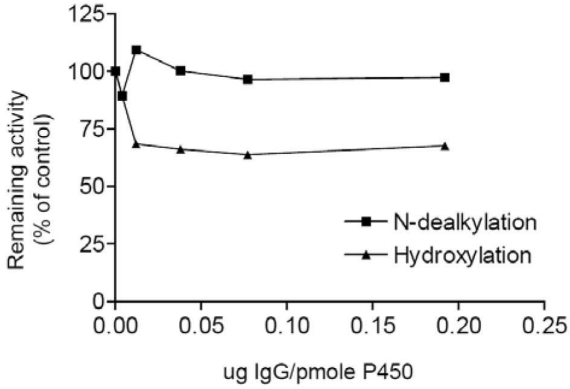


FIG. 6. *Inhibition of ebastine hydroxylation by MAb 6-5-20-8: lack of inhibition of N-dealkylation.*

MAb was incubated with HLM and ebastine and analyzed by LC/MS for N-dealkylation and hydroxylation activity as described in Materials and Methods. Data are the mean of duplicate incubations

P450 expression and hybridoma production. Recombinant P450 2J2 baculovirus and the recombinant protein expression in Sf9 (Spodoptera frugiperda) cells were previously described (Wu et al., 1996). The resulting expressed P450 2J2 protein was extracted from the cells yielding 28.8 nanomoles of P450 2J2 from an one liter Sf9 culture preparation. The extracted P450 was used as the immunogen. Three Balb/c mice were immunized with 10 ug of P450 2J2 emulsified in 0.2 ml of adjuvant once a week for three weeks. Spleen cells were isolated and fused to mouse myeloma cells (NS-1), and the resulting hybridomas were screened for antibody production by ELISA using the extracted material.

Detailed procedures of immunization, hybridization, and ELISA screening has been described (Gelboin et al., 1998). Extracted material from Sf9 cells infected with wild-type baculovirus was used to test for specific binding of the antibodies. The hybridization resulted in the screening of over 1000 individual wells with hybridoma growth. Three specific individual clones, MAb 6-2-16-1, MAb 6-5-20-8, MAb 5-3-2-2, were isolated. Each was screened for P450 binding specificity by ELISA using human P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9*1*2, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 and 3A5, and tested for P450 enzyme inhibition as measured by the metabolism of phenanthrene by the same P450s. The incubation and assay conditions have been described (Krausz et al., 2001).

All three clones were found to be specific to P450 2J2 and did not bind nor inhibit the other human P450s mentioned above (Table I). All hybridomas were cloned at least three times. All three MAbs produced are mouse IgG1, as determined by the MAb isotyping kit purchased from The Binding Site (San Diego, CA). IgG1 concentrations in mouse ascites fluid were determined using radial immunodiffusion kits also from The Binding Site (San Diego, CA).

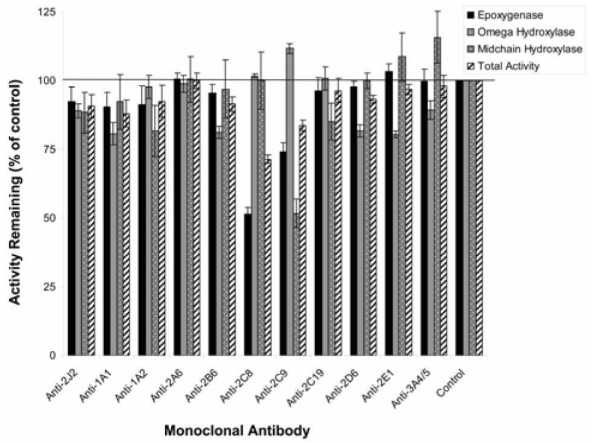


FIG. 7. *Effect of specific inhibitory MAbs on the metabolism of arachidonic acid in human liver.*

MAbs were incubated with HLM and AA and products analyzed by HPLC as described in Materials and Methods. The inhibitory effect of each MAb was measured for metabolite group as indicated. Data are expressed as percentage of control with a control MAb and are the mean ±S.D.

Results

Three hybridoma cell clones were isolated which produced monoclonal antibodies MAb 6-5-20-8 MAb 6-2-16-1 and MAb 5-3-2-2 each of which bound specifically to P450 2J2 as measured by ELISA (Table 1) . The three MAbs bound to P450 2J2 and did not cross react with the expressed human P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 and 4A11. Figure 1 shows that MAb 6-5-20-8 and MAb 5-3-2-2 formed immunoblots with expressed P450 2J2 and did not cross react with the other human P450s listed above (blot not shown). MAb 5-3-2-2 yielded a strong immunoblot detecting 0.0312 pmole P450 2J2 (Fig. 1). MAb 6-2-16-1 did not yield a blot. Of the three MAbs isolated, MAb 6-12-16-1and MAb 6-5-20-8 inhibited (>90%) the P450 2J2 catalyzed metabolism of AA, ebastine, terfenadone and astemizole (Fig. 2 and 3). Figure 2 shows the inhibitory activity of the two MAbs against P450 2J2 metabolism. MAb 6-5-20-8 and MAb 6-2-16-1 inhibited by more than 90% the metabolism of AA by expressed P450 2J2. Although MAb 5-3-2-2 yielded a strong immunoblot (Fig. 1), it did not inhibit P450 2J2 activity. Figure 3 shows a high level of inhibition of expressed P450 2J2 catalyzed metabolism of ebastine, terfenadone and astemizole by MAbs 6-5-20-8 and 6-2-16-1. The inhibitory activity of both MAb clones was similar. The specificity and inhibitory activity of the MAbs was measured by the amount of inhibition of the metabolism of the common P450 substrate, phenanthrene, by anti 2J2 MAbs to each of the other human P450s. Figure 4 demonstrates the lack of inhibition of phenanthrene metabolism by any of the P450 isoforms except that of P450 2J2 by MAb 6-5-20-8, MAb 6-2-16-1. The anti-2J2 MAbs completely inhibited phenanthrene metabolism catalyzed by 2J2 (>95%). The anti- 2J2 MAbs exhibited no inhibition of phenanthrene metabolism catalyzed by human P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 and 3A5.

The extraordinary specificity and high inhibitory activity of the new anti-2J2 MAbs make them ideal

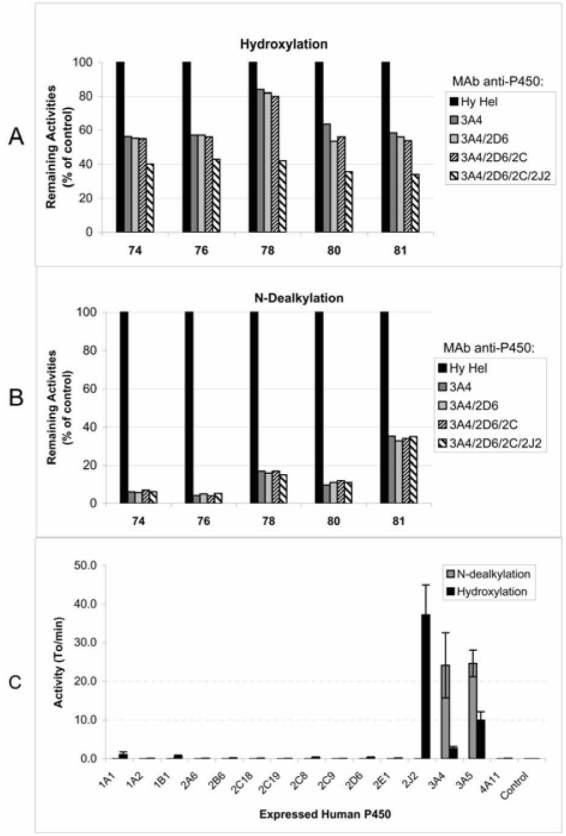


FIG. 8. *Analysis of ebastine metabolism in human liver and by expressed P450s.*

MAbs wereincubated with HLM and ebastine and products analyzed by LC/MS as described in Materials and Methods. The MAbs were added combinatorially (in succession) so the each bar represents the inhibitory activity of the last MAb added. The preceding bar is the control. The inhibitory effect of each MAb on (A) ebastine hydroxylation and (B) N-dealkylation in HLM. Data are expressed as percentage of control with a control MAb and are the mean of duplicate incubations. (C) Panel of expressed P450s metabolism of ebastine. Data are expressed as mean ±S.D. of triplicate incubations.

probes for determining the contribution of P450 2J2 for the metabolism of drugs and endobiotics in a variety of human tissues. Figure 5 shows that the percent contribution of 2J2 to the metabolism (hydroxylation) of ebastine, terfenadone and astemizole in human liver microsomes (HLM) was 35%, 20% and 31%, respectively. The remainder of the total hydroxylation is likely catalyzed by other P450s. This correlates well with the published reports that P450s other than 2J2 contribute to the hydroxylation of ebastine, terfenadone and astemizole (Hashizume et al., 1998; Matsumoto et al., 2003). P450 3A4 is the major isoform responsible for ebastine N-dealkylation in HLM (Hashizume et al., 1998). Figure 6 shows that the anti 2J2 MAb distinguishes between the metabolism catalyzed through the alternate pathways of hydroxylation and N-dealkylation. The MAb anti-2J2 inhibits ebastine hydroxylation in HLM by 35%, and does not inhibit the N-dealkylation pathway. P450 2J2 is thus responsible for some of the hydroxylation of ebastine and none of the N-dealkylation.

Arachidonic Acid (AA) metabolism is characterized by different reactions including epoxygenation, omega hydroxylation and midchain hydroxylation (Zeldin, 2001). P450 2J2 is believed to be a major enzyme involved in AA metabolism. The MAbs anti-2J2, along with the panel of MAbs (Gelboin et al., 1999) to the other human P450s, were used to determine the contribution of each of eleven human P450s to the metabolism of AA in

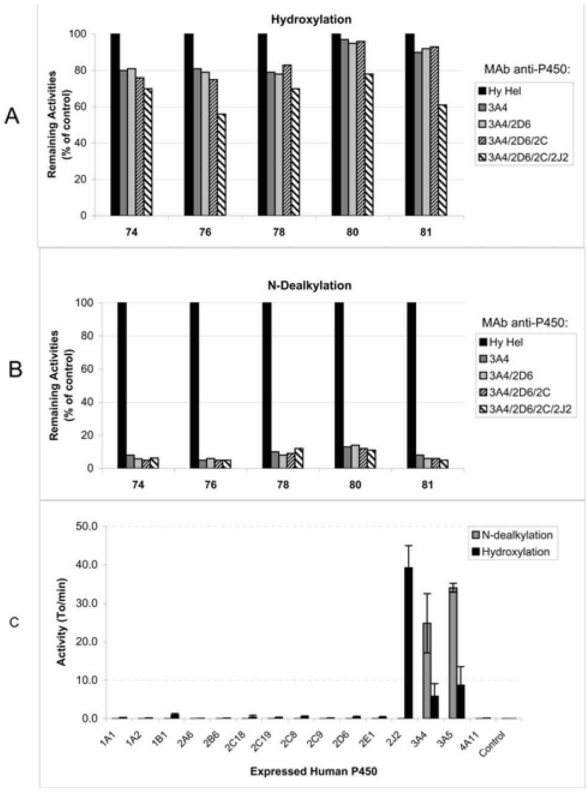


FIG. 9. Analysis of terfenadone metabolism in human liver and by expressed P450s.

MAbs were incubated with HLM and terfenadone and products analyzed by LC/MS as described in Materials and Methods. The MAbs were added combinatorially (in succession) so that each bar represents the inhibitory activity of the last MAb added, with the preceding bar as the control. The inhibitory effect of each MAb on (A) terfenadone hydroxylation and (B) N-dealkylation in HLM. Data are expressed as percentage of control with a control MAb and are the mean of duplicate incubations. (C) Panel of expressed P450s metabolism of terfenadone. Data are expressed as mean ±S.D. of triplicate incubations.

human liver. Figure 7 shows the results of this analysis. P450 2C8 and 2C9 were found to be the major isoforms responsible for metabolism, contributing 40% and 25 % respectively to the epoxygenase activity, and 0% and 40% respectively to the midchain hydroxylase activity while P450 2J2 activity was responsible for 10% to the total AA metabolism of in human liver.

Previous studies have demonstrated the presence of P450 2J2 in human intestine and its involvement in drug metabolism (Hashizume et al., 2002; Matsumoto et al., 2003). The results suggest that P450 2J2 in the small intestine maybe involved in the metabolism of other drugs. P450 2J2 activity in human intestine may clearly be important for first pass metabolism of drugs and other substrates. The quantitative role of the major human P450s to the metabolism of ebastine and terfenadone was determined using the method of combinatorial addition of inhibitory MAbs previously described (Yang et al., 1999). Figure 8 shows an analysis of the contribution in five HLM of P450s 3A4, 2D6, the 2C family and 2J2 to the hydroxylation (Fig. 8a) and N-dealkylation (Fig. 8b) of ebastine, and the contribution of a panel of expressed P450 enzymes (Fig. 8c). The range of variation among the five individual HLM samples for ebastine hydroxylation was respectively 20-40% for 3A4 and 10-40% for 2J2, with virtually no activity(<10%) exhibited by 2D6 or the

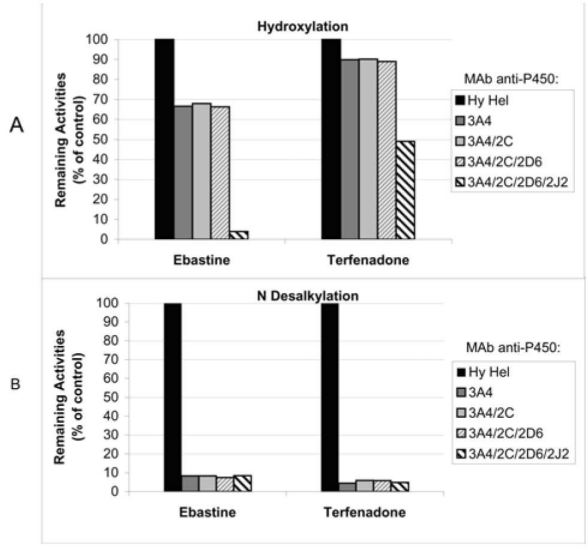


FIG. 10. *Analysis of ebastine and terfenadone metabolism in human intestinal microsomes.*

MAbs were incubated with HIM and ebastine or terfenadone with products analyzed by LC/MS as described in Materials and Methods. The MAbs were added combinatorially (in succession) so that each bar represents the inhibitory activity of the last MAb added, with the preceding bar as the control. The inhibitory effect of each MAb on (A) hydroxylation and (B) N-dealkylation formation in HIM. Data are expressed as percentage of control with a control MAb and are the mean of duplicate incubations.

2C family (Fig. 8a). N-dealkylation was almost entirely catalyzed by P450 3A4 (70-90%) in all five HLM assayed (Fig. 8b). No activity was observed in the five HLM by 2D6, the 2C family or 2J2 for N-dealkylation. In comparison, using a panel of 16 expressed P450s demonstrate that 2J2 is most active towards ebastine hydroxylation, followed by 3A5, 3A4, and 4F12, whereas the N-dealkylation of ebastine is predominantly catalyzed by 3A4 and 3A5. In parallel, Figure 9 shows an analysis of the contribution of P450 3A4, 2D6, 2C and 2J2 to the hydroxylation (Fig. 9a) and N-dealkylation (Fig. 9b) of terfenadone and the contribution of a panel of expressed P450 enzymes (Fig. 9c). The contribution among the five individual HLM samples for terfenadone hydroxylation was 5-20%for 3A4, <10% for the 2C family and 2D6, and 5-30% for 2J2. N-dealkylation was almost entirely catalyzed by P450 3A4 (>85%) in all five HLM. There was no N-dealkylation activity from 2D6, 2C or 2J2. In comparison, using a panel of 16 expressed P450s demonstrate that 2J2 is most active towards terfenadone hydroxylation, followed by 3A5, 3A4, and 4F12, whereas the N-dealkylation of terfenadone is predominantly catalyzed by 3A4 and 3A5. Figure 10 shows the analysis of the activity of P450 3A4, 2D6, 2C and 2J2 for the N-dealkylation and hydroxylation of ebastine and terfenadone in (a pooled sample of) human intestinal microsomes. P450 3A4 contributed almost entirely to the N-dealkylation of ebastine and terfenadone (Fig. 10a) with no activity exhibited by P450 2C, 2D6, and 2J2. However P450 2J2 contributes significantly to the hydroxylation of ebastine (60%) and terfenadone (40%), in addition to the hydroxylase activity by 3A4 of 33% and 10 %, respectively (Fig. 10b). No activity was

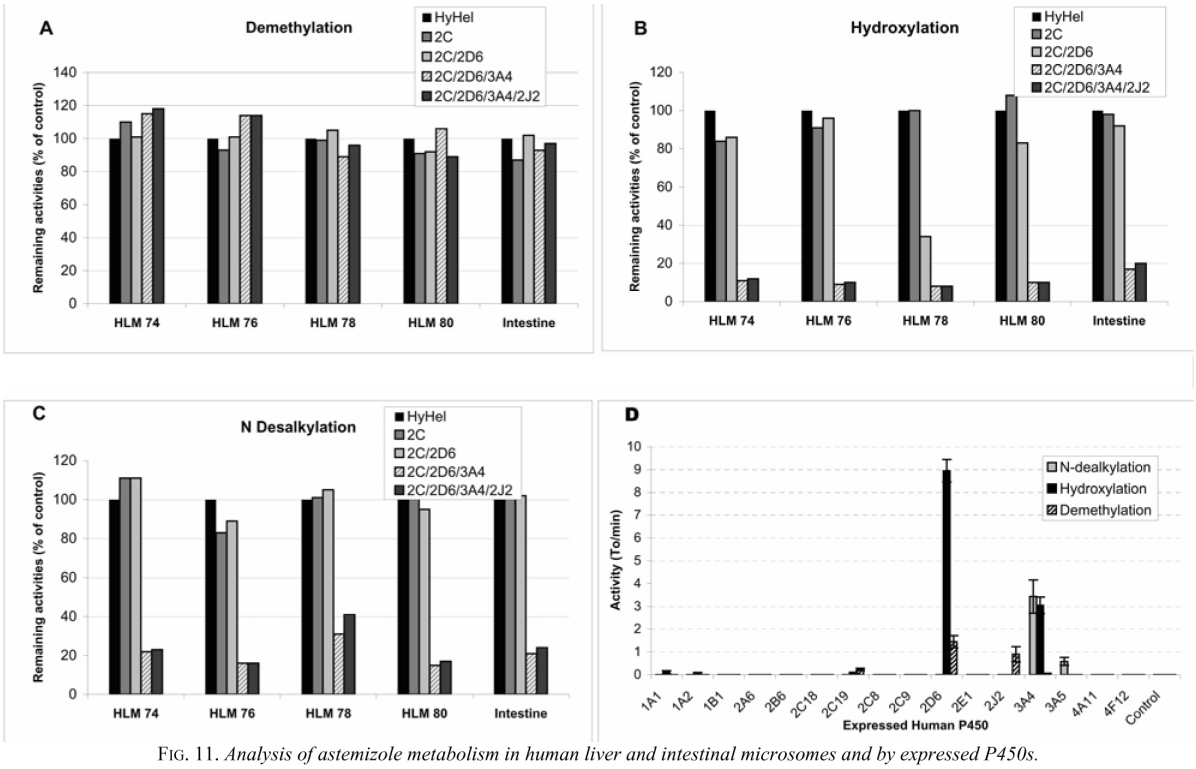


FIG. 11. *Analysis of astemizole metabolism in human liver and intestinal microsomes and by expressed P450s.*

MAbs were incubated with HLM and HIM and astemizole with products analyzed by LC/MS as described in Materials and Methods. The MAbs were added combinatorially (in succession) so that each bar represents the inhibitory activity of the last MAb added, with the preceding bar as the control. The inhibitory effect of each MAb on astemizole (A) demethylation, (B) hydroxylation and (C) N-dealkylation in HLM and HIM. Data are expressed as percentage of control with a control MAb and are the mean of duplicate incubations. (D) Panel of expressed P450s metabolism of astemizole. Data are expressed as mean ±S.D. of triplicate incubations.

observed by P450 2C family or 2D6 for the metabolism of these two drugs in human intestinal microsomes. The combinatorial contribution of 3A4 and 2J2 accounts for >90% of the hydroxlyatin of ebastine in human intestinal microsomes but only 50% of the hydroxlatin of terfenadone, indicating the likelihood of other P450 involvement in terfenadone metabolism. These observations correlate well with the inhibition observed in HLM, where ≤ 40% of terfenadone hydroxylation was inhibited by MAbs against 3A4 and 2J2 combined. However, where ≥ 90% of ebastine hydroxylation inhibition was observed in human intestinal microsomes by MAbs against 3A4 and 2J2 combined, only ≤ 60% inhibition was observed in HLM, indicating the possibility of other P450 involvement. Figure 11 shows an analysis of the contribution of P450 3A4, 2D6, 2C, and 2J2 to the demethylation (Fig. 11a), hydroxylation (Fig. 11b), and N-dealkylation (Fig. 11c) of astemizole in human liver and intestinal microsomes and the contribution of a panel of expressed P450 enzymes (Fig. 11d).

Here, among the five individual HLM samples and one pooled human intestinal sample , there is no total contribution greater than 10% for demethylation activity by P450 2C, 2D6, 3A4, and 2J2, whereas the contribution to hydroxylation activity was 0-16% for P450 2C, 2-66% for 2D6, 73-90% for 3A4, and 0% for 2J2. The N-dealkylation activity was primarily attributed to P450 3A4 (≥70%) with 2C contribution of 17% in only one HLM sample. In comparison, using a panel of 16 expressed P450s demonstrate that P450 2J2 and 2D6 are most active towards astemizole demethylation, with a minor contribution from 2C19. However, this does not correlate with the inhibitory MAb data, which shows less than a 10% combined contribution of 2J2, 2D6 and 2C. Hydroxylation of astemizole, as determined by expressed enzyme, is contributed strongly by 2D6, followed by 3A4. In contrast, 3A4 accounted for up to 90% and 2D6 up to 66% when analyzed by inhibitory MAbs in tissue microsomes. N-dealkylation of astemizole is primarily formed by P450 3A4, which is in agreement with the inhibitory MAb data.

Discussion

The paper describes the production of immortal hybridoma clones which produced three MAb which specifically inhibit and/or immunoblot the CYP450 2J2. The MAbs can be used to quantify the role of P450 2J2 compared to the activity of human P450s for the metabolism of a drug, xenobiotic or endobiotic. The amount of inhibition by the addition of a P450 target specific MAb to the metabolism of a substrate incubated with human liver microsomes, (or other enzyme or tissue preparation), defines the quantitative role of the target P450 to the metabolism of the substrate.

We have developed hybridoma clones that produce MAbs to all the major P450's in human liver including 1A1, 1A2 (Yang et al., 1998b), 2A6 (Sai et al., 1999), 2B6 (Yang et al., 1998a), 2C8, 2C9, 2C19 (Krausz et al., 2001), 2C Family (Yang et al., 1999), 2D6 (Krausz et al., 1997), 2E1 (Gelboin et al., 1996), and 3A4/5 (Gelboin et al., 1995) and the addition of anti-2J2 MAbs is a significant addition to our panel of specific inhibitory monoclonal antibodies. Using specific inhibitory MAbs, we have identified and quantitated the role of each specific P450s responsible for the metabolism of bufuralol, dextromethorphan, phenacetin, chlorzoxazone,

coumarin, 7-ethyoxycoumarin, diazepam, diclofenac, imipraimine, mephenytoin, p-nitroanisole, taxol, testosterone , tolbutamide, aflatoxin nitroanisole and toluene (Gelboin and Krausz, 2006). Commonly used chemical inhibitors have been repeatedly shown to be, at best, selective and thus nonspecific and inadequate for quantitative measurements (Sai et al., 2000). For example, ketocanozole is a highly favored and considered a strong inhibitor of P450 3A4. Previous studies indicate that ketoconazole also inhibits expressed P 450 2J2 catalyzed metabolism of astemizole by 40% (Hashizume et al., 2001). Another popular chemical inhibitor of P450 1A1, alpha-napthlflavone, also inhibits the activity of expressed P450 2J2 metabolism of astemizole metabolism by 60% (Matsumoto et al., 2003). Both chemical inhibitors were utilized at 10uM, a concentration commonly used for inhibition studies. Thus, chemical inhibitors should be used with extreme caution at very well defined concentrations since they are generally selective and not specific and their extravagant use may lead to misleading results. In contrast, the specific highly inhibitory MAbs can be used at saturating levels to inhibit their target P450 without displaying cross-reactive or non-specific inhibition toward other P450s.

In summary, three monoclonal antibodies have been isolated and characterized for their specificity and inhibitory activity towards human Cytochrome P450 2J2. These MAbs have been used to determine and quantitate the role of P450 2J2 in the metabolism of arachidonic acid, ebastine, terfenadone and astemizole in human liver and intestine. The 2J2 MAbs can also be used to determine the role of 2J2 catalyzed metabolism of the above substrates relative to their metabooism by other P450s in bothe liver and extrahepatic tissues. The new anti-2J2 MAbs will be useful to determine the role of P450 2J2 relatoive to the role of other P450s in the metabolism of new drugs, xenobiotics and endobiotics.

Footnotes

This research was supported (in part) by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research.

References

Alvares AP, Schilling G, Garbut A and Kuntzman R (1970) Studies on the hydroxylation of 3,4-benzpyrene by hepatic microsomes. Effect of albumin on the rate of hydroxylation of 3,4-benzpyrene. *Biochem Pharmacol* **19:**1449-1455.

Gelboin HV, Goldfarb I, Krausz KW, Grogan J, Korzekwa KR, Gonzalez FJ and Shou M (1996) Inhibitory and noninhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 2E1. *Chem. Res. Toxicol.* **9:**1023-1030.

Gelboin HV and Krausz K (2006) Monoclonal antibodies and multifunctional cytochrome P450: drug metabolism as paradigm. *J. Clin. Pharmacol.* **46:**353-372.

Gelboin HV, Krausz KW, Goldfarb I, Buters JT, Yang SK, Gonzalez FJ, Korzekwa KR and Shou M (1995) Inhibitory and non-inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 3A3/4. *Biochem. Pharmacol.* **50:**1841-1850.

Gelboin HV, Krausz KW, Gonzalez FJ and Yang TJ (1999) Inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 enzymes: a new avenue for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **20:**432-438.

Gelboin HV, Shou M, Goldfarb I, Yang TJ and Krausz K (1998) Monoclonal antibodies to cytochromes P450. *Methods Mol. Biol.* **107:**227-237.

Guengerich FP (2005) Human Cytochrome P450 Enzymes, in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Montellano PR ed), pp 377-530, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T and Funae Y (2002) Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300:**298-304.

Hashizume T, Mise M, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T, Imaoka S, Funae Y, Kamataki T and Miyazaki H (2001) A novel cytochrome P450 enzyme responsible for the metabolism of ebastine in monkey small intestine. *Drug Metab. Dispos.* **29:**798-805.

Hashizume T, Mise M, Terauchi Y, O L, Fujii T, Miyazaki H and Inaba T (1998) N-Dealkylation and hydroxylation of ebastine by human liver cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* **26:**566-571.

Krausz KW, Goldfarb I, Buters JT, Yang TJ, Gonzalez FJ and Gelboin HV (2001) Monoclonal antibodies specific and inhibitory to human cytochromes P450 2C8, 2C9, and 2C19. *Drug Metab. Dispos.* **29:**1410-1423.

Krausz KW, Yang TJ, Gonzalez FJ, Shou M and Gelboin HV (1997) Inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 2D6. *Biochem. Pharmacol.* **54:**15-17.

Kroetz DL and Zeldin DC (2002) Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **13:**273-283.

Lafite P, Dijols S, Buisson D, Macherey AC, Zeldin DC, Dansette PM and Mansuy D (2006) Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16:**2777-2780.

Matsumoto S, Hirama T, Kim HJ, Nagata K and Yamazoe Y (2003) In vitro inhibition of human small intestinal and liver microsomal astemizole O-demethylation: different contribution of CYP2J2 in the small intestine and liver. *Xenobiotica* **33:**615-623.

Newman MA, Mainhart CR, Mallett CP, Lavoie TB and Smith-Gill SJ (1992) Patterns of antibody specificity during the BALB/c immune response to hen eggwhite lysozyme. *J Immunol* **149:**3260-3272.

Omura T and Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* **239:**2370-2378.

Sai Y, Dai R, Yang TJ, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV and Shou M (2000) Assessment of specificity of eight chemical inhibitors using cDNA-expressed cytochromes P450. *Xenobiotica* **30:**327-343.

Sai Y, Yang TJ, Krausz KW, Gonzalez FJ and Gelboin HV (1999) An inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2A6 defines its role in the metabolism of coumarin, 7-ethoxycoumarin and 4-nitroanisole in human liver. *Pharmacogenetics* **9:**229-237.

Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Borgel J, Mugge A, Lindpaintner K, Huesing A, Maisch B, Zeldin DC and Liao JK (2004) Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2. *Circulation* **110:**2132-2136.

Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR and Zeldin DC (1996) Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J. Biol. Chem.* **271:**3460-3468.

Xiao YF, Ke Q, Seubert JM, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Falck JR, Krausz K, Gelboin HV, Morgan JP and Zeldin DC (2004) Enhancement of cardiac L-type Ca2+ currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of CYP2J2. *Mol. Pharmacol.* **66:**1607-1616.

Yang TJ, Krausz KW, Sai Y, Gonzalez FJ and Gelboin HV (1999) Eight inhibitory monoclonal antibodies define the role of individual P-450s in human liver microsomal diazepam, 7-ethoxycoumarin, and imipramine metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **27:**102-109.

Yang TJ, Krausz KW, Shou M, Yang SK, Buters JT, Gonzalez FJ and Gelboin HV (1998a) Inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2B6. *Biochem. Pharmacol.* **55:**1633-1640.

Yang TJ, Sai Y, Krausz KW, Gonzalez FJ and Gelboin HV (1998b) Inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 1A2: analysis of phenacetin O-deethylation in human liver. *Pharmacogenetics* **8:**375-382.

Zeldin DC (2001) Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **276:**36059-36062.

II-4 Conclusions de cette étude.

L'article présente la mise au point d'un anticorps monoclonal anti-2J2 (aucun anticorps monoclonal n'était disponible jusqu'à présent). Notre contribution à ce travail a permis d'établir que ces anticorps étaient de très bons inhibiteurs de l'activité enzymatique du CYP 2J2. Elle a permis d'illustrer l'utilité de ce nouvel outil dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques par le CYP 2J2 chez l'homme.

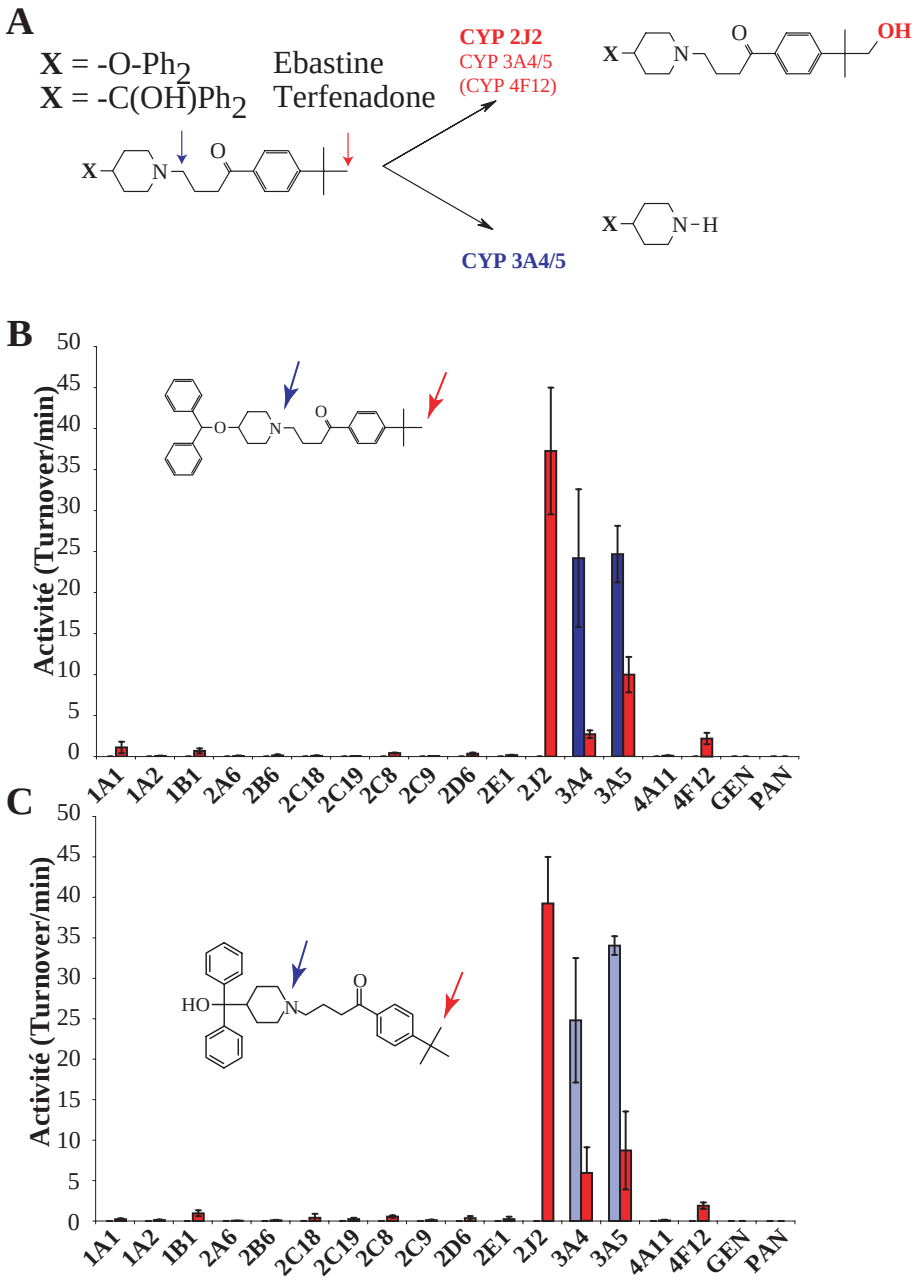


Figure II.4 – **(A) Régiosélectivité des oxydations par les P450s humains de l'ébastine et de la terfénadone. Oxydation de l'ébastine (B) et de la terfénadone (B) par 16 P450s humains recombinants**. Les figures B et C sont tirées de l'Article 1 (Figures 8C et 9C, respectivement).

Ce travail nous a également fourni des éléments intéressants en ce qui concerne la spécificité des substrats présentés précédemment pour le CYP 2J2 :

- L'étude du métabolisme de l'ébastine et de la terfénadone par l'ensemble des 15 P450s humains recombinants testés montre que seules les isoformes 3A4, 3A5 et 2J2 hydroxylent de façon efficace ces substrats (figures 8C et 9C de l'article, agrandies en figure II.4-B et C). La vitesse d'hydroxylation du groupe *ter*-butyle de ces substrats par le CYP 2J2 est 7 à 8 fois supérieure à celle du 3A4, 4 fois supérieure à celle du 3A5 et 10 à 20 fois supérieure à celle du 4F12 (qui sera négligée par la suite). Le CYP 2J2 est le seul qui conduise à une hydroxylation régiosélective significative sur le groupe *ter*-butyle de ces substrats. Par contre, l'oxydation majoritaire catalysée par les CYP 3A4 et 3A5 a lieu au niveau de la fonction amine tertiaire et conduit à une coupure oxydative de la molécule (voir figure II.4-A).
- Le CYP 2J2 est le P450 majoritairement impliqué dans l'hydroxylation intestinale de l'ébastine et de la terfénadone (sa contribution à cette réaction varie entre 40 et 60 %). Dans le foie, il participe pour 20 à 40 % à l'hydroxylation de ces composés. Cette différence est vraisemblablement due à la variation de l'expression relative des CYP 3A4 et 2J2 dans le foie et l'intestin (voir figure I.18).

Les hydroxylations du groupe *ter*-butyle de l'ébastine et de la terfénadone sont donc des activités de choix pour la mise en évidence du CYP 2J2. En plus du CYP 2J2, seuls les CYP 3A4 et 3A5 catalysent cette réaction avec une activité significative, mais avec une efficacité bien plus faible par rapport au CYP 2J2. De plus, si on s'intéresse au système cardiovasculaire, le CYP 3A4 est présent en quantité très faible et ne devrait pas jouer un rôle significatif vis-à-vis de ces substrats. Enfin, les valeurs des constantes K_m de l'hydroxylation de l'ébastine et de la terfénadine par le CYP 2J2 sont respectivement de 0,5 et 1 μM, ce qui témoigne de la forte affinité de ces composés pour le CYP 2J2.

La sélectivité de l'ébastine et de la terfénadone pour le CYP 2J2, leur oxydation rapide et régiosléective, et leur forte affinité pour ce cytochrome P450 sont autant de critères qui ont déterminé le choix de ces composés comme base stucturale pour construire une série de dérivés susceptibles d'être des inhibiteurs ou des substrats affins et sélectifs du CYP 2J2. Cette étude préliminaire a été très importante pour la conception des composés qui ont été synthétisés et étudiés en tant qu'inhibiteurs (voir chapitre **III**) ou substrats (chapitre **IV**) par la suite.

Au cours de ma thèse, d'autres substrats du CYP 2J2 ont été identifiés. Leur structure chimique, ainsi que les constantes de leur oxydation par le CYP 2J2 sont indiquées dans la figure II.5. Ainsi, en 2005, un résumé de congrès mentionnait que le CYP 2J2 pouvait catalyser l'oxydation d'un antiémétique, la dompéridone *(Michaud et al., 2005).* En 2006, deux travaux ont montré l'implication du CYP 2J2 dans l'oxydation de la vitamine D_3 *(Aiba et al., 2006)* et d'un composé antiparasitaire, le DB 289 *(Wang et al., 2006).*

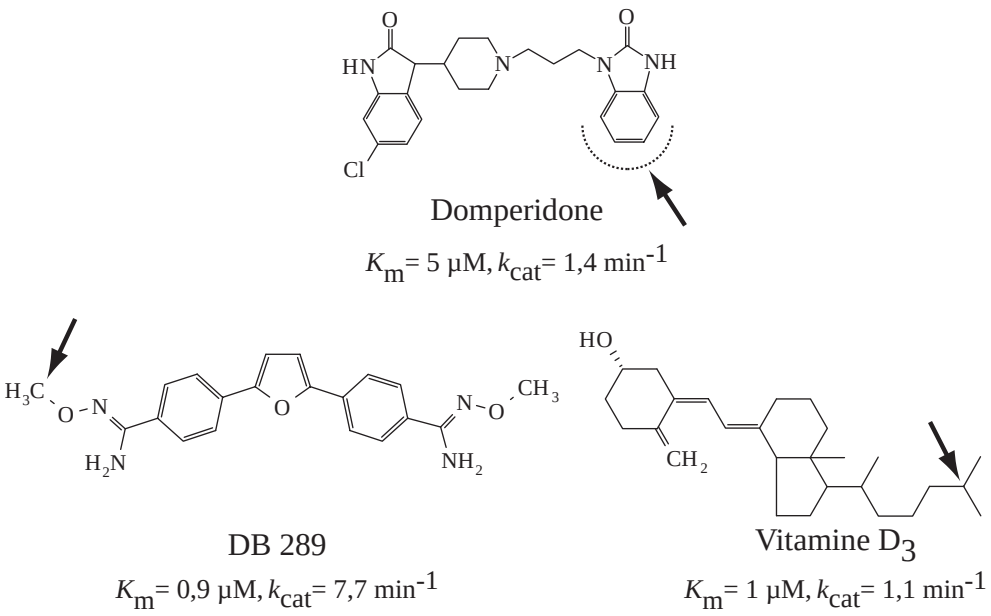


Figure II.5 – **Substrats du CYP 2J2 publiés après 2003**. Les sites d'oxydations sont indiqués par une flèche. La régiosélectivité d'hydroxylation de la dompéridone n'a pas été établie.

La stucture globale de ces trois composés est similaire à la structure générale décrite précédemment :

– Les molécules sont globalement linéaires, avec une vingtaine de liaisons d'un bout à l'autre,

– L'oxydation a lieu à une des extrémités de la chaîne de ces composés.

On peut identifier dans les structures de ces substrats quelques motifs qui correspondent aux groupes fonctionnels importants pour la reconnaissance par le CYP 2J2 présentés figure II.1. Ainsi, on retrouve le noyau pipéridine et la partie hydrophobe dans la dompéridone. Les affinités sont du même ordre de grandeur que celles de l'ébastine ou de la terfénadine, mais les vitesses d'oxydation sont très inférieures à celles obtenues avec l'ébastine ou ses dérivés. Cette constatation a confirmé l'intérêt de la structure de l'ébastine ou de la terfénadone pour construire de nouveaux substrats ou inhibiteurs.

CHAPITRE III

MISE AU POINT D'INHIBITEURS SPÉCIFIQUES DU CYTOCHROME P450 2J2.

Pour connaître le rôle biologique du CYP 2J2, il est nécessaire de posséder des outils biochimiques, comme des **inhibiteurs affins et sélectifs** des activités enzymatiques de cette isoforme. De nombreuses études ont utilisé des inhibiteurs d'époxygénation de l'acide arachidonique, parmi lesquels le 17-ODYA, le MS-PPOH ou des analogues d'EET (figure III.1), pour mettre en évidence le rôle des P450s époxygénases dans divers phénomènes physiologiques *(Chataigneau et al., 1998; Gauthier et al., 2002; Brand-Schieber et al., 2000; Jiang et al., 2005).* Cependant, tous ces inhibiteurs ont une structure dérivée de l'acide arachidonique et sont par conséquent très peu spécifiques d'une isoforme particulière de P450 époxygénase.

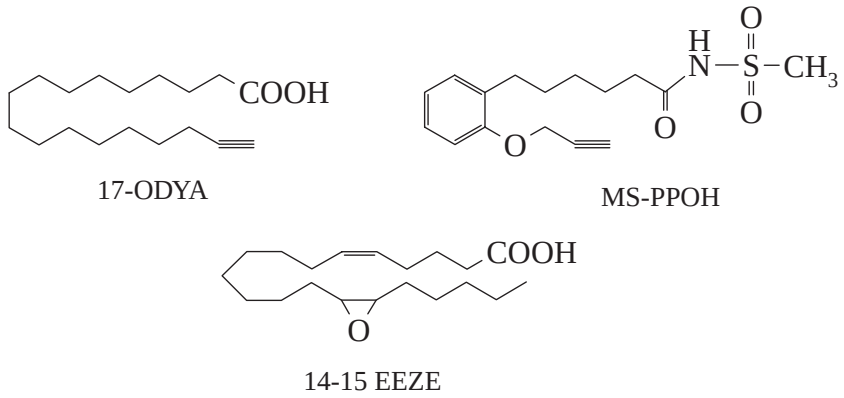


Figure III.1 – **Inhibiteurs usuels des P450s époxygénases dérivés de l'acide arachidonique**. 17-ODYA : Acide 17-Octadecynoïque ; MS-PPOH : N-Methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)hexanamide ; 14,14-EEZE : acide 14,15-epoxyeïcosa-5(Z)-enoïque.

Par ailleurs, l'implication du CYP 2J2 dans certains phénomènes angiogéniques et tumoraux laisse penser que des inhibiteurs de ce cytochrome P450 pourraient posséder une activité anti-tumorale. En effet, dans des lignées cellulaires tumorales ou dans des tumeurs xeno-greffées, l'inhibition de l'expression du CYP 2J2 par des transfections d'ADN anti-sens ou l'inhibition de l'activité enzymatique par le 17-ODYA se traduit par une diminution de la multiplication cellulaire et de la taille de la tumeur *(Jiang et al., 2005).*

L'objectif premier de ce travail a été la mise au point d'inhibiteurs affins et sélectifs du CYP 2J2 et l'évaluation de l'efficacité et de la sélectivité de ces composés. L'étude préliminaire réalisée dans le chapitre précédent a montré que l'ébastine et la terfénadone sont des points de départ de choix pour construire une banque d'inhibiteurs du CYP 2J2. Un travail réalisé en collaboration avec l'équipe de W.B. Campbell de l'université du Wisconsin (U.S.A.) a démontré l'implication d'un orthologue du CYP 2J2 dans la transformation d'un hydroperoxyde d'acide arachidonique (15-HPETE) en hydroxy-époxyde dans l'aorte de lapin *(Pfister et al., 2003b)* (voir annexe A). Ce travail montre l'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs du CYP 2J2 en tant que moyens d'étude du rôle de cette isoforme au niveau vasculaire (au moins *in vitro*).

A la suite d'une première étape de synthèse d'une série de composés dérivés de la terfénadone et de l'étude de leur efficacité et de leur sélectivité, la caractérisation de leur type d'inhibition (compétitive, irréversible) a pu être réalisée pour proposer un spectre large d'inhibiteurs pour de futurs tests biologiques.

III-1 Vers de nouveaux inhibiteurs du CYP 2J2.

III-1.1 Présentation de l'article.

Nous avons choisi de construire une première série d'inhibiteurs en partant de la structure de la terfénadone. Ce composé est hydroxylé par le CYP 2J2 au niveau de son groupe *ter*-butyle (voir chapitre **II**), il nous a donc semblé intéressant de garder la structure générale de la terfénadone, tout en changeant la nature du groupe *ter*-butyle (figure III.2).

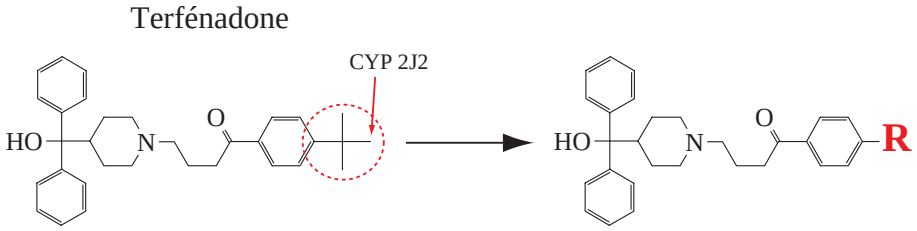


Figure III.2 – **Conception des inhibiteurs dérivés de la terfénadone**. Le groupe *ter*-butyle, hydroxylé par le CYP 2J2, est remplacé par le groupe **-R** dans le cas des nouveaux inhibiteurs

Les différents inhibiteurs synthétisés possédent des groupes **-R** de taille et de polarité variables, pour profiter du plus grand nombre possible d'interactions avec le site actif et pour tenter d'optimiser l'affinité. Certaines fonctions connues pour conduire à des inactivations de type suicide des cytochromes P450 ont aussi été introduites au niveau du groupe **-R**. L'efficacité de ces inhibiteurs a été déterminée vis-à-vis de l'hydroxylation de l'ébastine par le CYP 2J2. Les concentrations conduisant à une inhibition de 50 % (ou CI_{50}) ont été mesurées. Elles ont donné une première indication de l'affinité du composé pour le CYP 2J2, car la concentration en substrat (ébastine) utilisée étant égale à la valeur de la constante K_m d'hydroxylation de l'ébastine, l'approximation $IC_{50} \approx 2 \times K_i$ pour un inhibiteur compétitif est valable *(Cheng et Prusoff, 1973)*. Nous avons ensuite sélectionné les meilleurs inhibiteurs du CYP 2J2, et étudié les effets inhibiteurs de ces composés sur les autres P450s époxygénases présents dans les vaisseaux, ainsi que le CYP 3A4.

Ce travail a été publié au cours de ma thèse, et l'article correspondant est inclus dans la partie suivante.

III-1.2 Article 2.

Article présenté :

P. Lafite, S. Dijols, D. Buisson, A-C. Macherey, D.C. Zeldin, P.M. Dansette and D. Mansuy, *"Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human CYP 2J2"*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **16** (2006) 2777-2780.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters
ELSEVIER
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16 (2006) 2777–2780

Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2

Pierre Lafite,[a] Sylvie Dijols,[a] Didier Buisson,[a] Anne-Christine Macherey,[a] Darryl C. Zeldin,[b] Patrick M. Dansette[a] and Daniel Mansuy[a,*]

[a]*Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 CNRS, Universite Paris 5 René Descartes, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France*
[b]*NIEHS, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC 27709, USA*

Received 11 January 2006; revised 1 February 2006; accepted 1 February 2006
Available online 21 February 2006

Abstract—The active site topology, substrate specificity, and biological roles of the human cytochrome P450 CYP2J2, which is mainly expressed in the cardiovascular system, are poorly known even though recent data suggest that it could be a novel biomarker and potential target for therapy of human cancer. This paper reports a first series of high-affinity, selective CYP2J2 inhibitors that are related to terfenadine, with K_i values as low as 160 nM, that should be useful tools to determine the biological roles of CYP2J2.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

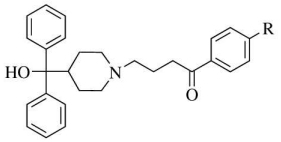
In the human genome, 57 genes have been found to code for cytochromes P450 (CYPs) that are involved in the oxidative metabolism of endogenous compounds and xenobiotics.[1] The main CYPs implicated in drug metabolism, such as CYP3A4, CYP2C9 or CYP2D6, and those responsible for the biosynthesis of steroid hormones have been extensively studied,[1] and several X-ray structures of human CYPs have been recently published.[2] Much less is known about recently discovered human CYPs such as CYP2J2.[1,3] This cytochrome seems to be primarily expressed in heart[3]; it has also been found in kidney, liver, lung,[4] and the gastrointestinal tract.[5] Its biological role is presently unclear, even though it has been found to catalyze the oxidation of a few drugs such as ebastine in the intestine.[6,7] Moreover, recombinant CYP2J2 catalyzes the epoxidation of arachidonic acid to four *cis*-epoxyeicosatrienoic acids (EETs), with regio- and stereo-selectivities that match those of the EETs isolated from heart tissue.[3] Some EET-derived metabolites play important roles in regulation of vascular tone[8] and in a host of processes related to cancer cell behavior, angiogenesis, and tumor pathogenesis.[9] Very recent data suggest that CYP2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and may represent a novel biomarker and potential target for therapy of human cancers.[10] However, little data are presently available on the active site topology and substrate specificity of CYP2J2.[1] This communication reports the design and synthesis of a first series of high-affinity inhibitors of human CYP2J2. These inhibitors should be useful tools to determine the biological roles of this cytochrome.

Hydroxylation of the drug ebastine by recombinant CYP2J2[7] expressed in baculovirus-infected Sf9 insect cells[3] was used as an assay to find CYP2J2 inhibitors. During a first screening for such inhibitors, compound **1**, derived from the drug terfenadine by oxidation of its benzylic alcohol function, was found to inhibit CYP2J2[11] with an IC_{50} value of 0.7 ± 0.1 μM. This value was much lower than the IC_{50} found for terfenadine itself (8.1 ± 0.4 μM) (Table 1), that was previously described as an inhibitor of CYP2J2.[12] Then, compound **1**, called terfenadone in the following, was used as a starting point for the design of high-affinity inhibitors of CYP2J2. Ebastine,[7] terfenadine,[13] and compound **1** are all hydroxylated by CYP2J2 at a site that is weakly reactive from a chemical standpoint, a CH_3 of the *t*-butyl group (Scheme 1). This regioselectivity in favor of the least reactive part of these substrates implies their strict positioning in the CYP2J2 active site in order to maintain the *t*-butyl group in close proximity of the heme iron for transfer of an oxygen atom from O_2. Therefore, a series of compounds derived from **1** by replacement of

Keywords: Cardiovascular system; Terfenadine; Ebastine; Hydroxylation; Suicide substrates; Monooxygenases.
* Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 42 86 21 69; fax: +33 (0)1 42 86 83 87; e-mail: daniel.mansuy@univ-paris5.fr

0960-894X/$ - see front matter © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bmcl.2006.02.004

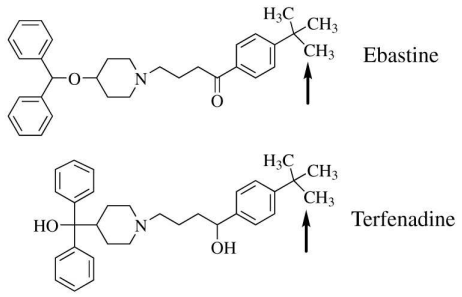
Table 1. Inhibitory effects of terfenadone derivatives toward recombinant CYP2J2



Inhibitor	–R	IC_{50}[a](μM)
Terfenadine		8.1 ± 0.4
Terfenadone, **1**	$-C(CH_3)_3$	0.7 ± 0.1
2	$-CH_3$	0.7 ± 0.1
3	$-CH_2-CH_3$	0.6 ± 0.1
4	$-CH_2-CH_2-CH_3$	0.4 ± 0.1
5	$-CH_2-CH=CH_2$	0.4 ± 0.2
6	$-(CH_2)_3CH_3$	0.7 ± 0.2
7	$-CH_2-CH_2-OH$	1.3 ± 0.8
8	$-CH_2-CH_2-CH_2-OH$	1.9 ± 0.3
9	$-CH_2-CH_2-CH_2-OAc$	2.5 ± 0.5
10	$-O-CH_3$	7.6 ± 0.6
11	–Br	4.2 ± 0.6
12	$-CH_2-CHF_2$	2.2 ± 0.9
13	Ar[b] = 	6.7 ± 2.3

[a] Compound concentration leading to 50% inhibition of the hydroxylation of ebastine by CYP2J2 expressed in baculovirus-infected Sf9 insect cells.[3] Conditions as described in Ref. 15. Under these conditions, the K_m of ebastine hydroxylation was 0.5 μM. Values are means ± SD from three to four experiments.

[b] Ar = $-C_6H_5-R$.



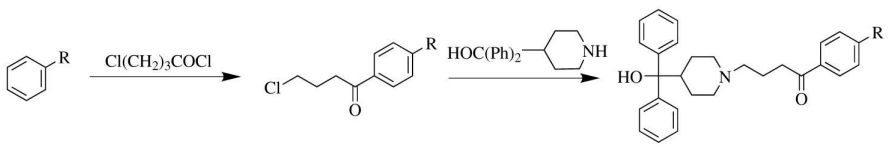
Scheme 1. Formula and site of CYP2J2-dependent hydroxylation of ebastine and terfenadine.

its *t*-butyl group with various R groups of different size and polarity was synthesized (Scheme 2). This included compounds bearing functions previously known to lead to suicide inactivation of cytochromes P450 after in situ oxidation.[14] This is the case for the terminal double bond of compound **5**, since terminal alkenes act as mechanism-based inhibitors of cytochromes P450 after N-alkylation of the heme by an intermediate derived from P450-catalyzed oxidation of the substrate double bond.[14] The choice of the CHF_2 and benzodioxole functions of compounds **12** and **13** was also made on the basis of literature data on suicide substrates of cytochrome P450.[14] In situ hydroxylation of the C–H bond of CHF_2 groups leads to an electrophilic intermediate able to acylate the P450 protein, whereas inactivation of cytochrome P450 by benzodioxole derivatives is due to the formation of an iron–carbene bond after oxidation of the benzodioxole CH_2 group.[14] The structure of compounds **5**, **12**, and **13** has been chosen in order that CYP2J2-catalyzed oxidations occur at the site leading to inactivating metabolites, assuming that hydroxylation of **5**, **12**, and **13** should occur on the homobenzylic position as the hydroxylation of compound **1** and terfenadine.

The general synthetic route used for the preparation of terfenadone derivatives (Scheme 2) with R = $(CH_2)_nCH_3$ (with n = 0–3), $(CH_2)_nOH$ and $(CH_2)_nOCOCH_3$ (with n = 2 or 3), Br, CH_2CHF_2, OCH_2O–, and OCH_3 involved an acylation of the benzenic starting compound with 4-chlorobutanoic acid chloride in the presence of $FeCl_3$, $AlCl_3$ or $SnCl_4$ and reaction of the corresponding product with α,α-diphenyl-4-piperidinomethanol. In the case of **7** and **8**, the starting compounds were the acetates of 2-phenylethanol and 3-phenylpropanol, respectively. Deprotection of the alcohol function was done as the last step of the synthesis. Compound **5** was obtained from reaction of **11** with allyltributyltin, in the presence of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0).

The structures of all the terfenadone derivatives listed in Table 1 were completely established from their ^1H NMR and mass spectra; ^1H NMR spectroscopy analysis in the presence of an internal standard showed that all these compounds were more than 95% pure.

Table 1 compares the IC_{50} values measured for the inhibition of ebastine hydroxylation catalyzed by recombinant CYP2J2. It shows that most of the synthesized terfenadone derivatives are good CYP2J2 inhibitors with IC_{50} values at the low μM range. Compounds **4** and **5** had the highest affinity with an IC_{50} value of 0.4 μM. In fact, increasing the chain length from R = methyl to R = propyl results in a gradual decrease of the IC_{50} value, whereas a further increase of the chain length (R = butyl) leads to a loss of affinity. Introduction of a polar function in the R substituent generally leads to a decrease in the affinity of the inhibitors. Compounds such as **10** and **13** in which oxygen atoms have been introduced at benzylic positions exhibit IC_{50} values one order of magnitude



Scheme 2. General synthetic route used for the preparation of terfenadone derivatives (for the nature of R, see Table 1).

Table 2. Comparison of the inhibitory effects of terfenadone derivatives toward vascular cytochromes P450

Compound	IC_{50} (μM)[a]				
	CYP2J2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP3A4
4	0.4 ± 0.1	28 ± 1	>100	26 ± 3	7.9 ± 0.5
5	0.4 ± 0.2	21 ± 1	>100	21 ± 1	5.5 ± 1.0

[a] Compound concentration leading to 50% inhibition of CYP2B6-catalyzed 7-benzyloxyresorufin O-deethylation,[16] CYP2C8-catalyzed 6-α-hydroxylation of taxol,[17] CYP2C9-dependent 4′-hydroxylation of diclofenac,[18] and CYP3A4-catalyzed 6-β-hydroxylation of testosterone,[19] respectively. Microsomes from W(R)fur yeast strain expressing each of these cytochromes P450[20] were incubated with the corresponding substrate at a concentration equal to the K_m value of the studied reactions (0.5, 5, 10, and 20 μM, respectively) and a NADPH-generating system. Incubations and analyses of the reaction mixture were performed as described previously.[16–19] Values are means ± SD from three to four experiments.

greater than those observed for compounds bearing an alkyl chain (R = Et or Pr, **3** or **4** for instance). Compounds such as **7**, **8**, **9**, and **12** in which an OH, OAc or F substituent have been introduced in the R-chain farther from the phenyl ring exhibit intermediate IC_{50} values, around 2 μM. Thus, the best inhibitors (in terms of IC_{50} value) were compounds **4** and **5**. Preliminary experiments showed that compound **4** is a competitive inhibitor of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine with a K_i of 160 ± 30 nM and also a competitive substrate of CYP2J2. Compound **5** seems to be a time-dependent inhibitor, as expected for a compound bearing a terminal double bond.[14] Interestingly, compounds **12** and **13** involving a CHF_2 and benzodioxole function, respectively, also led to time-dependent inhibitory effects that suggest a mechanism-based type of inhibition.

Table 2 compares the inhibitory effects of the best inhibitors found for CYP2J2, compounds **4** and **5**, toward the other main human cytochromes P450 that are present in the cardiovascular system, CYP2C8, CYP2C9, CYP2B6, and CYP3A4.[21] The data clearly show that compounds **4** and **5** are selective inhibitors of CYP2J2, as they are nearly inactive toward CYP2C8 and their IC_{50} values for CYP2C9, CYP2B6, and CYP3A4 are 1–3 orders of magnitude higher than those observed for CYP2J2.

In conclusion, the aforementioned results have led to the first selective, high-affinity inhibitors of CYP2J2, compounds **4** and **5**, that exhibit IC_{50} values around 400 nM. Compound **4** is a competitive inhibitor characterized by a K_i of 160 nM, a value that is remarkably low for a human cytochrome P450 inhibitor.[14] Additional studies are underway to determine the type of inhibition exhibited by compounds **5**, **12**, and **13**, and to use these new inhibitors as tools to study the biological roles of CYP2J2 in vitro and in vivo. In light of the recent findings that CYP2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells, these compounds are also currently being investigated as potential anti-cancer therapeutics.

References and notes

1. Guengerich, F. P. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, P. R., Ed., 3rd ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2005; pp 377–530.
2. (a) Williams, P. A.; Cosme, J.; Ward, A.; Angove, H. C.; Matak Vinkovic, D.; Jhoti, H. *Nature* **2003**, *424*, 464; (b) Schoch, G. A.; Yano, J. K.; Wester, M. R.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9497; (c) Wester, M. R.; Yano, J. K.; Schoch, G. A.; Yang, C.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35630; (d) Williams, P. A.; Cosme, J.; Vinkovic, D. M.; Ward, A.; Angove, H. C.; Day, P. J.; Vonrhein, C.; Tickle, I. J.; Jhoti, H. *Science* **2004**, *305*, 683; (e) Yano, J. K.; Wester, M. R.; Schoch, G. A.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38091; (f) Yano, J. K.; Hsu, M. H.; Griffin, K. J.; Stout, C. D.; Johnson, E. F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 822(g) Rowland, P.; Blaney, F. E.; Smyth, M. G.; Jones, J. J.; Leydon, V. R.; Oxbrow, A. K.; Lewis, C. J.; Tennant, M. M.; Modi, S.; Eggleston, D. S.; Chenery, R. J.; Bridges, A. M. *J. Biol. Chem.* **2005**, in press.
3. Wu, S.; Moomaw, C. R.; Tomer, K. B.; Falck, J. R.; Zeldin, D. C. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3460.
4. Zeldin, D. C.; Foley, J.; Ma, J.; Boyle, J. E.; Pascual, J. M.; Moomaw, C. R.; Tomer, K. B.; Steenbergen, C.; Wu, S. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 1111.
5. (a) Zeldin, D. C.; Foley, J.; Goldsworthy, S. M.; Cook, M. E.; Boyle, J. E.; Ma, J.; Moomaw, C. R.; Tomer, K. B.; Steenbergen, C.; Wu, S. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 931; (b) Scarborough, P. E.; Ma, J.; Qu, W.; Zeldin, D. C. *Drug Metab. Rev.* **1999**, *31*, 205.
6. Matsumoto, S.; Hirama, T.; Matsubara, T.; Nagata, K.; Yamazoe, Y. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 1240.
7. Hashizume, T.; Imaoka, S.; Mise, M.; Terauchi, Y.; Fujii, T.; Miyazaki, H.; Kamataki, T.; Funae, Y. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 298.
8. Spector, A. A.; Fang, X.; Snyder, G. D.; Weintraub, N. L. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 55.
9. Wang, Y.; Wei, X.; Xiao, X.; Hui, R.; Card, J. W.; Carey, M. A.; Wang, D. W.; Zeldin, D. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 522.
10. Jiang, J. G.; Chen, C. L.; Card, J. W.; Yang, S.; Chen, J. X.; Fu, X. N.; Ning, Y. G.; Xiao, X.; Zeldin, D. C.; Wang, D. W. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4707.
11. Pfister, S. L.; Spitzbarth, N.; Zeldin, D. C.; Lafite, P.; Mansuy, D.; Campbell, W. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *420*, 142.
12. Matsumoto, S.; Hirama, T.; Kim, H. J.; Nagata, K.; Yamazoe, Y. *Xenobiotica* **2003**, *33*, 615.
13. Patten, C.; Gagne, P.; Miller, V.; Crespi, C.; Thummel, K. *Drug Metab. Rev., 35, Suppl. 1*, 8th European ISSX Conference, Dijon, France 2003; International Society for the Study of Xenobiotics, 2003.
14. Correira, M. A.; Ortiz de Montellano, P. R. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, P. R., Ed., 3rd ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2005; pp 247–322.
15. Ebastine (0.5 μM) and inhibitor were incubated at 37 °C, for either 2 or 4 min, in the presence of microsomes from baculovirus-infected insect cells (1 nM CYP2J2) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA and a NADPH-generating system, for a total volume of 200 μL. The reaction was stopped within a few seconds by treatment with 100 μL of a cold CH_3CN/CH_3COOH (10:1) mixture and vortexing of the incubate. Proteins were precipitated

by centrifugation for 5 min at 10,000 rpm, and the supernatant aliquots were analyzed by HPLC, after injection on a Hypersil C18 column (Thermo, Les Ulis, France). The mobile phase was delivered at a rate of 1 mL/min with a gradient from A (0.1 M acetate, pH 4.6) to B ($CH_3CN/CH_3OH/H_2O$, 7:2:1) (30% up to 100% B in 15 min). The column effluent was monitored at 254 nm.

16. Ekins, S.; Vandenbranden, M.; Ring, B. J.; Gillespie, J. S.; Yang, T. J.; Gelboin, H. V.; Wrighton, S. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *286*, 1253.
17. Rahman, A.; Korzekwa, K. R.; Grogan, J.; Gonzalez, F. J.; Harris, J. W. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5543.
18. Mancy, A.; Antignac, M.; Minoletti, C.; Dijols, S.; Mouries, V.; Duong, N. T.; Battioni, P.; Dansette, P. M.; Mansuy, D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14264.
19. Brian, W. R.; Sari, M. A.; Iwasaki, M.; Shimada, T.; Kaminsky, L. S.; Guengerich, F. P. *Biochemistry* **1990**, *29*, 11280.
20. Truan, G.; Cullin, C.; Reisdorf, P.; Urban, P.; Pompon, D. *Gene* **1993**, *125*, 49.
21. (a) Hoebel, B. G.; Steyrer, E.; Graier, W. F. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1998**, *25*, 826; (b) Fisslthaler, B.; Popp, R.; Kiss, L.; Potente, M.; Harder, D. R.; Fleming, I.; Busse, R. *Nature* **1999**, *401*, 493; (c) Borlak, J.; Walles, M.; Levsen, K.; Thum, T. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 888.

III-1.3 Conclusions.

Il a été possible de synthétiser divers composés dérivant de la terfénadone par remplacement du substituant *ter*-butyle par des groupes **-R** variés. Certains de ces produits sont d'excellents inhibiteurs du CYP 2J2 avec des CI_{50} allant jusqu'à 400 nM (composés **4** et **5** de l'article). D'autre part, plusieurs de ces composés comportant des fonctions suicides des cytochromes P450 semblent effectivement être des inhibiteurs irréversibles du CYP 2J2.

III-2 Synthèse et caractérisation d'inhibiteurs du CYP 2J2.

III-2.1 Déterminants importants pour une inhibition efficace et sélective du CYP 2J2.

A partir des résultats de la partie précédente (article 2), nous avons voulu déterminer les facteurs structuraux qui conditionnent la reconnaissance des inhibiteurs par le CYP 2J2 et l'efficacité de ces inhibiteurs. Pour cela, nous avons testé au total 27 composés dérivés soit de l'ébastine, soit de la terfénadone par variation (voir figure III.3) :

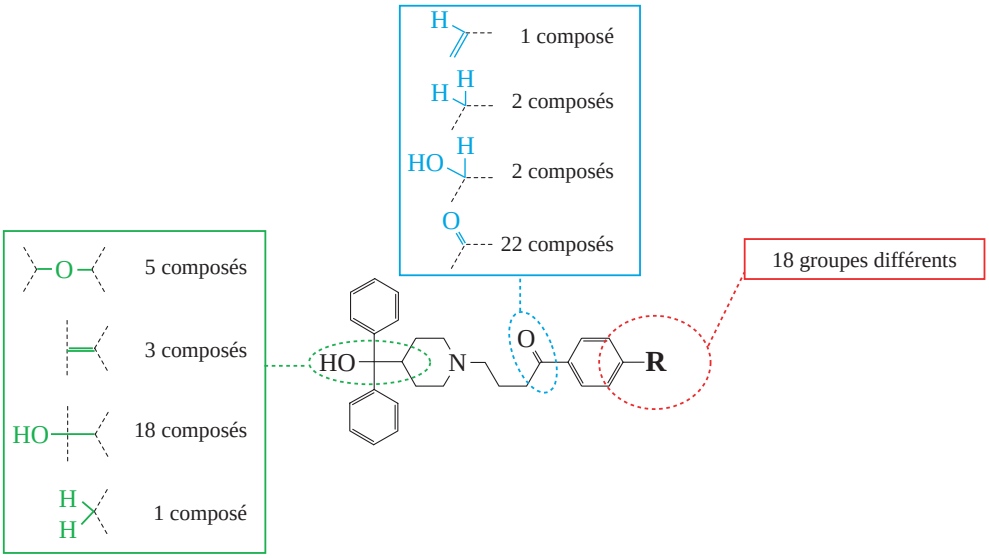


Figure III.3 – **Variations structurales des différents inhibiteurs synthétisés et testés**.

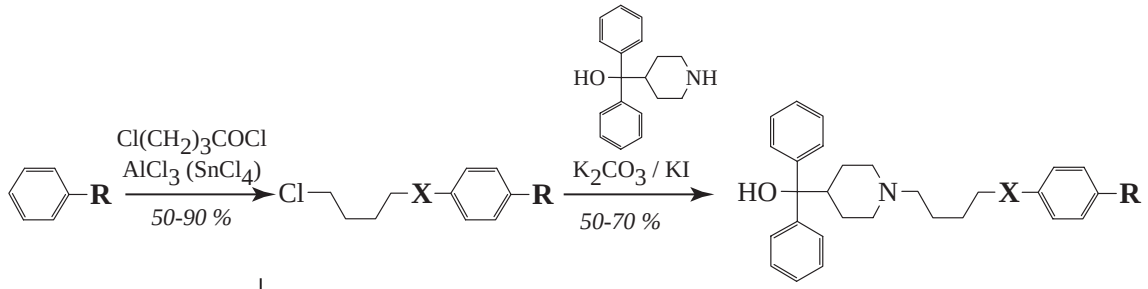
- du groupe **-R** terminal sur lequel se produit l'hydroxylation,
- de la fonction -CO- en *para* de **R** (réduction en -CHOH- ou $-CH_2-$, introduction d'une fonction -CH=CH-),
- du groupe terminal Ph_2COH le plus éloigné du site d'hydroxylation (Ph_2COH-, Ph_2CH-O-, Ph_2C=, ou absence de ce groupe).

III-2.2 Schémas de synthèse.

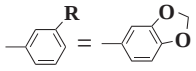
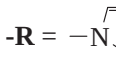
La majorité des 25 composés synthétisés a été préparée au laboratoire par Sylvie Dijols ; certains nous ont été fournis par Didier Buisson (UMR 8601). Les schémas généraux de synthèse des déri-

vés de la terfénadone, de l'ébastine et de la deshydroterfénadone sont représentés respectivement en figures III.4, III.5 et III.6. Les conditions expérimentales particulières, les rendements des réactions et les caractérisations structurales (RMN, spectrométrie de masse, ...) des produits et des différents intermédiaires sont indiqués dans la partie expérimentale et dans les suppléments de l'article 3.

De façon générale, un couplage entre le dérivé de la 1-phényl-4-chlorobutan-1-one et la pipéridine correspondante (α,α-diphényl-4-pipéridinométhanol ou 4-(diphénylméthoxy)pipéridine) a permis d'obtenir les différents composés portant le groupe **-R** de la terfénadone ou de l'ébastine, respectivement (composés **1** à **21**). Les dérivés **22** à **24** sont issus de la déhydratation en milieu acide de la terfénadone, du dérivé **15** et de la terfénadine, respectivement (figure III.6).



X = -C(=O)- :

- **-R** = -C(CH_3) *(terfénadone)* : **1**
- **-R** = -CH_3 : **2**
- **-R** = -CH_2-CH_3 : **3**
- **-R** = -CH_2-CH_2-CH_3 : **4**
- **-R** = -CH_2-CH=CH_2 : **5**
- **-R** = -CH_2-CH_2-CH_2-CH_3 : **6**
- **-R** = -CH_2-CH_2-OH : **7**
- **-R** = -CH_2-CH_2-CH_2-OH : **8**
- **-R** = -CH_2-CH_2-CH_2-OAc : **9**
- **-R** = -O-CH_3 : **10**
- **-R** = -Br : **11**
- **-R** = -CH_2-CHF_2 : **12**
- **-R** =  : **13**
- **-R** =  : **14**
- **-R** = -CH_2-CH_2-NHAc : **15**

X = -CH_2- :

- **-R** = -C(CH_3) : **16**
- **-R** = -CH_2-CH_2-CH_3 : **17**

Figure III.4 – **Schéma général de synthèse des dérivés de la terfénadone (composés 1 à 17)**.

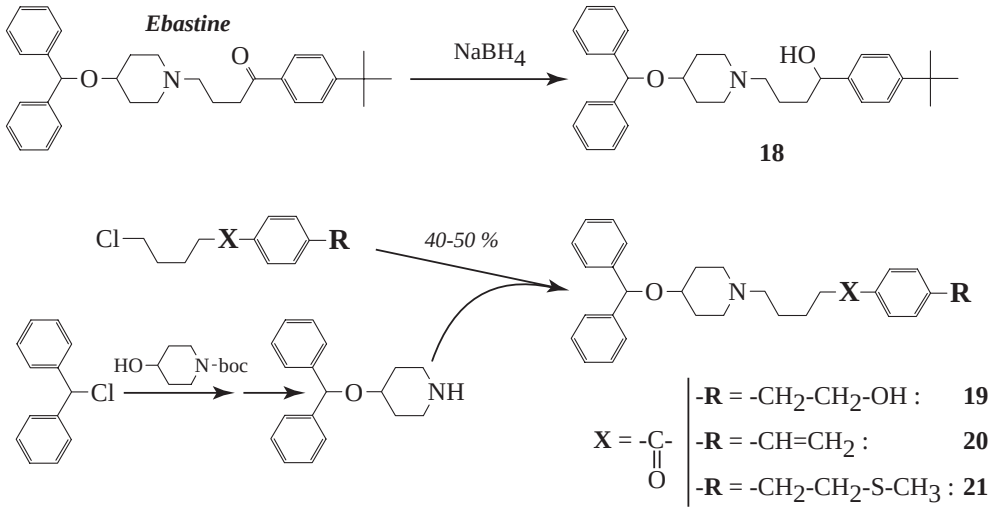


Figure III.5 – **Schéma général de synthèse des dérivés d'ébastine (composés 18 à 21)**.

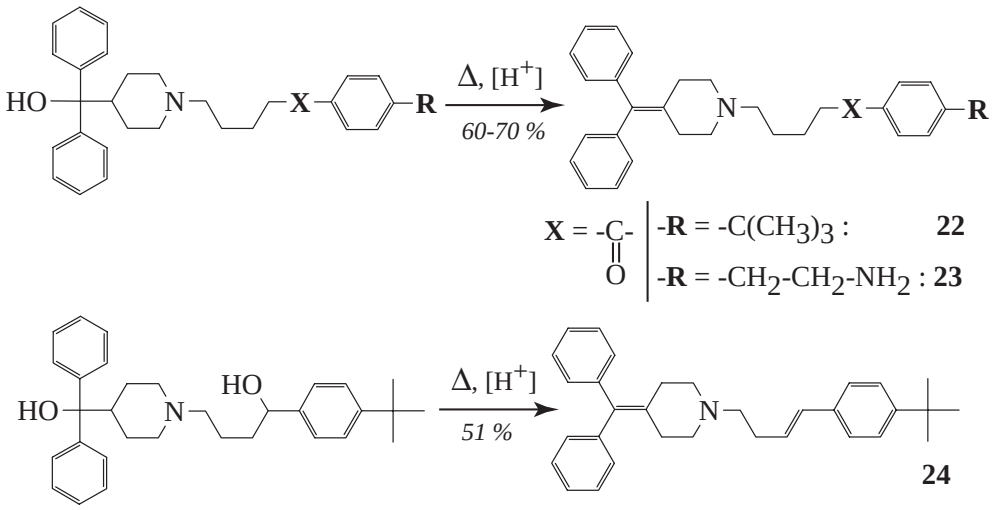
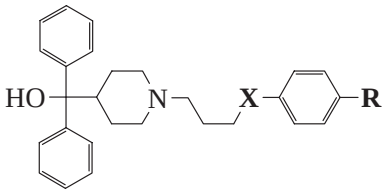


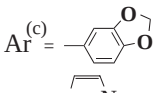
Figure III.6 – **Schéma général de synthèse des dérivés de la deshydroterfénadone, obtenus après hydrolyse acide (composés 22 à 24)**.

III-2.3 Inhibition du CYP 2J2 par les dérivés de la terfénadone et de l'ébastine.

Les tableaux III.1, III.2 et III.3 comparent les CI_{50} de divers dérivés de la terfénadone, de l'ébastine et de la déhydroterfénadone pour l'inhibition de l'hydroxylation de l'ébastine par le CYP 2J2 exprimé dans les cellules d'insectes infectées par le baculovirus.

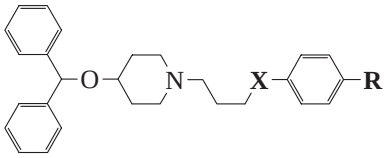
Tableau III.1 – **Comparaison des effets inhibiteurs des dérivés de la terfénadone vis-à-vis des cytochromes P450 vasculaires**.



Composé	-X-	-R	CI_{50} (μM) [a]				
			2J2	2B6	2C8	2C9	3A4
Terfénadine	**-CHOH-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	8,1 ± 0,4[b]	70 ± 1	> 100[c]	38 ± 1	2,0 ± 0,1
1	**-CO-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	0,7 ± 0,1	67 ± 5	> 100	19 ± 1	12 ± 1
2	**-CO-**	**-CH$_3$**	0,7 ± 0,2	29 ± 1	∼ 100	32 ± 2	15 ± 1
3	**-CO-**	**-CH$_2$-CH$_3$**	0,6 ± 0,1	25 ± 2	> 100	18 ± 4	6,1 ± 0,2
4	**-CO-**	**-CH$_2$-CH$_2$-CH$_3$**	0,4 ± 0,1	28 ± 1	> 100	26 ± 3	7,9 ± 0,1
5	**-CO-**	**-CH$_2$-CH=CH$_2$**	0,4 ± 0,2	21 ± 1	> 100	21 ± 1	5,5 ± 1,0
6	**-CO-**	**-(CH$_2$)$_3$-CH$_3$**	0,7 ± 0,2	13 ± 2	> 100	38 ± 2	8,2 ± 0,8
7	**-CO-**	**-CH$_2$-CH$_2$-OH**	1,3 ± 0,8	48 ± 1	> 100	28 ± 4	20 ± 1
8	**-CO-**	**-(CH$_2$)$_3$-OH**	1,9 ± 0,3	16 ± 2	∼ 100	33 ± 1	6,8 ± 0,6
9	**-CO-**	**-(CH$_2$)$_3$-OAc**	2,5 ± 0,5	9,0 ± 0,5	> 100	42 ± 3	0,9 ± 0,2
10	**-CO-**	**-OCH$_3$**	7,6 ± 0,6	19 ± 1	> 100	40 ± 1	11 ± 1
11	**-CO-**	**-Br**	4,2 ± 0,6	26 ± 2	> 100	34 ± 6	2,2 ± 0,6
12	**-CO-**	**-CH$_2$-CHF$_2$**	2,2 ± 0,9	16 ± 1	> 100	19 ± 4	8,9 ± 0,2
13	**-CO-**	Ar$^{(c)}$ = 	6,7 ± 2,3	16 ± 1	∼ 100	10 ± 2	2,8 ± 0,1
14	**-CO-**		0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,3	5,2 ± 0,3	1,6 ± 0,1	2,8 ± 0,9
15	**-CO-**	**-(CH$_2$)$_2$-NHAc**	23 ± 5	60 ± 3	> 100	15 ± 2	2,8 ± 0,9
16	**-CH$_2$-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	3,6 ± 0,7	86 ± 2	> 100	28 ± 2	4,1 ± 1,0
17	**-CH$_2$-**	**-CH$_2$-CH$_2$-CH$_3$**	4,5 ± 0,9	28 ± 4	> 100	34 ± 5	4,6 ± 0,7

(a) Concentration inhibiteur donnant 50 % d'inhibition de l'activité d'oxydation du substrat par les différents P450s vasculaires exprimés dans des cellules d'insectes (CYP 2J2) ou de levure (CYP 2B6, 2C8, 2C9 et 3A4).
(b) Les valeurs ont été obtenues par moyenne de 3 ou 4 expériences indépendantes.
(c) Activité résiduelle supérieure à 50 % de l'activité initiale à 100 μM en inhibiteur.
(d) Ar = -C$_6$H$_4$-**R**

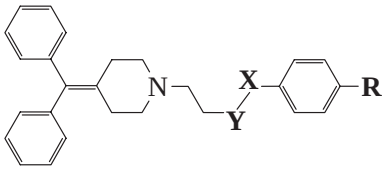
Tableau III.2 – **Comparaison des effets inhibiteurs des dérivés d'ébastine vis-à-vis des cytochromes P450 vasculaires**.

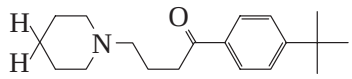


Composé	-X-	-R	CI_{50} (μM)[a]				
			2J2	2B6	2C8	2C9	3A4
Ebastine	**-CO-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	*n.d.*	90 ± 2[b]	> 100[c]	27 ± 4	13 ± 1
18	**-CHOH-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	$7{,}2 \pm 1{,}0$	38 ± 1	> 100	69 ± 8	$3{,}7 \pm 0{,}5$
19	**-CO-**	**-CH$_2$-CH$_2$-OH**	$1{,}1 \pm 0{,}3$	$7{,}5 \pm 0{,}9$	> 100	35 ± 3	$6{,}8 \pm 0{,}9$
20	**-CO-**	**-CH=CH$_2$**	$3{,}8 \pm 0{,}5$	$7{,}4 \pm 0{,}4$	> 100	22 ± 2	$5{,}9 \pm 0{,}2$
21	**-CO-**	**-CH$_2$-CH$_2$-S-CH$_3$**	$0{,}7 \pm 0{,}1$	15 ± 1	> 100	30 ± 2	$4{,}0 \pm 0{,}2$

(a) Concentration inhibiteur donnant 50 % d'inhibition de l'activité d'oxydation du substrat par les différents P450s vasculaires exprimés dans des cellules d'insectes (CYP 2J2) ou de levure (CYP 2B6, 2C8, 2C9 et 3A4).
(b) Les valeurs ont été obtenues par moyenne de 3 ou 4 expériences indépendantes.
(c) Activité résiduelle supérieure à 50 % de l'activité initiale à 100 μM en inhibiteur.

Tableau III.3 – **Comparaison des effets inhibiteurs des dérivés de la déhydroterfénadone et du composé 25 vis-à-vis des cytochromes P450 vasculaires**.



Composé	-X-Y-	-R	CI_{50} (μM)[a]				
			2J2	2B6	2C8	2C9	3A4
22	**-CO-CH$_2$-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	$0{,}9 \pm 0{,}3$[b]	41 ± 4	> 100[c]	17 ± 2	55 ± 8
23	**-CO-CH$_2$-**	**-CH$_2$-CH$_2$-NH$_2$**	$1{,}7 \pm 0{,}7$	< 0,05[d]	> 100	13 ± 1	12 ± 1
24	**-CH=CH-**	**-C(CH$_3$)$_3$**	15 ± 2	41 ± 2	> 100	15 ± 3	49 ± 6
							
25	-	-	13 ± 2	58 ± 3	~ 100	39 ± 2	68 ± 1

(a) Concentration inhibiteur donnant 50 % d'inhibition de l'activité d'oxydation du substrat par les différents P450s vasculaires exprimés dans des cellules d'insectes (CYP 2J2) ou de levure (CYP 2B6, 2C8, 2C9 et 3A4).
(b) Les valeurs ont été obtenues par moyenne de 3 ou 4 expériences indépendantes.
(c) Activité résiduelle supérieure à 50 % de l'activité initiale à 100 μM en inhibiteur.
(d) La valeur réelle n'a pu être déterminée, car la concentration en CYP 2B6 semble influer fortement sur l'IC_{50}.

Les 26 composés testés (sans l'ébastine) inhibent le CYP 2J2 avec des CI_{50} allant de 0,4 à 23 μM. La présence d'un groupe terminal hydrophobe à l'extrémité opposée au site d'hydroxylation (Ph_2COH-, Ph_2CHO- ou Ph_2C= respectivement) est importante pour l'affinité des inhibiteurs. Ceci est indiqué par la valeur de la CI_{50} du composé **25** qui est 19 fois plus importante que celle de la terfénadone **1** (13 et 0,7 μM respectivement). L'hydrophobie de ce groupe terminal semble être le facteur important dans la reconnaissance de cette partie de la molécule par le CYP 2J2. En effet, la suppression d'une fonction alcool ou éther lorsqu'on passe de la terfénadone **1** ou de l'ébastine au composé **22** ne conduit pas à une perte d'affinité significative (CI_{50} ou K_m de 0,7 et 1 μM pour **1** et l'ébastine respectivement à comparer à une CI_{50} de 0,9 μM pour **22**).

La présence de la fonction cétone en *para* du substituant **R** est également un élément important pour l'affinité des composés. La réduction de cette fonction -CO- en -CHOH- ou $-CH_2-$ (passage du composé **1** à la terfénadine ou à **16**) s'accompagne d'une augmentation de la CI_{50} (0,7 à 8 et 3,6 μM). Des augmentations similaires d'un facteur 10 environ se retrouvent lorsque l'on passe des composés **4** et **22** aux dérivés **16** et **24** respectivement.

La nature du substituant **R** influe fortement sur l'affinité des inhibiteurs du CYP 2J2. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des groupes **R** hydrophobes, correspondant à des chaînes alkyles linéaires de trois carbones. Les CI_{50} les plus faibles ont été observées pour **4** et **5** (**R** = propyle ou allyle) ; la présence d'une chaîne plus courte (**R** = méthyle ou éthyle) ou plus longue (**R** = butyle) conduit à une légère augmentation de la valeur des IC_{50} (composés **2**, **3** et **6** respectivement). L'introduction de fonctions polaires dans **R** s'est toujours traduite par une diminution d'affinité comme le montre une comparaison des CI_{50} de **7**, **8**, **9** et **15** à celle de **4** ou **6**, ou de la CI_{50} de **10** à celle de **3**. Dans ce contexte, la forte affinité du composé **14**, pour lequel **R** est un groupe imidazole très polaire est un cas particulier. En effet, les dérivés comportant un groupe imidazole sont d'excellents ligands du fer des cytochromes P450 *(Correira et Ortiz de Montellano, 2005),* et, de ce fait, sont de très bons inhibiteurs de ces enzymes dans la mesure où leur fixation sur le fer empêche la fixation de substrats dans le site actif et la coordination de l'oxygène moléculaire au fer du P450 qui est indispensable pour la catalyse d'hydroxylation. Cette complexation du fer de l'hème est vérifiée expérimentalement par la détermination du spectre visible de l'interaction entre **14** et le CYP 2J2 (figure III.7). Ce spectre différentiel montre une interaction de type II (voir partie I-1.2.1), caractéristique d'un ligand azoté du fer de l'hème, défini par un minimum à 413 nm, ainsi qu'un maximum à 432 nm.

Cette étude des effets des 26 dérivés de la terfénadone sur le CYP 2J2 a donc permis de mettre en évidence les facteurs structuraux importants pour l'obtention d'inhibiteurs à forte affinité. Elle fait en particulier ressortir deux composés très affins, **4** et **5**, présentant une CI_{50} de 400 nM.

III-2.4 Sélectivité des inhibiteurs pour le CYP 2J2 par rapport aux autres P450s vasculaires.

Les tableaux III.1, III.2 et III.3 comparent également les effets inhibiteurs de l'ensemble des dérivés de la terfénadone et de l'ébastine vis-à-vis des principaux P450s présents dans les tissus vasculaires, les CYP 2B6, 2C8, 2C9 et 3A4 (voir introduction). Les activités enzymatiques de référence

utilisées pour mesurer les effets inhibiteurs vis-à-vis de ces 4 isoformes sont respectivement la 7-benzyloxyrésorufine O-débenzylase (CYP 2B6) *(Ekins et al., 1998)*, taxol 6α−hydroxylase (CYP 2C8) *(Rahman et al., 1994)*, diclofénac 4'-hydroxylase (CYP 2C9) *(Mancy et al., 1999)* et testostérone 6β-hydroxylase (CYP 3A4) *(Brian et al., 1990)*. Toutes les conditions d'incubation et de mesure d'activité sont explicitées dans la partie *Protocoles expérimentaux* (chapitre **VII**) et dans l'article 3. Pour que les CI_{50} mesurées soient comparables entre elles, les concentrations de substrat utilisées dans ces expériences correspondent dans chaque cas à la K_m de la réaction enzymatique suivie.

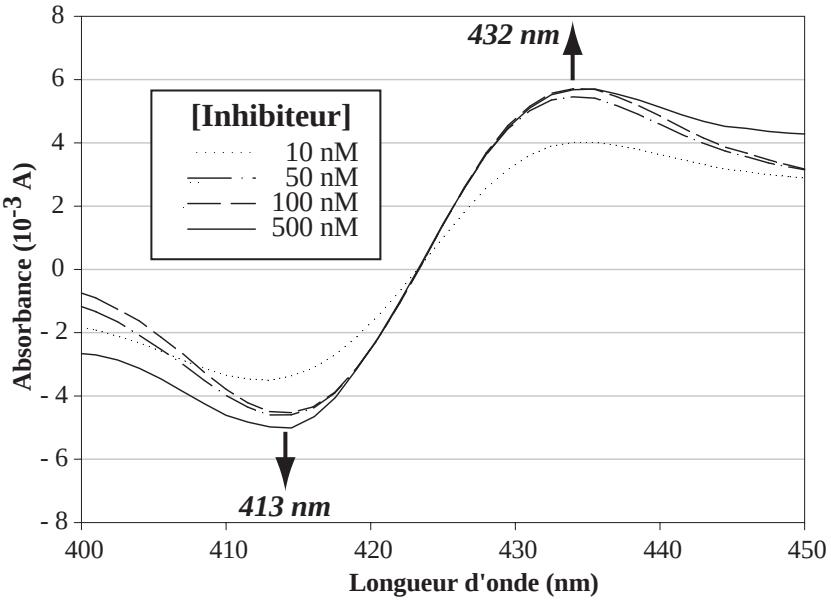


Figure III.7 – **Spectre différentiel de l'interaction entre le CYP 2J2 et 14**. Les deux cuves contiennent le CYP 2J2 (100 nM) exprimé dans les microsomes de cellules d'insectes. Différentes concentrations de **14** sont ajoutées dans la cuve échantillon, puis le spectre obtenu est enregistré.

De tous les composés étudiés, le composé **14**, qui comporte un groupement imidazole est clairement un cas particulier. Du fait de la présence de ce groupe capable capable d'agir comme un excellent ligand du fer, **14** est un bon inhibiteur de tous les P450s testés, avec des CI_{50} de 0,4 à 5,2 μM ; c'est toutefois pour le CYP 2J2 qu'il présente la plus grande affinité. En tant qu'inhibiteur des CYP 2C8, 2C9 et 2J2, **14** pourrait être utilisé comme inhibiteur de l'ensemble des P450s époxygénases présents dans les tissus vasculaires.

En ce qui concerne l'ensemble des autres composés figurant dans les tableaux III.1, III.2 et III.3, les conclusions majeures de l'examen de ces tableaux sont les suivantes :

– **Aucun de ces composés n'inhibe de façon significative le CYP 2C8 (CI_{50} > 100 μM).** Pour vérifier ce résultat un peu surprenant, nous avons étudié les effets inhibiteurs des composés **1** à **5** vis-à-vis de la 6α-hydroxylation du taxol par le CYP 2C8 recombinant exprimé dans un autre système (microsomes de cellules d'insectes infectées par le baculovirus, au lieu des microsomes de levure utilisés pour obtenir les résultats des tableaux III.1, III.2 et III.3). De plus, nous avons étudié les effets des mêmes composés vis-à-vis d'une autre activité du CYP 2C8, la N-déséthylation de l'amodiaquine *(Li et al., 2002)*. Dans les deux cas, aucun de ces composés n'a conduit à une inhibition significative du CYP 2C8 (CI_{50} > 100 μM).

- **Le CYP 2C9** est inhibé avec des CI_{50} allant de 10 à 69 μM, qui sont en général **environ 10 fois plus élevées** que celles observées pour le CYP 2J2.
- **La conclusion précédente concernant le CYP 2C9 est globalement valable pour le CYP 2B6**, avec des CI_{50} allant de 7 à 90 μM, si on exclut le composé **23** qui s'est révélé être un remarquable inhibiteur du CYP 2B6. L'effet inhibiteur de **23** vis-à-vis du CYP 2B6, et dans une moindre mesure vis-à-vis du CYP 2J2, pourrait être dû à une liaison forte entre le fer de ce P450 et la fonction NH_2 de **23**.
- **Ces composés inhibent le CYP 3A4** avec des CI_{50} allant de 0,9 à 68 μM qui sont en général intermédiaires entre celles mesurées pour le CYP 2J2 et le CYP 2C9 (ou 2B6).

Les meilleurs inhibiteurs du CYP 2J2, les composés **4** et **5**, présentent une bonne sélectivité vis-à-vis de cette isoforme, puisque leurs CI_{50} pour les autres P450s testés sont au minimum 20 fois (pour **4**) et 14 fois (pour **5**) plus grandes que celles observées avec le CYP 2J2.

A ce stade de l'étude, nous avons sélectionné 5 composés pour des études enzymatiques plus détaillées, en particulier pour déterminer leur mode d'inhibition du CYP 2J2 :

- le composé **4** qui présente la plus faible CI_{50}, qui pourrait se comporter comme un inhibiteur de type compétitif.
- le composé **14** qui possède un groupe imidazole, pouvant se fixer au fer de l'hème, et qui est un bon inhibiteur de tous les CYPs vasculaires.
- les composés **5**, **12** et **13**, qui semblaient être des inhibiteurs irréversibles du CYP 2J2 d'après des études préliminaires de suivi d'activité en fonction du temps.

III-2.5 Etude du mode d'inhibition du composé 4.

Etant donnée la grande analogie de structure de **4** avec celle de la terfénadone, qui est un substrat du CYP 2J2 (cf. chapitre **II**), et l'absence de fonctions susceptibles d'inactiver ce cytochrome P450 dans la formule de **4**, il semblerait probable que ce composé soit un inhibiteur compétitif du CYP 2J2. Pour vérifier cette hypothèse, une étude de l'hydroxylation de l'ébastine par le CYP 2J2 en présence de **4**, à des concentrations diverses de substrat (0,2 à 5 μM) et d'inhibiteur (0 à 2 μM) a été réalisée.

Une représentation des résultats obtenus par la méthode de Lineweaver-Burk (figure III.8-A) montre clairement que les droites correspondantes à 1/activité = f(1/[substrat]) pour diverses concentrations d'inhibiteur se coupent sur l'axe des ordonnées, ce qui est caractéristique d'une inhibition de type compétitif. En effet, l'addition de l'inhibiteur n'influe que sur la constante de Michaelis K_m du complexe enzyme-substrat, en déplaçant l'équilibre de complexation. Pour une concentration infinie en substrat (abscisse = 0), la vitesse V_{max} reste constante et indépendante de la concentration en inhibiteur *(Dixon et Webb, 1964).*

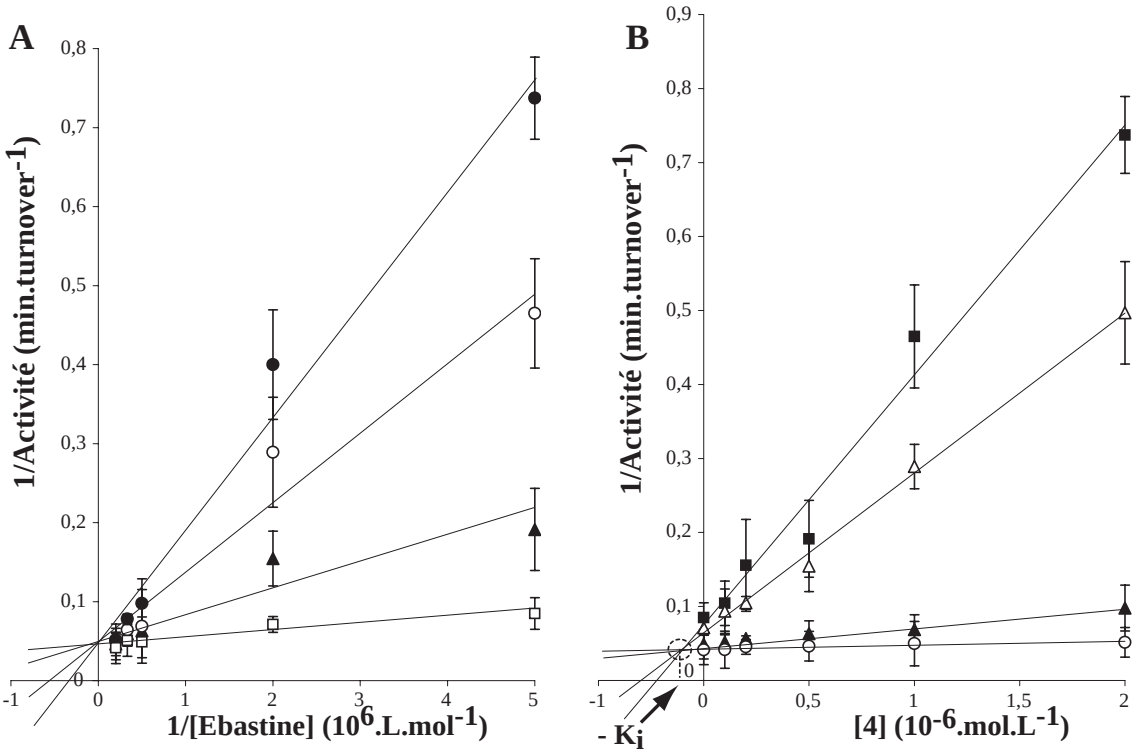


Figure III.8 – **Représentation selon Lineweaver-Burk (A) et Dixon (B) de l'inhibition du CYP 2J2 par le composé <u>4</u>.** (A) Les vitesses de réaction ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes, avec des concentrations en inhibiteur de 0 (□), 0,5 (▲), 1 (○) et 2 μM (●). Pour plus de clarté, les courbes obtenues pour des concentrations en inhibiteur de 0,1 et 0,2 μM n'ont pas été représentées. Ces droites passent également par le point d'intersection défini sur l'axe des ordonnées. (B) Les vitesses de réaction ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes, avec des concentrations en substrat de 0,2 (■), 0,5 (Δ), 2 (▲) et 5 μM (○). Pour plus de lisibilité, la courbe obtenue pour une concentration de 3 μM en inhibiteur n'a pas été tracée. Celle-ci passe également par le point d'intersection des autres droites, d'abscisse $-K_i$.

Pour obtenir une valeur la plus précise possible de la constante d'inhibition K_i, nous avons utilisé la représentation de Dixon, en traçant la courbe 1/activité = f ([inhibiteur]) *(Dixon et Webb, 1964).* Les droites obtenues (figure III.8-B) se coupent en un point dont l'abscisse est $-K_i$, d'où une valeur de $K_i = 0{,}16 \pm 0{,}04$ μM. Dans le cas d'un inhibiteur compétitif, l'approximation $K_i = CI_{50}/2$ est raisonnable si la concentration en substrat est égale à la valeur K_m *(Cheng et Prusoff, 1973),* et donne une valeur de K_i de 0,2 μM, en utilisant la valeur du tableau III.1. Les deux valeurs de K_i, obtenues par la CI_{50} et par la représentation de Dixon, sont donc en excellent accord, compte-tenu des domaines d'erreur.

En fait, comme ceci sera établi dans le chapitre **IV**, **<u>4</u>** est un substrat du CYP 2J2, hydroxylé au niveau de son groupe propyle. Le composé **<u>4</u>** est donc un inhibiteur compétitif, substrat alternatif du CYP 2J2. On pouvait donc craindre que la concentration en inhibiteur **<u>4</u>** varie en fonction du temps d'incubation, au cours des études cinétiques que nous avons réalisées pour déterminer le mode d'inhibition de **<u>4</u>**. En réalité, dans les conditions utilisées, qui font intervenir une très faible quantité d'enzyme (1 nM) et des temps d'incubation courts (2 à 4 minutes), nous avons vérifié que la concentration de **<u>4</u>** ne variait pas de façon significative (consommation inférieure à 10 %). De plus, la linéarité de l'activité enzymatique a été vérifiée en analysant le milieu réactionnel à plusieurs temps d'incubation.

III-2.6 Etude du mode d'inhibition du CYP 2J2 par le composé 14.

L'étude du mécanisme d'inhibition du CYP 2J2 par **14** a été réalisée en traçant le graphique de Lineweaver-Burk correspondant (figure III.9-A). Les droites obtenues se coupent en un point, qui n'est pas situé sur les axes du graphique. On est donc en présence d'un mécanisme d'inhibition de type mixte, avec une composante compétitive, et une composante non-compétitive. Deux constantes d'inhibition correspondantes K_i^C et K_i^{NC} peuvent être calculées en traçant le diagramme de Dixon de cette inhibition *(Segel, 1993)* (figure III.9-B). Le point d'intersection des droites permet d'accéder aux constantes K_i^C et K_i^{NC} :

– l'abscisse de ce point vaut $-K_i^C$,
– l'ordonnée du point d'intersection vaut $(1 - K_i^C/K_i^{NC})/V_{max}$.

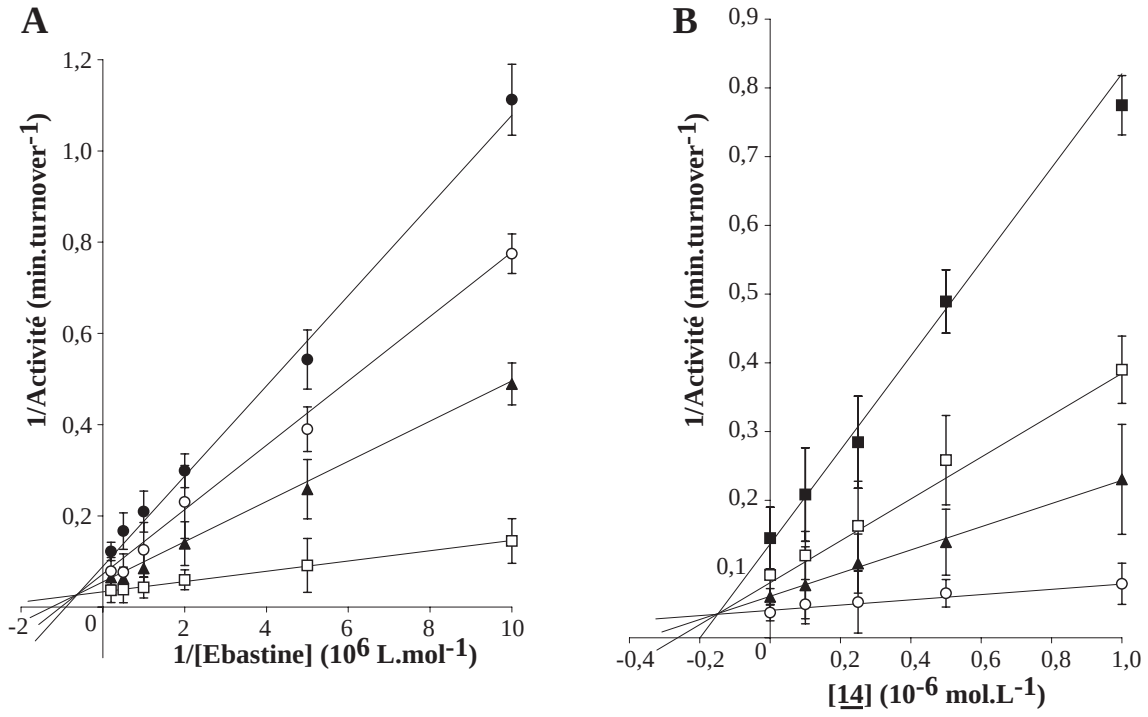


Figure III.9 – **Graphe de Lineweaver-Burk (A) et Dixon (B) correspondant à l'inhibition du CYP 2J2 par le composé 14**. Les points expérimentaux sont la moyenne ± l'erreur standard de trois expériences indépendantes, en utilisant des microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2, en présence de système générateur de NADPH (voir chapitre **VII**). **(A)** : Les concentrations de **14** utilisées étaient de 0 (□), 0,5 (▲), 1 (○) et 2,5 μM (●). **(B)** : Les concentrations en ébastine utilisées étaient de 0,1 (■), 0,2 (□), 0,5 (▲) et 5 μM (○). Pour des raisons de lisibilité, les courbes obtenues pour des concentrations en inhibiteur de 0,1, 0,2 et 5 μM (**A**) et en substrat de 1 et 2 μM (**B**) n'ont pas été représentées.

En utilisant ces deux formules, on obtient comme constantes d'inhibition $K_i^C = 0{,}2 \pm 0{,}1$ μM et $K_i^{NC} = 2{,}4 \pm 0{,}4$ μM. Comme la constante d'inhibition compétitive K_i^C est environ 10 fois plus faible que K_i^{NC}, on peut considérer que le mécanisme mixte d'inhibition de **14** montre un fort caractère compétitif.

III-2.7 Etude du mode d'inhibition du CYP 2J2 par les composés 5, 12 et 13.

Ces composés comportent une fonction « suicide » classique de la chimie des cytochromes P450, et ont été conçus pour être des inhibiteurs de type substrat-suicide du CYP 2J2. Nous avons donc dans un premier temps vérifié qu'ils conduisaient à une inhibition dépendante du temps du CYP 2J2. La figure III.10 montre que l'activité résiduelle du CYP 2J2 (vis-à-vis de l'ébastine) mesurée après des temps variables d'incubation avec le composé **5** (ou **13**) et du NADPH diminue fortement en fonction du temps. Lorsque les mêmes incubations sont réalisées en absence de NADPH, on n'observe qu'une très faible chute d'activité (fig. III.10), ce qui montre bien qu'une oxydation de l'inhibiteur par le CYP 2J2 en présence de NADPH et d'O_2 est nécessaire pour observer cette inhibition.

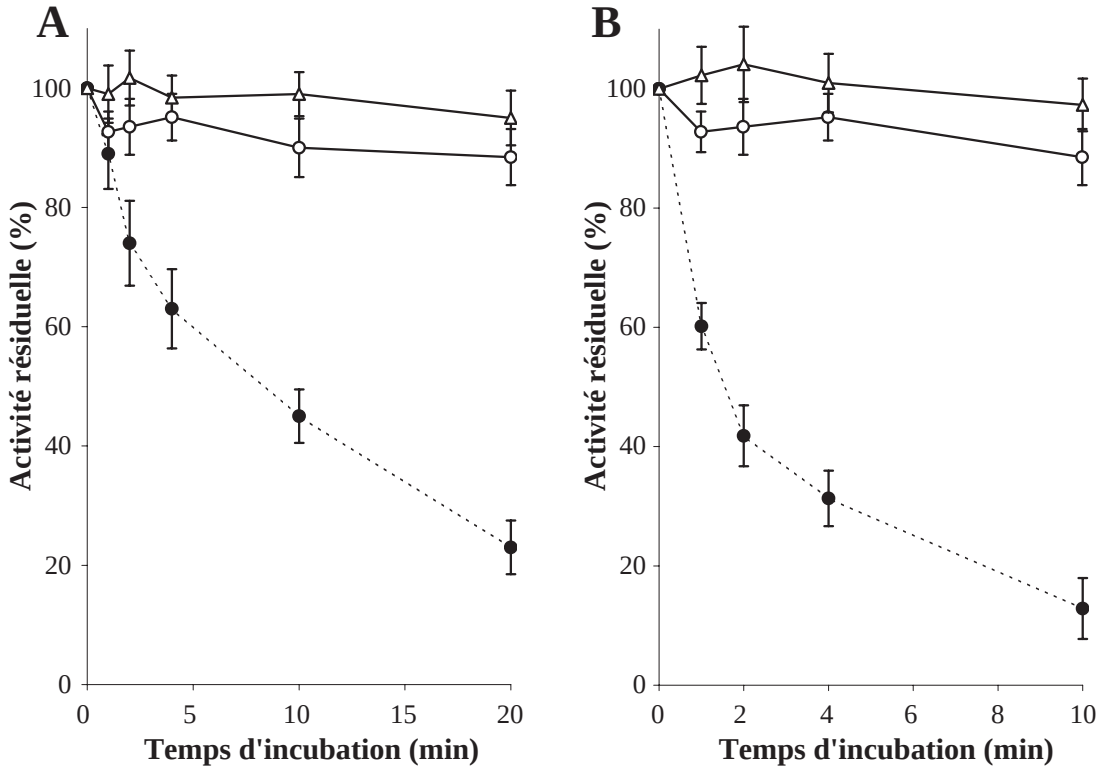
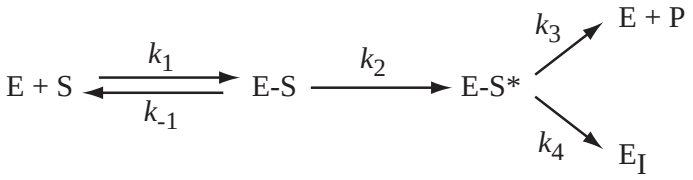


Figure III.10 – **Variation en fonction du temps de l'activité du CYP 2J2 après incubation avec les composés 5 (A) et 13 (B).** Les activités résiduelles sont obtenues en incubant des microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 en présence de 0 μM (○) et 20 μM d'inhibiteur (●). Une incubation témoin est réalisée en présence de 20 μM d'inhibiteur, mais en absence de système générateur de NADPH (Δ). Les valeurs expérimentales ont été obtenues à la suite de trois expériences indépendantes.

Alors que les composés **5** et **13** conduisent à des inhibitions dépendantes du temps, allant jusqu'à 75-90 % après 20 minutes d'incubation en présence de 20 μM d'inhibiteur, l'inhibiteur **12** ne montre qu'une chute d'activité de 30 % environ même après 30 minutes d'incubation avec une concentration de 100 μM en inhibiteur (courbe non représentée). Nous n'avons donc continué l'étude et déterminé les constantes cinétiques d'inactivation du CYP 2J2 que pour les composés **5** et **13**.

III-2.7.1 Détermination des constantes cinétiques d'inactivation.

Dans le schéma classique d'une inhibition de type « substrat-suicide » définie selon les équations suivantes :



où E, S, E-S, E-S*, P et E_I désignent respectivement l'enzyme, le substrat, le complexe enzyme-substrat, le complexe enzyme-substrat activé, le produit de la réaction et l'enzyme inactivée, les paramètres décrivant l'inactivation sont *(Walsh, 1982; Silverman, 1995)* :

- $K_I = [(k_{-1} + k_2)/k_1][(k_2 + k_4)/(k_2 + k_3 + k_4)]$, constante représentative du mécanisme d'inhibition suicide,
- $k_{inact} = k_2 k_4/(k_2 + k_3 + k_4)$, constante de vitesse d'inactivation,
- $t_{1/2}^{max} = \ln(2)/k_{inact}$, temps nécessaire pour observer 50 % d'inactivation de l'enzyme, pour une concentration infinie en inhibiteur,
- $r = k_3/k_4$, coefficient de partition entre formation de produit stable d'oxydation et inactivation de l'enzyme.

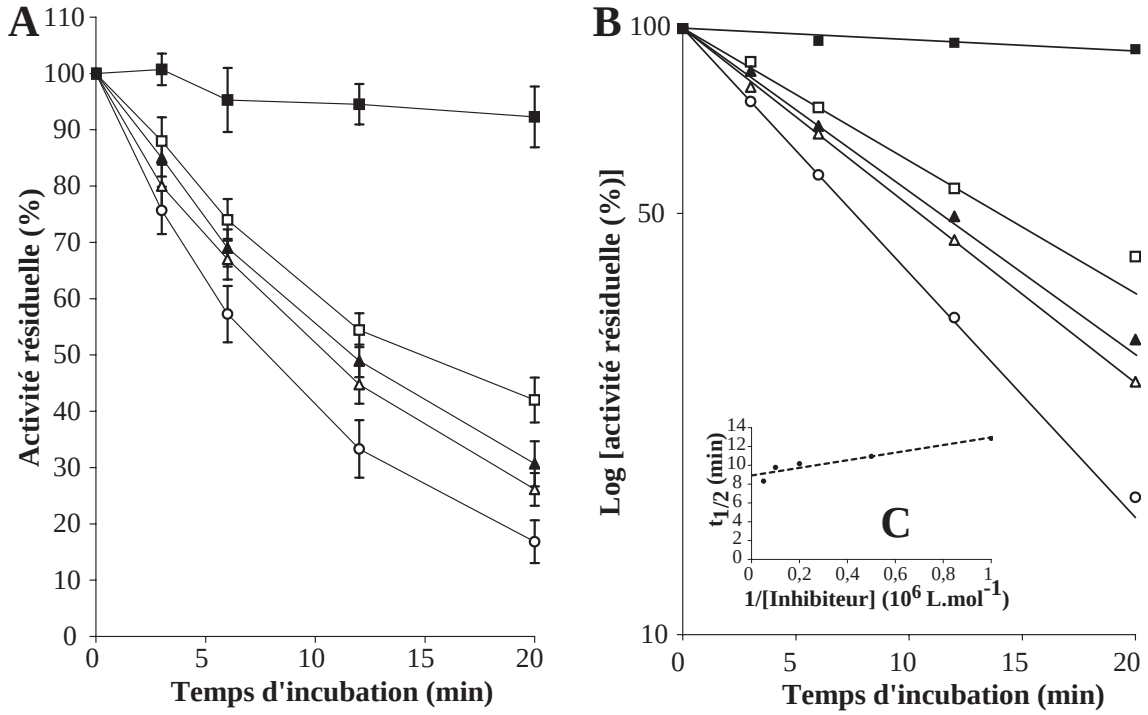


Figure III.11 – **Cinétique d'inactivation du CYP 2J2 par l'inhibiteur 5. (A)** : Activité résiduelle du CYP 2J2 en présence de différentes concentrations de **5**. **(B)** : Régression linéaire du logarithme décimal de l'activité résiduelle du CYP 2J2. **(C)** : Courbe de Kitz-Wilson correspondante. Les courbes ont été obtenues à la suite de trois expériences indépendantes, réalisées en présence de microsomes contenant le CYP 2J2, de NADPH, et pour des concentrations de 0 (■), 1 (□), 2 (▲), 5 (Δ) et 20 μM (○) de l'inhibiteur **5**. Les courbes obtenues en présence de 10 μM d'inhibiteur n'ont pas été représentées pour plus de clarté.

Les trois premières constantes ont été calculées à partir des courbes de l'activité résiduelle du CYP 2J2 en fonction de l'inhibition, et des courbes correspondantes donnant la variation du logarithme de l'activité résiduelle en fonction du temps d'incubation *(Kitz et Wilson, 1962)* (figures III.11 et III.12).

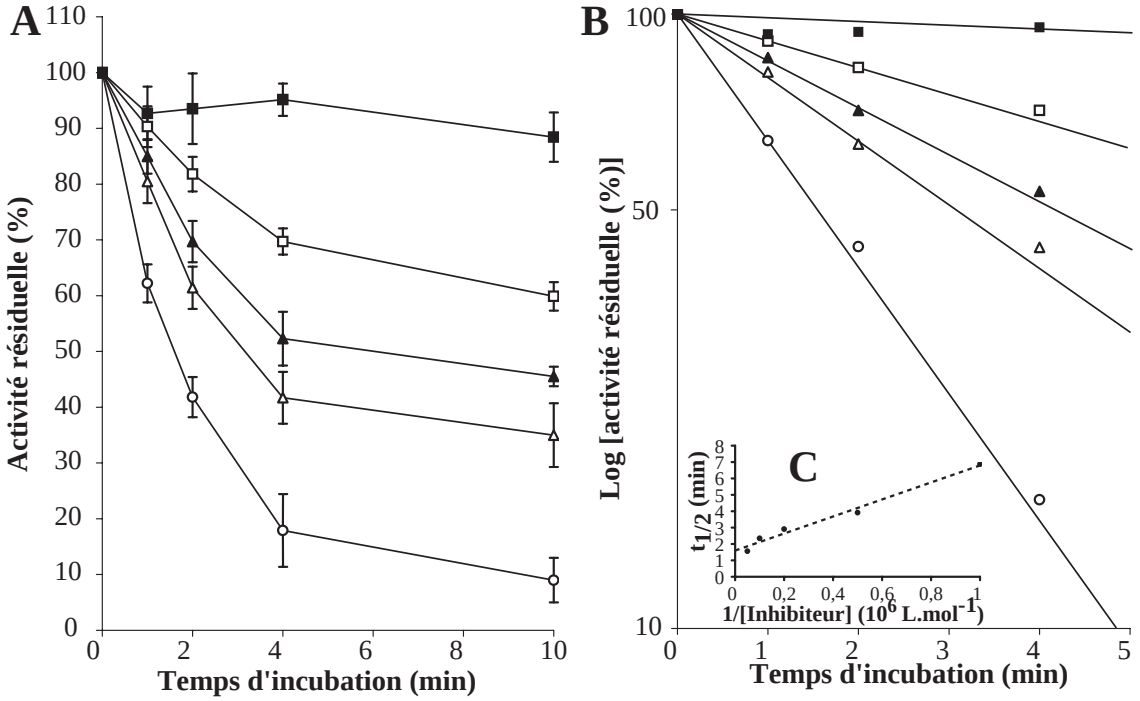


Figure III.12 – **Cinétique d'inactivation du CYP 2J2 par l'inhibiteur 13. (A)** : Activité résiduelle du CYP 2J2 en présence de différentes concentrations de **5**. **(B)** : Régression linéaire du logarithme décimal de l'activité résiduelle du CYP 2J2. **(C)** : Courbe de Kitz-Wilson correspondante. Conditions expérimentales identiques à celles de la figure III.11.

Tableau III.4 – **Constantes cinétiques d'inactivation du CYP 2J2 par les composés 5 et 13, comparées avec celles d'autres substrats suicides de P450s**.

Inhibiteur	P450	Fonction inactivante	K_I (μM)	k_{inact} (min^{-1})	$t_{1/2}^{max}$ (min)	k_{inact}/K_I ($L.mol^1.s^{-}1$)
5[a]	-	Alcène terminal	0,45 ± 0,05	0,08 ± 0,02	8,7 ± 1,6	2960 ± 30
13[a]	-	Benzo-1,3-dioxole	2,9 ± 0,7	0,47 ± 0,12	1,5 ± 0,9	2700 ± 40
Ticlopidine[b]	2C19	Thiophène	87	0,2	3,4	39
Paroxetine[c]	2D6	Benzo-1,3-dioxole	4,9	0,17	4,1	580
Acide tiénilique[d]	2C9	Thiophène	4,3	0,2	3,6	746
Chloramphenicol[e]	2B11	Dichloroacetamide	5	1,2	0,6	4 000
2-Ethynylnaphtalène[f]	2B1	Alcyne terminal	0,08	0,83	0,84	173 000

(a) Ces valeurs ont été calculées à partir des figures III.11 et III.12.
(b) *Ha-Duong et al., 2001.*
(c) *Bertelsen et al., 2003.*
(d) *Lopez-Garcia et al., 1994.*
(e) *Ciaccio et al., 1987.*
(f) *Roberts et al., 1993.*

Les valeurs des constantes cinétiques d'inactivation du CYP 2J2 par les composés **5** et **13** sont indiquées dans le tableau III.4. Elles sont comparées à d'autres constantes publiées précédemment

pour d'autres substrats suicides des P450s. L'efficacité de ces inhibiteurs est caractérisée par la valeur du rapport k_{inact}/K_I *(Bednarski et Nelson, 1989)*. De ce point de vue, les composés **5** et **13** sont parmi les inhibiteurs les plus efficaces des substrats suicides précédemments publiés *(Fontana et al., 2005)*. En fait, la vitesse d'inactivation du CYP 2J2 par le composé **13** est 6 fois supérieure à celle causée par le composé **5** (k_{inact} de 0,47 et 0,08 min^{-1}, respectivement). En revanche, l'affinité de **5** pour le CYP 2J2 est supérieure à celle de **13**, comme l'indiquent les valeurs de K_I (0,5 et 3 μM respectivement) ainsi que les valeurs des CI_{50} du tableau III.1 (0,4 et 6,7 μM).

III-2.7.2 Etude du mécanisme de l'inactivation par 13.

Afin de mieux caractériser, au niveau moléculaire, le mécanisme d'inactivation du CYP 2J2 par **13**, nous avons cherché à identifier la nature du métabolite conduisant à l'inactivation du CYP 2J2, ainsi que celle du (ou des) métabolite(s) non inactivants formés au cours de cycles catalytiques productifs.

*(a) Etude de l'oxydation de **13** par le CYP 2J2.*

Compte tenu de la structure de **13**, nous nous attendions à une oxydation majeure par le CYP 2J2 ayant lieu au niveau du groupe CH_2 de fonction benzodioxole de **13** *(Correira et Ortiz de Montellano, 2005)*. D'après ce qui est connu sur l'oxydation de cette fonction par les P450s *(Mansuy et al., 1979, 1989)*, la réaction de l'espèce Fe^V=O du P450 avec le groupe CH_2 devrait conduire à la formation d'un radical dérivé du substrat qui peut (figure III.13) :

- soit subir un transfert oxydatif du ligand OH de l'espèce Fe^{IV}-OH avec formation d'un formiate de catéchol qui s'hydrolyse en catéchol,
- soit se lier au fer de l'hème et conduire, après élimination d'H_2O, à un complexe carbénique du P450 très stable, et à l'inactivation de ce cytochrome.

La formation d'un complexe CYP 2J2 Fe-carbène a été étudiée en spectroscopie UV-visible différentielle. L'addition de NADPH à des microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 en présence du composé **13** conduit à l'apparition progressive d'un spectre présentant 2 pics à 428 et 457 nm, caractéristique de la formation d'un complèxe carbénique de P450 dérivé du benzodioxole *(Correira et Ortiz de Montellano, 2005)* (figure III.14). Si l'on tient compte du coefficient d'extinction molaire (ε) du pic à 455 $\pm$ 2 nm décrit dans la littérature pour de tels complexes (ε variant de 50 000 à 75 000 $M.cm^{-1}$ *(Murray et al., 1983; Elcombe et al., 1975)*), on calcule que 66 à 99 % du CYP 2J2 est engagé dans la formation de complexe carbénique dans les conditions de l'expérience (CYP 2J2 0,1 μM, **13** 100 μM, 10 min. après l'addition de NADPH 1mM).

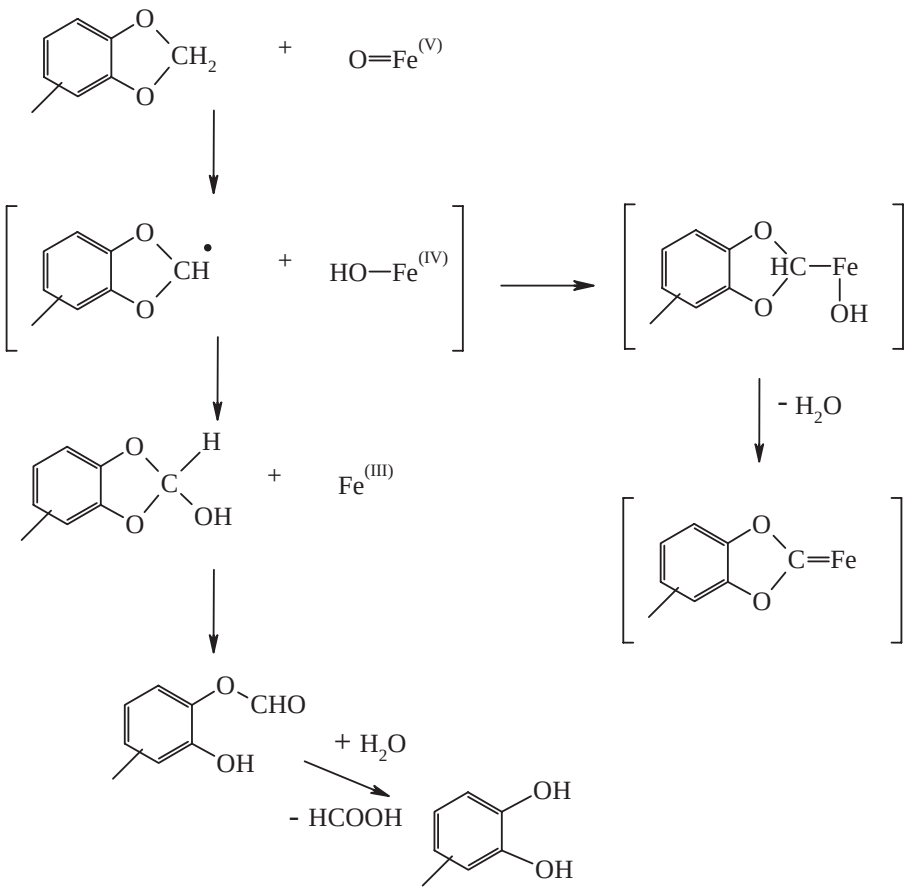


Figure III.13 – **Mécanismes de l'oxydation et de l'inactivation du CYP 2J2 par le composé 13**.

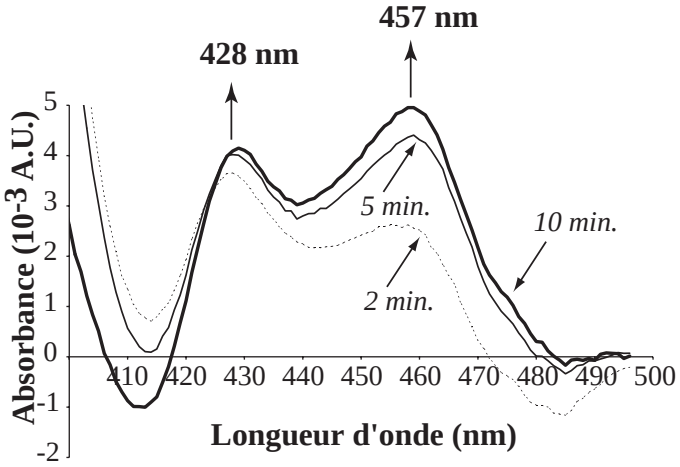


Figure III.14 – **Spectre différentiel obtenu lors de l'oxydation de 13 par le CYP 2J2**. Les deux cuves contiennent une suspension de microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 (100 nM). **13** (100 μM) est ajouté dans la cuve de mesure, puis du NADPH (1 mM) est ajouté dans les deux cuves. Les spectres indiqués ont été obtenus 2, 5 et 10 minutes après addition de NADPH.

La formation de métabolites stables de 13 lors d'incubation de **13** avec des microsomes de cellules d'insectes exprimant du CYP 2J2 en présence d'un système générateur de NADPH, a été étudiée par CLHP couplée à un spectromètre de masse. Le métabolite majoritaire détecté par cette

méthode présente un spectre de masse avec un pic moléculaire à m/z = 446 (M-12 si M est la masse de l'ion molaire du composé **13**) correspondant au catéchol dérivé de **13**. L'étude des fragments du métabolite comparés à ceux de **13** est aussi tout à fait en faveur d'une structure de type catéchol pour le métabolite (figure III.15). La plupart des fragments a une masse m/z égale à ceux de **13** - 12, sauf ceux de la partie gauche du métabolite, ne contenant pas le motif terminal oxydé (m/z = 268 et 250). On détecte également un pic de masse 474 (M+16) de très faible intensité. Ce produit pourrait être le dérivé formiate, précurseur du catéchol. Mais du fait de la faible quantité de ce composé, aucune analyse par fragmentation n'a pu être réalisée pour établir la structure de ce second métabolite.

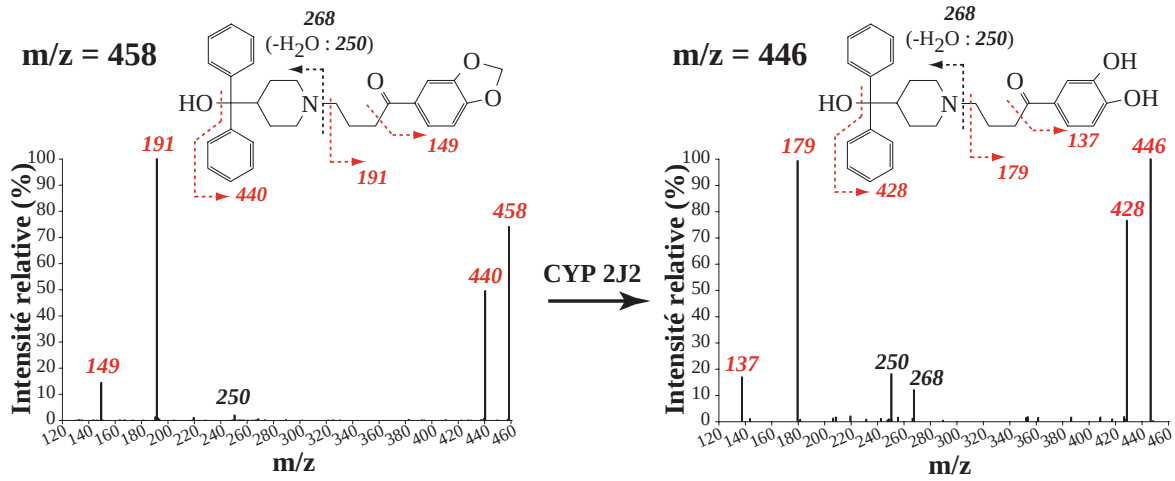


Figure III.15 – **Spectres de masse SM^2 de 13 et de son métabolite formé après oxydation par le CYP 2J2.** Les spectres de masse ont été obtenus après analyse par CLHP/SM^2 d'une incubation de **13** (50 μM) avec 10 nM de CYP 2J2 en présence d'un système générateur de NADPH (20 min). Les attributions des fragments sont indiqués sur les structures chimiques. Le fragment (-H_2O : 250) indique la perte d'une molécule d'eau du fragment de masse 268.

Une comparaison des spectres UV de **13** et de son métabolite montre des caractéristiques très analogues avec un léger déplacement vers le bleu du pic à 305-310 nm lorsqu'on passe de **13** à son métabolite. Les spectres UV de composés analogues, la 3',4'-(methylenedioxy)propiophénone et le catéchol correspondant sont très proches de ceux de **13** et de son métabolite. On note ici aussi un faible déplacement vers le bleu du pic à 305-310 nm en passant du composé de type benzodioxole au catéchol correspondant (figure III.16).

Les caractéristiques du métabolite de **13** en spectrométrie de masse et en UV sont donc tout à fait en accord avec la structure de type catéchol attendu.

(b) Etudes complémentaires et calcul du coefficient de partage.

*(b)-i Corrélation entre l'oxydation de **13** par le CYP 2J2 et l'inactivation de l'enzyme. Calcul du coefficient de partage r.*

La figure III.17-A montre que l'inactivation par **13** du CYP 2J2 (mesure de l'activité enzymatique résiduelle) varie de façon parallèle avec la formation du métabolite (catéchol), comme cela est attendu pour des substrats suicides *(Walsh, 1982; Lopez-Garcia et al., 1994; Silverman, 1995)*. Ceci confirme que l'oxydation de **13** par le CYP 2J2 est nécessaire pour qu'il y ait inactivation de cette enzyme.

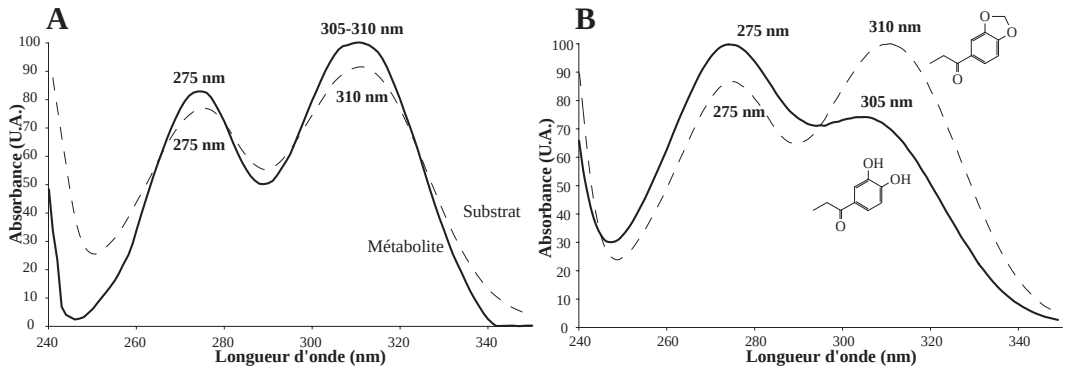


Figure III.16 – **Comparaison des spectres UV de 13 et de son métabolite obtenus après incubation du composé 13 avec le CYP 2J2 (A) et pour deux composés de structures proches : les 3',4'-(methylenedioxy)propiophénone et 3',4'-dihydroxypropiophénone (B)**. Les spectres de **13** et de son métabolite ont été obtenus lors d'une incubation avec des microsomes contenant le CYP 2J2, **13** et du NADPH.

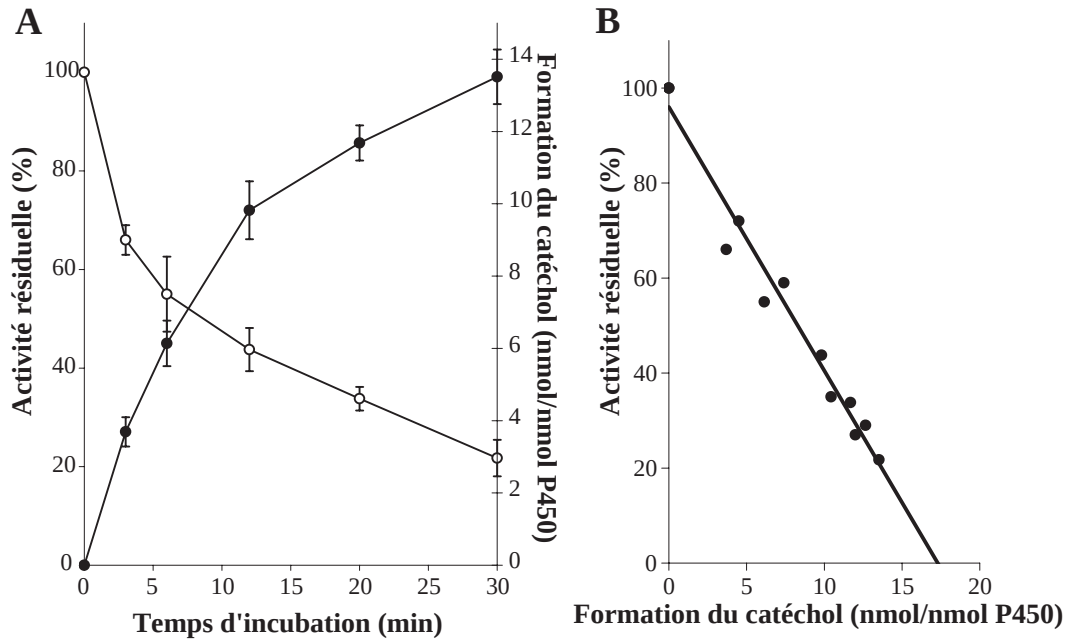


Figure III.17 – **Corrélation entre inactivation du CYP 2J2 et métabolisation du composé 13 en catéchol (A) et calcul du cofficient de partage (B)**. (A) : Les microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 ont été incubés avec 2 μM de **13** et du système générateur de NADPH. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ l'erreur standard de 3 mesures distinctes. La courbe (B) est obtenue à partir de l'activité résiduelle du CYP 2J2 et de la quantité de métabolite formée, dans le cas d'incubation du CYP 2J2 en présence de **13** (2-20 μM) et de différents temps d'incubation (0 à 30 minutes).

L'efficacité des inhibiteurs de type « substrat-suicide » est quantifiée d'une part par le rapport k_{inact}/K_I mentionné plus haut, et, d'autre part, par son cœfficient de partition, *r*, qui est le nombre de cycles catalytiques « productifs » (conduisant à un (ou des) métabolite(s) stable(s)) effectués par l'enzyme en présence de l'inhibiteur avant d'être complètement inactivée. La courbe permettant le calcul de *r* est indiquée en figure III.17-B.

Elle correspond à la variation de l'activité résiduelle de l'enzyme après incubation avec **13** et du NADPH, en fonction de la quantité de métabolite stable (ici le catéchol) formé, exprimé en moles par moles d'enzyme. La valeur de *r*-1 est l'abscisse du point d'intersection de la droite obtenue avec l'axe des abscisses *(Waley, 1980).* Dans le cas de **13**, $r = 17{,}6 \pm 2{,}8$, soit 18 cycles.

*(b)-ii Effet d'un inhibiteur compétitif sur l'inactivation du CYP 2J2 par **13**.*

La figure III.18-A montre que la présence du composé **4**, inhibiteur compétitif du CYP 2J2 (voir partie III-2.5), lors d'incubations du CYP 2J2 avec **13** et du NADPH, retarde fortement l'inactivation de cette enzyme.

*(b)-iii Effet d'un nucléophile sur l'inactivation du CYP 2J2 par **13**.*

La figure III.18-B montre que l'addition de glutathion réduit (5 mM) à des incubations du CYP 2J2 en présence de **13** et de NADPH n'a pas d'effet significatif sur l'inactivation de cette enzyme. L'espèce réactive formée par oxydation de **13** dans le site actif du CYP 2J2 se fixe de façon quasi-irréversible avec un élément du site actif (ici, il s'agit du fer), en conduisant à une inactivation irréversible de l'enzyme, avant de pouvoir sortir du site actif et être piégé par un nucléophile comme le glutathion.

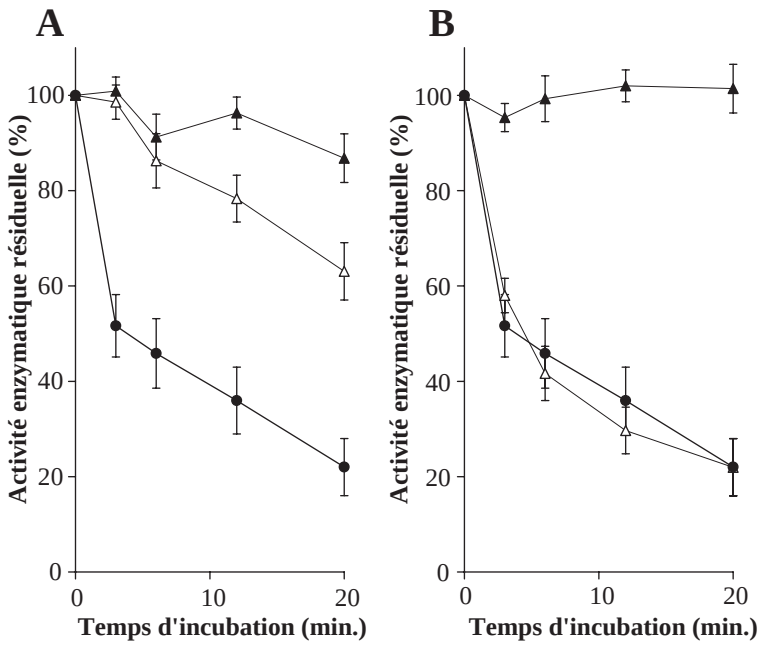


Figure III.18 – **Influence de l'addition du composé 4 (A) ou du glutathion réduit (B) sur l'inactivation du CYP 2J2 par le composé 13**. Les courbes sont obtenues à partir de co-incubations du CYP 2J2 avec le composé **13** (5μM), en présence (Δ) ou en absence (●) de **4** (50 μM) ou du glutathion réduit (5 mM). Des incubations témoins sans substrat suicide, mais en présence de l'inhibiteur compétitif ou du GSH ont aussi été réalisées (▲). Les points représentés sont la valeur moyenne ± l'erreur standard de trois expériences distinctes.

III-2.8 Conclusion.

En partant des structures de l'ébastine et de la terfénadone, dont l'étude en tant que substrats du CYP 2J2 a été présentée dans le chapitre précédent, 25 dérivés ont été synthétisés et l'ensemble des 27 composés a été testé comme inhibiteurs du CYP 2J2. Beaucoup de ces composés présentent une bonne affinité pour le CYP 2J2 avec des CI_{50} de l'ordre du μM. Une étude de corrélation entre la CI_{50} de ces composés et leur structure moléculaire a montré l'importance des deux substituants en *para* du noyau phényl terminal. La présence d'un groupe **-R** hydrophobe de taille moyenne (3 carbones) au niveau terminal de la molécule et d'un groupe -CO- en *para* est un élément important pour une affinité maximum. De fait, les inhibiteurs les plus affins mis en évidence sont **4** et **5**. Une étude plus détaillée des composés **4**, **5**, **13** et **14** a montré que **4** était un inhibiteur compétitif, substrat alternatif du CYP 2J2 avec une K_i de 160 nM. Le composé **14**, très affin pour le CYP 2J2 (IC_{50} = 400 nM), s'est révélé être un inhibiteur faisant intervenir un mécanisme d'inhibition de type « mixte », du fait de la complexation du fer de l'hème par le groupe imidazole de **14**. Les composés **5** et **13** sont des inhibiteurs de type « substrat-suicide », caractérisés par des valeurs de k_{inact}/K_I de l'ordre de 3000 $L.mol^1.s^{-1}$. Le composé **13** conduit à une inactivation du CYP 2J2 par formation d'un complexe carbénique du fer de ce cytochrome P450, qui intervient lors d'un cycle catalytique sur 18 cycles productifs.

L'efficacité d'inhibiteurs comme **4**, **5**, **13** vis-à-vis du CYP 2J2 s'accompagne d'une assez bonne sélectivité par rapport à leur action sur les principaux P450s présents en plus du CYP 2J2 au niveau vasculaire, les CYP 2C8, 2C9, 2B6 et 3A4 (cf partie I-3.1).

On peut donc maintenant proposer un ensemble d'inhibiteurs très sélectifs vis-à-vis de chacun des P450s majeurs du tissu vasculaire. Il s'agit de

- la ticlopidine comme inhibiteur du CYP 2B6 *(Richter et al., 2004)*,
- le montelukast comme inhibiteur du CYP 2C8 *(Walsky et al., 2005)*,
- le sulfaphénazole comme inhibiteur du CYP 2C9 *(Baldwin et al., 1995)*,
- le ketoconazole comme inhibiteur du CYP 3A4 *(Baldwin et al., 1995)*,
- le composé **4** comme inhibiteur du CYP 2J2.

Le tableau III.5 montre que chacun de ces inhibiteurs a une forte affinité pour le P450 qu'il inhibe (CI_{50} compris entre 20 et 600 nM) et une grande sélectivité vis-à-vis de ce P450 (rapport des CI_{50} du P450 visé par rapport aux autres au moins égal à 20).

Inhibiteur	CI_{50} (μM)				
	CYP 2B6	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 3A4	CYP 2J2
Ticlopidine	**0,32**[a]	100[a]	> 200[b]	> 50[b]	> 50
Montelukast	11[c]	**0,02**[c]	1,2[c]	1,2-7,9[c]	> 100
Sulfaphénazole	> 100[d]	120[d]	**0,6**[d]	> 200[d]	> 150
Kétoconazole	6,3[d]	5,5[d]	16[d]	**0,02**[d]	3
4	28	> 100	26	7,9	**0,4**

Tableau III.5 – **Inhibiteurs sélectifs des principaux CYP vasculaires**. Les valeurs données pour le CYP 2J2 ont été déterminées lors de ce travail. Les autres valeurs proviennent des publications suivantes : (a) *Richter et al., 2004* ; (b) *Ha-Duong et al., 2001* ; (c) *Walsky et al., 2005* ; (d) *Baldwin et al., 1995*

A la suite de l'étude préliminaire des dérivés de la terfénadone comme inhibiteurs du CYP 2J2 (Article 2, *Lafite et al., 2006*), plusieurs applications de ces composés dans des études pharmacologiques nous ont été proposées :

- Le CYP 2J2 semble être impliqué dans des phénomènes de protection des tissus vasculaires à la suite d'un stress oxydant, consécutifs, par exemple, à une ischémie-reperfusion *(Yang et al., 2001).* Pour étudier ce phénomène, des souris transgéniques surexprimant le CYP 2J2 ont été élaborées par le Dr. Seubert à l'université d'Alberta (Canada). En étudiant *ex vivo* le coeur de ces animaux soumis à une ischémie-reperfusion, la récupération des fonctions cardiaques est beaucoup plus importante par comparaison à des animaux ne surexprimant pas le CYP 2J2 *(Seubert et al., 2004).* Il a été montré que ces phénomènes impliquaient la formation d'époxydes d'acide arachidonique. Cependant, aucun inhibiteur sélectif du CYP 2J2 n'étant disponible, les études d'inhibition pour montrer l'importance de ce CYP ont été réalisée avec un inhibiteur de P450 époxygénase non sélectif (MS-PPOH). L'utilisation des composés présentés dans ce travail pourrait permettre de montrer clairement le rôle du CYP 2J2 dans les phénomènes de protection du tissu cardiaque. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Seubert, l'influence des inhibiteurs de CYP 2J2 sur ces modèles de coeurs perfusés est en cours d'étude.
- L'équipe du Dr. Bishop-Bailey (W. Harvey Research Institute, University of London) a obtenu des résultats montrant l'activation du *Peroxisome Proliferation-Activated Receptor* α (PPARα) par les époxydes d'acide arachidonique dont la formation pourrait être catalysée par le CYP 2J2. Cette voie de signalisation pourrait être relié à leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-prolifératives (activité NFκB et expression de la cyclooxygénase 2) *(Moraes et al., 2006).* En inhibant les cytochromes P450 présents dans des lignées cellulaires de monocytes par un inhibiteur non-sélectif de P450s (proadifen SKF525A), on observe une réponse pro-inflammatoire (induction de COX-2), dont l'effet peut être inversé par addition d'un agoniste du PPARα ou d'EETs. Ces lignées cellulaires expriment le CYP 2J2. Pour déterminer son implication éventuelle dans l'activation du PPARα, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs du CYP 2J2 a été envisagée. L'effet des inhibiteurs **4**, **5** et **13** sur ces lignées cellulaires sont en cours de réalisation en collaboration avec l'équipe du Dr. Bishop-Bailey.
- Le rôle du CYP 2J2 dans les phénomènes liés à l'angiogénèse et au cancer se révèle très important *(Jiang et al., 2005; Wang et al., 2005).* La transfection d'un adénovirus contenant l'ADNc antisens codant pour le CYP 2J2 dans certaines lignées tumorales (ou dans une tumeur xenogreffée sur une souris) se traduit par la diminution de certains phénomènes caractéristiques des tumeurs (croissance et migration cellulaire, résistance à l'apoptose, taille de la tumeur, ...). L'utilisation d'inhibiteurs non-spécifiques de l'époxydation de l'acide arachidonique a révélé une diminution identique. Pour pouvoir compléter cette étude et peut-être ouvrir la voie à une série de nouveaux composés anti-tumoraux, l'utilisation des inhibiteurs dérivés de l'ébastine ou de la terfénadone est envisagée, en collaboration avec les équipes des Drs. Zeldin (NCBI, NIH, USA) et Wang (Université de Wuhan, Chine).

III-2.9 Article 3.

Article présenté :

P. Lafite, S. Dijols, D.C. Zeldin, P.M. Dansette and D. Mansuy, *"Selective, competitive and mechanism-based inhibitors of human cytochrome P450 2J2"*, Archives of Biochemistry & Biophysics, **464** (2007) 155-168.

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics xxx (2007) xxx–xxx

ABB

www.elsevier.com/locate/yabbi

Enzymology and Toxicity

Selective, competitive and mechanism-based inhibitors of human cytochrome P450 2J2

Pierre Lafite [a], Sylvie Dijols [a], Darryl C. Zeldin [b], Patrick M. Dansette [a], Daniel Mansuy [a,*]

[a] *Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 Université Paris Descartes, CNRS, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France*
[b] *NIEHS, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC 27709, USA*

Received 30 January 2007, and in revised form 16 March 2007

Abstract

Twenty five derivatives of the drugs terfenadine and ebastine have been designed, synthesized and evaluated as inhibitors of recombinant human CYP2J2. Compound **14**, which has an imidazole substituent, is a good non-competitive inhibitor of CYP2J2 ($IC_{50} = 400$ nM). It is not selective towards CYP2J2 as it also efficiently inhibits the other main vascular CYPs, such as CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4; however, it could be an interesting tool to inhibit all these vascular CYPs. Compounds **4**, **5** and **13**, which have a propyl, allyl and benzo-1,3-dioxole terminal group, respectively, are selective CYP2J2 inhibitors. Compound **4** is a high-affinity, competitive inhibitor and alternative substrate of CYP2J2 ($K_i = 160 \pm 50$ nM). Compounds **5** and **13** are efficient mechanism-based inhibitors of CYP2J2 (k_{inact}/K_i values ~3000 L mol^{-1} s^{-1}). Inactivation of CYP2J2 by **13** is due to the formation of a stable iron–carbene bond which occurs upon CYP2J2-catalyzed oxidation of **13** with a partition ratio of 18 ± 3. These new selective inhibitors should be interesting tools to study the biological roles of CYP2J2.
Published by Elsevier Inc.

Keywords: Ebastine; Terfenadine; Drug metabolism; Arachidonic acid epoxidation; Vascular P450s; Benzo-1,3-dioxole; Hydroxylation; Monooxygenases; Hemeproteins

Cytochromes P450 (CYPs)[1] constitute a superfamily of hemoproteins that play key roles in the metabolism of a large variety of xenobiotics and endogenous compounds [1]. In the human genome, 57 genes have been found to code for CYPs [2]. The main CYPs implicated in drug metabolism, such as CYP3A4, CYP2C9 or CYP2D6, and those responsible for the biosynthesis of steroid hormones have been extensively studied, and several X-ray structures of human CYPs have been recently published [3–10]. Much less is known about more recently discovered human CYPs such as CYP2J2 [2,11,12]. This cytochrome seems to be primarily expressed in heart [11]; it has also been found in kidney, liver, lung and the gastrointestinal tract [11–14]. CYP2J2 has been found to catalyze the epoxidation of arachidonic acid to four cis-epoxyeicosatrienoic acids (EETs), with regio- and stereo-selectivities that match those of the EETs isolated from heart tissue [11]. Some EETs-derived metabolites play important roles in the regulation of vascular tone [15,16]. Moreover, it has been shown that CYP2J2-derived metabolites are involved in the recovery of heart function following ischemia in mice [17], that the risk of coronary artery disease is associated with polymorphisms in CYP2J2 gene in humans [18], and that CYP2J2-derived products are involved in cardiac electrophysiology [19,20]. EETs and EETs-derived metabolites are also involved in a host of processes related

* Corresponding author. Fax: +33 (0) 1 42 86 83 87.
E-mail address: daniel.mansuy@univ-paris5.fr (D. Mansuy).

[1] *Abbreviations used:* CYP or P450, cytochrome P450; DMF, *N*, *N*-dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acid; ESI, electrospray ionization; GSH, glutathione, reduced form; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; MS, mass spectrometry; MS^2, tandem mass spectrometry; THF, tetrahydrofuran; TLC, thin layer chromatography; Tris, 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol; UV, ultraviolet.

0003-9861/$ - see front matter Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

to cancer cell behavior, angiogenesis and tumor pathogenesis [21,22]. Very recent data suggest that CYP2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and may represent a novel biomarker and potential target for therapy of human cancers [23]. Besides these possible roles in the metabolism of endogenous compounds, CYP2J2 could be implied in the metabolism of some drugs, especially at the intestinal level. Thus, CYP2J2 has been shown to contribute to the metabolism of three drugs, ebastine [24,25], astemizole [26] and terfenadine [27].

Little data are presently available on the active site topology and substrate specificity of CYP2J2 [2]. Quite recently, preliminary results have shown that it was possible to obtain high-affinity inhibitors for CYP2J2, by chemical modification of terfenadone [28], that is an isomer of ebastine and a derivative of the drug terfenadine (see Fig. 1 and Table 1). This article describes the design, synthesis and evaluation as CYP2J2 inhibitors of 25 derivatives of terfenadone and ebastine. It also reports the compared effects of these compounds towards the other main CYPs that are present in the vascular system, such as CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4. Finally, it describes a detailed study of the mechanism of inhibition of CYP2J2 by some of these compounds and reveals a high-affinity and selective, competitive inhibitor of CYP2J2, and two selective, mechanism-based inhibitors of CYP2J2.

Materials and methods

Commercial chemicals

All chemicals used in this study were of the highest purity available. Organic and HPLC solvents were purchased from SDS (Peypin, France); ebastine was provided by Almirall (Paris, France). $NADP^+$, glucose 6-phosphate and glucose 6-phosphate dehydrogenase were purchased from Boehringer-Mannheim (Mannheim, Germany). Paclitaxel, amodiaquine, reduced glutathione (GSH), 7-benzyloxyresorufin, resorufin, diclofenac, testosterone, ticlopidine, sulfaphenazole and ketoconazole were obtained from Sigma chemicals (Lyon, France). 3′,4′-Dihydroxypropiophenone and 3,4-(methylenedioxy)propiophenone were purchased from Alfa Aesar (Strasbourg, France). Montelukast was obtained from Sequoia Research (Oxford, UK).

Physical measurements

UV–vis spectra were recorded at room temperature using an Uvikon 941 spectrophotometer. ^{1}H NMR spectra were recorded at 27 °C on a Bruker ARX-250 instrument; chemical shifts are reported downfield from $(CH_3)_4Si$ and coupling constants are in Hz. The abbreviations s, d, t, q, m, bs, dd, dt, td and tt are used for singlet, doublet, triplet, quadruplet, massif, broad singlet, doublet of doublets, doublet of triplets, triplet of doublets and triplet of triplets, respectively. Mass spectra (MS) were performed using a LCQ Advantage-ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, Les Ulis, France). MS ionization was carried out using an electrospray ionization (ESI) source in positive mode, with a capillary temperature of 275 °C, a capillary voltage of 21 V and a spray voltage of 5 kV. This ionization gave the molecular ion ($M+H^+$) indicated for each compound. The mentioned fragments were obtained from tandem mass spectrometry (MS^2) that was performed with activated broadband and a fragmentation power set to 40–50%, depending on the substrate. Compound **11** contains one bromine atom, and all peaks corresponding to the molecular ion or fragments involving a Br atom exhibited the isotope cluster expected for the presence of one Br atom (with a M:M + 2 ratio of 51:49).

Synthesis of ebastine and terfenadone derivatives

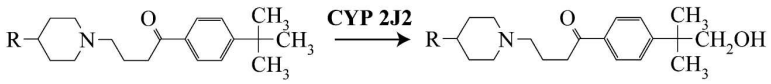
All compounds were characterized by ^{1}H NMR spectroscopy in $CDCl_3$ and ESI-ion trap MS^2 in positive mode. ^{1}H NMR spectroscopy analysis in the presence of an internal standard showed that all these compounds were more than 95% pure. Most compounds were synthesized according to the scheme indicated on Fig. 2. This was the case of compounds **1**, **3**, **4**, **6**–**9**, **11**–**13**, **15** and **19**–**21**. Compounds **5** and **14** were prepared from **11**. Compound **17** was synthesized by a very similar protocol using 4-(4-propylphenyl)butylmethane sulfonate as an intermediate. Compounds **2**, **10**, **16** and **25** were a gift from Dr. Didier Buisson (UMR 8601, Paris); their syntheses will be described elsewhere (El Ouarradi et al., in preparation). Finally, compounds **22**, **23** and **24** were obtained from dehydration of **1**, **15**, and terfenadine, respectively. Compounds **1**, **11**, **20**, **22** and **24** were reported in a patent [29]; however their ^{1}H NMR and mass spectrum characteristics were not described. The main ^{1}H NMR and MS characteristics of compounds **1**, **3**, **4**, **6**, **9**, **11**–**13**, **15**, **17**, **5**, **14**, **7**, **8**, **19**, **18** and **20**–**24** (in the order of appearance in following paragraphs (a)–(h)) as well as those of some of their precursors are given in Supplementary Materials.

(a) Synthesis of the intermediates (see Fig. 2)

4-(Diphenylmethoxy)piperidine [30] and 1,1-difluoro-2-phenylethane [31] were prepared as described previously.

Typical procedure for the synthesis of the intermediate alkylchlorides by Friedel-Crafts acylations. To a solution of aromatic starting compound C_6H_5–**R** (see Fig. 2) (15 mmol) and 4-chlorobutanoyl chloride (15 mmol) in dry CH_2Cl_2, $AlCl_3$ or $SnCl_4$ (20 mmol) was progressively added at room temperature under argon. After stirring at room temperature for 2–18 h then at 40 °C for 2–7 h, the mixture was poured into ice water and stirred overnight. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2. The combined extract was dried ($MgSO_4$) and the solvent evaporated. Compounds were purified by column chromatography (SiO_2) (cyclohexane/ethyl acetate 90/10). The obtained alkylchlorides were characterized by ^{1}H NMR spectroscopy and used as such for the following reactions.

Synthesis of 4-(4-propylphenyl)butylmethanesulfonate. 4-(4-Propylphenyl)butanoic acid was prepared as described previously [32,33]. A solution of this carboxylic acid (1.03 g, 5 mmol) in THF (10 mL) was slowly added to a suspension of $NaBH_4$ (227 mg, 6 mmol) in THF (10 mL) at room temperature (10 min). The mixture was stirred until the end of gas emission. Iodine (635 mg, 2.5 mmol) in THF (10 mL) was then added slowly (10 min) at room temperature. The medium was further stirred for 1 h. Dilute HCl (7 mL, 1 N) was added carefully and the mixture extracted



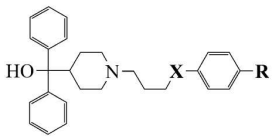
R = $OCHPh_2$ Ebastine

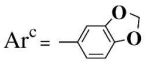
R = $C(OH)Ph_2$ Terfenadone

Fig. 1. Regioselectivity of the hydroxylation of ebastine and terfenadone by CYP2J2.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

Table 1
Comparison of the inhibitory effects of terfenadone derivatives towards CYP2J2, 2B6, 2C8, 2C9 and 3A4



Compound	–X–	–R	IC_{50} (μM)[a]				
			2J2	2B6	2C8	2C9	3A4
Terfenadine	–CHOH–	$-C(CH_3)_3$	8.1 ± 0.4	70 ± 1	>100[b]	38 ± 1	2.0 ± 1
1 (Terfenadone)	–CO–	$-C(CH_3)_3$	0.7 ± 0.1	67 ± 5	>100	19 ± 1	12 ± 1
2	–CO–	$-CH_3$	0.7 ± 0.2	29 ± 1	~100	32 ± 2	15 ± 1
3	–CO–	$-CH_2-CH_3$	0.6 ± 0.1	25 ± 2	>100	18 ± 4	6.1 ± 0.2
4	–CO–	$-CH_2-CH_2-CH_3$	0.4 ± 0.1	28 ± 1	>100	26 ± 3	7.9 ± 0.1
5	–CO–	$-CH_2-CH=CH_2$	0.4 ± 0.2	21 ± 1	>100	21 ± 1	5.5 ± 1.0
6	–CO–	$-(CH_2)_3-CH_3$	0.7 ± 0.2	13 ± 2	>100	38 ± 2	8.2 ± 0.8
7	–CO–	$-CH_2-CH_2-OH$	1.3 ± 0.8	48 ± 1	>100	28 ± 4	20 ± 1
8	–CO–	$-(CH_2)_3-OH$	1.9 ± 0.3	16 ± 2	~100	33 ± 1	6.8 ± 0.6
9	–CO–	$-(CH_2)_3-OAc$	2.5 ± 0.5	9.0 ± 0.5	>100	42 ± 3	0.9 ± 0.2
10	–CO–	$-OCH_3$	7.6 ± 0.6	19 ± 1	>100	40 ± 1	11 ± 1
11	–CO–	–Br	4.2 ± 0.6	26 ± 2	>100	34 ± 6	2.2 ± 0.6
12	–CO–	$-CH_2-CHF_2$	2.2 ± 0.9	16 ± 1	>100	19 ± 4	8.9 ± 0.2
13	–CO–	$Ar^c =$ 	6.7 ± 2.3	16 ± 1	~100	10 ± 2	2.8 ± 0.1
14	–CO–		0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.3	5.2 ± 0.3	1.6 ± 0.1	2.8 ± 0.9
15	–CO–	$-(CH_2)_2-NHAc$	23 ± 5	60 ± 3	>100	15 ± 2	2.8 ± 0.9
16	$-CH_2-$	$-C(CH_3)_3$	3.6 ± 0.7	86 ± 2	>100	28 ± 2	4.1 ± 1.0
17	$-CH_2-$	$-CH_2-CH_2-CH_3$	4.5 ± 0.9	28 ± 4	>100	34 ± 5	4.6 ± 0.7

[a] Compound concentration leading to 50% inhibition of the oxidation of typical substrates of the different CYPs (for the nature of these substrates and the conditions used, see Materials and methods; concentrations of substrates were equal to the K_m values found for their CYP-catalyzed oxidations under our experimental conditions). Values are means ± SD for three to four independent experiments.
[b] Above 50% of remaining activity at the indicated inhibitor concentration.
[c] –Ar: $-C_6H_4-$**R**.

with ether. The combined ether extracts were washed with 1 M NaOH and brine, and dried over $MgSO_4$. Evaporation of the organic layer gave 4-(4-propylphenyl)butan-1-ol which was purified by column chromatography on SiO_2 (CH_2Cl_2 then +10% ether), and was obtained as a pale yellow oil in a 61% yield. ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.19 (1H, bs), 1.65 (6H, m), 2.56 (4H, m), 3.65 (2H, m), 7.07 (4H, s). Methanesulfonyl

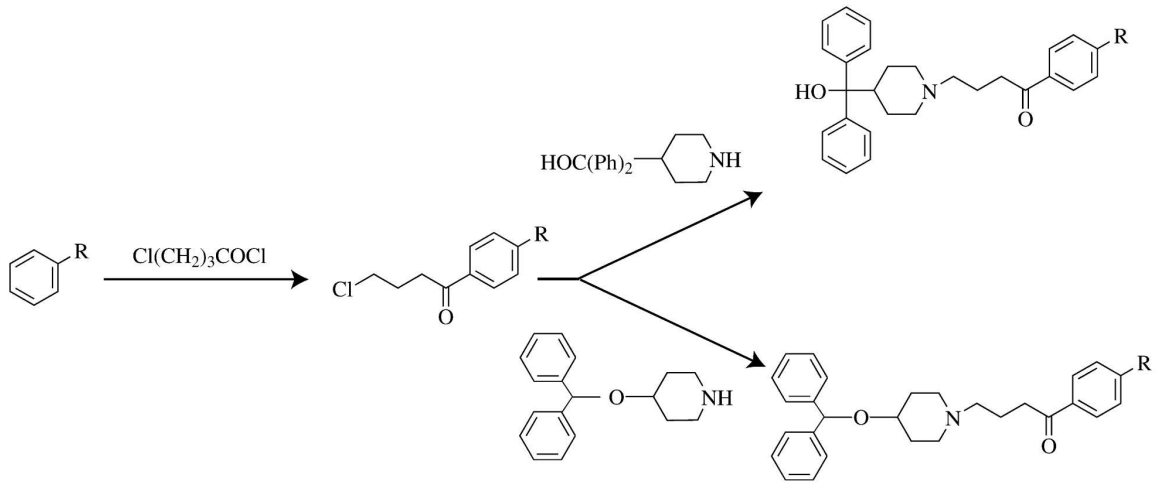


Fig. 2. General synthetic routes used for the preparation of terfenadone and ebastine derivatives. For the nature of **R**, see Tables 1 and 2. Specific protection and deprotection of reactive chemical functions were used when necessary. They were mentioned in Ref. [28].

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

chloride (326 μL, 4.22 mmol) was then added to a stirred solution of this alcohol (405 mg, 2.11 mmol) in dry CH_2Cl_2 (6.5 mL) containing pyridine (1.48 mL) at 0 °C. This solution was stirred under an argon atmosphere for 20 h at room temperature, diluted with CH_2Cl_2, washed with aqueous sulfuric acid (1%, 2 × 50 mL), saturated aqueous $NaHCO_3$ (50 mL), and brine, and reextracted with CH_2Cl_2. The combined organic phase was dried ($MgSO_4$), and the solvent was removed under vacuum to afford a colourless oil (100% yield). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 0.92 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 1.61 (2H, m), 1.65 (4H, m), 2.53 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.61 (2H, m), 2.96 (3H, s), 4.21 (2H, t, $J = 5.8$ Hz), 7.07 (4H, s).

(b) General procedure for N-alkylation of α,α-diphenyl-4-piperidinomethanol (terfenadone derivatives) or 4-(diphenylmethoxy)piperidine (ebastine derivatives) [34], used for the synthesis of ***1****,* ***3****,* ***4****,* ***6****,* ***7****,* ***9****,* ***11****–****13****,* ***15*** *and* ***17***

The piperidine derivative (1 eq.), anhydrous K_2CO_3 (2 eq.) and KI (0.2 eq.) were added to a solution of 4-chlorobutan-1-one-derived compounds (1 eq.) in dry DMF. The resulting mixture was refluxed under argon for 24 h. After cooling, the solvent was removed under vacuum to give a residue that was dissolved in CH_2Cl_2, washed with water, and dried over $MgSO_4$. After evaporation of the solvent, products were purified by column chromatography on SiO_2 (CH_2Cl_2 then 10% MeOH), and by dissolution in ether to filter the insoluble impurities.

(c) Synthesis of 1-(4-allylphenyl)-4-(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)butan-1-one, ***5***

Coupling of **11** (620 mg, 1.26 mmol) with allyltributyltin (0.5 mL) in DMF (13 mL) was performed in the presence of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (90 mg) under argon, 30 min at room temperature then 6 h at 110 °C. Purification by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2–MeOH 95:5) led to compound **5** as a white powder in 45% yield.

(d) Preparation of 1-(4-N-imidazolylphenyl)-4-(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)butan-1-one, ***14***

Coupling of **11** (0.13 mmol) with imidazole (0.16 mmol) was performed in the presence of CuI (0.013 mmol), proline (0.13 mmol) and K_2CO_3 (0.26 mmol) [35]. The reaction was performed under argon at 95 °C during 40 h. After ethyl acetate extraction and drying on anhydrous $MgSO_4$, **14** was purified on SiO_2 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10) and led to a brown oil (54% yield).

(e) Preparation of 4-(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)butan-1-one, ***7****, 4-(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-(3-hydroxypropyl)phenyl)butan-1-one,* ***8****, and 4-(4-(diphenylmethoxy)piperidin-1-yl)-1-(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)butan-1-one,* ***19****, from their acetate precursors*

The acetate precursor (1 mmol) was heated under reflux in 5 mL EtOH with 70 mg NaOH (1.75 mmol) for 2.5 h. After evaporation of EtOH, the residue was diluted with water and extracted with CH_2Cl_2. The organic phase was dried over $MgSO_4$. After evaporation of the solvent, compounds **7**, **8** and **19** were purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2–EtOH 90:10) and by dissolution in ether to filter insoluble impurities.

(f) Synthesis of 4-(4-(diphenylmethoxy)piperidin-1-yl)-1-(4-(2-tertiobutyl)phenyl)butan-1-ol, ***18****, from reduction of ebastine*

A suspension of $NaBH_4$ (64,4 mg, 1.7 mmol) in MeOH (4 mL) was slowly added to a solution of ebastine (200 mg, 0.4 mmol) in distilled THF (8 mL) at 0 °C. After 7 h of stirring, HCl (1 mL, 1 M) was added to hydrolyze residual $NaBH_4$ and the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined extract was washed with brine and dried over Na_2SO_4. After filtration, **18** was purified by column chromatography on SiO_2 (CH_2Cl_2 then 5% MeOH) and was obtained as white powder in 81% yield.

(g) Synthesis of 4-[4-(diphenylmethoxy)piperidin-1-yl]-1-(4-vinylphenyl)butan-1-one, ***20****, and 4-[4-(diphenylmethoxy)piperidin-1-yl]-1-[4-(2-thiomethoxy)ethylphenyl]butan-1-one,* ***21****, from* ***19***

Compound **19** (100 mg, 0.22 mmol) in the presence of ethylamine (30 μL, 0.21 mmol) was cooled to 0 °C in CH_2Cl_2 (2 mL). Methanesulfonyl chloride (20 μL, 0.26 mmol) was added and the reaction mixture was kept at 0 °C for 2 h. After evaporation, 2-(4-{4-[4-(diphenylmethoxy)piperidin-1-yl]-1-oxobutyl}phenyl)ethyl methanesulfonate was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2 then 7% EtOH). Then, dissolution in ether to filter insoluble impurities gave the desired product (110 mg, 0.21 mmol, 95% yield). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 1.66 (2H, m), 1.91 (4H, m), 2.12 (4H, m), 2.37 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.86 (3H, s), 2.95 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 3.09 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.40 (1H, m), 4.42 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 5.48 (1H, s), 7.17–7.30 (12H, m), 7.91 (2H, d, $J = 8.3$ Hz). MS^2 (ESI^+): m/z 536 ($M+H^+$), 269, 227, 167. Reaction of this methanesulfonate derivative (1 eq.) with 2 eq. of EtONa in 2 mL MeOH at 50 °C for 20 h gave **20**, whereas a very similar reaction with 1 eq. of CH_3SNa in 1.5 mL dry DMF led to **21**. The reaction mixtures were extracted with CH_2Cl_2 and the products were purified by chromatography on SiO_2 (CH_2Cl_2 then 7% MeOH).

(h) Synthesis of 4-[4-(diphenylmethylene)piperidin-1-yl]-1-[4-tertiobutylphenyl]butan-1-one ***22****, 1-[4-(2-aminoethyl)phenyl]-4-[4-(diphenymethylene)piperidin-1-yl]butan-1-one* ***23****, and 4-(diphenylmethylene)-1-[4-(4-tertiobutylphenyl)but-3-enyl]piperidine hydrochloride* ***24****, from dehydration of* ***1****,* ***15*** *and terfenadine, respectively*

Derivative **1** (100 mg, 0.2 mmol) in 10 mL HCl (3 M, 30 mmol) was heated to reflux for 6 h. After neutralization, the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2 and compound **22** was purified by TLC on SiO_2 (ethyl acetate, then 20% EtOH).

Origins of recombinant cytochromes P450

CYP2J2 was co-expressed with human P450 reductase in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* insect cells (*Sf9*) and microsomes of these cells were prepared as described previously [11]. CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4 were expressed in a previously described yeast strain W(R)fur1 [36] system, in which yeast cytochrome P450 reductase was overexpressed. Transformation by a pYeDP60 vector containing one of the human liver CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4 cDNAs was then performed according to a general method of construction of yeast strain W(R)fur 1 expressing various human liver P450s [37–39]. Yeast culture and microsomes preparation were performed by using previously described techniques [40]. Microsomes were homogenized in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 1 mM EDTA and 20% glycerol (v/v), aliquoted, frozen under liquid N_2, and stored at −80 °C until use. P450 contents of yeast microsomes or insect cell microsomes were 90, 30, 30, 300 and 100 pmol P450/mg protein for CYP2B6, 2C8, 2C9, 3A4 and 2J2, respectively. Those contents were determined spectrally using the method of Omura and Sato [41]. Some comparative experiments were done using microsomes from baculovirus-infected insect cells expressing CYP 2B6, 2C8, 2C9 and 3A4 (Supersomes from BD Discovery Labware, Woburn, MA, USA).

Enzyme activity assays

(a) Hydroxylation of ebastine. The assay for hydroxylation of ebastine by CYP2J2 [24] was performed at 37 °C in the presence of a NADPH-generating system (1 mM $NADP^+$, 10 mM glucose 6-phosphate, and 2 U/mL glucose 6-phosphate dehydrogenase) using a previously described method [28]. The concentrations of ebastine and CYP2J2 were 0.5 μM and 1 nM, respectively. The reaction was done at 37 °C for 2–5 min.

(b) O-Debenzylation of 7-benzyloxyresorufin. The protocol used for measuring the oxidation of 7-benzyloxyresorufin by CYP2B6 was based on a modification of the spectrofluorometric method described by Burke

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

and Mayer [42]. A mixture containing 0.5 μM 7-benzyloxyresorufin and yeast microsomes expressing CYP2B6 (10 nM) in 100 mM Hepes buffer pH 7.8 containing 5 mM $MgCl_2$ for a total volume of 985 μL was preincubated at 37 °C for 3 min. Reaction was started with the addition of NADPH (100 μM) and formation of resorufin was monitored by fluorimetry, with an excitation wavelength of 535 nm and an emission wavelength at 580 nm. After 2–3 min, during this fluorimetric monitoring, inhibitor was added and the change of slope of the activity vs time curve was observed. Then, quantitation of metabolite was done by addition of authentic resorufin (20 nM final concentration).

(c) 6a-Hydroxylation of paclitaxel. Hydroxylation of paclitaxel by CYP2C8 [43] was assayed as described previously [44] (10 μM substrate, 10 nM CYP2C8, 5 min at 28 °C).

(d) N-Deethylation of amodiaquine. N-Deethylation of amodiaquine by microsomes of yeast cells expressing CYP2C8 was performed according to a previously reported procedure [45] (1 μM substrate, 10 nM CYP2C8, 10 min at 28 °C).

(e) 4′-Hydroxylation of diclofenac. Diclofenac hydroxylation by CYP2C9 was carried out using a previously reported protocol [46] (15 μM substrate, 20 nM CYP2C9, 10 min at 28 °C).

(f) 6β-Hydroxylation of testosterone. The assay for testosterone 6β-hydroxylation was performed as described previously [47] (20 μM substrate, 10 nM CYP3A4, 20 nM cytochrome b_5, 10 min at 28 °C).

*Study of CYP2J2 inactivation by derivatives **5** and **13***

(a) General incubation procedure. All incubations were performed at 37 °C in triplicate, using glass tubes in a shaking bath. The incubation mixture contained insect cell microsomes expressing CYP2J2, an inhibitor, and a NADPH-generating system in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA.

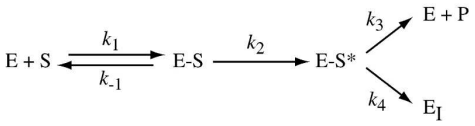
*(b) Time course analysis of the oxidation of compound **13** by CYP2J2-expressed insect cell microsomes.* Compound **13** was incubated at 37 °C in the presence of insect cell microsomes expressing CYP2J2 (10 nM) and reaction was started by the addition ($t_0 = 0$ min) of the NADPH-generating system, which had been preincubated at 37 °C for 3 min (total final volume of 2 mL). At t_0 and regularly thereafter, aliquots (200 μL) were taken and were mixed with 100 μL of a cold CH_3CN/CH_3COOH (10:1) mixture to quickly stop the enzymatic reaction. Proteins were precipitated by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min, and the supernatant was stored at −40 °C for HPLC/MS/UV analysis. The apparatus for HPLC/MS-UV analysis was composed of a Surveyor HPLC system and LCQ Advantage-ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, Les Ulis, France). Elution was carried out on a Betabasic-18 column (100 × 2.1 mm, 3.5 μm) (Thermo Finnigan, Les Ulis, France). The mobile phase consisted of water/acetonitrile/formic acid (80/20/1) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99/1) (solvent B), at a flow rate of 200 μL/min. Elution was performed with a linear gradient from 0 to 45% B in 5 min, followed by an increase of B to 55% in 17 min, and by 4 min at 100% B. Quantification of the metabolite formed was carried by monitoring of the effluent at 310 and 275 nm.

(c) Incubation for inactivation kinetics. The experimental protocols for determining the kinetic parameters of CYP2J2 inactivation were based on the previously described procedures for other mechanism-based inhibitors [48–50]. Insect cells microsomes (30 nM P450) were incubated under the conditions described above, in the presence of inhibitor concentrations ranging from 1 to 20 μM. At t_0 and regularly thereafter, aliquots (25 μL) were removed from the incubation medium and immediately processed to determine residual ebastine hydroxylase activity.

(d) Determination of the residual monooxygenase activity. Routine experimental procedures to determine the enzymatic activity remaining after exposure to a suicide substrate [50] need the use of an alternative substrate to assay the remaining activity in a second incubation period. To dramatically decrease the influence of the already present inactivator substrate on the accurate determination of enzymatic activity, samples were diluted 20-fold in the standard medium assay. Briefly, 25 μL aliquots taken from CYP2J2 inactivation experiments were rapidly diluted in a total volume of 500 μL containing 20 μM ebastine and a NADPH-generating system. At $t_0 = 0$ min, 150 μL aliquots were removed and quenched by adding 75 μL of CH_3CN/CH_3COOH (10:1) cold mixture and vortexing. The remaining medium was incubated at 37 °C and two other 150 μL aliquots were removed at $t = 2$ and 4 min to be treated as the first one. In all experiments, the initial rate for ebastine hydroxylation activity was taken as a measure of the maximal activity (100% activity).

*(e) Effect of a competitive inhibitor and glutathione on CYP2J2 inactivation by compound **13**.* Incubations for inactivation measurement were carried out as described above in order to determine the time course of enzyme inactivation in the presence of compound **4** or GSH. Compound **4** (50 μM) or GSH (5 mM) was added at t_0 of the inactivation incubation assay containing 5 μM compound **13**. At the indicated times, the residual activity was determined as described above. Hundred percent activity was defined for remaining activity measured at t_0 for each incubation conditions. Control assays under non-catalysis conditions (in the absence of the NADPH-generating system) were carried out in parallel with the experimental incubations.

(f) Inactivation kinetics analysis. Kinetic parameters of the inactivation process were calculated according to previously described models [48,50]. This process can be represented in the simplest way by the following equations:



where ES is the initial enzyme–substrate complex converted to an activated species, ES^*, which can either react with the enzyme that leads to inactivated enzyme (E_I), or break down to yield free enzyme and product (P). k_{-1}/k_1 represents the dissociation constant K_S, and k_3/k_4 is the partition ratio between the number of productive turnovers and the number of turnovers leading to enzyme inactivation. The pseudo-first order rate constant for the inactivation process (k_{inact}) is $k_2k_4/(k_2 + k_3 + k_4)$. The K_i constant, a term used for mechanism-based enzyme inactivators, is $[(k_{-1} + k_2)/k_1][(k_2 + k_4)/(k_2 + k_3 + k_4)]$. Calculation of those constants were performed using the analytical treatment described by Kitz and Wilson [51].

*(g) UV–vis spectra observed during interaction of compound **13** with CYP2J2.* A suspension of microsomes from insect cells expressing CYP2J2 (100 nM P450) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA was equally divided between two 200 μL black quartz cuvettes (1 cm path length). Three microliters of a DMSO solution of compound **13** was added to the sample cuvette, the same volume of solvent being added to the reference cuvette, and a baseline was recorded between 350 and 500 nm. Two microliters of NADPH (final concentration of 100 μM) was then added ($t_0 = 0$ min) to the sample cuvette and difference spectra were recorded at t_0 and every min thereafter for 20 min between 350 and 500 nm.

Results and discussion

Synthesis of three series of derivatives of terfenadone, dehydro-terfenadone and ebastine

The choice of terfenadone, **1**, and ebastine as starting points for the design of high-affinity inhibitors of CYP2J2 was based on: (i) the high regioselectivity of the CYP2J2-catalyzed hydroxylations of **1** and ebastine, in favor of the least reactive part of these substrates (Fig. 1), which implies their strict positioning in the CYP2J2 active site to keep their *t*-butyl group in close proximity of the heme iron for transfer of an oxygen atom from O_2, and (ii) the high affinity of **1** and ebastine for CYP2J2, as indicated

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

by the IC_{50} value of **1** for CYP2J2 inhibition (0.7 μM) [28] and the K_m of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine (1 μM) [24].

Sixteen derivatives of terfenadone were synthesized and compared to terfenadone and the drug terfenadine, as CYP2J2 inhibitors (Table 1). Most of them derive from terfenadone by replacement of its *t*-butyl group with various **R** groups of different size and polarity. This includes **R** groups bearing chemical functions well known to lead to suicide inactivation of cytochrome P450 after *in situ* oxidation [52–56]. This is the case of the terminal double bond of compound **5**, of the CHF_2 function of compound **12**, and of the benzo-1,3-dioxole function of compound **13** (Table 1). The structure of compounds **5**, **12** and **13** was chosen so that the CYP2J2-catalyzed hydroxylation occurs at the site leading to inactivating metabolites, assuming that hydroxylation of these compounds should occur on the homobenzylic position, as the hydroxylation of terfenadone [28], terfenadine [27] and ebastine [24]. The general synthetic route used for the preparation of the terfenadone and ebastine derivatives has been described previously [28]; it is recalled in Fig. 2. Compounds **16** and **17**, in which the keto group of **1** and **4** was replaced with a CH_2 group, were also synthesized to evaluate the importance of this keto group in CYP2J2 inhibition. Compounds **5** and **14** were obtained from reaction of **11** with allytributyltin and imidazole, respectively. In the ebastine series, compounds **20** and **21** were prepared from reactions of the methanesulfonate of **19** with sodium ethanolate and sodium thiomethoxide, respectively (see Materials and methods). Finally, compounds **22**, **23** and **24**, that are derived from dehydro-terfenadone, were obtained by treatment of compounds **1**, **15** and terfenadine by HCl in boiling water. All compounds were characterized by ^1H NMR spectroscopy and mass spectrometry. ^1H NMR spectroscopy in the presence of an internal standard showed that all these compounds were more than 95% pure.

Comparison of the inhibitory effects of the terfenadone and ebastine derivatives towards CYP2J2

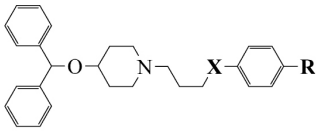
The fourth columns of Tables 1–3 compare the IC_{50} values found for the inhibition of ebastine hydroxylation catalyzed by recombinant CYP2J2 expressed in baculovirus-infected *Sf9* insect cells. These IC_{50} values vary from 0.4 to 23 μM.

The presence of a terminal hydrophobic group (Ph_2CHO–, $Ph_2C(OH)$– or Ph_2C=) in ω position relative to the hydroxylation site is important for the affinity of the inhibitors. This is indicated by the IC_{50} value of **25**, which is 19-fold higher than that of terfenadone **1** (13 and 0.7 μM, respectively). The hydrophobicity of this terminal group appears to be the most important factor for the affinity, as the removal of the tertiary alcohol function of **1** or of the ether function of ebastine resulting in **22** does not lead to any significant loss of affinity (IC_{50} of 0.7 and 1 μM for **1** and ebastine to be compared to an IC_{50} of 0.9 μM for **22**).

The presence of the keto function *para* to the **R** group is also important for the affinity of the compounds. This is shown by the marked increase of the IC_{50} value observed after reduction of the CO function of **1** into CHOH or CH_2 functions (0.7, 8 and 3.6 μM for **1**, terfenadine and **16**, respectively). Similar increases of IC_{50} by a factor of about 10 were also found when passing from **4** to **17** and from **22** to **24** (Tables 1 and 3).

The nature of the **R** substituent has a great influence on the affinity of the inhibitors towards CYP2J2. The best results were obtained with hydrophobic C_3 alkyl chains, as the lowest IC_{50} values were observed for compounds **4** and **5** (0.4 μM) for which **R** is a propyl or an allyl group. Any increase or decrease of the chain length, as in **6** or **3**, respectively, led to an increase of the IC_{50} value. Moreover, the introduction of polar groups into **R** always led to a marked increase of the IC_{50} (compare for instance **7**, **8**, **9** and **15** with **4** or **6** and **10** with **3**). In that regard, the

Table 2
Comparison of the inhibitory effects of ebastine derivatives towards CYP2J2, 2B6, 2C8, 2C9 and 3A4

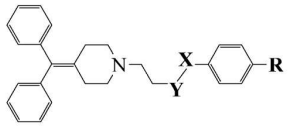


Compound	–X–	–R	IC_{50} (μM)[a]				
			2J2	2B6	2C8	2C9	3A4
Ebastine	–CO–	$-C(CH_3)_3$	n.d.	90 ± 2	>100[b]	27 ± 4	13 ± 1
18	–CHOH–	$-C(CH_3)_3$	7.2 ± 1.0	38 ± 1	>100	69 ± 8	3.7 ± 0.5
19	–CO–	$-CH_2-CH_2-OH$	1.1 ± 0.3	7.5 ± 0.9	>100	35 ± 3	6.8 ± 0.9
20	–CO–	$-CH=CH_2$	3.8 ± 0.5	7.4 ± 0.4	>100	22 ± 2	5.9 ± 0.2
21	–CO–	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	0.7 ± 0.1	15 ± 1	>100	30 ± 2	4.0 ± 0.2

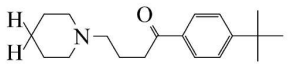
[a] Conditions as in Table 1.
[b] Above 50% of remaining activity at this concentration.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

Table 3
Comparison of the inhibitory effects of dehydro-terfenadone derivatives and of compound **25** towards CYP2J2, 2B6, 2C8, 2C9 and 3A4



Compound	–X–Y–	–R	IC_{50} (μM)[a]				
			2J2	2B6	2C8	2C9	3A4
22	–CO–CH_2–	–$C(CH_3)_3$	0.9 ± 0.3	41 ± 4	>100[b]	17 ± 2	55 ± 8
23	–CO–CH_2–	–CH_2–CH_2–NH_2	1.7 ± 0.7	0.1 ± 0.05	>100	13 ± 1	12 ± 1
24	–CH=CH–	–$C(CH_3)_3$	15 ± 2	41 ± 2	>100	15 ± 3	49 ± 6
25	—	—	13 ± 2	58 ± 3	~100	39 ± 2	68 ± 1



[a] Conditions as in Table 1.
[b] Above 50% of remaining activity at this concentration.

low IC_{50} value observed for compound **14**, for which **R** is a quite polar imidazole group, is a particular case. Its good affinity for CYP2J2 is due to the presence of the imidazole heterocycle, which is a well-known ligand of P450 iron [52] and should strongly bind to the iron of CYP2J2. Accordingly, addition of **14** to a suspension of microsomes from insect cells expressing CYP2J2 led, in difference visible spectroscopy, to a spectrum characterized by a peak at 432 nm and a trough at 415 nm (type II difference spectrum [57]) (data not shown). These data confirmed that **14** binds to CYP2J2 iron through the accessible nitrogen atom of its imidazole moiety.

Selectivity of the inhibitors towards CYP2J2 by comparison with other vascular P450s

Tables 1–3 also compare the inhibitory effects of the terfenadone and ebastine derivatives towards the other main CYPs that have been reported to be present in the blood vessels, namely CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4 [58–61]. The reference activities that were followed to measure these inhibitory effects were 7-benzyloxyresorufin *O*-debenzylase [42], paclitaxel 6α-hydroxylase [43], diclofenac 4′-hydroxylase [62] and testosterone 6β-hydroxylase [47], respectively. The substrate concentrations used in these experiments were equal to the K_m of the activity followed for each CYP (see Materials and methods). Microsomes of the W(R)fur1 yeast strain expressing each CYP and overexpressing yeast cytochrome P450 reductase [36] were used. We have confirmed that the IC_{50} values measured with these systems were very similar to those measured by using microsomes of insect cells expressing CYP 2B6, 2C8, 2C9 and 3A4 in the case of compounds **1**, **3**–**6**, **11**, **13**, **14** and **17** (less than 15% variation of the IC_{50} values).

Among all the studied compounds, the imidazole derivative **14** exhibited a particular behavior, as it acted as a good, but non-selective inhibitor of all the studied CYPs, with IC_{50} values from 0.4 to 5.2 μM. However, it is noteworthy that it exhibited the best affinity for CYP2J2 (IC_{50} = 0.4 μM). Even though **14** is not a selective inhibitor for CYP2J2, it could be useful to inhibit all the vascular CYPs and, consequently, all the activities of arachidonic acid epoxidation at the vascular level.

As far as all the other compounds mentioned in Tables 1–3 are concerned, the main conclusions drawn from those tables are the following ones:

(i) none of the studied compounds led to a significant inhibition of CYP2C8 (IC_{50} > 100 μM). In order to confirm these results, we have also studied the effects of the terfenadone and ebastine derivatives towards another usual CYP2C8 activity, the *N*-deethylation of amodiaquine [45]. Both CYP2C8-catalyzed activities were not significantly inhibited by compounds **1**–**25**, their IC_{50} values always being higher than 100 μM.
(ii) CYP2C9 was inhibited with IC_{50} values between 10 and 69 μM, which were, in general, about 10-fold higher than those found for CYP2J2.
(iii) the previous conclusion concerning CYP2C9 is globally valid for CYP2B6, with IC_{50} values varying from 7 to 90 μM, if one excludes compound **23** that appeared to be a very good inhibitor of CYP2B6. This inhibitory effect of **23** towards CYP2B6, and to a lesser extent towards CYP2J2, could be due to a strong binding of its terminal NH_2 function to P450 iron.
(iv) the studied compounds inhibited CYP3A4 with IC_{50} values from 0.9 to 68 μM, that were generally intermediate between those found for CYP2J2 and for CYP2C9 (or 2B6).

The best inhibitors of CYP2J2, **4** and **5**, are reasonably selective towards this cytochrome as their IC_{50} values

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

towards the other studied CYPs are at least 20-fold (for **4**) and 14-fold (for **5**) higher than those found for CYP2J2.

This preliminary study of the IC_{50} values of the terfenadone and ebastine derivatives allowed us to select the following compounds for further, more detailed studies. Compound **4** was chosen because of its IC_{50} value of 0.4 μM, which was the lowest one and of its good selectivity towards CYP2J2. The choice of compound **14** was made because of its low IC_{50} and because it could be considered as an inhibitor for all the main vascular CYPs. Finally, compounds **5** and **13** were selected because preliminary experiments showed us that their inhibitory effects increased as a function of the incubation time, suggesting that they could be mechanism-based inhibitors of CYP2J2.

*Study of the mode of inhibition of CYP2J2 by **4***

Kinetic studies of the inhibition of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine by **4** were performed at various ebastine (0.2–5 μM) and **4** (0–2 μM) concentrations. The Lineweaver-Burk plots of the reciprocal of the reaction rate vs the reciprocal of ebastine concentration, at different concentrations of **4**, indicated that **4** acts as a competitive inhibitor of CYP2J2 (intercept of the straight lines on the *y* axis [63], data not shown). The Dixon plot of $1/v$ vs the concentration of **4** led to a K_i value for the inhibition of CYP2J2 by **4** of 0.16 ± 0.05 μM (Fig. 3). This value was in excellent agreement with the K_i value (0.2 μM) that may be calculated from the IC_{50} value of Table 1, assuming that $K_i = IC_{50}/2$ for a competitive inhibitor [64].

Actually, **4** is a substrate of CYP2J2; it is hydroxylated at the level of its propyl group, as expected from its great analogy with terfenadone (Lafite et al., publication in preparation). Thus, compound **4** is a competitive inhibitor and an alternative substrate of CYP2J2. We have confirmed that the concentration of **4** did not vary in a significant manner (less than 10% consumption) under the conditions used in kinetic experiments of study of its inhibitory effects towards CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine (very low CYP2J2 concentration of 1 nM and short incubation times, 2–4 min).

*Characterization of the inhibition of CYP2J2 by **14***

In order to analyze the type of inhibition of CYP2J2 by **14**, the Lineweaver-Burk plots of the reciprocal of the reaction rate vs the reciprocal of ebastine concentration were drawn at different **14** concentrations. Fig. 4 shows that **14** acts as a mixed-type inhibitor of CYP2J2, with a competitive and a non-competitive component [65]. The Dixon plot drawn for the inhibition of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine by **14** led to an evaluation of the compet-

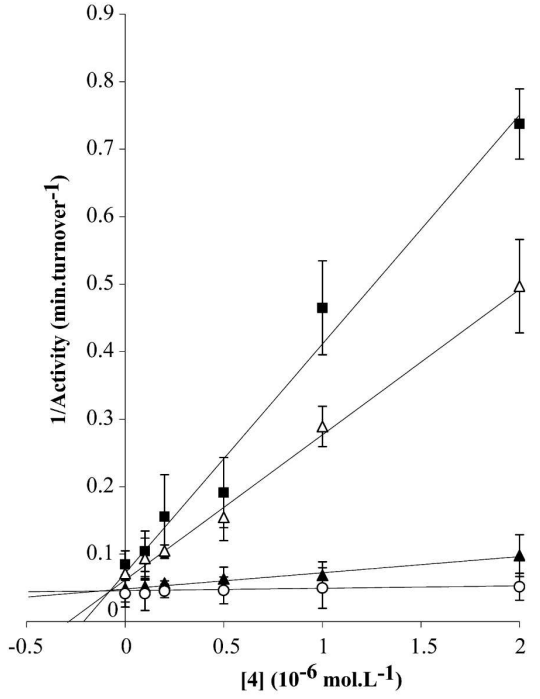


Fig. 3. Dixon plots obtained from a kinetic study of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine in the presence of different concentrations of compound **4**. Results are means ± SD calculated from three independent experiments, using microsomes of insect cells expressing CYP2J2, ebastine, **4**, and a NADPH-generating system, as described in Materials and methods. Substrate concentrations used were 0.2 (■), 0.5 (△), 2 (▲) and 5 μM (○).

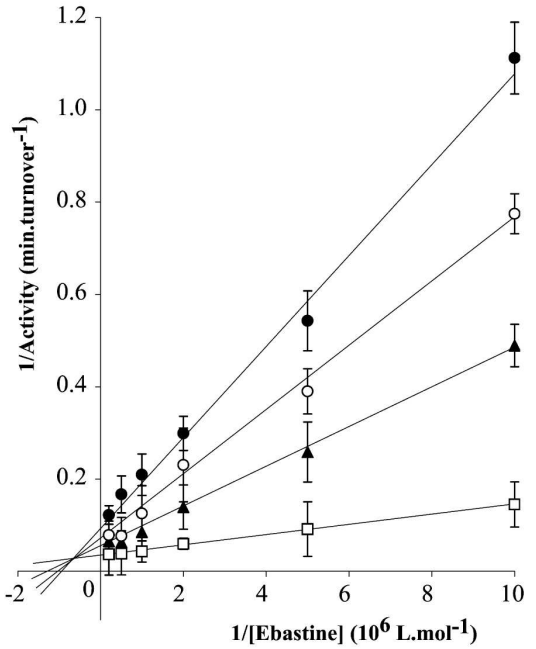


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots obtained from a kinetic study of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine in the presence of different concentrations of compound **14**. Results are means ± SD calculated from three independent experiments, using microsomes of insect cells expressing CYP2J2, ebastine, **14** and a NADPH-generating system. Inhibitor concentrations used were 0 (□), 0.5 (▲), 1 (○) and 2.5 μM (●).

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

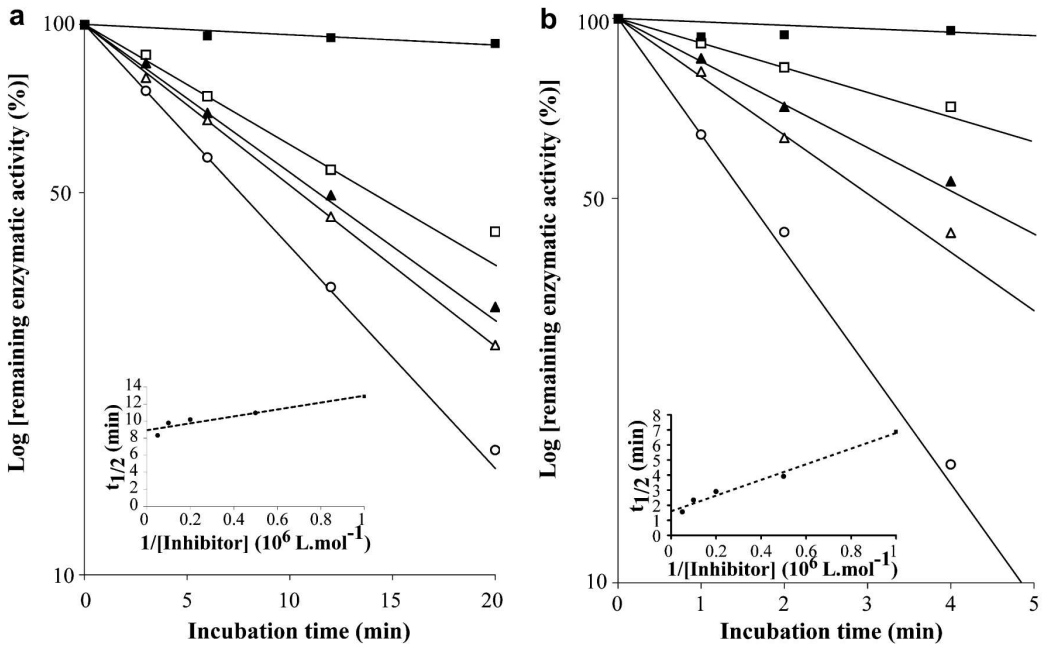


Fig. 5. Kinetics of inactivation of CYP2J2 upon NADPH-dependent oxidation of compounds **5** (a) and **13** (b). Details for incubations and determination of remaining activity are described in Materials and methods. CYP2J2 (30 nM) was incubated for the indicated times in the presence of a NADPH-generating system and 0 (■), 1 (□), 2 (▲), 5 (△) and 20 μM (○) compound **5** or **13**. Values are means calculated from three independent experiments. The inset shows the plot of $t_{1/2}$ (time required for half-inactivation of CYP2J2) vs the reciprocal of the concentration of **5** or **13** for the experiments depicted (Kitz–Wilson plot).

itive and the non-competitive inhibition constants K_i^C and K_i^{NC}, respectively (data not shown). The values deduced from the Dixon plot, $K_i^C = 0.2 \pm 0.1$ μM and $K_i^{NC} = 2.4 \pm 0.4$ μM, suggest that **14** is a mixed-type inhibitor, with a strong competitive component, as K_i^C is 10-fold lower than K_i^{NC}.

*Mechanism of inhibition of CYP2J2 by compounds **5** and **13***

To further analyze the time-dependent variation of the inhibitory effects of **5** and **13**, insect microsomes containing recombinant CYP2J2 were preincubated with **5** or **13** in the presence or absence of NADPH (i.e. under catalysis or non-catalysis conditions), and the remaining enzymatic activity was measured using ebastine as substrate, as a function of the preincubation time.

Incubation of microsomes with **5** in the presence of NADPH led to a progressive loss of CYP2J2 activity as a function of time (Fig. 5a). With 20 μM **5**, 50% of the activity was lost after 7 min and only 20% remained after 20 min. Loss of CYP2J2 activity was faster after incubation with identical concentrations of **13**, as 50% of the activity was lost after 1.5 min and only 20% remained after 4 min in the presence of 20 μM **13** (Fig. 5b). Incubations under identical conditions but in the absence of NADPH did not lead to any significant loss of CYP2J2 activity. In the absence of either **5** or **13**, less than 10% of the activity was lost after 10 min (data not shown). These results

Table 4
Comparison of the kinetic parameters calculated for inactivation of CYP2J2 by compounds **5** and **13** (this work) with those published for other suicide substrates of CYPs

Inhibitor	P450	Inactivating moiety	K_i (μM)	k_{inact} (min^{-1})	$t_{1/2max}$ (min)	k_{inact}/K_i (L mol^{-1} s^{-1})
5[a]	2J2	Terminal alcene	0.45 ± 0.05	0.08 ± 0.02	8.7 ± 2.2	2 960 ± 1 000
13[a]	2J2	Benzo-1,3-dioxole	2.9 ± 0.2	0.47 ± 0.05	1.5 ± 0.1	2 700 ± 500
Ticlopidine [71]	2C19	Thiophene	87	0.19	3.4	37
Paroxetin [75]	2D6	Benzo-1,3-dioxole	4.9	0.17	4.1	580
Tienilic acid [49]	2C9	Thiophene	4.3	0.22	3.4	813
Chloramphenicol [76]	2B11	Dichloroacetamide	5	1.2	0.6	4 000
2-Ethynylnaphthalene [77]	2B1	Terminal alcyne	0.08	0.83	0.84	173 000

[a] Values were calculated from data of Fig. 5, and are means ± SD from three independent experiments.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

confirmed the existence of a catalysis-dependent inactivation of CYP2J2 upon oxidation of **5** and **13**.

*Kinetics of CYP2J2 inactivation by **5** and **13***

Fig. 5a shows that the loss of CYP2J2 activity as a function of time after incubation in the presence of NADPH and various **5** concentrations followed the classical kinetics previously described for other CYP suicide substrates [54,55]. The time required for half-maximal inactivation, $t_{1/2}$, and the apparent first-order constant, k_{inact}, were calculated from the logarithmic transformation of the remaining activity as a function of time, as depicted in Fig. 5a. Plots of $t_{1/2}$ vs reciprocal **5** concentration (Fig. 5a, inset) led to the kinetic constants of the inactivation process (see Materials and methods). From extrapolation to infinite **5** concentration, the time required to inactivate half of the enzyme, at the maximal rate, $t_{1/2max}$, and the maximal k_{inact} were 8.7 ± 2.2 min and 0.08 ± 0.02 min^{-1}, respectively (Table 4). The inhibition constant, K_i, was found to be 0.45 ± 0.05 μM, and the second-order rate constant k_{inact}/K_i, a proper index of the *in vitro* effectiveness of a compound as inactivator [66], was found to be 2960 ± 1000 L mol^{-1} s^{-1}.

Identical experiments were performed in the case of compound **13** (Fig. 5b) and led to the kinetic constants reported in Table 4. The efficiencies of **5** and **13** as inactivators of CYP2J2 are similar, if one compares their k_{inact}/K_i values (2960 and 2700 L mol^{-1} s^{-1}, respectively). In fact, the inactivation rate of CYP2J2 by **13** is six times higher than that found in the case of **5** (0.47 ± 0.05 instead of 0.08 ± 0.02 min^{-1}). At the opposite, the affinity of **5** for CYP2J2 seems to be higher than that of **13**, as suggested by the K_i (0.45 ± 0.05 and 2.9 ± 0.2 μM respectively, Table 4) and IC_{50} values (0.4 ± 0.1 and 6.7 ± 2 μM, respectively, Table 1) found for these compounds. Table 4 also

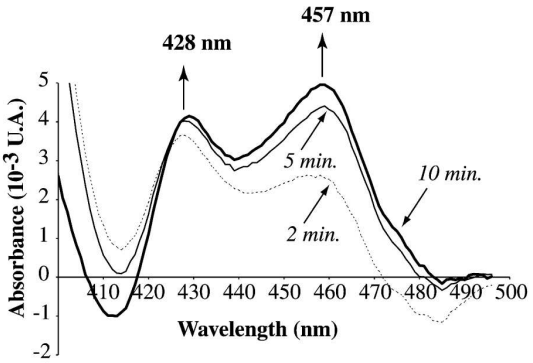


Fig. 7. Difference absorption spectra observed during CYP2J2-catalyzed oxidation of **13** in the presence of NADPH. Conditions described in Materials and methods; difference spectra obtained after 2, 5 and 10 min after addition of 100 μM NADPH to the sample cuvette containing 0.1 μM CYP2J2 and 100 μM **13**.

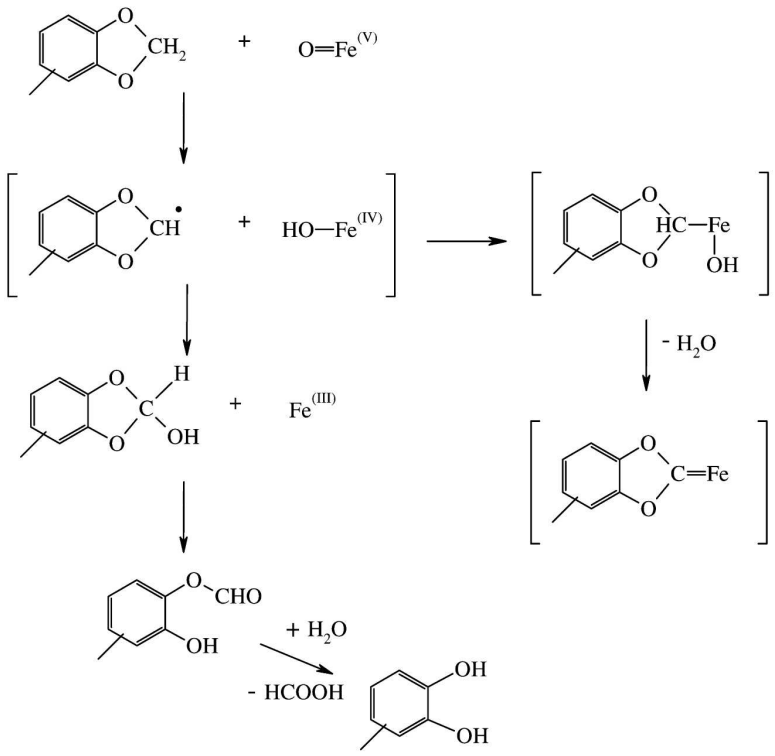


Fig. 6. Possible mechanisms of the CYP2J2-catalyzed oxidation of **13** and of the inactivation of this cytochrome.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

compares kinetic constants reported for other CYP mechanism-based inactivators [56]. It indicates that **5** and **13** are reasonably efficient mechanism-based inactivators of CYP2J2, as judged from their k_{inact}/K_i values.

*Study of the molecular mechanism responsible for CYP2J2 inactivation by **13***

Compound **13** has been designed to be a mechanism-based inhibitor of CYP2J2, as we expected that its hydroxylation by this enzyme would mainly occur at the level of its benzodioxole CH_2 group. Such P450-dependent oxidations of benzo-1,3-dioxole derivatives are well known to lead to the formation of the corresponding catechol metabolites and to P450 inactivation due to the formation of very stable P450 iron–benzodioxole-derived carbene complexes [52] (Fig. 6). The generally admitted mechanism of these reactions involves the free-radical abstraction of an hydrogen atom of the benzodioxole CH_2 group by the high-valent P450 iron-oxo active species. The resulting radical may either undergo an oxidative transfer of the OH ligand of the P450 Fe(IV)–OH intermediate, with formation of an unstable orthoformiate that is eventually hydrolyzed to the corresponding catechol, or bind to P450 iron leading to a very stable P450 iron–carbene complex after elimination of H_2O [67,68].

Addition of NADPH to microsomes of insect cells expressing CYP2J2 containing 100 μM **13** led to the progressive appearance of a difference visible spectrum characterized by two peaks at 428 and 457 nm (Fig. 7). This difference spectrum is characteristic of the formation of a P450 iron–benzodioxole-derived carbene complex [52]. Under the used conditions (0.1 μM CYP2J2, 100 μM **13**), the difference spectrum reached its maximal intensity 10 min after the addition of 100 μM NADPH. If one considers the $\varepsilon_{455-490}$ nm values reported in the literature for the difference spectra of these P450 iron–carbene complexes, which vary from 50,000 to 75,000 M cm^{-1} [69,70], one may estimate that 66–99% of CYP2J2 is engaged in an iron–carbene complex derived from **13**.

Reaction mixtures from incubation of **13** with microsomes from insect cells expressing CYP2J2 in the presence of NADPH were studied by HPLC coupled to mass spectrometry. The major metabolite detected by this method exhibited a mass spectrum characterized by a molecular ion at $m/z = 446$ (M-12 if M is the molecular ion of **13**). This ion well corresponded to the one expected for the catechol derived from **13**. Moreover, the main fragments appearing in the mass spectrum of the metabolite were also in complete agreement with what could be expected for the catechol derived from **13**. Thus, most fragments exhibited m/z values equal to those of **13** minus 12, except the fragments that do not contain the benzodioxole moiety which exhibited m/z values identical to chose of the corresponding fragments of **13** (Fig. 8). Finally, comparison of the UV spectra of **13** and of its main metabolite showed very similar characteristics with two peaks at 280 and 305–310 nm, and a small blueshift of the 305–310 nm peak for the metabolite of **13**. A comparison of the UV spectra of analog compounds, 3′,4′-(methylenedioxy)-propiophenone and the corresponding catechol, led to very similar characteristics (data not shown).

The aforementioned data confirmed that CYP2J2-catalyzed oxidation of **13** mainly occurred at the benzodioxole CH_2 group with formation of the corresponding catechol metabolite and of a CYP2J2 iron–carbene complex that leads to the inactivation of this cytochrome.

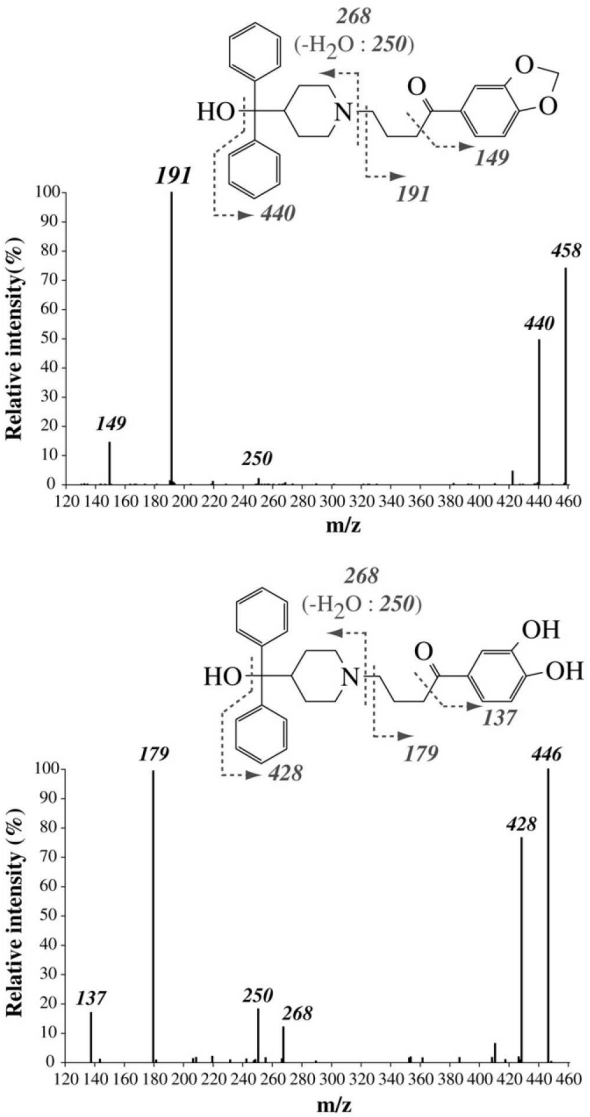


Fig. 8. Mass spectra of compound **13** and its metabolite formed after oxidation by CYP2J2. Mass spectra were obtained from HPLC-MS^2 analysis of incubations of 50 μM **13** with 10 nM CYP2J2 and a NADPH-generating system for 20 min, as described in Materials and methods. The molecular fragments corresponding to the observed peaks are shown. (–H_2O: 250) indicates the fragment having lost H_2O from dehydration of the tertiary alcohol function.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

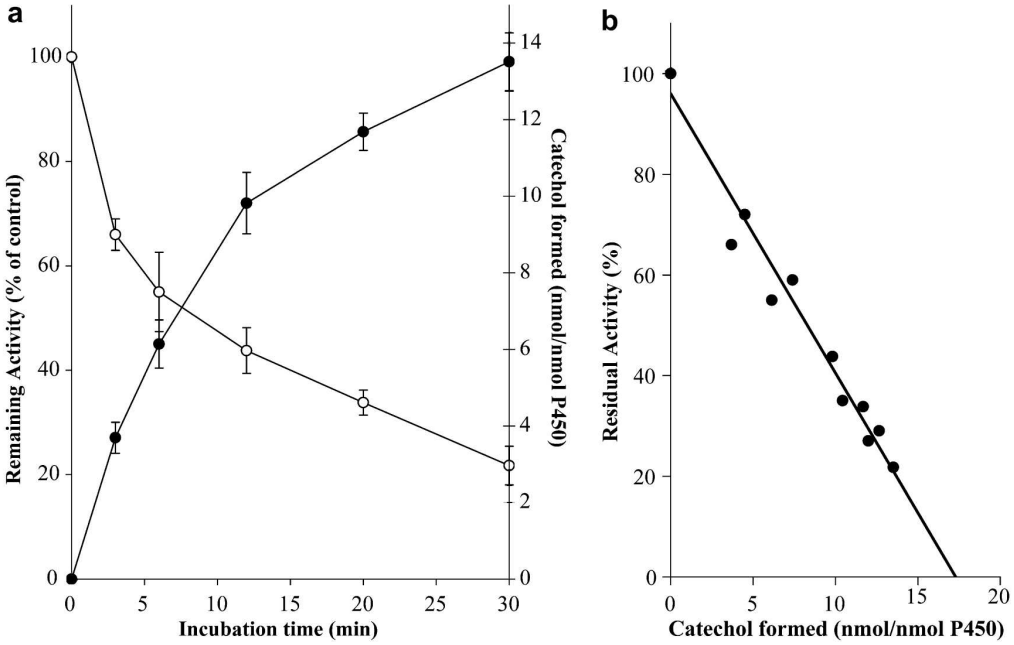


Fig. 9. Relationship between CYP2J2 inactivation and efficient catalysis of **13** oxidation (catechol metabolite formation) (a) and determination of the partition ratio (b). Microsomes from insect cells expressing CYP2J2 were incubated with 2 μM **13** and a NADPH-generating system (a). Values are means ± SD calculated from three independent experiments. Curve (b) was obtained from residual CYP2J2 activities and amounts of catechol metabolites measured from incubations of microsomes containing CYP2J2 in the presence of a NADPH-generating system and various concentrations of **13** (2–20 μM) for different time periods (0–30 min). Points are mean values from three experiments.

*Further studies of the characteristics of CYP2J2 inactivation by **13***

Fig. 9a shows that the loss of CYP2J2 activity upon incubation with 2 μM **13** for increasing times paralleled catechol metabolite formation, as expected for mechanism-based inhibition [48–50]. Fig. 9b illustrates the correlation between the CYP2J2 activity remaining after oxidation of **13** and the amount of catechol metabolite formed for various concentrations of **13** and incubation times. The linear relationship observed allowed us to estimate the partition ratio of the inactivation process, *r*, which represents the number of productive turnovers (leading to the catechol metabolite) divided by the number of inactivating events [48–50]. Actually, extrapolation to 0% remaining activity in Fig. 9b led to a *r* value of 18 ± 3.

The presence of **4**, a good competitive inhibitor and alternative substrate of CYP2J2, in incubations of CYP2J2 with **13** and NADPH led to a clear decrease of the rate of inactivation of CYP2J2 (see figure in Supplementary Materials).

An important property of efficient mechanism-based inhibitors is to generate reactive species that will rapidly react within the active site rather than diffuse out into solution. The presence of 5 mM reduced glutathione in incubations of CYP2J2 with **13** and NADPH did not have any significant effects on the rate of CYP2J2 inactivation (see figure in Supplementary Materials). This result indicates that the reactive intermediate of **13**, which is responsible for CYP2J2 inactivation is not an electrophilic metabolite released in the medium. It is in agreement with the mechanism shown in Fig. 6, in which the free-radical intermediate from **13** is rapidly trapped by CYP2J2 iron, with the eventual formation of the iron–carbene complex, and is not released in the medium.

Conclusion

Starting from the structures of terfenadone and ebastine, 24 derivatives have been synthesized and evaluated as inhibitors of CYP2J2. Many of them exhibit a good affinity for this isoform with IC_{50}s at the micromolar level. A comparison of these IC_{50}s has shown the importance of three structural features for a good recognition by CYP2J2: (i) the presence of a short hydrophobic alkyl chain at one end of the molecule, (ii) the presence of a keto group para to this alkyl chain on the terminal aryl group and (iii) the presence of an hydrophobic diarylmethyl substituent at position 4 of the central piperidine ring. Four compounds appeared to be particularly interesting. Compound **14** is a good non-competitive (or mixed) inhibitor of CYP2J2 with an IC_{50} value of 400 ± 100 nM. It is not selective towards CYP2J2 as it also efficiently inhibits the other main vascular CYPs such as CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4. However it could be an interesting tool to inhibit all these vascular CYPs. Compounds **4**, **5** and **13** are reasonably selective CYP2J2 inhibitors (Table 1). Compound **4** is a competitive

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

Table 5
Proposed selective inhibitors of the main human vascular CYPs

Inhibitor	IC_{50} (μM)				
	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP3A4	CYP2J2
Ticlopidine	**0.32** [72]	100 [72]	>200 [71]	>50 [71]	>50
Montelukast	11 [73]	**0.02** [73]	1.2 [73]	1.2–7.9 [73]	>100
Sulfaphenazole	>100 [74]	120 [74]	**0.6** [74]	> 200 [74]	>150
Ketoconazole	6.3 [74]	5.5 [74]	16 [74]	**0.02** [74]	3
4	28	>100	26	7.9	**0.4**

Values for CYP2J2 and for **4** were determined in this work. The other IC_{50} values were previously reported in the references indicated into brackets.

inhibitor, alternative substrate of CYP2J2 of high-affinity ($K_i = 160 \pm 50$ nM). Finally, compounds **5** and **13** are mechanism-based inhibitors of CYP2J2, characterized by high k_{inact}/K_i values (around 3000 L mol^{-1} s^{-1}) (Table 4). Inactivation of CYP2J2 by **13** is due to the formation of a very stable iron–carbene bond which occurs with a partition ratio of 18 ± 3.

Compounds **4**, **5** and **13** should be interesting tools to study the biological roles of CYP2J2. As far as vascular CYPs are concerned, Table 5 summarizes data obtained on **4** (this work, Table 1) and on ticlopidine [71,72], montelukast [73], sulfaphenazole [74] and ketoconazole [74] as selective inhibitors of CYP2B6, 2C8, 2C9 and 3A4, respectively. These data show that each compound is a selective inhibitor of a given P450—i.e. its IC_{50} for this CYP is at least 20-fold lower than its IC_{50} towards the other P450s—, and exhibits a high affinity for its preferred P450 (IC_{50} values between 20 nM for montelukast and ketoconazole towards CYP2C8 and 3A4, respectively, to 600 nM for sulfaphenazole towards CYP2C9). This set of compounds should be very useful to determine the biological role of each P450 in the cardiovascular system. Finally, given the recent findings suggesting that CYP2J2 may represent a potential target for therapy of human cancers [23], studies are currently underway to test the above described CYP2J2 inhibitors as potential therapeutic agents for cancer.

Acknowledgments

We thank Dr. Didier Buisson (UMR8601) for a gift of compounds **2**, **10**, **16** and **25**. This research was supported by the C.N.R.S. (Centre National de la Recherche Scientifique) and Ministère de la Recherche (France), and by the Intramural Research Program of the National Institutes of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health (USA).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article (main ^{1}H NMR and MS characteristics of compounds **1**, **3**, **4**, **6**, **9**, **11**–**13**, **15**, **17**, **5**, **14**, **7**, **8**, **19**, **18** and **20**–**24**; Figure showing the effects of **4** or GSH on the rate of CYP 2J2 inactivation by **13**) can be found, in the online version of this article. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.abb.2007.03.028.

References

[1] P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.
[2] F.P. Guengerich, in: P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005, pp. 377–530.
[3] P.A. Williams, J. Cosme, A. Ward, H.C. Angove, D. Matak Vinkovic, H. Jhoti, Nature 424 (2003) 464–468.
[4] G.A. Schoch, J.K. Yano, M.R. Wester, K.J. Griffin, C.D. Stout, E.F. Johnson, J. Biol. Chem. 279 (2004) 9497–9503.
[5] M.R. Wester, J.K. Yano, G.A. Schoch, C. Yang, K.J. Griffin, C.D. Stout, E.F. Johnson, J. Biol. Chem. 279 (2004) 35630–35637.
[6] P.A. Williams, J. Cosme, D.M. Vinkovic, A. Ward, H.C. Angove, P.J. Day, C. Vonrhein, I.J. Tickle, H. Jhoti, Science 305 (2004) 683–686.
[7] J.K. Yano, M.R. Wester, G.A. Schoch, K.J. Griffin, C.D. Stout, E.F. Johnson, J. Biol. Chem. 279 (2004) 38091–38094.
[8] J.K. Yano, M.H. Hsu, K.J. Griffin, C.D. Stout, E.F. Johnson, Nat. Struct. Mol. Biol. 12 (2005) 822–823.
[9] P. Rowland, F.E. Blaney, M.G. Smyth, J.J. Jones, V.R. Leydon, A.K. Oxbrow, C.J. Lewis, M.M. Tennant, S. Modi, D.S. Eggleston, R.J. Chenery, A.M. Bridges, J. Biol. Chem. 281 (2005) 7614–7622.
[10] M. Ekroos, T. Sjogren, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 13682–13687.
[11] S. Wu, C.R. Moomaw, K.B. Tomer, J.R. Falck, D.C. Zeldin, J. Biol. Chem. 271 (1996) 3460–3468.
[12] P.E. Scarborough, J. Ma, W. Qu, D.C. Zeldin, Drug Metab. Rev. 31 (1999) 205–234.
[13] D.C. Zeldin, J. Foley, J. Ma, J.E. Boyle, J.M. Pascual, C.R. Moomaw, K.B. Tomer, C. Steenbergen, S. Wu, Mol. Pharmacol. 50 (1996) 1111–1117.
[14] D.C. Zeldin, J. Foley, S.M. Goldsworthy, M.E. Cook, J.E. Boyle, J. Ma, C.R. Moomaw, K.B. Tomer, C. Steenbergen, S. Wu, Mol. Pharmacol. 51 (1997) 931–943.
[15] A.A. Spector, X. Fang, G.D. Snyder, N.L. Weintraub, Prog. Lipid Res. 43 (2004) 55–90.
[16] I. Fleming, R. Busse, Hypertension 47 (2006) 629–633.
[17] J. Seubert, B. Yang, J.A. Bradbury, J. Graves, L.M. Degraff, S. Gabel, R. Gooch, J. Foley, J. Newman, L. Mao, H.A. Rockman, B.D. Hammock, E. Murphy, D.C. Zeldin, Circ. Res. 95 (2004) 506–514.
[18] M. Spiecker, H. Darius, T. Hankeln, M. Soufi, A.M. Sattler, J.R. Schaefer, K. Node, J. Borgel, A. Mugge, K. Lindpaintner, A. Huesing, B. Maisch, D.C. Zeldin, J.K. Liao, Circulation 110 (2004) 2132–2136.
[19] Y.F. Xiao, Q. Ke, J.M. Seubert, J.A. Bradbury, J. Graves, L.M. Degraff, J.R. Falck, K. Krausz, H.V. Gelboin, J.P. Morgan, D.C. Zeldin, Mol. Pharmacol. 66 (2004) 1607–1616.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

[20] T. Lu, D. Ye, X. Wang, J.M. Seubert, J.P. Graves, J.A. Bradbury, D.C. Zeldin, H.C. Lee, J. Physiol. 575 (2006) 627–644.
[21] Y. Wang, X. Wei, X. Xiao, R. Hui, J.W. Card, M.A. Carey, D.W. Wang, D.C. Zeldin, J. Pharmacol. Exp. Ther. 314 (2005) 522–532.
[22] U.R. Michaelis, I. Fleming, Pharmacol. Ther. 111 (2006) 584–595.
[23] J.G. Jiang, C.L. Chen, J.W. Card, S. Yang, J.X. Chen, X.N. Fu, Y.G. Ning, X. Xiao, D.C. Zeldin, D.W. Wang, Cancer Res. 65 (2005) 4707–4715.
[24] T. Hashizume, S. Imaoka, M. Mise, Y. Terauchi, T. Fujii, H. Miyazaki, T. Kamataki, Y. Funae, J. Pharmacol. Exp. Ther. 300 (2002) 298–304.
[25] K.H. Liu, M.G. Kim, D.J. Lee, Y.J. Yoon, M.J. Kim, J.H. Shon, C.S. Choi, Y.K. Choi, Z. Desta, J.G. Shin, Drug Metab. Dispos. 34 (2006) 1793–1797.
[26] S. Matsumoto, T. Hirama, T. Matsubara, K. Nagata, Y. Yamazoe, Drug Metab. Dispos. 30 (2002) 1240–1245.
[27] S. Parikh, P. Gagne, V. Miller, C. Crespi, K. Thummel, C. Patten, Drug Metab. Rev. 35 (2003) 190.
[28] P. Lafite, S. Dijols, D. Buisson, A.C. Macherey, D.C. Zeldin, P.M. Dansette, D. Mansuy, Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 2777–2780.
[29] A.A. Carr, C.R. Kinsolving, U.S. Patent 3,862,173 (1975).
[30] M.Q. Zhang, Y. Wada, F. Sato, H. Timmerman, J. Med. Chem. 38 (1995) 2472–2477.
[31] R. Bujok, M. Makosza, Synlett (2002) 1285–1286.
[32] J.V. Bhashkar, M. Periasamy, J. Org. Chem. 56 (1991) 5964–5965.
[33] Y. Kawakami, H. Kitani, S. Yuasa, M. Abe, M. Moriwaki, M. Kagoshima, M. Terasawa, T. Tahara, Eur. J. Med. Chem. 31 (1996) 683–692.
[34] B. Di Giacomo, D. Coletta, B. Natalini, M.H. Ni, R. Pellicciari, Il Farmaco 54 (1999) 600–610.
[35] H. Zhang, Q. Cai, D. Ma, J. Org. Chem. 70 (2005) 5164–5173.
[36] G. Truan, C. Cullin, P. Reisdorf, P. Urban, D. Pompon, Gene 125 (1993) 49–55.
[37] A. Bellamine, J.C. Gautier, P. Urban, D. Pompon, Eur. J. Biochem. 225 (1994) 1005–1013.
[38] L. Gervot, B. Rochat, J.C. Gautier, F. Bohnenstengel, H. Kroemer, V. de Berardinis, H. Martin, P. Beaune, I. de Waziers, Pharmacogenetics 9 (1999) 295–306.
[39] J.P. Renaud, C. Cullin, D. Pompon, P. Beaune, D. Mansuy, Eur. J. Biochem. 194 (1990) 889–896.
[40] D. Pompon, B. Louerat, A. Bronine, P. Urban, Methods Enzymol. 272 (1996) 51–64.
[41] T. Omura, R. Sato, J. Biol. Chem. 239 (1964) 2370–2378.
[42] M.D. Burke, R.T. Mayer, Chem. Biol. Interact. 45 (1983) 243–258.
[43] A. Rahman, K.R. Korzekwa, J. Grogan, F.J. Gonzalez, J.W. Harris, Cancer Res. 54 (1994) 5543–5546.
[44] A. Melet, C. Marques-Soares, G.A. Schoch, A.C. Macherey, M. Jaouen, P.M. Dansette, M.A. Sari, E.F. Johnson, D. Mansuy, Biochemistry 43 (2004) 15379–15392.
[45] X.Q. Li, A. Bjorkman, T.B. Andersson, M. Ridderstrom, C.M. Masimirembwa, J. Pharmacol. Exp. Ther. 300 (2002) 399–407.
[46] A. Melet, N. Assrir, P. Jean, M. Pilar Lopez-Garcia, C. Marques-Soares, M. Jaouen, P.M. Dansette, M.A. Sari, D. Mansuy, Arch. Biochem. Biophys. 409 (2003) 80–91.
[47] W.R. Brian, M.A. Sari, M. Iwasaki, T. Shimada, L.S. Kaminsky, F.P. Guengerich, Biochemistry 29 (1990) 11280–11292.
[48] C. Walsh, Tetrahedron 38 (1982) 871–909.
[49] M.P. Lopez-Garcia, P.M. Dansette, D. Mansuy, Biochemistry 33 (1994) 166–175.
[50] R.B. Silverman, in: D.L. Purich (Ed.), Enzyme Kinetics and Mechanism Part D: Developments in Enzyme Dynamics, Academic Press, 1995, pp. 240–283.
[51] R. Kitz, I.B. Wilson, J. Biol. Chem. 237 (1962) 3245–3249.
[52] M.A. Correira, P.R. Ortiz de Montellano, in: P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005, pp. 247–322.
[53] B. Testa, P. Jenner, Drug Metab. Rev. 12 (1981) 1–117.
[54] J.R. Halpert, J.C. Stevens, Methods Enzymol. 206 (1991) 540–548.
[55] U.M. Kent, M.I. Juschyshyn, P.F. Hollenberg, Curr. Drug Metab. 2 (2001) 215–243.
[56] E. Fontana, P.M. Dansette, S.M. Poli, Curr. Drug Metab. 6 (2005) 413–454.
[57] C.R. Jefcoate, Methods Enzymol. 52 (1979) 258–279.
[58] B.G. Hoebel, E. Steyrer, W.F. Graier, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25 (1998) 826–830.
[59] B. Fisslthaler, R. Popp, L. Kiss, M. Potente, D.R. Harder, I. Fleming, R. Busse, Nature 401 (1999) 493–497.
[60] J. Borlak, M. Walles, K. Levsen, T. Thum, Drug Metab. Dispos. 31 (2003) 888–891.
[61] T.C. DeLozier, G.E. Kissling, S.J. Coulter, D. Dai, J.F. Foley, J.A. Bradbury, E. Murphy, C. Steenbergen, D.C. Zeldin, J.A. Goldstein, Drug Metab. Dispos 35 (2007) 682–688.
[62] A. Mancy, M. Antignac, C. Minoletti, S. Dijols, V. Mouries, N.T. Duong, P. Battioni, P.M. Dansette, D. Mansuy, Biochemistry 38 (1999) 14264–14270.
[63] M. Dixon, E.C. Webb, Enzymes, Academic Press Inc., New York, 1964.
[64] Y. Cheng, W.H. Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 3099–3108.
[65] I.H. Segel, Enzyme Kinetics, Wiley-Interscience, New York, 1993.
[66] P.J. Bednarski, S.D. Nelson, J. Med. Chem. 32 (1989) 203–213.
[67] D. Mansuy, J.P. Battioni, J.C. Chottard, V. Ullrich, J. Am. Chem. Soc. 101 (1979) 3971–3973.
[68] D. Mansuy, P. Battioni, J.P. Battioni, Eur. J. Biochem. 184 (1989) 267–285.
[69] C.R. Elcombe, J.W. Bridges, T.J.B. Gray, R.H. Nimmo-Smith, K.J. Netter, Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 1427–1433.
[70] M. Murray, C.F. Wilkinson, C. Marcus, C.E. Dube, Mol. Pharmacol. 24 (1983) 129–136.
[71] N.T. Ha-Duong, S. Dijols, A.C. Macherey, J.A. Goldstein, P.M. Dansette, D. Mansuy, Biochemistry 40 (2001) 12112–12122.
[72] T. Richter, T.E. Murdter, G. Heinkele, J. Pleiss, S. Tatzel, M. Schwab, M. Eichelbaum, U.M. Zanger, J. Pharmacol. Exp. Ther. 308 (2004) 189–197.
[73] R.L. Walsky, R.S. Obach, E.A. Gaman, J.P. Gleeson, W.R. Proctor, Drug Metab. Dispos. 33 (2005) 413–418.
[74] S.J. Baldwin, J.C. Bloomer, G.J. Smith, A.D. Ayrton, S.E. Clarke, R.J. Chenery, Xenobiotica 25 (1995) 261–270.
[75] K.M. Bertelsen, K. Venkatakrishnan, L.L. Von Moltke, R.S. Obach, D.J. Greenblatt, Drug Metab. Dispos. 31 (2003) 289–293.
[76] P.J. Ciaccio, D.B. Duignan, J.R. Halpert, Drug Metab. Dispos. 15 (1987) 852–856.
[77] E.S. Roberts, N.E. Hopkins, W.L. Alworth, P.F. Hollenberg, Chem. Res. Toxicol. 6 (1993) 470–479.

Please cite this article in press as: P. Lafite et al., Arch. Biochem. Biophys. (2007), doi:10.1016/j.abb.2007.03.028

CHAPITRE IV

RÉGIOSÉLECTIVITÉ DES OXYDATIONS CATALYSÉES PAR LE CYP 2J2 ET TOPOLOGIE DE SON SITE ACTIF

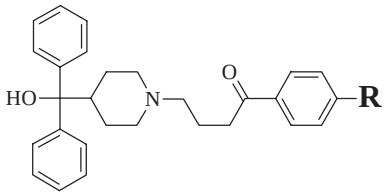
L'ébastine et la terfénadone sont toutes deux efficacement transformées par le CYP 2J2, en étant hydroxylées en bout de chaîne sur leur groupe *ter*-butyle (voir chapitre **II**). Cette oxydation à une extrémité de la molécule suggère un positionnement particulier de ces substrats au sein du site actif du CYP 2J2. Nous avons cherché à déterminer si certains des inhibiteurs de haute affinité caractérisés dans le chapitre précédent étaient oxydés par le CYP 2J2, et si une variation de structure chimique pouvait influer sur la régiosélectivité de cette oxydation.

A la suite de ce travail, une étude par modélisation moléculaire du CYP 2J2 et *docking* des dérivés de la terfénadone a été mise en oeuvre pour comprendre les différentes interactions pouvant exister entre les substrats et les amino acides du site actif du CYP 2J2.

IV-1 Oxydation des dérivés de la terfénadone par le CYP 2J2.

Nous avons choisi d'étudier l'oxydation par le CYP 2J2 d'une série de composés dont la structure est inspirée de la terfénadone (voir tableau IV.1). Ces composés portent une chaîne **R** de longueur variant entre 1 et 4 carbones, ce qui en fait des substrats possibles du CYP 2J2 car aucun motif pouvant complexer le fer ou inactiver l'enzyme n'est présent. Nous avons choisi d'ajouter le composé **5** à cette liste, car il s'agissait du substrat suicide le plus affin pour le CYP 2J2 (voir tableau III.1), dont certaines caractéristiques de son mode d'inhibition ont été étudiées précédemment.

Tableau IV.1 – **Analogues de la terfénadone testés comme substrats potentiels du CYP 2J2**.



Composé	-R
1	$-(CH_3)_3$
2	$-CH_3$
3	$-CH_2-CH_3$
4	$-CH_2-CH_2-CH_3$
5	$-CH_2-CH=CH_2$
6	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$

IV-1.1 Activités hydroxylases catalysées par le CYP 2J2.

L'étude de l'oxydation des composés **1** à **6** par des microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 en présence de NADPH par CLHP/SM montre que tous ces composés sont hydroxylés, ce qui se traduit par l'apparition d'un ou plusieurs pics dont la masse est augmentée de 16 (masse molaire d'un atome d'oxygène) par rapport à la masse des substrats de départ. Un exemple de chromatogramme obtenu par incubation de **3** avec le CYP 2J2, ainsi que l'analyse des masses du substrat et des différents métabolites sont présentés en figure IV.1. On observe l'apparition de deux métabolites, notés **3a** et **3b** dont la masse est augmentée de 16 par rapport à celle de **3**. Dans le cas des composés **4**, **5** et **6**, plusieurs métabolites sont également formés après oxydation de ces substrats (3, 3 et 4 métabolites, respectivement), mais on observe toujours la présence d'un métabolite majoritaire (> 85 %). Le dérivé **2**, portant une fonction méthyle, ne donne, lui, qu'un seul métabolite de masse

M+16. Dans le cas du composé **5**, on observe l'apparition d'un métabolite majoritaire dont la masse est augmentée de 16, mais également un produit très polaire dont la masse est augmentée de 34, qui pourrait correspondre au diol obtenu par hydrolyse d'une fonction époxyde.

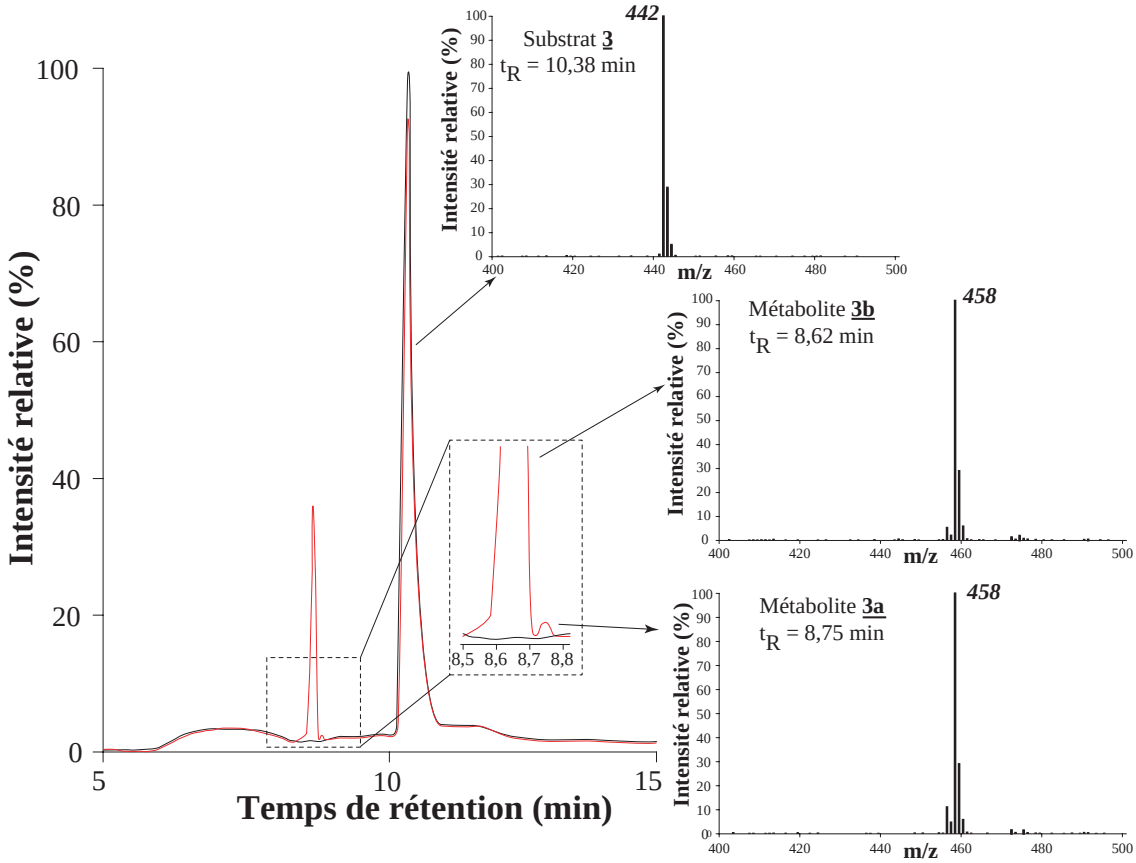


Figure IV.1 – **Chromatogrammes CLHP/SM obtenus après incubation du dérivé 3 avec le CYP 2J2 en présence de NADPH**. Les deux chromatogrammes ont été obtenus pour un temps d'incubation de 0 minute (noir) et de 30 minutes (rouge). Les spectres de masse du substrat **3**, ainsi que des métabolites **3a**, **3b**, à 30 minutes d'incubation, sont indiqués à droite du chromatogramme. t_R : temps de rétention.

Les vitesses de formation des métabolites, calculées en sommant les aires des pics correspondant aux différents métabolites, sont indiquées dans la figure IV.2. Il est à noter que l'activité d'oxydation augmente avec la longueur de chaîne à oxyder. Ainsi, le composé **2** est faiblement oxydé, sa vitesse d'hydroxylation est 100 fois inférieure à celle observée pour le composé **6**.

Les constantes de Michaelis-Menten de formation du composé principal ont ensuite été déterminées et sont indiquées dans le tableau IV.2. Du fait de la faible activité d'oxydation du composé **2**, la détection des métabolites pour des concentrations inférieures à 5 μM en substrat n'est pas possible, et les constantes cinétiques de métabolisation de ce substrat n'ont pu être mesurées.

Le rapport de la constante de vitesse k_{cat} sur la constante de Michaelis K_m est plus représentatif de l'efficacité de la réaction enzymatique par rapport aux activités présentées dans la figure IV.2. La comparaison de ce rapport pour tous les substrats indique que le composé **4** est le substrat le plus efficacement métabolisé, bien que la k_{cat} correspondant à son oxydation soit inférieure à celle obtenue pour d'autres substrats. Les dérivés de la terfénadone testés sont donc des substrats du CYP 2J2, certains comme le substrat **4** étant très efficacement métabolisés par ce cytochrome P450.

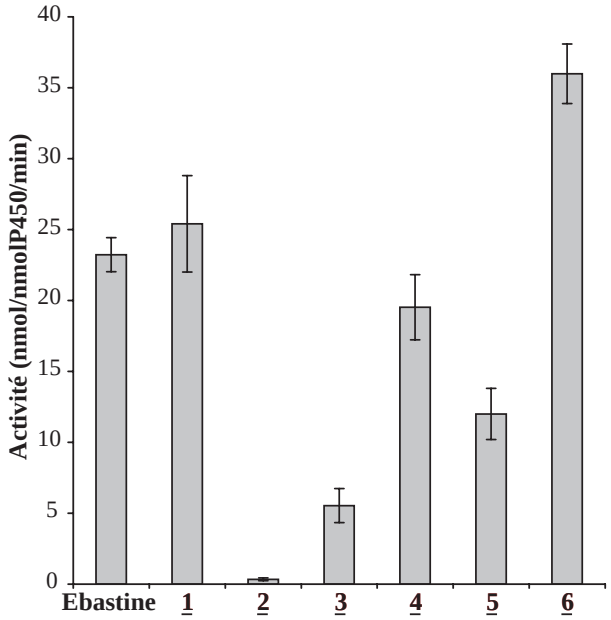


Figure IV.2 – **Activités d'oxydation par le CYP 2J2 des composés analogues de la terfénadone**. La concentration en substrat est de 20 μM, pour une incubation de 30 minutes. Les valeurs obtenues sont calculées en moyennant les résultats obtenus pour 3 expériences distinctes, les barres d'erreurs représentant l'erreur standard.

Tableau IV.2 – **Constantes cinétiques d'oxydation des dérivés de la terfénadone par le CYP 2J2**.

Composé	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (μM^{-1}.min^{-1})
Ebastine	0,52 $\pm$ 0,08[a]	35 $\pm$ 3	70
1	0,39 $\pm$ 0,01	36 $\pm$ 2	90
2	*n.d.*[b]	*n.d.*	*n.d.*
3	0,24 $\pm$ 0,07	5,4 $\pm$ 0,6	23
4	0,14 $\pm$ 0,02	19 $\pm$ 1	141
5	0,21 $\pm$ 0,02	23 $\pm$ 2	110
6	0,32 $\pm$ 0,02	42 $\pm$ 5	132

(a) : Les valeurs obtenues sont la moyenne $\pm$ l'erreur standard d'après 3 expériences indépendantes.
(b) : Non-déterminée.

IV-1.2 Régiosélectivité de l'oxydation des composés 3 à 5.

IV-1.2.1 Une régiosélectivité inattendue.

L'identification de la structure des différents régioisomères formés a été réalisée par analyse SM^2 d'incubations du substrat à étudier et les microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2. Par exemple, pour identifier les métabolites **3a** et **3b** formés après oxydation de **3** par le CYP 2J2, on étudie les spectres SM^2 des pics présentés en figure IV.1, de m/z = 442 et 458 (figure IV.3). Les spectres SM^2 du substrat et du métabolite **3b**, ainsi que l'identification des fragments observés sont représentés en figure IV.3. La faible quantité de métabolite **3a** formé par le CYP 2J2 ne permet pas d'obtenir un spectre de masse SM^2 assez intense pour identifier ce métabolite. Cependant, ce métabolite est le métabolite principal après oxydation de **3** par le CYP 3A4 (voir plus loin). Le spectre SM^2 du métabolite **3a** présenté en figure IV.3 a donc été obtenu après une incubation du CYP 3A4 en présence de **3**.

- Une comparaison des spectres SM^2 du substrat avec ceux des deux métabolites montre que l'oxydation a bien lieu sur le groupe ethyle situé en *para* de la cétone, car seuls les fragments contenant ce groupe alkyle ont une masse augmentée de 16 dans le cas des métabolites (m/z à 191 et 149, au lieu de 175 et 133 pour le substrat). Par contre, la masse des fragments ne contenant pas la chaîne éthyle oxydée est la même dans le cas des métabolites et du substrat (m/z = 250 et 268).
- Le composé **7**, présenté dans le chapitre précédent, est un métabolite authentique de l'oxydation en bout de chaîne de **3**. La co-injection de **7** en CLHP/UV avec un incubat du **3** et du CYP 2J2 (ou du CYP 3A4) montre que **3b** a le même temps de rétention que **7** (non montré). D'autre part, les fragments obtenus par SM^2 du composé **7** correspondent à ceux de **3b** (voir partie expérimentale). On en déduit donc que **3b** est le régioisomère dont la fonction alcool est située en position homo-benzylique.
- Le fragment de masse m/z = 176 observé dans le spectre de **3a** est caractéristique du groupe -OH situé en position benzylique, et permet d'identifier **3a**. Ce fragment est également obtenu par fragmentation SM^3 du fragment de masse 191, ce qui montre la filiation entre les deux fragments. Par déduction, on suppose donc que **3a** porte la fonction OH en position benzylique.

Des analyses identiques des métabolites dans le cas des composés **4** et **5** ont permis d'identifier les régioisomères formés après oxydation par le CYP 2J2. Les spectres SM^2 correspondants sont indiqués en annexe B. Dans le cas de **6**, l'analyse par SM^2 n'a pas permis d'identifier les régioisomères formés.

La proportion des différents métabolites caractérisés pour les substrats **3** à **5** ainsi que la nomenclature utilisée pour définir les sites d'hydroxylation sont indiquées dans le tableau IV.3.

Tous ces composés sont oxydés majoritairement sur le carbone β de la chaîne carbonée. Ceci est en accord avec la faible vitesse d'hydroxylation du composé **2** observée dans la figure IV.2. Lorsque la chaîne carbonée est plus longue, on observe toujours une hydroxylation majoritaire de ce carbone, comme dans le cas du substrat **4**. Dans le cas du composé **5**, on observe majoritairement l'époxydation de l'alcène terminal, qui est hydrolysé en diol, détecté également par spectrométrie de masse (voir annexe B).

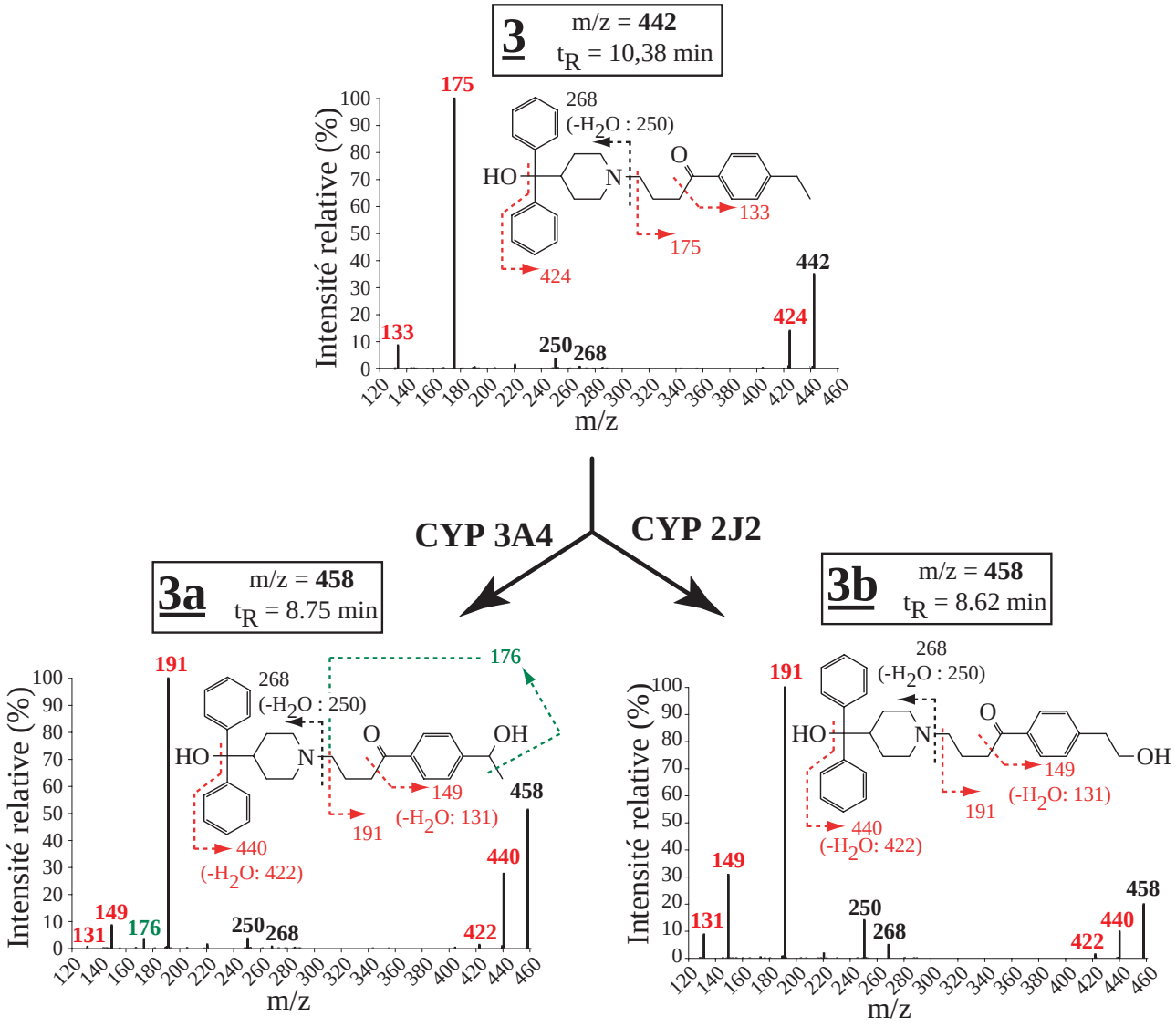
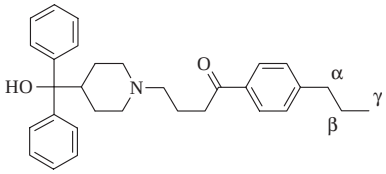


Figure IV.3 – **Spectres de fragmentation SM^2 et assignations structurales des fragments pour les deux métabolites 3a et 3b (m/z = 458) formés après oxydation du composé 3 par le CYP 2J2 et le CYP 3A4.** Les fragments indiqués en noir (respectivement en rouge) représentent les fragments dont la masse ne change pas (respectivement dont la masse augmente de 16) après oxydation. Le fragment caractéristique du métabolite **3a** est indiqué en vert.

Tableau IV.3 – **Régiosélectivité d'oxydation des analogues de terfénadone par le CYP 2J2.**



Composé	Position d'hydroxylation		
	α	β	γ
3	2 %	**98 %**	-
4	5 %	**85 %**	10 %
5	1%	**99 %**[a]	

(a) : époxydation de la double liaison.

La position β, ou **homobenzylique**, favorisée dans le cas du CYP 2J2, n'est pas la plus réactive sur le plan chimique. En effet, le carbone **benzylique** est toujours le plus réactif vis-à-vis des oxydants. Un résultat analogue est obtenu dans le cas du composé **5**, car la position benzylique-allylique α est chimiquement très réactive et pourtant peu hydroxylée par le CYP 2J2.

Pour expliquer une telle régiosélectivité, qui ne va pas dans le sens de la réactivité chimique des différentes liaisons C-H, il faut supposer que les substrats soient bien reconnus par le site actif du CYP 2J2 (valeurs de K_m faibles) et que cette reconnaissance s'accompagne d'un positionnement très contraint au sein de ce site actif qui maintiendrait la position benzylique trop loin du fer pour qu'elle puisse être oxydée.

IV-1.2.2 Comparaison avec le CYP 3A4.

Nous avons décidé de comparer la régiosélectivité du CYP 2J2 avec celle du CYP 3A4. Cette isoforme, la plus abondante au niveau hépatique chez l'homme, possède un large site actif ce qui implique que la régiosélectivité des réactions catalysées par le CYP 3A4 est souvent déterminée par la réactivité chimique intrinsèque des sites à oxyder *(Smith et Jones, 1992)*. De plus, le CYP 3A4 est capable d'hydroxyler l'ébastine et la terfénadone sur le même site que le CYP 2J2, même si cette hydroxylation est minoritaire par rapport à la N-déalkylation oxydante de sa fonction amine (cf chapitre **II**). Les activités d'hydroxylation des dérivés de la terfénadone par le CYP 3A4 ont été mesurées et sont représentées en figure IV.4.

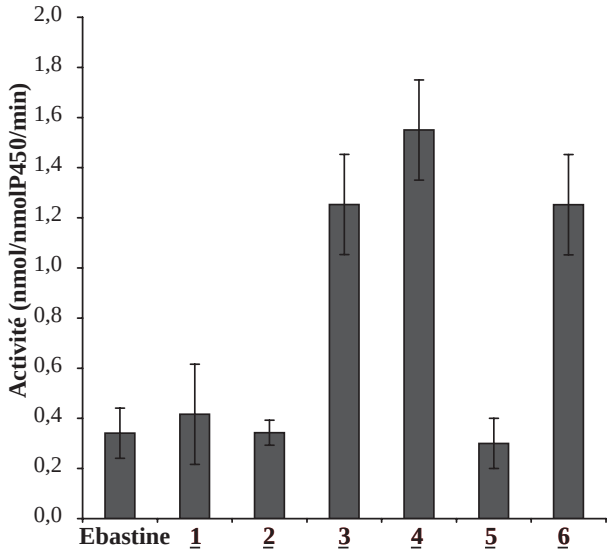
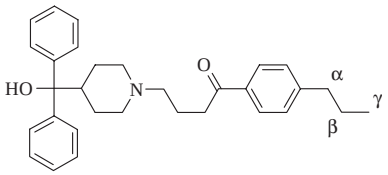


Figure IV.4 – **Activités d'oxydation par le CYP 3A4 des composés analogues de la terfénadone**. La concentration en substrat est de 20 μM, pour une incubation de 30 minutes. Les valeurs obtenues sont calculées en moyennant les résultats obtenus pour 3 expériences distinctes, les barres d'erreurs représentant l'erreur standard.

Les activités d'oxydation du groupe **R** sont du même ordre de grandeur quel que soit le substrat (0,4 à 1,6 nmol/mol P450 $^{-1}$/min^{-1}) et sont généralement très inférieures à celles relevées pour le CYP 2J2 (figure IV.2), comme cela avait été montré pour l'ébastine et la terfénadone (voir chapitre **II**). La structure des composés formés à la suite de l'oxydation par le CYP 3A4 a également été déterminée, et les proportions de ces régioisomères sont indiquées dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4 – **Régiosélectivité d'oxydation des analogues de terfénadone par le CYP 3A4**.



Composé	Position d'hydroxylation		
	α	β	γ
3	**98 %**	2 %	-
4	**88 %**	9 %	3 %
5	**81 %**	19 %[a]	

(a) : époxydation de la double liaison.

Contrairement au CYP 2J2, la position benzylique α est favorisée dans tous les cas, ce qui est en accord avec la vitesse d'hydroxylation du composé **2** proche de celles des autres composés. Dans le cas de cette isoforme dont le large site actif ne permet pas un positionnement contraint des substrats, le site d'hydroxylation favorisé est la position sur la chaîne carbonée la plus réactive.

Le cas particulier du composé **5**, substrat suicide du CYP 2J2 (voir partie III-2.7), permet d'illustrer l'implication de la différence de régiosélectivité des CYP 2J2 et 3A4 dans le caractère inactivant de cet inhibiteur. En effet, la fixation covalente de **5** se produit après oxydation de la double liaison. Le CYP 2J2 catalyse principalement cette réaction, tandis que le CYP 3A4 n'oxyde qu'à 19 % cette double liaison. On pourrait donc s'attendre à ce que **5** ne soit pas ou très peu substrat suicide du CYP 3A4. L'inhibition du CYP 3A4 par **5** est en effet peu dépendante du temps, comme l'indique la figure IV.5, qui compare l'inhibition dépendante du temps par **5** observée pour le CYP 2J2 et le CYP 3A4.

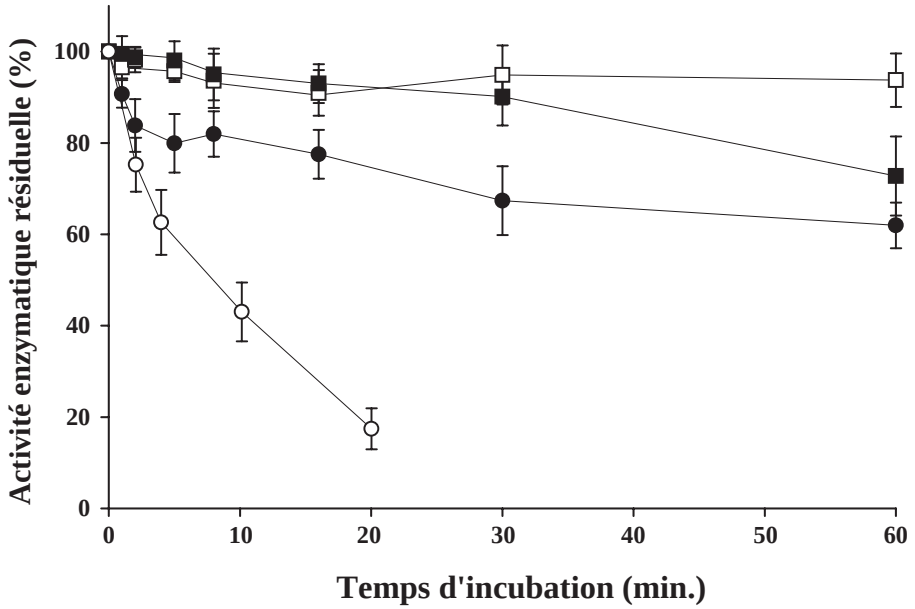


Figure IV.5 – **Inhibition dépendante du temps par 5 du CYP 3A4, comparé au CYP 2J2**. Les activités résiduelles de 6β-hydroxylation de la testostérone (pour le CYP 3A4) ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes. Les incubations ont été réalisées en présence de système générateur de NADPH et de 20 μM de **5** (●). Deux expériences témoins ont été réalisées, l'une en absence de **5** (■), l'autre en absence de système générateur de NADPH (□). L'inhibition par **5** de l'activité d'hydroxylation de l'ébastine par le CYP 2J2 (○) est issue de la figure III.10.

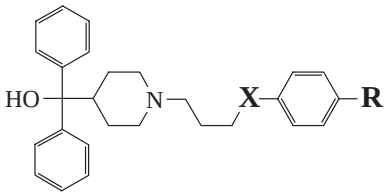
Le CYP 3A4, qui possède un large site actif, oxyde le groupe **R** des dérivés de la terfénadone en position **benzylique**, plus réactive. Ceci appuie notre hypothèse d'un site actif du CYP 2J2 plus restreint, qui favoriserait l'oxydation en position homo-benzylique, moins réactive, par positionnement contraint des substrats.

IV-1.3 Importance de la cétone en *para* du groupe R dans la reconnaissance et la régiosélectivité d'hydroxylation des composés 3 à 5 par le CYP 2J2.

Nous avons décidé d'étudier l'importance de la fonction cétone dans la régiosélectivité d'hydroxylation des composés **3**-**5**. L'analyse des CI_{50} des différents inhibiteurs du CYP 2J2 présentés dans le chapitre **III** a montré que cette fonction cétone était très importante pour l'affinité (tableau IV.5).

Tableau IV.5 – **Variation de l'affinité des inhibiteurs en présence ou en absence de la fonction cétone**.

Composé	-X	-R	CI_{50} (μM)
16	$-CH_2-$	$-(CH_3)_3$	$3,6 \pm 0,7^a$
1	-CO	$-(CH_3)_3$	$0,7 \pm 0,1$
17	$-CH_2-$	$-CH_2-CH_2-CH_3$	$4,1 \pm 0,9$
4	-CO	$-CH_2-CH_2-CH_3$	$0,4 \pm 0,1$



(a) : les valeurs indiquées sont celles du tableau III.1.

Nous avons également étudié la régiosélectivité d'hydroxylation du composé **17** par le CYP 2J2. Ce composé est identique au composé **4**, sans fonction cétone. Une analyse du milieu d'incubation par CLHP/SM[2] nous a permis d'identifier les métabolites formés (les spectres correspondants sont indiqués dans l'annexe B). Le schéma IV.6 indique la proportion des alcools obtenus après incubation.

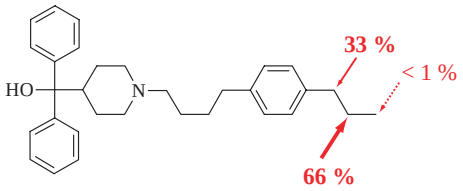


Figure IV.6 – **Régiosélectivité de l'hydroxylation du composé 17 par le CYP 2J2**.

Le composé **17** ne présente pas la même régiosélectivité d'hydroxylation que le dérivé **4**, car 33% de l'hydroxylation se produit sur le site benzylique, contre 5% pour **4**. Ainsi, la fonction cétone confère aux substrats dérivés de la terfénadone une bonne affinité vis-à-vis du CYP 2J2, et participe à la régiosélectivité observée. On peut donc en déduire que cette fonction chimique pourrait jouer un rôle dans le positionnement contraint des substrats au sein du site actif du CYP 2J2.

IV-1.4 Discussion.

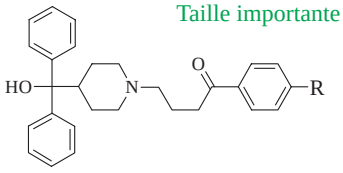
Certains dérivés de la terfénadone sont des substrats plus efficacement métabolisés que les substrats précédemment décrits, comme l'ébastine ou la terfénadone. Une affinité importante couplée à une bonne constante de vitesse en font d'excellents substrats utilisables comme marqueurs d'activité possibles du CYP 2J2.

L'étude de l'oxydation des composés **3** à **5** permet également de compléter l'analyse structure-affinité des dérivés de la terfénadone pour le CYP 2J2 esquissée dans le chapitre précédent. En effet, l'étude des CI_{50} des différents inhibiteurs avait permis d'identifier les motifs structuraux importants

pour l'affinité de ces composés, ainsi que d'émettre certaines hypothèses sur le site actif du CYP 2J2, rappelées ici :

– la présence d'un groupe **R** hydrophobe et relativement petit est nécessaire pour avoir des composés affins (voir tableau IV.6). Par conséquent, on peut supposer que le site actif près de l'hème doit être assez restreint et bordé par des résidus hydrophobes.

Tableau IV.6 – **Evolution de l'affinité des inhibiteurs en fonction de la taille et de la polarité du groupe R**.



Composé	-R	IC_{50} (μM)
11	-Br	8
12	$-CH_2-CHF_2$	2,2
10	$-OCH_3$	7,6
15	$-(CH_2)_2-NHAc$	23
7	$-CH_2-CH_2-OH$	1,3
8	$-(CH_2)_3-OH$	1,9
9	$-(CH_2)_3-OAc$	2,5
13	$-O-CH_2-O-$	6,7
1	$-C(CH_3)_3$	0,7
6	$-(CH_2)_3-CH_3$	0,7
5	$-CH_2-CH=CH_2$	0,4
4	$-CH_2-CH_2-CH_3$	0,4
3	$-CH_2-CH_3$	0,6
2	$-CH_3$	0,7

– la fonction cétone en *para* de **R** assure également une bonne affinité des dérivés de la terfénadone pour le CYP 2J2. Celle-ci doit donc être impliquée dans la fixation des inhibiteurs au sein du site actif.
– la présence d'une fonction polaire située à l'extrémité opposée au groupe **R** n'est pas déterminante pour l'affinité. Par contre, les deux noyaux phényles semblent être importants pour la reconnaissance des inhibiteurs par le CYP 2J2.

L'étude de la régiosélectivité d'oxydation des dérivés de la terfénadone par le CYP 2J2 montre qu'il y a un positionnement contraint de ces composés dans le site actif. En effet, seule une contrainte de distance entre la position benzylique α de **R** et le fer de l'hème pourrait expliquer la faible oxydation de ce carbone. En revanche, la position homo-benzylique pourrait être favorisée grâce au positionnement contraint des substrats favorisant l'accès de cette position au fer de l'hème. Cette hypothèse est appuyée par la régiosélectivité très différente d'oxydation des composés **3** à **5** par le CYP 3A4, dont le site actif plus large ne permettrait pas un tel positionnement contraint des substrats.

Cette étude a également confirmé l'importance de la cétone située en *para* du groupe **R** dans la reconnaissance des dérivés de la terfénadone. En effet, la perte de cette fonction s'accompagne d'une perte partielle de la régiosélectivité observée en faveur de la position homo-benzylique β. Ainsi, cette fonction serait impliquée dans le positionnement contraint des substrats dans le site actif du CYP 2J2, par exemple grâce à une liaison hydrogène entre cette cétone et un groupe donneur de liaison hydrogène de la protéine (voir figure IV.7).

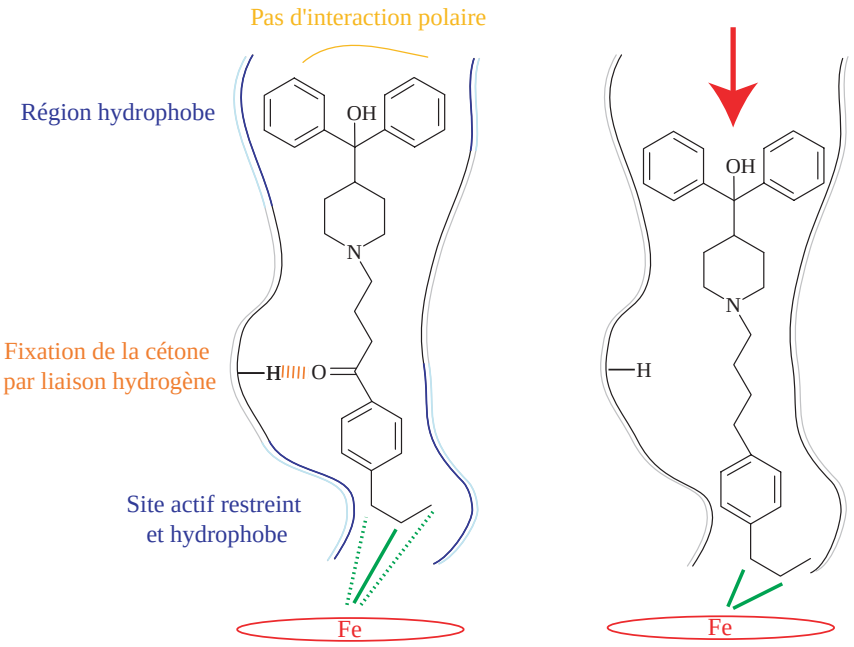


Figure IV.7 – **Schéma des interactions supposées entre les substrats analogues de la terfénadone et le site actif du CYP 2J2 en présence (A) ou en absence (B) de la fonction cétone du substrat**.

IV-2 Construction et utilisation d'un modèle 3D du CYP 2J2.

Les expériences *in vitro* précédentes nous ont permis de caractériser des interactions importantes entre les analogues de terfénadone et le site actif du CYP 2J2. L'absence de structure cristallographique du CYP 2J2 nous a amené à construire un modèle par homologie de ce P450, qui a ensuite été utilisé pour y *docker* certains composés au sein du site actif pour essayer de rendre compte des interactions mises en jeu lors de la fixation des analogues de terfénadone.

IV-2.1 Construction d'un modèle 3D du CYP 2J2 par homologie.

IV-2.1.1 Le serveur Swiss-Model comme outil de modélisation par homologie des P450s.

Pour la construction du modèle, nous avons choisi d'utiliser le programme Swiss-Model version 3.5 *(Schwede et al., 2003)* accessible sur le serveur suisse ExPASy à l'adresse suivante : *http://Swiss-Model.expasy.org*. Comme toute construction de modèle par homologie, cette méthode nécessite l'utilisation de structures 3D de référence, appelées *templates*, dont la séquence protéique doit être la plus proche possible de celle de la protéine à modéliser. Le modèle est ensuite construit en se basant sur un alignement des structures des *templates*, alignement qui dépend très sensiblement de la qualité de l'alignement des séquences primaires correspondantes. Dans la pratique, l'alignement structural devient fiable pour des séquences homologues à plus de 30 %. Ce logiciel présente l'avantage de permettre à un opérateur de laisser le programme construire automatiquement le modèle, mais également de manipuler tous les paramètres manuellement. Il est composé de plusieurs modules qui ont chacun leur rôle à jouer tout au long de la construction du modèle :

Recherche des structures *templates* à utiliser. Après soumission sur le serveur de la séquence de la protéine à modéliser, le module BLASTP la compare avec les séquences des protéines dont les structures 3D sont disponibles (Protein Data Bank), et en extrait les séquences les plus homologues *(Altschul et al., 1990).*

Définition des zones à modéliser. Le programme ne retient que les séquences dont l'identité locale de séquence est supérieure à 25 %, et définit les fragments de la séquence cible qui seront modélisés, en fonction de la similarité des séquences *templates*.

Alignement structural des *templates* et construction du modèle. Le programme ProMod *(Peitsch, 1996)* aligne les structures 3D des *templates*. Puis, les parties structurales des templates qui sont proches (spatialement) sont alors utilisées pour définir un nouvel alignement structural en séquences primaires des *templates*. La séquence de la protéine à modéliser est alors alignée sur cet alignement multiple. Les parties de la séquence cible qui n'ont pu être alignées (généralement les boucles) sont alors modélisées à partir d'une bibliothèque de fragments issue de la Protein Data Bank.

Minimisation énergétique. La minimisation énergétique de la structure obtenue est ensuite assurée par le logiciel GROMOS96 *(Scott et al., 1999).*

Le principal avantage pratique de cette méthode est sa rapidité, il faut compter environ 10 minutes pour générer un modèle, avec une bonne facilité d'utilisation. En revanche, le programme excluant les groupes prosthétiques, l'hème n'est pas présent dans le modèle obtenu, il faut donc le rajouter et minimiser l'ensemble P450 + hème.

Cette méthode automatique a été utilisée précédemment pour construire des modèles par homologie des CYP 2B6 *(Bathelt et al., 2002),* 11A1 ($P450_{scc}$) *(Sivozhelezov et Nicolini, 2005)* et 2E1 *(Vidali et al., 2004; Collom et al., 2007).* Pour valider cette méthode et affiner les paramètres à utiliser dans le cas du CYP 2J2, nous avons donc décidé de construire plusieurs modèles préliminaires de CYP dont la structure RX était résolue, sans optimisation supplémentaire, en comparant le modèle avec la structure cristallographique. Cette étude préliminaire ayant été réalisée fin 2004, je n'ai utilisé que les structures de P450s de mammifères disponibles à ce moment là, celles des CYP 2B4 (2 structures), 2C5 (3 structures), 2C8 (1 structure), 2C9 (3 structures) et 3A4 (4 structures).

Nous nous sommes affranchis de la recherche automatique des structures proches en séquence du CYP à modéliser, en sélectionnant nous-même les *templates* structuraux à utiliser pour construire le modèle. Le tableau IV.7 rapporte les résultats obtenus dans le cas du CYP 2C8. En partant de la séquence protéique et après utilisation de Swiss-Model, une comparaison globale du modèle obtenu avec la structure obtenue par diffraction de rayons X (pdb code 1PQ2), en terme de distance moyenne (au sens des moindres carrés, ou *Root Mean Square Deviation* ; RMSD) entre les carbones α ou entre les atomes du squelette peptidique, a été réalisée. Le choix des *templates* s'est porté soit sur une unique structure cristallographique, soit sur un groupe de 4 ou 5 structures.

Tableau IV.7 – **Comparaison des RMSDs entre la structure RX du CYP 2C8 et le modèle de 2C8 généré par Swiss-Model en partant des structures RX des CYP 2B4, 2C5, 2C9 et 3A4 comme *templates*.**

P450[a]	*pdb*	Substrat	Identité[b]	Homologie[b]	**RMSD (Å)**[c] **Cα**	**Squelette**
Utilisation d'un unique template						
2B4	*1PO5*	-	50 %	69 %	5,31	5,27
	1SUO	CPI[d]	50 %	69 %	1,73	1,71
2C5	*1DT6*	-	70 %	81 %	2,33	2,27
	1NR6	Diclofenac	70 %	81 %	1,28	1,28
	1N6B	DMZ	70 %	81 %	1,21	1,19
2C9	*1OG2*	-	75 %	84 %	1,09	1,13
	1OG5	Warfarine	75 %	84 %	1,08	1,13
	1R9O	Flurbiprofène	75 %	84 %	2,77	2,74
3A4	*1TQN*	-	23 %	38 %	4,32	4,25
	1W0E	-	23 %	38 %	3,24	4,25
	1W0G	Metyrapone	23 %	38 %	2,91	2,89
Utilisation d'une combinaison de templates						
2C5	*1NR6*	Diclofenac	70 %	81 %	1,00	1,03
2C5	*1N6B*	DMZ				
2C9	*1R9O*	Flurbiprofène				
2C9	*1OG2*	-	70 %	81 %		
2C9	*1OG5*	Warfarine				
2B4	*1SUO*	CPI	50 %	69 %	1,48	1,45
2C5	*1N6B*	DMZ[d]	70 %	81 %		
2C9	*1OG5*	Warfarine	75 %	84 %		
3A4	*1W0E*	-	23 %	38 %		

(a) : Les lignes du tableau représentent les différents modèles de 2C8 générés à partir de la structure tridimensionnelle du P450 indiqué.

(b) : Les calculs d'identité et d'homologie de séquence ont été réalisés en utilisant le programme CLUSTALW (*http://www.ebi.ac.uk/clustalw*).

(c) : Le calcul de RMSD a été effectué après superposition des deux structures par le logiciel Swiss-pdb-viewer (en utilisant l'otion *magic fit*) *(Guex et Peitsch, 1997).* (d) : CPI : 4-Chlorophénylimidazole ; DMZ : 4-methyl-N-methyl-N(2-phenyl-2H-pyrazol-3-yl)benzenesulfonamide.

Les modèles de CYP 2C8 obtenus sont pour certains très proches de la structure 3D de l'enzyme, avec des RMSD proches de 1 Å, calculés sur les C_α ou le squelette peptidique. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant les structures du CYP 2C5 complexé avec le diclofénac ou le MDZ, certaines structures du CYP 2C9, mais également une combinaison de ces structures. Mais l'utilisation du CYP 2B4 (pdb 1SUO) donne également un résultat relativement correct (RMSD = 1,7 Å), malgré une identité de séquence plus faible. Les modèles obtenus en utilisant le CYP 3A4 sont évidemment moins proches de la structure RX du CYP 2C8, car la faible identité de séquence avec le 3A4 ne permet pas d'obtenir un bon modèle.

Le même protocole a été employé pour construire des modèles des CYPs 2B4, 2C5 et 2C9. Dans la majorité des cas, une précision surprenante du RMSD calculé pour les carbones α ou le squelette

peptidique a été obtenue compte tenu de l'automaticité et de la rapidité de la méthode. Nous avons ainsi pu construire un modèle de CYP 2B4 en utilisant des structures RX plus récentes de la famille 2 (CYPs 2A6, 2C8 et 2C9 ; pdb 1Z11, 1PQ2, 1OG2) dont le RMSD avec la structure RX du CYP 2B4 contenant le chlorophénylimidazole (pdb 1SUO) était inférieur à 1,5 Å sur l'ensemble du squelette peptidique.

Enfin, le positionnement des chaînes latérales des résidus du site actif est proche de celui observé dans les structures RX. Par exemple, un calcul de RMSD de l'ensemble des atomes d'une trentaine de résidus du site actif, entre un modèle de CYP 2C9 et la structure RX correspondante (pdb 1R9O) est de l'ordre de 1 Å. De plus, ces différences ne sont pas plus grandes que celles observées dans les autres modèles de P450s générés au laboratoire, comme par exemple pour les résidus importants pour la reconnaissance des substrats par le CYP 2C9 (voir figure IV.8). Le modèle présenté est issu de la thèse de C. Marques-Soares *(Marques-Soares, 2002)* ; un autre modèle généré par C. Minoletti *(Minoletti, 1998)*, qui donne le même résultat n'est pas représenté pour plus de clarté.

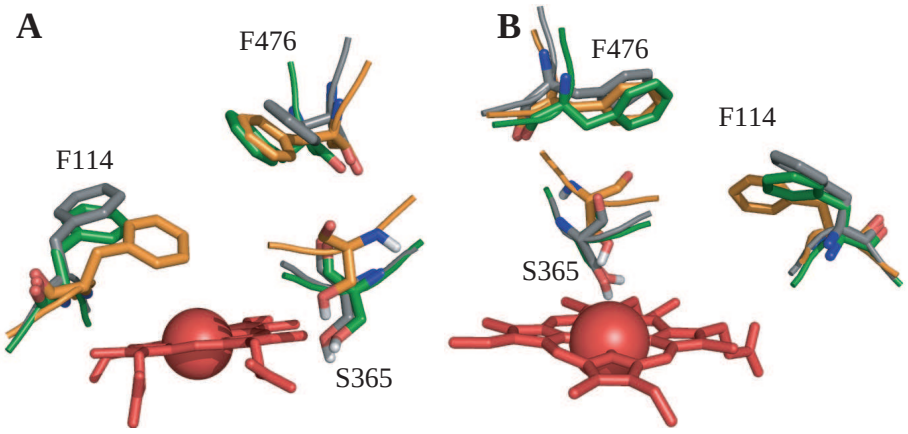


Figure IV.8 – **Comparaison du positionnement des résidus F114, S365 et F476 du CYP 2C9 dans différents modèles et dans la structure cristallographique**. Deux vues (**A**) et (**B**) sont représentées. La structure obtenue par RX (pdb 1RO9) est représentée en gris, le modèle généré dans cette étude par Swiss-Model en vert, celui obtenu par C. Marques en orange.

Ainsi, sans optimisation particulière, le modèle généré est relativement précis et acceptable. Plusieurs conclusions ressortent de cette étude préliminaire, qui peuvent permettre d'améliorer l'utilisation de ce protocole :

- Plusieurs structures de départ doivent être utilisées comme *templates*, car la précision semble être meilleure par rapport à l'utilisation d'un seul *template*.
- La forte représentativité des CYPs 2C peut impliquer des erreurs dans le modèle d'un P450 autre que 2C, car en utilisant beaucoup de structures de la sous-famille 2C, le modèle obtenu serait très proche des CYPs 2C. Il faut donc éviter de choisir trop de *templates* parmi cette sous-famille pour ne pas biaiser la construction du modèle.
- La structure ouverte du CYP 2B4 (pdb 1PO5, voir figure I.16) est trop différente des autres structures de P450s de la famille 2. Son utilisation comme *template* pourrait générer un modèle trop ouvert, ce qui n'est pas envisagé.
- L'utilisation du CYP 3A4 comme *template* pour modéliser les CYPs de la famille 2 ne semble

pas être judicieuce, car le logiciel exclut souvent cette isoforme, du fait de la faible homologie de séquence (proche de 25%). De plus, le repliement des hélices F-G dans les différentes structures de 3A4 publiées semble être un cas à part chez les P450s *(Scott et Halpert, 2005).*

Le serveur Swiss-Model permet de construire des modèles de P450s relativement proches des structures RX de ces mêmes P450s. Il est donc envisageable d'utiliser un tel programme pour modéliser par homologie le CYP 2J2.

IV-2.1.2 Construction et validation du modèle.

Notre choix de *templates* s'est porté sur les structures cristallographiques des cytochromes de la famille 2. Avec plus de 40 % d'identité, ce sont des structures de choix pour construire un modèle de P450 de cette même famille. Cependant, le serveur n'acceptant que 5 *templates* initiaux, nous avons donc restreint notre choix en se basant sur plusieurs critères :

– Toutes les sous-familles de P450s pour lesquels une structure RX a été publiée (2A, 2B, 2C et 2D) sont utilisées pour fournir les *templates*, afin de permettre un spectre plus large de structures.
– Parmi toutes les structures RX de la famille 2, 8 ont un substrat ou ligand au sein de leur site actif, 5 sont des CYPs sans substrat. Les variations de chaînes latérales et de repliement pouvant varier fortement en présence ou non de substrat *(Wester et al., 2003b; Scott et al., 2003, 2004),* nous avons choisi comme *templates* des structures avec et sans substrat.

En prenant en considération tous ces critères de choix, nous avons décidé d'utiliser les structures cristallographiques de 5 P450s différents (tableau IV.8).

Tableau IV.8 – **Structures utilisés pour construire le modèle de CYP 2J2**.

CYP	Code pdb	*Substrat*	Nombre d'acides aminés	Identité (*Homologie*) de séquence avec le CYP 2J2
2A6	1Z11	*Methoxalène*	476	42% (*62%*)
2B4	2BDM	*Bifonazole*	476	44% (*64%*)
2C5	1NR6	*Diclofénac*	473	41% (*61%*)
2C8	1PQ2	-	476	41% (*59%*)
2D6	2F9Q	-	479	42% (*61%*)

Après soumission de la séquence protéique du CYP 2J2 (code SwissProt P51589) au serveur Swiss-Model et sélection des *templates* à utiliser, le programme a généré un modèle privé de son hème. Le fichier des évènements créé lors de la construction du modèle par Swiss-Model est indiqué dans l'annexe C. A ce niveau de la modélisation par homologie, une pré-validation du modèle a été possible. En effet, le logiciel fournit également des outils pour valider le modèle en le testant par les algorithmes ANOLEA et WHATCHECK *(Hooft et al., 1996; Melo et al., 1997; Melo et Feytmans, 1998).* Le premier étudie les irrégularités énergétiques qui peuvent apparaître dans le modèle, tandis que le second se base sur des critères géométriques. Le résultat fourni par ANOLEA a été très proche de ceux obtenus pour des structures RX, et n'a pas présenté d'aberration au niveau énergé-

tique, comme l'illustre la figure IV.9. Un extrait du rapport fourni par WHATCHECK est également indiqué en annexe C, indiquant que le modèle a montré quelques imperfections mineures dans la structure tridimensionnelle de la protéine. Cependant, le modèle n'était pas encore affiné et ne contenait pas d'hème, les résultats des tests de validité présentés à ce niveau de la construction n'étaient pas représentatifs du modèle final obtenu après avoir ajouté l'hème et optimisé la structure.

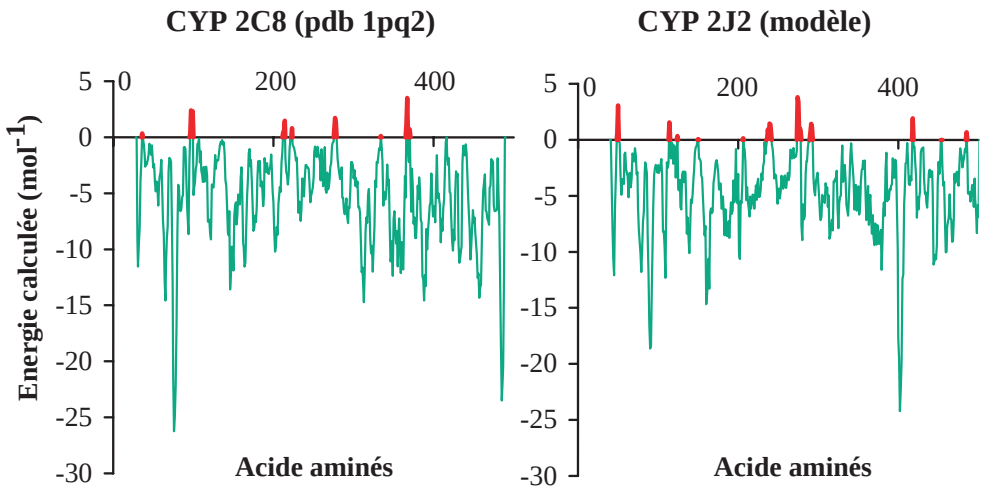


Figure IV.9 – **Courbes d'énergies calculée par ANOLEA du modèle de CYP 2J2, comparée à celle du CYP 2C8**. L'énergie calculée par le programme est divisée par la valeur k_bT où k_b est la constante de Boltzmann. On considère que les résidus dont l'énergie calculée est positive subissent des contraintes stériques fortes. Dans le cas du CYP 2J2, 4,3% de résidus sont dans ce cas, contre 3,5% pour le CYP 2C8.

L'hème est ajouté manuellement au sein du modèle en utilisant les coordonnées de ce groupe prosthétique dans une des structures cristallographiques utilisées précédemment (CYP 2C8, pdb 1PQ2). Comme tous les *templates* possédent un hème dans leur structure, le modèle contient encore l'espace correspondant, et l'hème peut être ajouté sans créer de contraintes stériques trop importantes.

La validation et l'optimisation du modèle 3D de CYP 2J2 ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. F. André, du CEA de Saclay. L'optimisation et l'affinement du modèle sont réalisés par plusieurs cycles de dynamique moléculaire *in vacuo* et de minimisation, jusqu'à atteindre un minimum d'énergie de l'ordre de -6000 kcal/mol (énergie relative propre au logiciel Sybyl, voir chapitre **VII**).

Plusieurs outils ont permis de valider ce modèle final :

– Le logiciel PROCHECK, couramment utilisé pour évaluer des structures tridimensionnelles *(Laskowski et al., 1993)*, a été utilisé. Ce programme calcule notamment un diagramme de Ramachandran représenté en figure IV.10. Dans le cas du CYP 2J2, la proportion de résidus dans la zone la plus probable est de 81 % (le même pourcentage calculé pour les 5 stuctures RX *templates* varie entre 84 % et 89 %). Le programme Procheck effectue une analyse géométrique de tous les résidus et extrait un score global de qualité. Le score calculé pour le modèle du CYP 2J2 est de 0,29, ce qui est considéré comme un modèle de bonne qualité, car inférieur à la valeur limite de 0,5 *(Morris et al., 1992)*. D'autre part, ce score issu de Procheck se situe dans la zone définie par les scores calculés dans les mêmes conditions pour les 5 *templates* (0,17 à 0,39). Le modèle obtenu après insertion de l'hème et optimisation énergétique est donc d'une qualité

comparable aux structures cristallographiques dont il est issu.

– La qualité du modèle est liée à la présence de toutes les interactions qui permettent la stabilité de la protéine, notamment en assurant la structuration et le repliement de la chaîne peptidique. Pour s'assurer d'une stabilité importante du modèle généré, une longue dynamique *in vacuo* à 300 K a été réalisée pendant 1 ns. Généralement, les dynamiques dans le vide ne dépassent pas 150 K pour éviter une dénaturation de la protéine. La stabilité d'une structure dans une dynamique dans le vide à 300 K est donc un bon test de la qualité du repliement. La structure tertiaire globale du modèle de CYP 2J2 est préservée tout au long de cette dynamique. La minimisation énergétique du modèle n'a pas mené sur un minimum local d'énergie qui aurait été surmonté lors de cette dynamique. On peut donc considérer que la structure du modèle obtenu est bien optimisée.

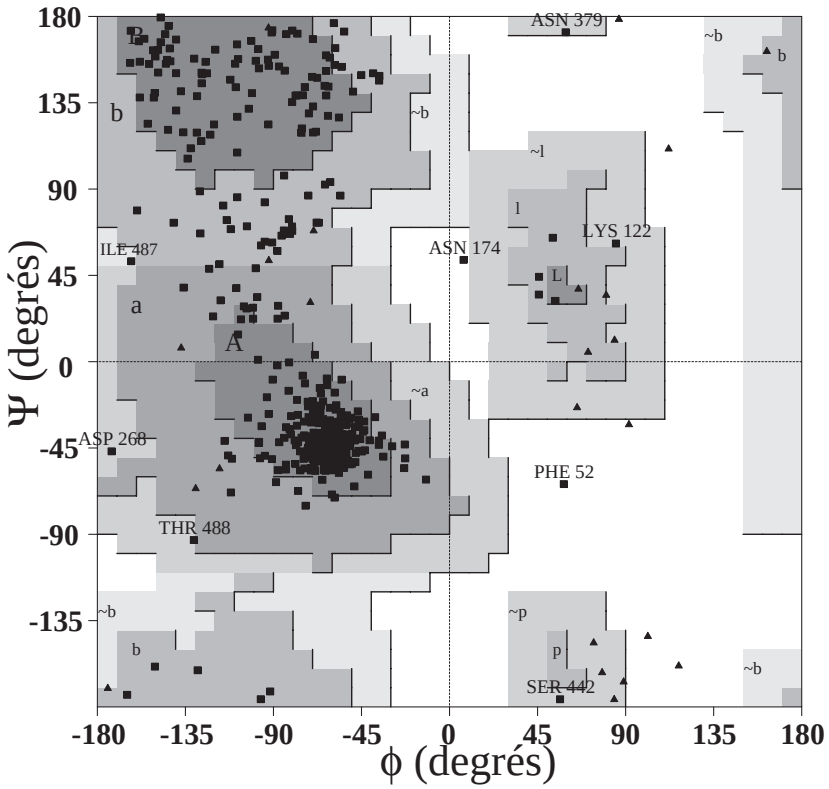


Figure IV.10 – **Diagramme de Ramachandran du modèle de CYP 2J2.** Les triangles correspondent aux résidus glycine et proline de la protéine, les carrés indiquent les autres résidus. Les résidus sont situés à 81 % (respectivement 18,5 et 0,5 %) dans les régions favorables (défavorables et interdites, respectivement).

IV-2.1.3 Description du modèle.

(a) Structure générale.

Les éléments de structures secondaires que présente le CYP 2J2 sont indiqués sur la figure IV.11, qui montre également l'alignement de la séquence du CYP 2J2 avec les résidus des 5 *templates* réalisé par le programme Swiss-Model. Ces éléments structuraux sont alignés entre eux, et le repliement du modèle final du CYP 2J2 est identique à celui des autres P450s, comme l'illustre la figure IV.12. Cette

homologie entre les structures est peu étonnante, du fait de l'utilisation de 5 P450s possédant cette structure tertiaire.

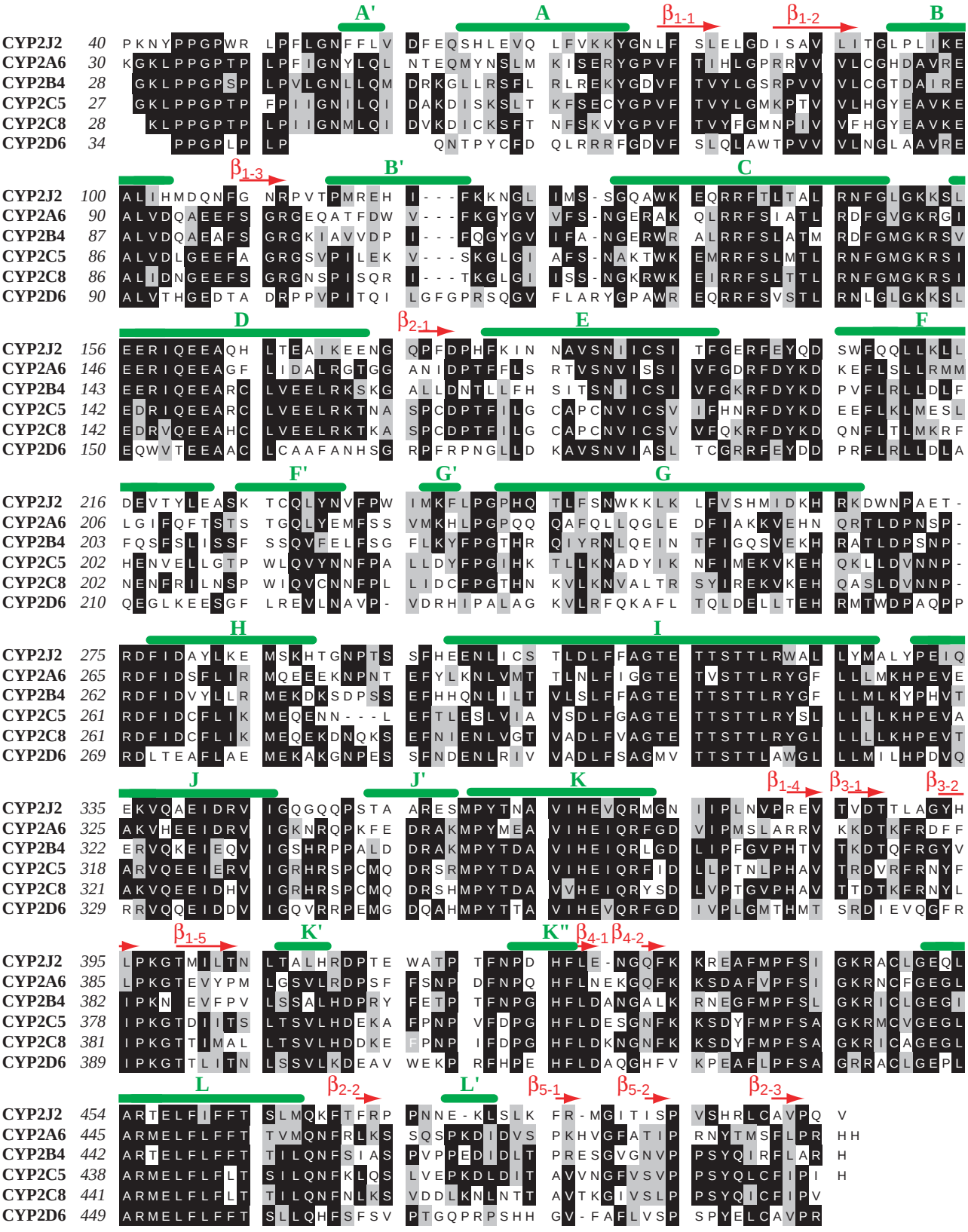
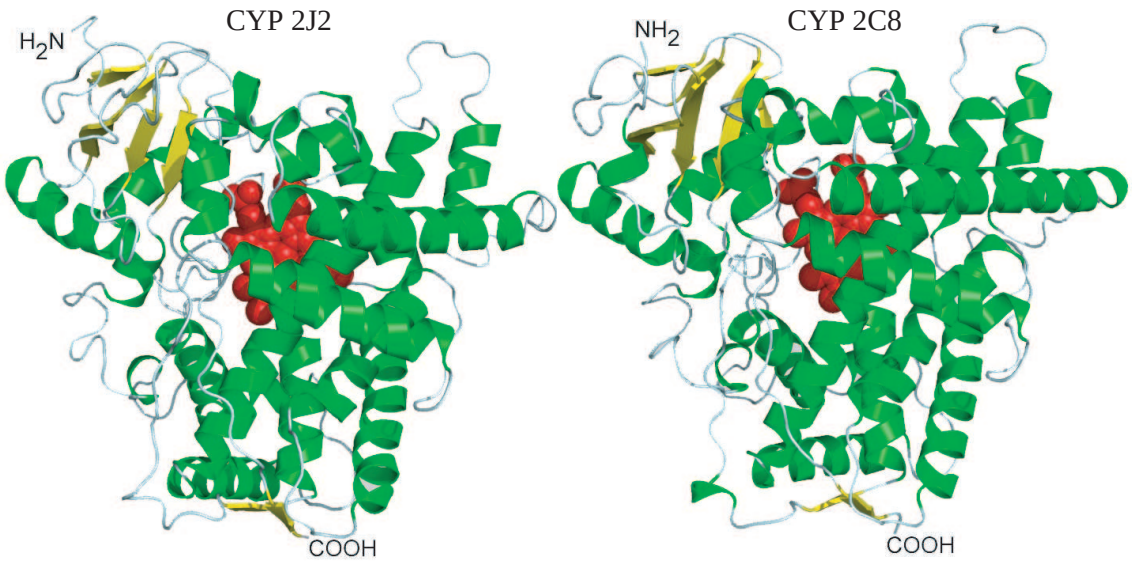


Figure IV.11 – **Alignement de séquence entre le CYP 2J2 et les P450s utilisés comme structures de référence, et éléments de stucture secondaire du modèle de CYP 2J2.** Les résidus communs à la totalité (resp. à la moitié) des 6 P450s sont en noir (resp. en gris). Les hélices sont indiquées en vert, les feuillets en rouge. Les éléments de stuctures secondaires sont nommées par référence à *Poulos et al., 1985* (voir introduction).

Figure IV.12 – **Structure du modèle de CYP 2J2 obtenu, comparée à la structure RX du CYP 2C8 (pdb 1PQ2)**.



(b) Description du site actif.

(b)-i Volume de la cavité.

La cavité définie par les résidus du site actif a été calculée par le logiciel VOIDOO *(Kleywegt et Jones, 1994)*, utilisé pour caractériser le site actif de certaines structures RX de P450s de mammifères *(Schoch et al., 2004; Yano et al., 2005)*. Afin de pouvoir comparer le volume de ce site actif avec ceux des autres P450s de mammifères de structure RX connue, différents modes de calcul ont été utilisés. Pour déterminer l'existence d'une cavité, tous les programmes (comme CASTP ou MOLCAD) utilisent une sphère (dont le rayon correspond généralement à celui d'une molécule d'eau) qui balaye l'espace disponible. Deux types de volumes sont alors calculés, définis respectivement par deux types de surfaces : la surface accessible au solvant (*SAS*), définie par le centre de la sphère, et la surface **moléculaire** accessible au solvant (*SMAS*) définie par les contacts de Van der Waals entre la protéine et la sphère (voir chapitre **VII**). Le volume dans le cas d'une cavité de type *SAS* est toujours inférieur à celui de la cavité correspondante de type *SMAS*. Le protocole de détermination de la cavité et de calcul du volume correspondant sont indiqués dans le chapitre **VII** "Protocoles Expérimentaux". Il est à noter que, dans certains cas, les cavités sont ouvertes sur l'extérieur par l'existence de canaux. Afin de calculer une valeur du volume, il est nécessaire de boucher virtuellement ces canaux par des molécules d'eau dont les coordonnées sont ajoutées manuellement au fichier de coordonnées de la structure du P450. On peut donc considérer que la valeur du volume indiquée est indicative, et qu'une erreur de plus ou moins 100 $Å^3$, liée à la définition de l'embouchure des canaux doit être envisagée.

Tableau IV.9 – **Volumes de site actif des cytochromes P450 de mammifères de structures RX publiées, d'une structure de CYP 3A4 (pdb 1TQN) après dynamique moléculaire, et du modèle de CYP 2J2**.

P450	Code pdb	Substrat	Volume calculé (Å^3)		Valeurs de la littérature	
			SMAS	*SAS*	**SMAS**	*SAS*
CYP 2A6	1Z10	*Coumarine*	**286**	*56*	-	-
	1Z11	*Methoxalène*	**262**	*49*	-	-
CYP 2B4	1PO5[a]	-	-[a]	-[a]	-	-
	1SUO	*Chlorophénylimidazole*	**271**	*32*	-	-
CYP 2D6	2F9Q	-	**484**	*65*	-	-
CYP 2C5	1DT6	-	**924**	*295*	-	360[c]
	1NR6	*Diclofénac*	**730**	*173*	645[d]	-
	1N6B	*DMZ*	**714**	150	-	-
CYP 2J2	-	-	**995**	146	-	-
CYP8A1	2IAG	-	**981**	*113*	-	350[e]
CYP 2C9	1OG2	-	**1450**	*441*	-	670[f]
	1OG5	*Warfarine*	**1617**	*467*	-	470[g]
	1R9O	*Flurbiprofène*	**1114**	*239*	-	-
CYP 2C8	1PQ2	-	**1578**	*345*	1438[d]	-
	-	*Acide rétinoïque*[h]	**1663**	*442*	-	-
CYP 3A4	1W0E	-	**1289**	*364*	950 [i]	520[i]
	1W0F	*Progesterone*	**1318**	*394*	-	-
	1W0G	*Metyrapone*	**1415**	*461*	-	-
	1TQN	-	**1576**	*354*	1386[j]	-
	-	Dynamique	**1713**	*447*	-	-
	2J0C	*Kétoconazole*	**2080**	*737*	1650[i]	-
	2J0D	*Erythromycine*	≈ **2300**[b]	≈ *900*[b]	≈2000[i]	-

(a) La structure est trop ouverte pour détecter une cavité.
(b) Les structures présentent une grande ouverture qui rend difficile un calcul exact du volume.
(c) *Williams et al., 2000.*
(d) *Schoch et al., 2004.*
(e) *Chiang et al., 2006.*
(f) *Williams et al., 2004.*
(g) *Williams et al., 2003.*
(h) Cette structure RX nous a été fournie par l'équipe de E.F. Johnson (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).
(i) *Ekroos et Sjogren, 2006.*
(j) *Yano et al., 2004.*

Les quelques valeurs volume de site actif de P450s, données par la littérature ont été calculées en utilisant l'un des deux modes de calcul (*SAS* ou *SMAS*), ce qui ne permettait pas de comparer les différentes valeurs de volume entre elles. Pour pouvoir comparer ces valeurs avec le volume du site actif du CYP 2J2 calculé dans ce travail, toutes les cavités des structures RX de P450s de mammifères ont été déterminées et les volumes correspondant ont été calculés en utilisant ces deux modes. Les valeurs obtenues, ainsi que celles données par la littérature sont reportées dans le tableau IV.9.

Pour s'assurer d'une faible variation de volume après une expérience de dynamique moléculaire, le volume du site actif du CYP 3A4 (pdb 1TQN) a été également calculé après une dynamique de

2ns dans l'eau. Une autre structure de P450 a été ajoutée à cette série, qui n'a pas été publiée, mais qui nous a été fournie par l'équipe de E.F. Johnson, du Scripps Research Institute (La Jolla, USA). Il s'agit du CYP 2C8 contenant 2 molécules d'acide rétinoïque, dont une est proche du fer de l'hème.

Par définition, le volume correspondant à la surface de Van der Waals (*SMAS*) de la cavité représente mieux l'espace disponible au sein du site actif. A partir des volumes de type *SMAS* présentés, on peut classer les différents P450s en fonction de la taille de leur site actif :

- Les cytochromes 2A6 et 2B4 présentent les sites actifs les plus petits ($\approx$ 300 Å^3). Ces P450s sont connus pour oxyder des substrats de petite taille *(Guengerich, 2005).*
- Quatre isoformes, dont les CYPs 2C5, 2D6 et 8A1 présentent des volumes de taille intermédiaire, compris entre 500 et 1000 Å^3. Le volume calculé pour le modèle de CYP 2J2 est de 995 Å^3, ce qui l'inclut dans ce groupe.
- Enfin, les CYPs 2C9, 2C8 et 3A4 ont les sites actifs les plus gros. Ces tailles importantes avaient déjà été indiquées pour les CYPs 2C8 et 3A4, capables de métaboliser des composés de très grande taille. Le volume est supérieur à 1000 Å^3 et peut atteindre 2300 Å^3, après déformation par un ou plusieurs substrats. On peut noter également que la dynamique n'induit qu'un changement de volume de moins de 10 % par rapport à la structure de 3A4 initiale.

(b)-ii Description de la cavité.

La valeur du volume de la cavité ne permet pas d'obtenir des informations tridimensionnelles de ce site actif. Il est donc nécessaire de s'intéresser à la forme de la cavité, notamment à proximité de l'hème. Dans le cas du CYP 2J2, cette cavité est en forme de cône tronqué, bordée par les hélices I, B', F et F' et possède deux extensions qui s'étendent jusqu'au feuillet β_1 (voir figure IV.13). Contrairement à certaines structures cristallographiques, il n'y a pas de canal visible dans la structure.

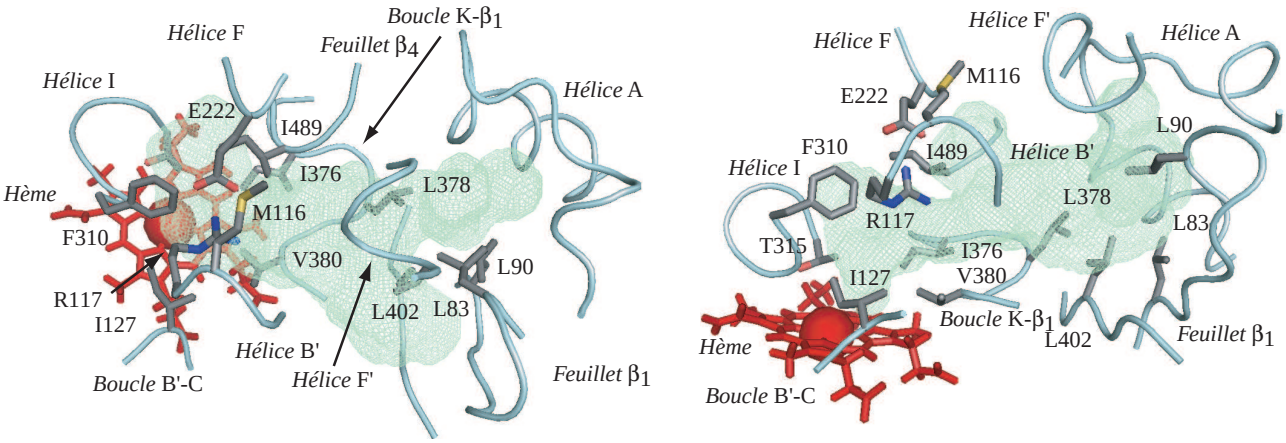


Figure IV.13 – **Site actif du modèle de CYP 2J2**. La surface de la cavité du site actif calculée par Voidoo est représentée en grillage vert. Les deux vues correspondent à une vue axiale (gauche) et coplanaire (droite) par rapport à l'hème.

Comparée à d'autres P450s dont le volume du site actif est équivalent, la partie de la cavité proche de l'hème est rétrécie dans le cas du CYP 2J2. Ceci est illustré par la figure IV.14, qui compare cette cavité à celle du CYP 2C5.

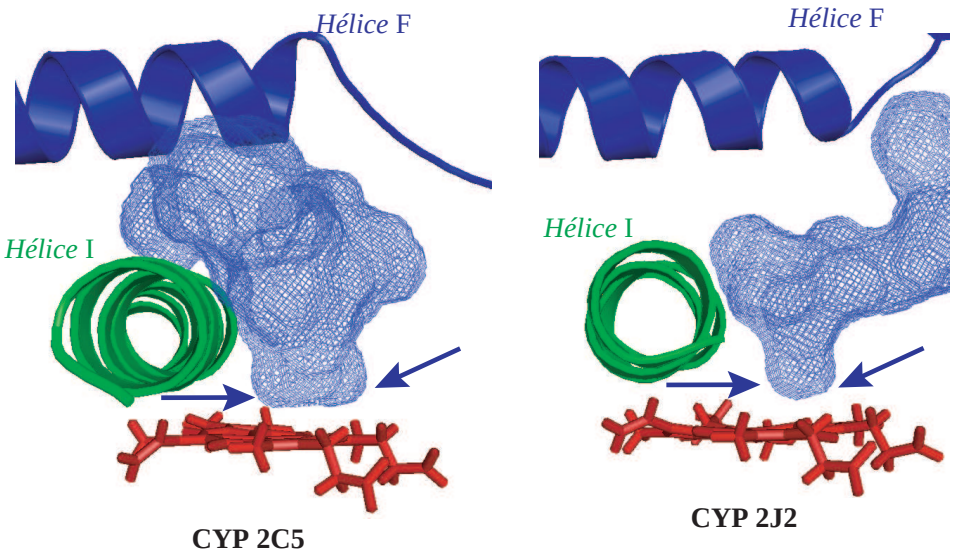


Figure IV.14 – **Comparaison de la cavité du site actif près de l'hème pour le CYP 2C5 (pdb 1NR6) et CYP 2J2**. La cavité du site actif est représentée sous forme de grillage bleu.

Les résidus qui bordent le site actif sont indiqués en figure IV.13. Dans le cas du CYP 2J2, les acides aminés proches de l'hème sont plutôt hydrophobes et relativement encombrants (isoleucines, phénylalanine, valine, alanine et thréonine). La restriction de l'accès au fer de l'hème observée en figure IV.14 est due à l'encombrement stérique important des chaînes latérales de ces résidus (figure IV.15).

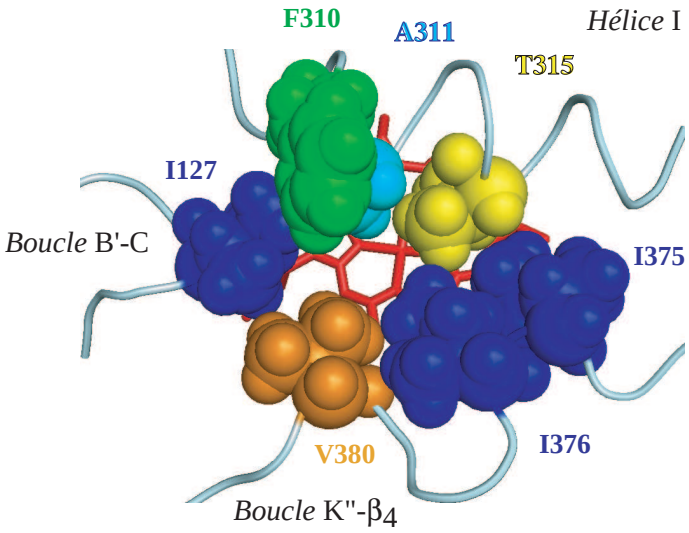


Figure IV.15 – **Résidus restreignant l'accès au fer de l'hème dans le site actif du CYP 2J2**. L'hème est représenté en rouge, les chaînes latérales des résidus impliqués sont représentées en sphères de Van der Waals.

IV-3 *Docking* des dérivés de la terfénadone dans le site actif du modèle de CYP 2J2.

Les expériences de *docking* ont été réalisées au CEA de Saclay (dans l'équipe de F. André). Afin de pouvoir déterminer le positionnement de la chaîne où a lieu l'hydroxylation et de tenter d'expliquer la régiosélectivité observée, les composés **1**, **2**, **3** et **4** ont été utilisés comme substrats pour le *docking*. L'importance de la fonction cétone dans la reconnaissance des substrats a pu être appréhendée en *dockant* le dérivé **17** au sein du site actif. Toutes les expériences de mise au point et d'affinement des paramètres ont été menées en utilisant la terfénadone comme ligand.

IV-3.1 Choix de la méthode de *docking* sous contraintes douces.

On distingue généralement plusieurs méthodes de *docking*, en fonction du modèle théorique dont elles s'inspirent :

- Les méthodes dites « rigides » où la protéine et le ligand sont fixes, selon l'approche *« Lock & Key »* (clé-serrure) du complexe ligand-récepteur *(Fischer, 1894).*
- D'autres méthodes, appelées « semi-flexibles » ou « flexibles » font varier la conformation du ligand ou/et de la protéine pour chercher les positionnements les plus favorables. Ces méthodes tendent à rendre compte de l'*« Induced Fit »*, modèle selon lequel la complexation ligand-récepteur s'accompagne de changements conformationnels de chacun des partenaires *(Koshland, 1958).*

Pour les P450s, enzymes dont l'adaptabilité de structure à la présence d'un substrat est très importante (voir partie I-1.3 de l'introduction), la flexibilité de l'enzyme et du substrat doit être prise en compte pour estimer le positionnement d'un substrat. D'autre part, le site actif est situé à l'intérieur de la protéine, sans ouverture vers l'extérieur clairement définie et dans certains cas, notamment pour le CYP 3A4, un phénomène de coopérativité entre substrats peut être observé.

Afin de pouvoir s'affranchir de toutes ces contraintes, l'équipe de F. André a mis au point une technique de *docking* applicable au cas des P450s, appelée *« Soft-Restrained Molecular Dynamics Docking »* (*Docking* par dynamique moléculaire sous contraintes douces) qui consiste à faire rentrer le substrat dans le site actif *(André et al., 2004; Delaforge et al., 2005).* Après avoir placé le substrat à l'extérieur de la protéine (voir figure IV.16), on applique une ou plusieurs contraintes de distance entre le ligand et le P450 lors d'une dynamique moléculaire, ce qui a pour effet de rapprocher le ligand du P450 (**A**). Si les paramètres des contraintes sont judicieusement choisis, le ligand peut trouver sa voie d'entrée au site actif, en passant par un canal d'accès, sans dénaturer la protéine (**B**). Enfin, la force à la sortie du canal est supprimée, et le ligand évolue de lui-même dans le site actif du P450 pour trouver un positionnement optimisant les interactions stabilisantes (**C**). Tous les paramètres utilisés lors de ces expériences sont indiqués dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

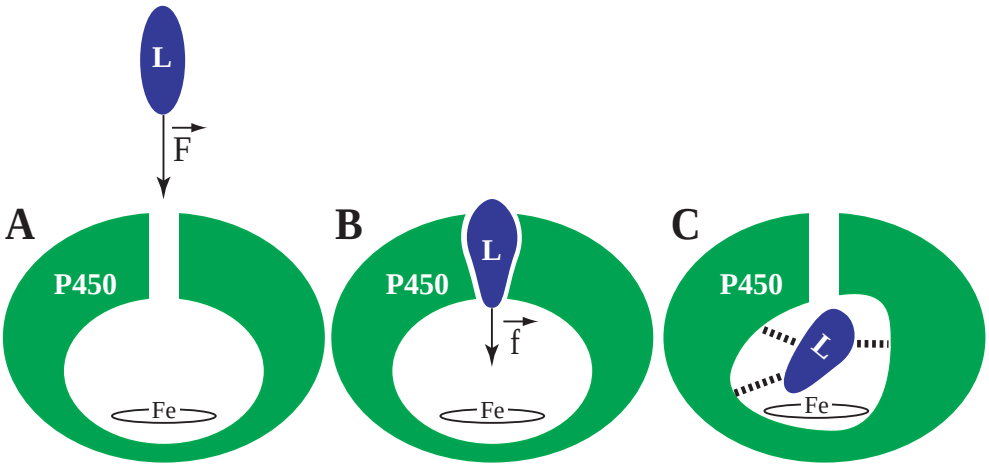


Figure IV.16 – **Schéma du protocole de *docking* par dynamique moléculaire sous contraintes douces**. Le ligand (L) subit la contrainte ($\vec{F}$), qui diminue au fur et à mesure vers une force de plus faible intensité $\vec{f}$, pour être annulée à la fin du *docking* et laisser évoluer le complexe ligand-P450. D'après *André et al., 2004.*

Cette approche a l'avantage de prendre en compte le changement de structure éventuel qui peut intervenir lors de l'entrée du substrat dans le canal d'accès. Mais un canal d'accès aux substrats doit être clairement identifié, afin d'orienter convenablement le substrat hors du P450, et de définir la contrainte initiale à appliquer. Dans le cas du CYP 2J2 et des composés à *docker*, le site actif est relativement étroit et allongé (8 Å sur 20 Å), tout comme les substrats (longueur de l'ordre de 25 Å) ; le substrat doit donc occuper en partie le canal d'accès et interagir avec les résidus formant ce canal d'accès. Ainsi, pour caractériser toutes les interactions qui pourraient intervenir dans la reconnaissance de ces composés, l'identification préalable du canal d'accès est nécessaire.

IV-3.2 Choix du canal d'entrée des substrats.

Plusieurs preuves expérimentales et arguments calulatoires démontrent l'existence chez les P450s bactériens d'un canal d'accès des substrats dont l'entrée est située entre la boucle F-G, l'hélice B' et le domaine en feuillet β (voir partie I-1.3 de l'introduction). Cependant aucune des structures RX des P450s de mammifères ne présente de canal d'accès clairement défini. Pour déterminer le canal à utiliser dans nos expériences de *docking*, plusieurs résultats issus de la littérature ont orienté nos choix :

- Dans la structure du CYP 2B4 sans substrat (pdb 1PO5), une rotation des hélices F, G, F' et G' autour de l'hélice I, par rapport à la structure contenant un substrat (pdb 1SUO) (voir figure I.16), a pour effet « d'ouvrir » la structure. Cette variation dans la structure de ce P450 membranaire montre la très grande flexibilité de cette région de l'enzyme, appuyant le choix d'un canal défini dans cette zone.
- Les différentes structures cristallographiques de P450s microsomaux, comme celles des P450s solubles, présentent des facteurs de température élevés de la boucle B-C, indiquant une flexibilité importante de cet élément structural.
- Les études de sortie de substrats par dynamique moléculaire menées par l'équipe de R.C. Wade *(Wade et al., 2005; Cojocaru et al., 2007)* montrent que trois canaux peuvent généralement

permettre l'accès des substrats dans le cas des P450s de mammifères. Les entrées de ces 3 canaux sont définies autour de l'hélice B'.

– Une autre étude par dynamique moléculaire sur la structure RX du CYP 2C9 a identifié un possible canal d'accès du substrat situé entre le feuillet β_1 et l'hélice B' *(Seifert et al., 2006).*

A partir de ces considérations et de l'observation visuelle de la cavité du site actif du CYP 2J2, nous avons décidé de choisir trois canaux, représentés en figure IV.17, pour tester notre méthode de *docking*.

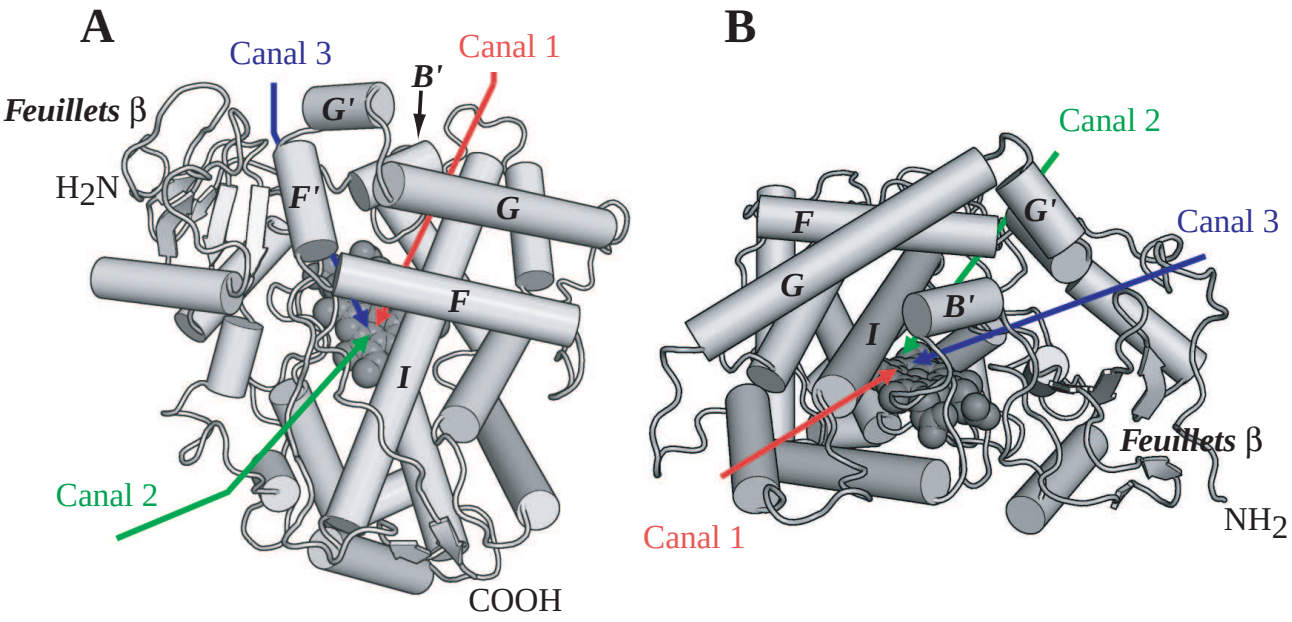


Figure IV.17 – **Canaux testés dans les expériences de *docking***. L'hème est représenté en sphères de Van der Waals, les hélices par des tubes (mode *cartoon*).

Les trois canaux choisis présentent les caractéristiques suivantes :

– Le **canal 1** est parallèle à l'hélice I et son entrée est délimitée par la boucle B'-C et les hélices I et G. Ce canal avait été identifié comme possible entrée des substrats par l'équipe de E.F Johnson dans le cas du CYP 2C5 *(Wester et al., 2003a).*

– Le **canal 2** est situé perpendiculairement à l'hème, et son entrée est bordée par les hélices F, I et par le feuillet β_5 de la partie C-terminale. Ce canal est usuellement considéré comme le canal du solvant *(Cojocaru et al., 2007)*, par lequel les molécules d'eau participant à la catalyse ou à la structuration du site actif, arrivent dans la cavité.

– Le **troisième canal** est le canal « historique » identifié chez les P450s cytosolubles. Son entrée est encadrée par les hélices B', G' et le feuillet β_1.

Les résidus utilisés pour définir les entrées respectives des canaux d'accès sont indiqués dans le tableau IV.10.

Afin de déterminer le canal à utiliser pour *docker* les 5 substrats au sein du site actif du CYP 2J2, une approche expérimentale a été envisagée. Le protocole de *docking* utilisant les mêmes paramètres a été appliqué à la terfénadone en utilisant les trois canaux décris précédemment. La discrimination d'un canal a été réalisée en se basant sur plusieurs critères expérimentaux, qui ont permis de déterminer le

chemin d'accès le plus énergétiquement favorable.

Tableau IV.10 – **Résidus encadrant les entrées des canaux d'accès aux substrats**.

Canal	Résidus
1	Ile120, Gln245, Trp251, Lys255, Cys303
2	Asp179, Asp216, Trp220, Arg495, Lys497
3	Phe52, Gly84, Ile86, Val113, Pro115, Asn231

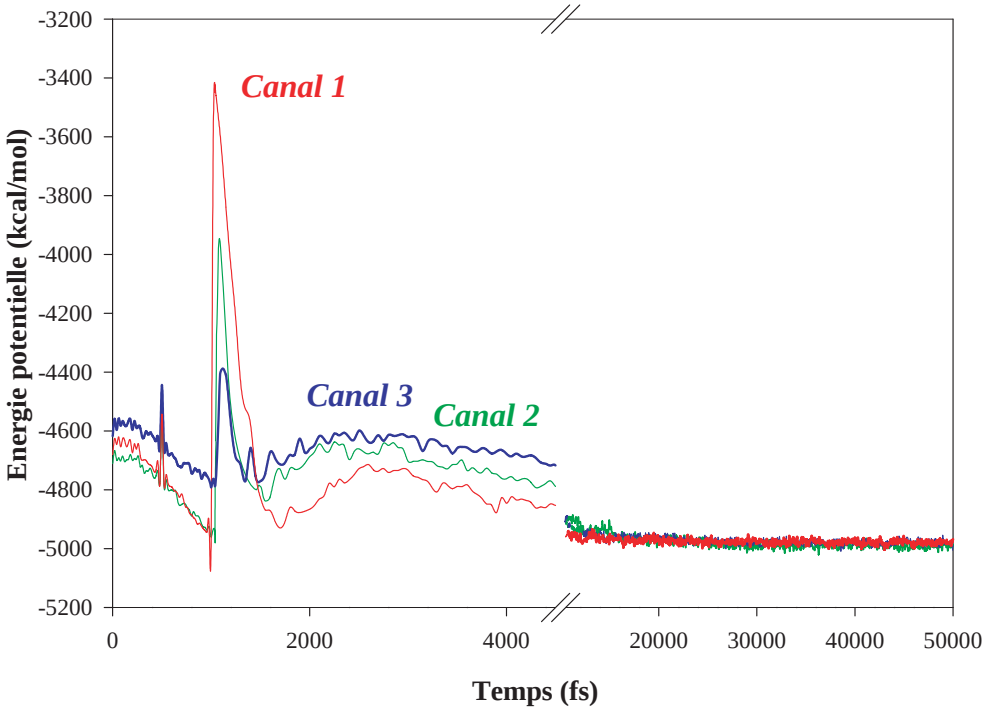


Figure IV.18 – **Energies potentielles calculées lors du *docking* de la terfénadone au travers des trois canaux**. L'énergie présentée est l'énergie donnée par le logiciel Sybyl, pour laquelle l'énergie potentielle de la contrainte a été soustraite. Les énergies sont obtenues pour une contrainte globale d'entrée de 12 kcal/mol.

- Pour chaque canal, plusieurs *dockings* ont été réalisés en diminuant progressivement la valeur de la contrainte imposée à la terfénadone (12, 9, 6 et 3 kcal/mol). Dans le cas des canaux 1 et 2, le substrat est stoppé dans le canal et la distance entre l'extrémité du substrat et le fer reste supérieure à 12 Å, indiquant que le composé ne traverse pas entièrement les deux canaux.
- L'analyse énergétique au cours des différents *dockings* montre que la barrière d'énergie à franchir est la plus importante dans le cas des canaux 1 et 2, par rapport au canal 3 (figure IV.18).

Suite à ces études préliminaires, le **canal 3** a été choisi comme canal d'accès des substrats lors des *dockings*.

IV-3.3 Description des complexes enzyme-substrat obtenus.

Les dérivés **1**, **2**, **3**, **4** et **17** ont été *dockés* dans le site actif du modèle de CYP 2J2, par le canal 3. Pour chaque composé, 3 *dockings* différents ont été réalisés, en changeant l'orientation initiale du substrat avant l'entrée dans le canal. Ce positionnement est tel que la liaison C-H subissant

l'hydroxylation pointe toujours vers le fer, car le site d'hydroxylation est bien identifié par les tests enzymologiques présentés précédemment. Il est nécessaire de préciser ici que ces expériences de *docking* ont pour but d'expliquer les résultats biochimiques obtenus et non de prédire le métabolisme du composé. Par conséquent, les substrats *dockés* dans le site actif ont toujours été orientés pour observer l'oxydation sur le groupe **R** en *para* de la fonction cétone.

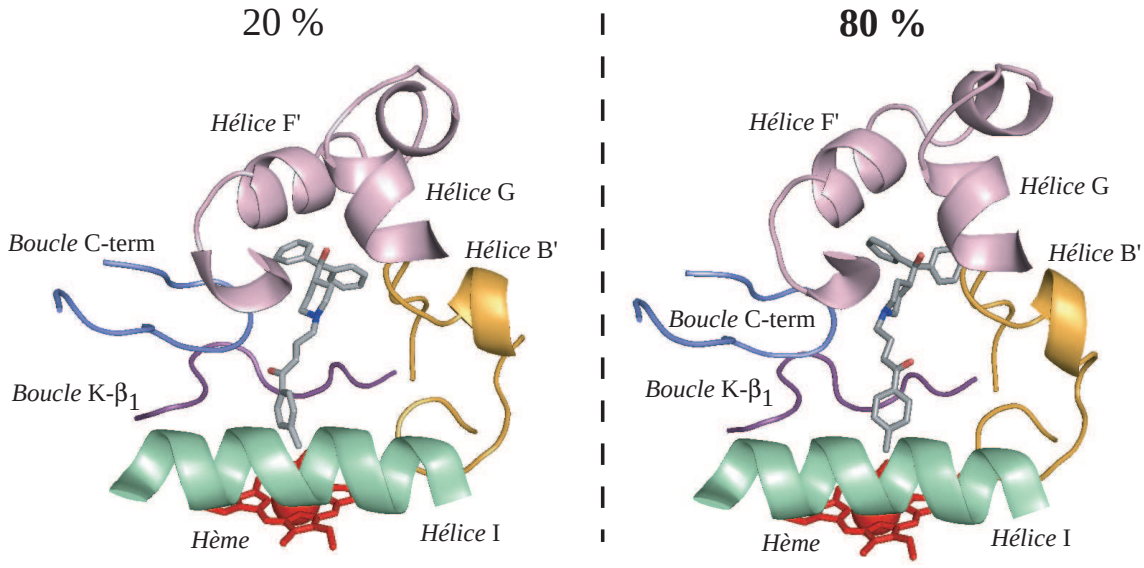


Figure IV.19 – **Positionnements du substrat 2 au sein du site actif du CYP 2J2**. Ces deux positionnements obtenus avec le composé **2** sont représentatifs des positionnements obtenus avec tous les autres substrats.

Après minimination énergétique des 15 *dockings* réalisés (pour une contrainte totale de 9 kcal/mol, voir chapitre **VII**), nous avons obtenu 3 modèles de complexe enzyme-substrat par composé. Dans tous les cas, l'énergie potentielle du complexe est inférieure à la somme des énergies potentielles calculées séparément de l'enzyme et du substrat, dans les mêmes conformations. Ceci indique que les interactions entre le substrat et la protéine sont globalement stabilisantes.

On observe deux positionnements représentés en figure IV.19, dont l'un est très majoritaire (80 % de l'ensemble des *dockings*, observés pour chacun des composés). La différence principale entre les deux positionnements est l'orientation de la fonction cétone, qui pointe soit vers l'hélice B' (80 %), soit vers la boucle K'-β_1. Nous avons choisi d'analyser le positionnement majoritaire, car plus reproductible et commun à tous les substrats testés.

Les composés prennent place au sein de la cavité représentée en figure IV.13, le groupe **R** près de l'hème et les deux noyaux phényles proches du feuillet β_1. Un schéma récapitulatif des interactions relevées est indiqué en figure IV.20. Plusieurs interactions importantes pour la reconnaissance des dérivés de la terfénadone par le site actif du CYP 2J2 sont observées (dans l'ordre, en s'éloignant progressivement de l'hème) :

– La partie de la molécule qui est oxydée est en contact avec les résidus hydrophobes et encombrants présentés en figure IV.15 (Ile127, Phe310, Ile376, Val380).
– Le groupe phényle n'a pas d'interaction de type π-*stacking* avec Phe310, mais la cétone est liée à la protéine par le résidu Arg117. Cette fixation du composé est stabilisée par une ou deux liaisons hydrogènes, selon le complexe CYP 2J2-substrat considéré.

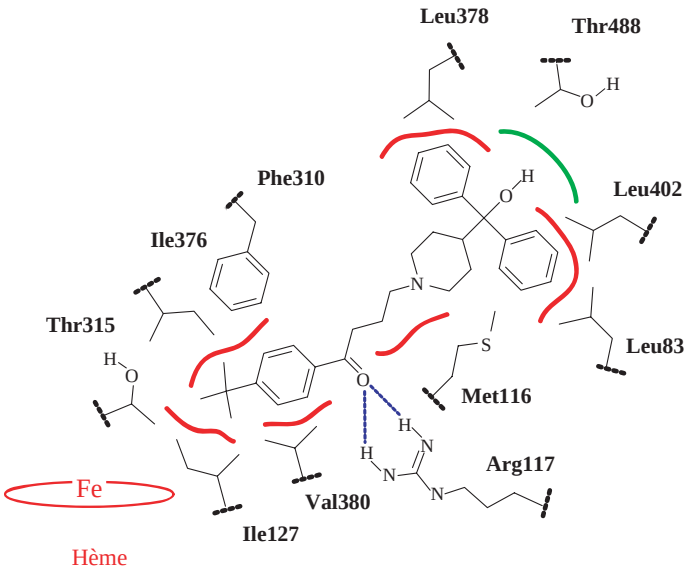


Figure IV.20 – **Interactions relevées dans les complexes CYP 2J2-substrats obtenus par *docking*.** Les interactions de Van der Waals sont indiquées en rouge, les liaisons hydrogènes en bleu. Une faible interaction polaire impliquant la fonction alcool de la terfenadone est représentée en vert.

– Il n'y a pas d'interaction notable entre la protéine et la longue chaîne carbonée au centre le la molécule, à part quelques interactions de type hydrophobe avec des résidus comme Met116.
– Les deux groupes phényles sont en contact avec plusieurs leucines, présentes dans le domaine des brins β. Les chaînes latérales de ces résidus entourent les deux noyaux aromatiques assurant un environnement hydrophobe optimal.
– Dans cette région, il n'y a pas de résidu pouvant interagir directement avec le groupe alcool. Le résidu polaire le plus proche, Thr488 est situé à 6 Å de cette fonction. Une petite poche moins hydrophobe est néanmoins présente dans cette partie de la cavité, dans laquelle se place cette fonction alcool.

Importance de Arg117 dans la régiosélectivité observé *in vitro*.

L'arginine 117 semble jouer un rôle important dans la fixation des substrats au sein du site actif. En effet, une comparaison du *docking* du composé **4** et de son analogue sans cétone **17** montre une grande variation de positionnement due à l'absence d'interactions avec Arg117 (figure IV.21).

Le composé **17** n'est plus maintenu par l'arginine et il peut se rapprocher de l'hème. Les distances obtenues entre les différents carbones hydroxylables du groupe **R** des composés *dockés* et le fer sont indiquées dans le tableau IV.11.

Dans les structures de complexes P450-substrat publiées dans la littérature, les distances observées entre le fer de l'hème et le carbone hydroxylé varient généralement entre 4 et 5 Å *(Poulos et Johnson, 2005)*. On observe généralement une corrélation entre la distance Fe^{III}-C et la régiosélectivité, même si les structures ne sont pas celles de l'état Fe^{V}=O où la liaison C-H est rompue (voir figure IV.22).

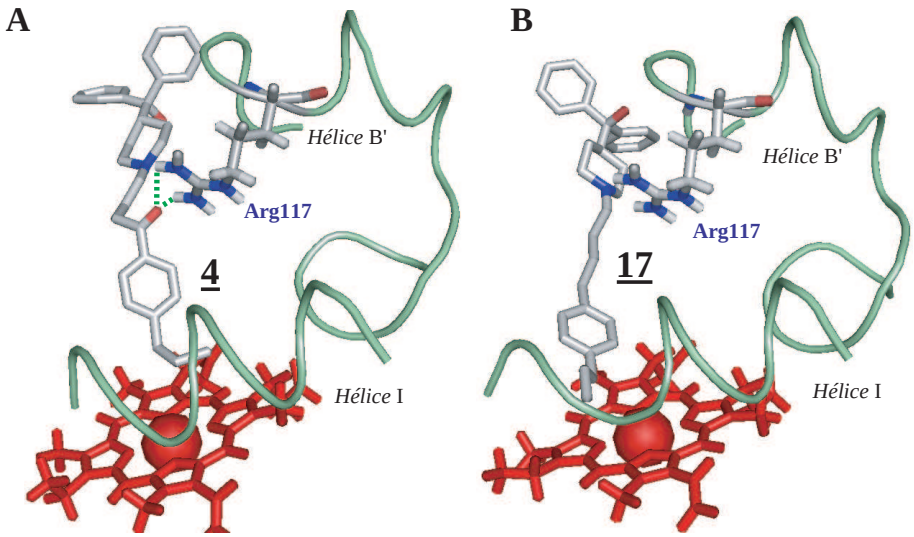


Figure IV.21 – **Positionnement des dérivés 4 (A) et 17 (B) au sein du site actif du CYP 2J2**.

Tableau IV.11 – **Distances (Å) entre les carbones hydroxylables et le fer pour les composés 2, 3, 4 et 17 et comparaison avec la régiosélectivité d'hydroxylation par le CYP 2J2**.

Substrat	(**R**)	**Modélisation** Distance[a] (Å)			**Enzymologie** Régiosélectivité[b]		
		C^{α}	C^{β}	C^{γ}	C^{α}	C^{β}	C^{γ}
2	(CH_3)	4,0 ± 0,1	-	-	100 %	-	-
3	(CH_2-CH_3)	5,1 ± 0,1	**3,9** ± 0,1	-	2 %	**98 %**	-
4	(CH_2-CH_2-CH_3)	4,9 ± 0,2	**3,8** ± 0,1	4,6 ± 0,1	5 %	**85 %**	10 %
17	(CH_2-CH_2-CH_3)	**4,2** ± 0,5	**4,4** ± 0,5	4,6 ± 0,1	**33 %**	**66 %**	< 1 %

(a) : Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes des distances obtenues pour les différents *dockings*.
(b) : D'après les données du tableau IV.3 et de la figure IV.6.

Les distances Fe-C figurant dans le tableau IV.11 sont dans cette fourchette puisqu'elles varient entre 3,8 ± 0,1 et 5,1 ± 0,1 Å. Toutefois, les valeurs absolues de ces distances doivent être considérées avec précaution puisqu'elles sont issues de ce qui n'est qu'un modèle. Il est néanmoins frappant de constater l'excellent corrélation entre ces distances calculées d'après le modèle et les valeurs expérimentales de régiosélectivité. Ainsi, l'hydroxylation majoritaire en position homobenzylique des composés **3** et **4** est en parfait accord avec les distances Fe-C^{β} les plus courtes (3,9 Å pour **3**, à comparer avec 5,1 Å pour la distance Fe-C^{α} ; 3,8 Å pour **4**, à comparer avec 4,6 Å et 4,9 Å pour Fe-C^{γ} et Fe-C^{α}). Dans le cas du composé **17**, les distance Fe-C deviennent très proches, ce qui est en accord avec la perte de régiosélectivité observée.

Le modèle construit pour le CYP 2J2 permet donc de bien rendre compte de la régiosélectivité surprenante observée pour les hydroxylations des composés **3** et **4**.

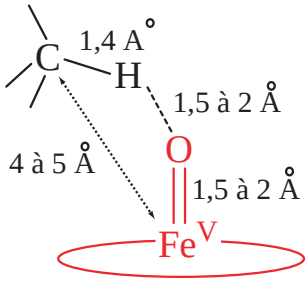


Figure IV.22 – **Distances supposées entre le fer du complexe activé Fer-oxo et le carbone subissant l'hydroxylation**.

IV-4 Conclusion.

La construction d'un modèle de CYP 2J2 et le *docking* de certains composés permettent de mieux comprendre les résultats expérimentaux obtenus dans le chapitre précédent concernant les inhibiteurs et leur affinité, et les résultats d'hydroxylation de certains dérivés de la terfénadone par le CYP 2J2, présentés plus haut. De nombreuses hypothèses émises dans la partie IV-1 se trouvent ainsi confirmées par l'analyse du modèle ou des *dockings*. De plus, l'approche par modélisation moléculaire permet d'identifier les résidus clés impliqués dans ces interactions :

1. Le site actif est très rétréci au voisinage direct de l'hème, car de nombreux résidus hydrophobes et de taille importante encombrent l'accès des substrats à l'hème. Cet espace d'accès des substrats au voisinage immédiat de l'hème explique l'affinité particulière des dérivés de la terfénadone porteurs d'un groupe **R** relativement petit et hydrophobe (affinité maximale pour **R** = propyle ou allyle). L'existence de cette petite cavité hydrophobe permet aussi d'expliquer la régiosélectivité surprenante en faveur de la position homobenzylique, observée pour l'hydroxylation des composés **3** et **4**. Cet encombrement stérique courbe notamment la chaîne de trois carbones du groupe propyle (figure IV.21), éloignant ainsi le carbone terminal du fer, ce qui pourrait expliquer l'hydroxylation minoritaire (10 %) observée sur la position γ (tableau IV.3).
2. Le groupe bi-phényle, situé à l'opposé de la partie hydroxylée, interagit avec la protéine par des interactions de type hydrophobe avec un grand nombre de leucines, sans qu'il y ait d'interaction de type π-*stacking*. Il n'y a pas d'interaction particulière avec la fonction alcool des dérivés de la terfénadone, ce qui confirme également les résultats expérimentaux, car cette fonction ne semblait pas avoir d'impact important sur l'affinité (tableaux III.1, III.2 et III.3).
3. Le rôle important de la fonction cétone dans la reconnaissance des substrats et son influence sur la régiosélectivité est expliquée par l'étude des structures CYP 2J2-substrat. Un résidu polaire, Arg117, interagirait avec cette fonction en augmentant l'affinité des composés porteurs de la fonction cétone. D'autre part, l'analyse des distances entre les carbones hydroxylables et le fer montre que cette interaction joue un rôle important dans le positionnement des substrats. Les distances relatives pour chaque substrat corrèlent bien avec les sites d'hydroxylation observés. Ainsi, dans le cas des composés **3** et **4**, la position homo-benzylique est plus proche du fer ; c'est aussi la position majoritaire d'hydroxylation. Le groupe propyle du composé **17** est globalement

plus proche du fer, du fait de l'absence de liaison hydrogène avec Arg117. Dans le cas de ce composé, les distances des carbones du groupe propyle au fer deviennent équivalentes, d'où la perte de régiosélectivité observée par rapport au cas de **4**. Il y a bien sûr une grande incertitude sur les distances fer-carbones estimées, et il est délicat de faire une corrélation quantitative entre ces distances et les régiosélectivités observées, d'autant plus que les distances importantes pour la détermination de la régiosélectivité ne sont pas les distances C-Fe^{III} du complexe 2J2-substrat à l'état natif, mais les distances C-Fe^{V} du complexe fer-oxo intermédiaire. Mais globalement, l'idée d'un glissement du composé vers le fer permet d'expliquer la régiosélectivité observée qui ne privilégie plus uniquement la position homo-benzylique.

Cette étude de la topologie du site actif du CYP 2J2 a été réalisée en combinant une analyse enzymologique sur une série de dérivés qui permet de déterminer les fonctions importantes des substrats pour la reconnaissance, et une étude *in silico* qui permet de proposer la nature des résidus de la protéine importants dans cette reconnaissance. La synthèse de nouveaux substrats ou d'inhibiteurs du CYP 2J2, plus affins et spécifiques pourra être envisagée au vu des résultats obtenus.

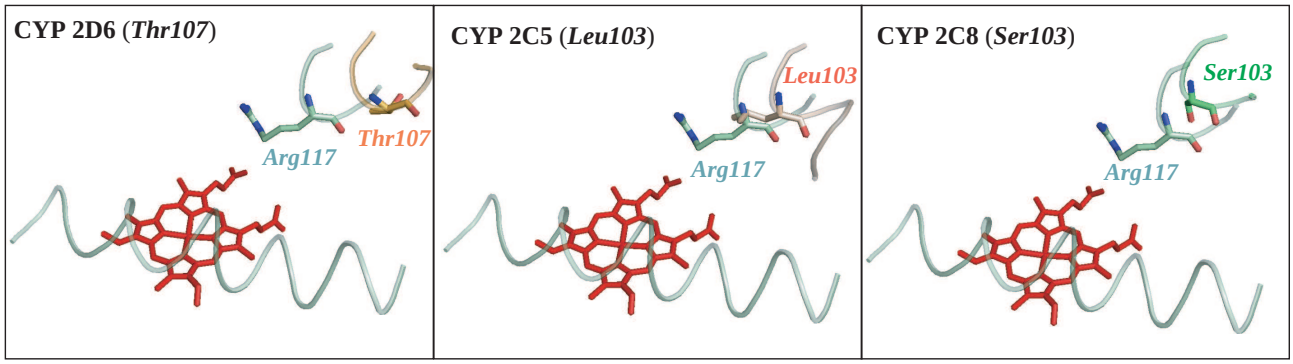


Figure IV.23 – **Comparaison du positionnement de l'arginine 117 du CYP 2J2 avec celui des résidus correspondants dans le cas des CYP 2C5, 2C8 et 2D6**. Les structures RX des CYP 2C5, 2C8 et 2C9 (code pdb 1NR6, 1PQ2 et 2F9Q, respectivement) ont été superposées sur le modèle du CYP 2J2 en utilisant le logiciel PYMOL.

De même, l'identification d'un résidu important pour la fixation des substrats qui comportent une fonction cétone, l'Arg117, permet de mieux prédire la reconnaissance de nouveaux composés. Cet acide aminé pointe au dessus de l'hème, au centre de la cavité, et sa longueur lui assure un rôle particulier au sein du site actif. Le positionnement de ce résidu ne semble pas être issu d'une erreur de modélisation par homologie, car l'acide aminé aligné avec Arg117 dans les autres structures cristallographiques de P450s de mammifères est orienté et placé de la même façon, même pour des structures qui n'ont pas été utilisées comme *templates* pour construire le modèle de CYP 2J2 (figure IV.23).

Dans ces structures cristallographiques, ce résidu est soit hydrophobe (Phe, Val, Leu ou Ala), soit contient un groupe hydroxy (Ser ou Thr), et a été identifié pour les CYPs 2A6, 2C5, 2C8 et 2C9 comme constituant le site actif *(Wester et al., 2003a,b; Schoch et al., 2004; Wester et al., 2004; Yano et al., 2005)*. Nous proposons donc que ce résidu, très long et très polaire participe à la fixation des substrats au sein du site actif du CYP 2J2. Ce travail devrait être complété par la construction

d'un CYP 2J2 possédant une mutation de Arg117, et en analysant la régiosélectivité d'hydroxylation éventuelle des dérivés de la terfénadone. Cette étude pourra confirmer ou infirmer l'importance de Arg117 dans la reconnaissance des substrats. Dans le cadre de notre collaboration avec le groupe de D. Zeldin, ce travail est en cours ; des CYP 2J2 mutés en Arg117 sont en cours d'expression, et seront utilisés dans des expériences ultérieures.

IV-5 Article 4

P. Lafite, F. André, D.Z. Zeldin, P.M. Dansette and D. Mansuy, *"Unusual regioselectivity and active site topology of human cytochrome P450 2J2"*. Biochemistry, *sous presse*.

Unusual Regioselectivity and Active Site Topology of Human Cytochrome P450 2J2†

Pierre Lafite,‡ François André,§ Darryl C. Zeldin,|| Patrick M. Dansette,‡ and Daniel Mansuy*,‡

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, 45 Rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France, Laboratoire Stress Oxydant et Détoxication, CNRS URA 2096 DSV/iBiTec-S/SB2SM, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, and National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina 27709

Received May 9, 2007; Revised Manuscript Received July 6, 2007

ABSTRACT: The oxidation of six derivatives of terfenadone by recombinant human CYP2J2 (CYP = cytochrome P450) was studied by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (MS) using tandem MS techniques and by ^{1}H NMR spectroscopy. CYP2J2 exhibited a surprising regioselectivity in favor of the hydroxylation of the substrate terminal chain at the weakly reactive homobenzylic position. In contrast, hydroxylation of the same substrates by CYP3A4 mainly occurred on the most chemically reactive sites of the substrates (N-oxidation and benzylic hydroxylation). A 3D homology model of CYP2J2 was constructed using recently published structures of CYP2A6, CYP2B4, CYP2C8, CYP2C9, and CYP2D6 as templates. In contrast with other CYP2 structures, it revealed an active site cavity with a severely restricted access of substrates to the heme through a narrow hydrophobic channel. Dynamic docking of terfenadone derivatives in the CYP2J2 active site allowed one to interpret the unexpected regioselectivity of the hydroxylation of these substrates by CYP2J2, which is mainly based on this restricted access to the iron. The structural features that have been found to be important for recognition of substrates or inhibitors by CYP2J2 were also interpreted on the basis of CYP2J2−substrate interactions in this model.

Cytochromes P450 (CYPs)[1] constitute a superfamily of hemoproteins that play key roles in the metabolism of a large variety of xenobiotics and endogenous compounds (*1*). In the human genome, 57 genes have been found to code for CYPs (*2*). Many studies on the major isoforms implicated in hepatic drug metabolism and those responsible for the biosynthesis of steroid hormones have been carried out. Specific inhibitors and substrates have been extensively studied (*2*). Moreover, several X-ray structures of human CYPs, including CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4, which together metabolize a large majority of drugs clinically used, have been recently published (*3*−*12*).

Fewer data are available for the other human P450's that have been more recently characterized. Among them, CYP2J2 is the only cytochrome that is mainly expressed in the cardiovascular system (*13*). Its presence was also detected in kidney, lung, and the gastrointestinal tract and to a lower extent in liver (*14*, *15*). CYP2J2 is assumed to be the main arachidonic acid epoxygenase in the heart as the regio- and stereoselectivities of *cis*-epoxyeicosatrienoic acid (EET) formation by CYP2J2 match those in the human heart (*13*). EETs are important intracellular messengers in vascular tissues, as they play important roles in the regulation of vascular tone (*16*, *17*), have anti-inflammatory (*18*) and antifibrinolytic properties (*19*), and protect endothelial cells from ischemic or hypoxic injuries (*20*, *21*). Moreover, it has been shown that CYP2J2-derived metabolites are involved in the recovery of heart function following ischemia in mice (*20*), that the risk of coronary artery disease is associated with polymorphisms in the CYP2J2 gene in humans (*22*), and that CYP2J2-derived products can affect the cardiac electrophysiology (*23*, *24*). EETs and EET-derived metabolites are also involved in a host of processes related to cancer cell behavior, angiogenesis, and tumor pathogenesis (*25*, *26*). Very recent data suggest that CYP2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and may represent a novel biomarker and potential target for therapy of human cancers (*27*).

Besides these roles in the metabolism of endogenous compounds, CYP2J2 could be involved in the metabolism of some drugs, especially in the intestine. So far, CYP2J2 has been shown to contribute to the metabolism of three drugs, ebastine (*28*, *29*), astemizole (*30*), and terfenadine (*31*).

† This work was supported by the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Ministère de la Recherche (France), and Intramural Research Program of the NIH, National Institute of Environmental Health Sciences.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33 (0)1 42 86 40 62. Fax: +33 (0)1 42 86 83 87. E-mail: daniel.mansuy@univ-paris5.fr.

‡ Université Paris Descartes.

§ CEA Saclay.

|| National Institutes of Health.

[1] Abbreviations: COSY, correlation spectroscopy; CYP or P450, cytochrome P450; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acid; ESI, electrospray ionization; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS, mass spectrometry; MD, molecular dynamics; MS^2/MS^3, tandem mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; UV, ultraviolet.

10.1021/bi700876a CCC: $37.00 © xxxx American Chemical Society
Published on Web 00/00/0000 PAGE EST: 10.5

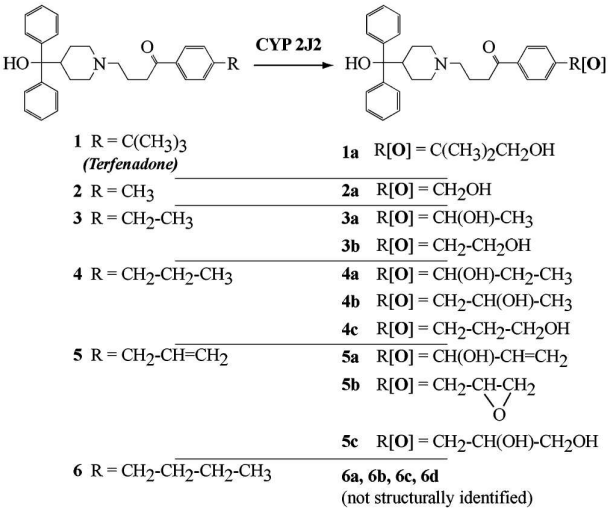


FIGURE 1: Structure of terfenadone derivatives **1**−**6** and of their products formed after oxidation by CYP2J2.

Very few data are presently available on the active site topology and substrate specificity of CYP2J2 (*2*). Quite recently, we have shown that it was possible to obtain high-affinity inhibitors for CYP2J2 by chemical modification of terfenadone, **1** (see Figure 1), which is an isomer of ebastine and a derivative of the drug terfenadine (*32*, *33*). Thus, compound **4** was found to be a selective, competitive inhibitor of CYP2J2 with a K_i value as low as 0.16 μM, and compound **5** was found to be an efficient mechanism-based inhibitor of CYP2J2 (*33*) (see Figure 1 for the formulas of **4** and **5**).

In this paper we show that terfenadone derivatives, such as **4**, are good CYP2J2 substrates which are hydroxylated by this P450 with an unexpected regioselectivity favoring the homobenzylic position of their R chain (Figure 1). Construction of a 3D homology model of CYP2J2 and dynamic docking of these terfenadone derivatives in its active site allowed us to interpret the particular affinity of some of these derivatives, as well as the peculiar regioselectivity of their hydroxylation by CYP2J2.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Terfenadone, 4-[4-(hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl]-1-(4-*tert*-butylphenyl)butan-1-one, **1**, 4-[(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl]-1-(4-methylphenyl)-butan-1-one, **2**, 4-[(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl]-1-(4-ethylphenyl)butan-1-one, **3**, 4-[(4-(hydroxydiphenyl-methyl)piperidin-1-yl]-1-(4-propylphenyl)butan-1-one, **4**, 1-(4-allylphenyl)-4-(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)butan-1-one, **5**, 4-[(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl]-1-(4-butylphenyl)butan-1-one, **6**, and diphenyl(1-(4-(4-propylphenyl)butyl)piperidin-4-yl)methanol, **7**, were synthesized as described previously (*33*). Reference compounds for products **2a**, **3b**, and **4c** were synthesized as reported recently (*33*). Ebastine was provided by Pharmafarm (Paris, France). All organic solvents were purchased from SDS (Peypin, France) and were of the highest purity available. $NADP^+$ and an NADPH-generating system (glucose 6-phosphate and glucose 6-phosphate dehydrogenase) were purchased from Boehringer-Mannheim (Mannheim, Germany).

Origins of Recombinant Cytochromes P450. CYP2J2 was coexpressed with human P450 reductase in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* insect cells (*Sf9*), and microsomes of these cells were prepared as described previously (*13*). Microsomes from insect cells expressing CYP3A4 (Supersomes) were purchased from BD Discovery Labware (Woburn, MA).

*Oxidation of Compounds **1**−**7** by CYP2J2 and CYP3A4. Incubation Procedure and HPLC−MS−UV Analysis*. The substrate (0.1−20 μM) and microsomes of insect cells expressing CYP2J2 or CYP3A4 (1−5 nM P450) were preincubated for temperature equilibration at 37 °C in a shaking bath for 2−3 min in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA. Incubation was started (t_0 = 0 min) with the addition of an NADPH-generating system (1 mM $NADP^+$, 10 mM glucose 6-phosphate, and 2 units of glucose 6-phosphate dehydrogenase/mL) preincubated at 37 °C for 2 min. The usual incubation times were 2−5 min for kinetic constant determination and up to 30 min for product identification. At t_0 and regularly thereafter, aliquots (200 μL) were taken, and the reaction was terminated by treatment with 100 μL of a cold CH_3CN/CH_3COOH (10:1) mixture. Proteins were precipitated by centrifugation for 10 min at 10 000 rpm, and the supernatant was analyzed by reversed-phase HPLC. The apparatus for HPLC−MS−UV analysis was composed of a Surveyor HPLC system and an LCQ Advantage ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, Les Ulis, France). The column used was a Kromasil C_{18} column (150 × 2.1 mm, 3.5 μm) (AIT, Marly, France). The mobile phase consisted of water/acetonitrile/formic acid (80:20:1) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99:1) (solvent B), at a flow rate of 200 μL/min. Elution was performed with a linear gradient from 0% B to 70% B in 13 min, followed by a gradient to 100% B in 4 min, and ended by 4 min at 100% B. Elution was monitored at 254 nm for quantification. The MS ionization was carried out using an ESI source in positive mode, with a capillary temperature of 275 °C, a capillary voltage of 41 V, and a spray voltage of 5 kV. The amounts of the products were quantified by using UV detection at 254 nm. K_M and k_{cat} parameters were determined using Kaleidagraph software (Synergy, Pennsylvania).

Identification of Oxidation Products by Tandem Mass Spectrometry (MS² and MS³). MS^2 and MS^3 analyses were performed with an activated broad band and the fragmentation power set to 40−50%, depending on the compound analyzed: (**1**) MS^2 *m/z* 470 ($M + H^+$), 452, 268, 250, 203, 161; (**1a**) MS^2 *m/z* 486 ($M + H^+$), 468, 450, 268, 250, 219, 177; (**2**) MS^2 *m/z* 428 ($M + H^+$), 410, 268, 250, 161, 119; (**2a**) MS^2 *m/z* 444 ($M + H^+$), 426, 408, 268, 250, 177, 135; (**3**) MS^2 *m/z* 442 ($M + H^+$), 424, 268, 250, 175, 133; (**3a**) MS^2 *m/z* 458 ($M + H^+$), 440, 422, 268, 250, 191, 176, 149, 131; MS^3 (for *m/z* = 191) 176 (*m/z* − CH_3); (**3b**) MS^2 *m/z* 458 ($M + H^+$), 440, 422, 268, 250, 191, 149, 131; (**4**) MS^2 *m/z* 456 ($M + H^+$), 438, 268, 250, 189, 147; (**4a**) MS^2 *m/z* 472 ($M + H^+$), 454, 436, 268, 250, 205, 163; (**4b**) MS^2 *m/z* 472 ($M + H^+$), 454, 436, 268, 250, 205, 161, 163; MS^3 (for *m/z* = 205) 161 (*m/z* − CH_3CHO); (**5**) MS^2 *m/z* 454 ($M + H^+$), 436, 268, 250, 187, 145; (**5a**) MS^2 *m/z* 470 ($M + H^+$), 452, 434, 250, 203, 176, 161; MS^3 (for *m/z* = 203) 176 (*m/z* − $CH{=}CH_2$); (**5b**) MS^2 *m/z* 470 ($M + H^+$), 452, 434, 268, 250, 203, 161, 131; MS^3 (for *m/z* = 161) 131 (*m/z* − CH_2O);

(**5c**) MS^2 *m*/*z* 488 ($M + H^+$), 452, 268, 250, 221, 203, 190, 179, 161, 131; MS^3 (for *m*/*z* = 221) 190 (*m*/*z* − CH_2OH).

Identification of Oxidation Products by ^1H NMR Spectroscopy. The amounts of **3a**, **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, and **5c** that were sufficient for ^1H NMR structure determination were obtained from incubations of **3**, **4**, and **5** with rat liver microsomes. Each incubation involved 40 mL of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA and 35 nmol of P450 (25 mg of protein from liver microsomes from dexamethasone-pretreated rats). In the particular case of the isolation of products **5a**, **5b**, and **5c**, incubations were done in the presence of an inhibitor of microsomal epoxide hydrolases, 3,3,3-trichloropropene oxide (1 mM) (*34*), to accumulate sufficient amounts of **5b**. Reaction was started with the addition of an NADPH-generating system (1 mM $NADP^+$, 10 mM glucose 6-phosphate, and 2 units of glucose 6-phosphate dehydrogenase/mL), lasted 1 h at 37 °C, and was terminated by treatment with 20 μL of CH_3COOH/mL of incubate. The proteins were precipitated by centrifugation at 10 000 rpm for 10 min. After filtration on a SepPak C18 cartridge (Waters, Massachusetts), washing of the column with 5 mL of H_2O, and elution with 2 mL of CH_3OH, the reaction products were separated by reversed-phase HPLC using the equipment described above. The fractions containing a single product were evaporated; the residue was dissolved in 200 μL of D_2O, evaporated to dryness, redissolved in 100 μL of D_2O saturated with Na_2CO_3, and extracted with 0.75 mL of CD_2Cl_2 (except in the case of **5a**, for which $CDCl_3$ was used). The final CD_2Cl_2 (or $CDCl_3$) solution was studied by ^1H NMR spectroscopy using a 250 MHz and, for some products, a 500 MHz Bruker instrument. Structure determination was done on the basis of one-dimensional ^1H NMR and COSY experiments. The signals observed for all the hydrogens of **3a**, **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, and **5c**, except for those of the R group, were almost identical to those of the starting substrate (**3**, **4**, and **5**) that are described in ref *33*. The ^1H NMR signals of the R group that are characteristic of the indicated structure (Figure 1) are the following (δ in parts per million relative to the peak for tetramethylsilane; s, d, t, q, m, and dd stand for singlet, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, and doublet of doublets, respectively): (**3a**) δ = 4.81 (1H, q, *J* = 6.3 Hz, C*H*OH), 1.97 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3); (**4a**) δ = 4.64 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, C*H*OH), 1.73 (2H, m, CH_2), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, CH_3); (**4b**) δ = 4.02 (1H, m, C*H*OH), 2.80 (1H, dd, *J* = 5.1, 13.3 Hz, CH_aH_b), 2.73 (1H, dd, *J* = 7.7, 13.3 Hz, CH_aH_b), 1.20 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, CH_3); (**5a**) δ = 6.00 (1H, m, CH), 5.35 (1H, d, *J* = 17.3 Hz, CH_aH_b), 5.25 (1H, d, *J* = 10.3 Hz, C*H*OH), 5.21 (1H, d, *J* = 5.9 Hz, CH_aH_b); (**5b**) 3.10 (1H, m, CHO), 2.94 (1H, dd, *J* = 5.0, 14.8 Hz, CH_aH_b), 2.85 (1H, dd, *J* = 6.2, 14.8 Hz, CH_aH_b), 2.74 (1H, dd, *J* = 3.9, 5.0 Hz, CH_cH_dO), 2.50 (1H, dd, *J* = 2.7, 5.0 Hz, CH_cH_dO); (**5c**) δ = 3.91 (1H, m, C*H*OH), 3.63 (1H, m, CH_aH_bOH), 3.45 (1H, m, CH_aH_bOH), 2.81 (2H, m, CH_2).

Homology Modeling and Model Refinement. Construction of a CYP2J2 model was done as follows.

(1) The amino acid sequence of CYP2J2 was submitted to the SWISS-MODEL v3.5 server in automatic mode (*35*). Templates used for homology modeling were the X-ray structures reported for CYP2A6 (*9*), CYP2B4 (*36*), CYP2C5 (*37*), CYP2C8 (*4*), and CYP2D6 (*8*) (PDB codes 1z11, 2bdm, 1nr6, 1pq2, and 2f9q, respectively). Validation of the protein structure (devoid of heme) was made at this early stage using ANOLEA (*38*) and WHATCHECK (*39*), as proposed by SWISS-MODEL.

(2) Iron protoporphyrin IX was then added to the protein using the X-ray structure data of one of the templates (CYP2C8).

(3) The complete structure was then optimized by 15 cycles of minimizations (1000 steps, Powell method (*40*)) and short molecular dynamics (MD) runs (500 ps at 50 K) for equilibration. Then, a minimization of 2000 steps (Powell method) was performed to obtain the final model. All computations were performed using Sybyl software (Tripos, Courtaboeuf, France) on an Octane 2 Silicon Graphics workstation (Mountain View, CA) using Tripos force field parameters. MD simulations and minimizations were carried out in vacuo. The temperature for all MD simulations was held to 50 or 100 K. The cutoff for the computation of nonbonded interactions was set to 12 Å.

(4) Validation of the final optimized model was performed using PROCHECK tools (*41*), yielding an overall score for the model. The stability of the model was also tested by running a 1 ns MD simulation at 300 K in vacuo, during which no partial unfolding of the protein secondary and tertiary structures was observed.

Solvent-accessible molecular surfaces were calculated using VOIDOO software from Uppsala Software Factory (Uppsala University, Sweden) (*42*) with a probe solvent radius of 1.4 Å and a grid size set to 0.33 Å. PYMOL software was used for structure rendering (http://www.pymol.org) in Figures 5−9.

Docking Procedure. The docking protocol used was based on a soft-restrained MD approach previously described (*43*) and applied to CYP2C8 (*44*). Briefly, in this protocol, the substrate was placed outside the protein structure in front of the entrance of a possible substrate access channel, its hydroxylation site being in front of the entrance about 20 Å from the iron. The three initial orientations corresponded to different angles (between −15° and +15°) between the mean axis of the substrate molecule and that of the substrate access channel entrance, globally considered as cylinders. The choice of the substrate access channel is described in the following paragraph. MD simulations (2 ps) were performed in vacuo at 50 K to thermally equilibrate the substrate and the protein without restraints applied to the system. Then a distance-dependent constraint whose force constant values ranged from 3 to 9 (kcal/mol)/$Å^2$ was applied between the heme iron and the substrate hydroxylation site, and MD simulations were performed at 50 K for 200 ps. Equilibration of the docked ligand in the active site was done by releasing the constraint in a final MD run of 200 ps at 100 K. Final minimization (1000 steps, conjugate gradient) was performed to obtain the CYP2J2−substrate complexes.

Choice of the Access Channel. The docking protocol needs a well-defined access channel through which the substrate will be driven. After thorough examination of the CYP2J2 model and consideration of previously published work on substrate access channels of mammalian P450's (*37*, *45*−*50*), three possible access channels were found for CYP2J2. Channel 1 was delineated by helices B′, G, and I and the B′−C loop; it corresponds to the substrate access channel previously proposed in CYP2C5 (*37*, *45*, *46*). Channel 2 was found to be located between helices F and I and the β_5 sheet;

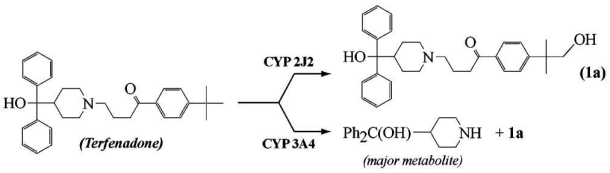


FIGURE 2: Oxidation of terfenadone, **1**, by CYP2J2 and CYP3A4.

it is described as the solvent access channel of several P450's (*48*). Channel 3 was located on the opposite side of the cleft bordered by the B−C loop utilized by channel 1, between helices B′ and G′ and the β_1 sheet. It should correspond to the cleft between helices B′ and G′ visible in the X-ray structure of an open conformation of CYP2B4 (*47*). In a more general manner, it corresponds to the access channel identified as "pathway 2b" by Cojocaru et al. in several mammalian P450's (*50*). Calculation of potential energy profiles of the CYP2J2−terfenadone complex after entrance of the substrate through each of these channels showed that channel 3 presented the lowest energy barrier for this entry. Moreover, when decreasing the constraint force constant value was decreased from 9 to 3 (kcal/mol)/Å^2, the distance between the iron and the substrate hydroxylated carbon remained larger than 7 Å in the case of channels 1 and 2. In the case of channel 3, the substrate came closer to the iron, with an iron−hydroxylated carbon distance of about 4 Å, even with the lowest constraint applied. Considering these preliminary docking results, channel 3 was chosen for docking the terfenadone derivatives. Residues used to define the channel entrance were Phe52, Gly84, Ile86, Val113, Pro115, and Asn231.

RESULTS AND DISCUSSION

Oxidation of Terfenadone Derivatives by CYP2J2. Oxidation of terfenadone derivatives **1**−**6** by microsomes of insect *Sf9* cells expressing CYP2J2, in the presence of an NADPH-generating system, was studied by HPLC−MS. Compounds **1** and **2** led to only one oxidation product, the mass spectrum of which exhibited a molecular ion at $m/z = m/z$ of the molecular ion of the starting compound + 16. A study of the fragments of these molecular ions by MS^2 showed that the oxygen atom introduced into **1** and **2** was inserted at the level of the R substituent (Figure 1). Actually, oxidation products of **1** and **2** exhibited HPLC and MS characteristics identical to those of authentic samples of the alcohols derived from a hydroxylation of the terminal methyl group of **1** and **2**, **1a** and **2a**, respectively (Figure 1). These results are in agreement with those of a recent study (Krausz, K. W., Lafite, P., et al., submitted for publication), that compared the oxidations of terfenadone, **1**, by 15 recombinant human P450's including CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5, CYP4A11, and CYP4F12. The latter results showed that only three of those P450's, CYP2J2, CYP3A4, and CYP3A5, were efficient catalysts of the oxidation of **1**. However, contrary to CYP3A4 and CYP3A5, which mainly oxidized **1** at the level of its amine function with formation of dealkylation products, CYP2J2 catalyzed the hydroxylation of the R group of **1** (R = *tert*-butyl in that case) in a highly regioselective manner (Figure 2).

Oxidation of compounds **3**, **4** and **6** respectively led to two, three, and four products that exhibited molecular ions at $m/z = m/z$ of the molecular ion of the starting compound + 16 and fragments consistent with a hydroxylation at the level of the R substituent.

Actually, structural determination of the oxidation products in this terfenadone series was possible in general because of the existence of three major fragments in the MS^2 spectra of these compounds (Figure 3). Two fragments resulted from the breaking of the N−CH_2 (exocyclic) bond—i.e., one corresponding to the $HOCPh_2$-piperidinyl fragment at $m/z = 268$ and the other corresponding to the $(CH_2)_3COC_6H_4R$ fragment. A third fragment corresponding to COC_6H_4R was also formed by cleavage of the CH_2−CO bond. In all products derived from CYP2J2-catalyzed oxidations of compounds **1**−**6**, the two latter fragments exhibited an m/z value equal to m/z of the corresponding starting compound fragment + 16. This clearly showed that the oxygen atom introduced into the substrate was systematically inserted at the level of the C_6H_4R group. A further detailed analysis of the $(CH_2)_3COC_6H_4R[O]$ fragment using MS^2 and MS^3 techniques showed the formation of fragments resulting from the breaking of C−C bonds whose at least one carbon bore the introduced oxygen atom. This allowed us to determine, in most cases, the site of R in which an oxygen atom was inserted (see the Experimental Procedures).

This is illustrated in the case of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of **3**, which led to two products. The major product was easily identified as the primary alcohol **3b** (*33*) on the basis of its HPLC and MS characteristics, which were identical to those of an authentic sample synthesized previously (*33*). MS^2 and MS^3 analyses of the minor product clearly showed that it was a regioisomer of **3b** resulting from a benzylic hydroxylation of **3** (fragments at $m/z = 149$ and 191 corresponding to $COC_6H_4CHOHCH_3$ and $(CH_2)_3COC_6H_4$-$CHOHCH_3$ and fragmentation of the latter, leading to a loss of a methyl group, $m/z = 176$) (Figure 3).

One of the two minor oxidation products of **4** was also identified as a previously described authentic compound (*33*), the alcohol **4c**, by using the same HPLC−MS characterization. One of the other products, **4b**, was characterized on the basis of MS^2 and MS^3 analyses as indicated above (the presence of a fragment corresponding to the loss of CH_3CHOH).

Compound **5** led to two kinds of oxidation products. The first ones, which comprise **5a** and **5b**, exhibited an MS molecular ion at $m/z = m/z$ of **5** + 16, whereas the second one (**5c**) exhibited an MS molecular ion at $m/z = m/z$ of **5** + 34. A more detailed analysis of their MS^2 characteristics was in favor of the structures shown in Figure 1. These HPLC−MS data showed that oxidation of **5** by CYP2J2 mainly occurred at the level of its double bond with formation of the corresponding epoxide **5b**, whose hydrolysis by insect cell microsomes, which should contain epoxide hydrolases (*51*), led to the diol **5c**. Product **5a** should result from a hydroxylation of the benzylic−allylic CH_2 group of **5**.

Finally, the structures of all these oxidation products of compounds **3**, **4**, and **5** were completely confirmed on the basis of their ^{1}H NMR spectra, after separation and isolation by preparative HPLC. To obtain sufficient amounts of each product for ^{1}H NMR studies, compounds **3**, **4**, and **5** were

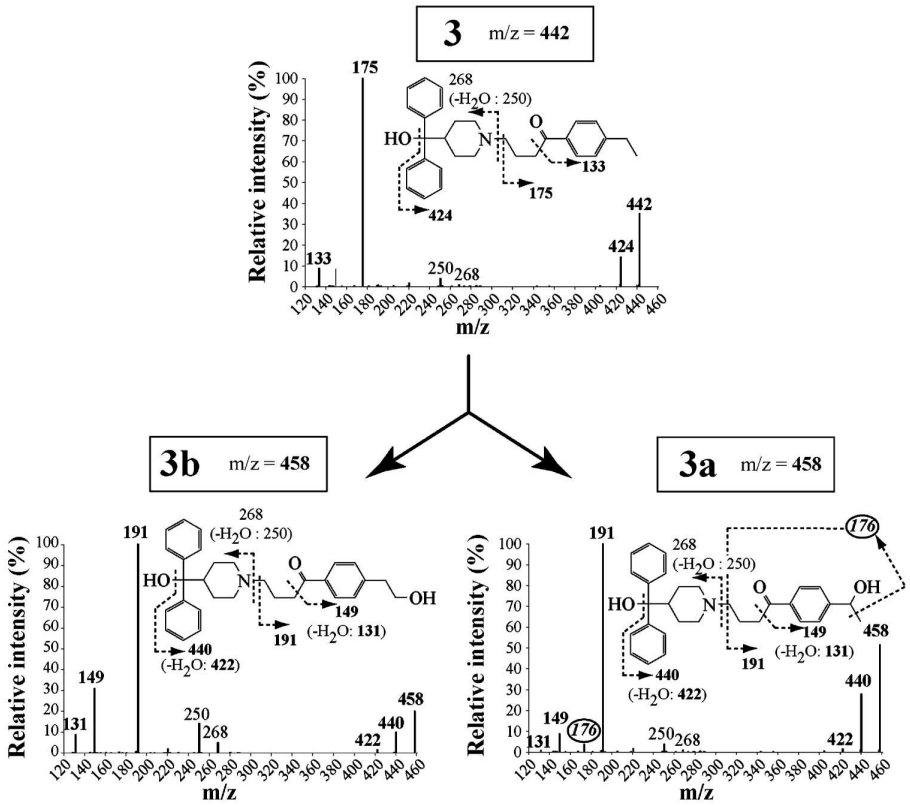


FIGURE 3: Mass spectra of compound **3** and of its products formed upon oxidation by CYP2J2. Mass spectra were obtained from HPLC−MS^2 and −MS^3 analysis of incubations of 20 μM **3** with 5 nM CYP2J2 and an NADPH-generating system for 30 min, as described in the Experimental Procedures. The *m/z* values corresponding to **3** and its oxidation products (**3a** and **3b**) are indicated in squares. Fragments containing the hydroxylated carbon are indicated in bold. The *m/z* value of the characteristic fragment for identification of compound **3a** is circled.

incubated with liver microsomes from rats pretreated with dexamethasone. Such preparative experiments required relatively large amounts of cytochrome P450 (up to 35 nmol of P450 per incubation), and we did not have enough recombinant CYP2J2 for that purpose. Fortunately, oxidation of **3**, **4**, and **5** by liver microsomes led to the expected products **3a**, **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, and **5c** in sufficient amounts for isolation by preparative HPLC and ^{1}H NMR structure determination. These products were found to be identical to those derived from CYP2J2-catalyzed oxidations of **3**, **4**, and **5** on the basis of their HPLC and MS (including MS^2 and MS^3) characteristics. The ^{1}H NMR characteristics of **3a**, **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, and **5c** completely confirmed the structures indicated in Figure 1. The signals corresponding to the hydrogens of the R substituent clearly showed the position of the oxygen atom introduced into the substrate (see the Experimental Procedures for a detailed description of these signals). As mentioned above, the other oxidation products, **3b** and **4c**, were identified as previously described authentic compounds (*33*) on the basis of their identical HPLC and MS characteristics.

As mentioned above, oxidation of **6** by CYP2J2 led to four products that should result from the hydroxylation of the four carbons of the butyl chain of **6**. The analysis of the mass spectra of these four products did not allow us to make definitive conclusions about their respective structures.

Table 1 compares the kinetic constants that were calculated for the oxidation (on the basis of the amounts of the major product detected by HPLC−UV) of compounds **1**, **3**, **4**, **5**, and **6** by CYP2J2. The amounts of product formed after oxidation of substrate **2** were too low (for **2** concentrations below 5 μM) to calculate the kinetic constants of this oxidation. The best CYP2J2 substrate in this series of compounds was **4** in terms both of K_M (lowest value of 0.14 $\pm$ 0.02 μM) and of k_{cat}/K_M (highest value of 141 $min^{-1}\cdot\mu M^{-1}$). Interestingly, the variation of the K_M value as a function of the R structure corresponded well to that of the IC_{50} value previously found for the inhibition of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine by the same compounds (*33*). Actually, the K_M value calculated for **4** (0.14 $\pm$ 0.02 μM) was in very good agreement with the K_i (0.16 $\pm$ 0.05 μM)

Table 1: Kinetic Constants for the Oxidation of Compounds **1**−**6** by CYP2J2[a]

compd	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1}\cdot min^{-1}$)	IC_{50}[b] (μM)
1	0.39 $\pm$ 0.01	36 $\pm$ 2	90	0.7 $\pm$ 0.1
2	nd[c]	nd	nd	0.7 $\pm$ 0.2
3	0.24 $\pm$ 0.07	5 $\pm$ 0.6	23	0.6 $\pm$ 0.1
4	0.14 $\pm$ 0.02	19 $\pm$ 1	141	0.4 $\pm$ 0.1
5	0.21 $\pm$ 0.02	23 $\pm$ 2	110	0.4 $\pm$ 0.2
6	0.32 $\pm$ 0.02	42 $\pm$ 5	132	0.7 $\pm$ 0.2

[a] Kinetic constants were calculated for the formation of the major product upon oxidation of each compound by microsomes of insect cells expressing recombinant CYP2J2 (conditions described in the Experimental Procedures). Values are means $\pm$ SD from three independent experiments. [b] Values previously reported (*33*) for the inhibition of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of ebastine by the indicated compound. [c] nd = not determined because of the formation of too low amounts of product.

Table 2: Regioselectivity of the Oxidation of the R Group of Compounds **3**−**5** by CYP2J2 and CYP3A4[a]

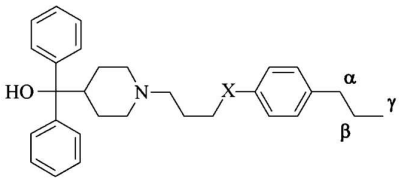
	regioselectivity[b] (%)					
	CYP2J2			CYP3A4		
compd	α	*β*	*γ*	α	*β*	*γ*
3	2	98		98	2	
4	5	85	10	88	9	3
5	1	99		81	19	

[a] Oxidation conditions as described in the Experimental Procedures. [b] α, *β*, and *γ* indicate the position of oxidation on the R chain (Figure 1) relative to the aryl ring; i.e., the α- and *β*-positions refer to the benzylic and homobenzylic positions, respectively. In the case of compound **5**, oxidation at positions *β* and *γ* corresponds to the epoxidation of the double bond. Values are means from three independent experiments.

and IC_{50} (0.4 ± 0.1 *μ*M) values previously found (*33*) for the inhibition of CYP2J2-dependent hydroxylation of ebastine by **4**, assuming that $K_i = IC_{50}/2$ for a competitive inhibitor (*52*). In a more general manner the K_M values found for compounds **1** and **3**−**6** were roughly equal to $IC_{50}/2$ (Table 1).

Regioselectivity of CYP2J2-Catalyzed Oxidations of Compounds 3, 4, and 5. Comparison with the Corresponding CYP3A4-Catalyzed Reactions. Table 2 shows the regioselectivity of CYP2J2-dependent oxidation of **3** that led almost exclusively to the homobenzylic alcohol **3b** (98% hydroxylation on the *β*-carbon relative to the aryl ring). This result could only be explained by a strict positioning of **3** in the CYP2J2 active site, as, from a chemical point of view, benzylic C−H bonds are much more reactive toward oxidants than unactivated C−H bonds. This was illustrated by a comparative study of the regioselectivity of the oxidation of the R group of **3** by CYP3A4, which is well-known to possess a large substrate binding site, which might allow free substrate reorientation and thus multiple positioning of substrates in the active site (*11*, *53*). CYP3A4-catalyzed hydroxylation of the R group of **3** almost exclusively occurred at the most reactive position, i.e., the benzylic position (Table 2). Such completely different regioselectivities of CYP2J2 and CYP3A4 in the hydroxylation of the R group of **3** were also observed for compounds **4** and **5**, as the CYP3A4-dependent oxidation of the R group of **4** and **5** mainly occurred on the benzylic position (88% and 81% regioselectivity, respectively), whereas the CYP2J2 oxidation of these substrates mainly occurred on the homobenzylic (*β*) position (85% and 99% regioselectivity, respectively, Table 2). Actually, CYP3A4-catalyzed oxidation of terfenadone and its derivatives **3**−**5** mainly led to N-dealkylation products resulting from an oxidation occurring at the level of their amino function (Figure 2). In the following, we will only discuss the regioselectivity of the minor CYP3A4-dependent oxidation that occurs at the level of the substrate R group for comparison with oxidations by CYP2J2.

The above data revealed two main differences between CYP2J2 and CYP3A4 as catalysts for the oxidation of terfenadone derivatives. The first difference had been described already in the case of terfenadone itself and was also observed in the case of its derivatives **3**−**5**. It is related to the ability of CYP2J2 to only oxidize the R substituent of the terfenadone derivatives, whereas CYP3A4 is much less selective as it oxidizes both the amine function (major pathway) and the R group of the same compounds. The second difference between CYP2J2 and CYP3A4 concerned their very different regioselectivities in the oxidation of the R group of terfenadone derivatives, as CYP2J2 mainly oxidizes the homobenzylic position, whereas CYP3A4 favors benzylic oxidation.



		% of hydroxylation		
		α	β	γ
4	X = CO	5	**85**	10
7	X = CH_2	33	**66**	< 1

FIGURE 4: Regioselectivity of the hydroxylation of compounds **4** and **7** by CYP2J2.

The regioselectivity of CYP3A4 seems to be dictated by the intrinsic chemical reactivity of the different parts of the terfenadone-derived molecules, which varies as follows: tertiary amine function > benzylic C−H bonds > unactivated C−H bonds (including homobenzylic C−H bonds). This is presumably due to the wide substrate binding site of CYP3A4, which permits several positionings of the substrates relative to the iron−oxo hydroxylating species. At the opposite, the highly regioselective oxidation of terfenadone derivatives by CYP2J2, which occurs on the poorly reactive homobenzylic C−H bonds, can be attributed to a unique, very strict positioning of these substrates in its active site.

Influence of the Presence of the Keto Group of Terfenadone Derivatives on the Regioselectivity of Their Oxidation by CYP2J2. Previous studies on the inhibitory effects of a series of terfenadone derivatives toward CYP2J2 have shown the importance of the presence of a keto group para to the R substituent for a good recognition by CYP2J2 (*33*). For instance, compound **7** (Figure 4), which results from a complete reduction of the keto function of **4**, exhibited an IC_{50} value for CYP2J2-dependent ebastine hydroxylation 10 times higher than that of **4** (*33*). An HPLC−MS study of the oxidation of **7** by microsomes of insect cells expressing CYP2J2, under conditions identical to those previously used for the oxidation of compounds **1**−**6**, showed that CYP2J2 catalyzed the hydroxylation of the R group of **7** with a regioselectivity different from that found in the case of **4** (Figure 4). The loss of regioselectivity observed in the case of **7** corresponds to a marked increase of the benzylic hydroxylation.

These data indicate that the very strict positioning of terfenadone derivatives in the CYP2J2 active site, which would be at the origin of the high regioselectivity of this enzyme in favor of homobenzylic C−H bonds, implies, at least in part, a binding of the keto group in the CYP2J2 active site.

Construction of a 3D Model of CYP2J2 by Homology Modeling. In a preliminary step, the SWISS-MODEL software, available at the address http://swissmodel.expasy-.org, was used to build 3D models of CYP2 proteins whose X-ray crystal structures had been recently published (CYP2C8, CYP2B4, and CYP2C9). This was done to further validate

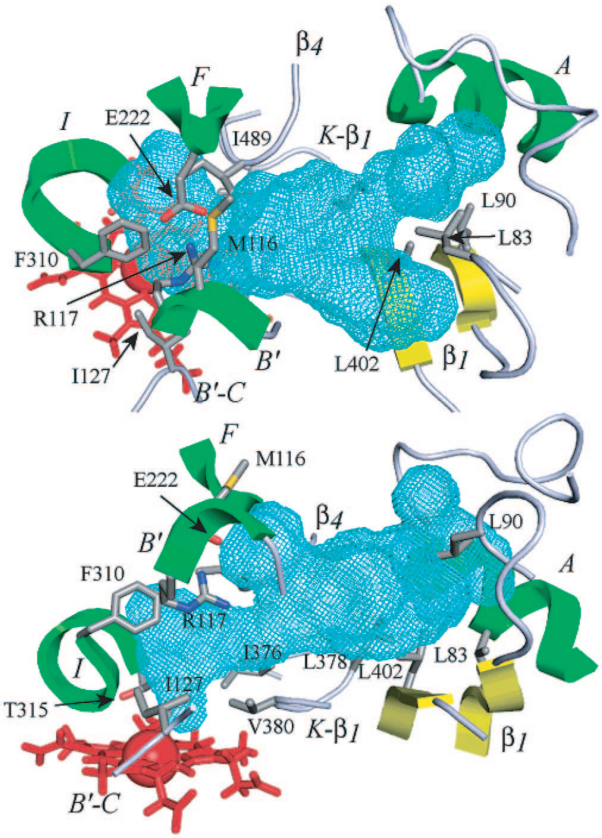


FIGURE 5: 3D model of the substrate binding site of CYP2J2 and cavity contours. The active site is viewed perpendicular (top) and parallel (bottom) to the heme. The heme is represented by red sticks with the iron atom shown as a van der Waals sphere. The active site cavity surface is rendered with a green mesh calculated using VOIDOO (*42*) with a probe size of 1.4 Å. Portions of the structural elements of the protein surrounding the active site (helices A, B′, F, and I; β_1 and β_4 sheets) are rendered as green (helices) or yellow (sheets) cartoons. Portions of the B′−C and K−β_1 loops are rendered as gray ribbons. The residues bordering the cavity are shown (sticks), with side chain atoms colored in gray for carbon, red for oxygen, blue for nitrogen, and orange for sulfur.

the method which had been previously used to build models of CYP2B6 (*54*), CYP2E1 (*55*, *56*), and CYP11A1 (*57*) and to find the most appropriate parameters for producing accurate models. For instance, a model of CYP2B4 was constructed from a combination of three CYP2 templates (CYP2A6, CYP2C8, and CYP2C9; PDB codes 1z10, 1pq2 and 1og2, respectively). The root-mean-square (rms) deviation of the peptide backbone atoms between the resulting model and the X-ray structure published for CYP2B4 in a closed conformation (*58*) (PDB code 1suo) was found to be 1.05 Å, whereas the sequence identities between CYP2B4 and the X-ray templates were 53%, 54%, and 51% for CYP2A6, CYP2C8, and CYP2C9, respectively.

A 3D model of CYP2J2 was then built using a combination of the X-ray structures of CYP2A6, CYP2B4, CYP2C5, CYP2C8, and CYP2D6 (PDB codes 1z11, 2bdm, 1nr6, 1pq2, and 2f9q, respectively) as templates. The choice of these templates was made to start from the greatest possible diversity of subfamilies in CYP family 2 (CYP2A, CYP2B, CYP2C, and CYP2D) and from structures of CYP2's with (CYP2A6−methoxalene, CYP2B4−bifonazole, CYP2C5−diclofenac) and without (CYP2C8, CYP2D6) substrate. Sequence identities of the templates with CYP2J2 varied from 41% to 44%. Final optimization of the model was done by several cycles of MD simulations in vacuo and energy minimizations. Optimization of the model was followed by validation of the geometry of the model using PROCHECK tools (*41*) that give an overall score for the model. A structure is considered to be of sufficient quality if its PROCHECK score is below the limit of 0.5. The score obtained for the CYP2J2 model was 0.29, which was within the score range calculated for the templates (X-ray structures) with the same method (from 0.17 to 0.39). Ramachandran plots also gave a good reliability of this model with 81% of the residues in the most favored region (to be compared with 84−90% for the templates).

The global folding of the protein in the final model was very similar to that found in previously described X-ray structures of CYP2's (*59*), as expected if one considers the construction method based on CYP2 templates. The substrate binding site appeared as a truncated cone between the I, B′, F, and F′ helices with an extension up to the β_1 sheet (Figure 5). The volume of the cavity corresponding to the solvent-accessible molecular surface was calculated using VOIDOO and found to be 945 Å^3. It is larger than that reported for CYP2D6 (540 Å^3, PDB code 2f9q (*8*)) but smaller than that

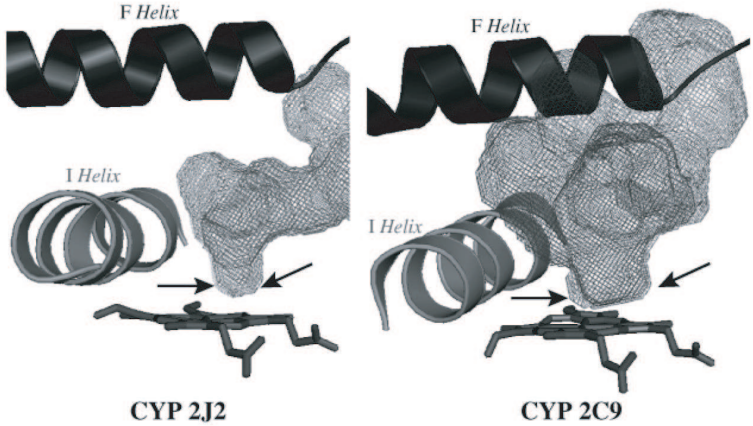


FIGURE 6: Comparison of the active sites of CYP2J2 and CYP2C9. The active site cavities for CYP2C9 (PDB code 1r9o) and CYP2J2 model were calculated using VOIDOO (*42*) and are represented as gray mesh. The heme is rendered in sticks, and the F and I helices are rendered as ribbons. The arrows indicate the width of the active site cavity available to the substrate in close proximity to the heme.

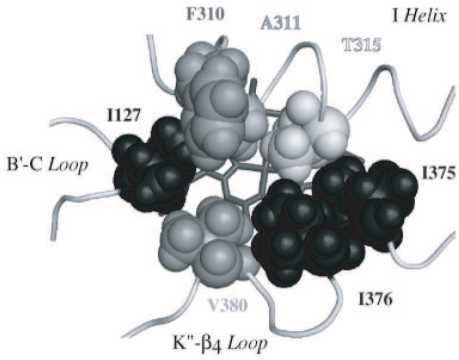


FIGURE 7: Detailed distal view of the amino acid residues determining the access to the heme in the CYP2J2 active site. The amino acid residues that delineate the active site near the heme are rendered in van der Waals spheres.

calculated for CYP2C8 (1438 Å^3, PDB code 1pq2 (*4*)). The part of this cavity that is close to the heme and leads to a possible access to the iron is markedly narrower than in other CYP2's, such as CYP2C5 (*37*), CYP2C8 (*4*), or CYP2C9 (*3*). Figure 6 illustrates this particular characteristic of CYP2J2 by comparing the access to the heme in the active site cavity in CYP2J2 and CYP2C9. This restricted access to the heme is due to the presence of a crown of bulky amino acid residues I127, F310, A311, T315, I375, I376, and V380 that are in close proximity to the heme (Figure 7). They form a small, hydrophobic tunnel which is the only possible access to CYP2J2 iron for the substrates.

Docking of Terfenadone Derivatives in the CYP2J2 Active Site. Docking of compounds **1**−**4** and **7** in the CYP2J2 active site model was performed using the soft-restrained MD docking method described previously (*43*) and applied to CYP2C8 (*44*). The interest of this method, which follows the substrate from its entrance into the substrate access channel to its final positioning close to the heme, is to take into account possible conformational changes of the protein and of the substrates that may occur after the entrance of the substrate into the access channel. The different steps of this protocol and the method used for choosing the most appropriate substrate access channel are described in the Experimental Procedures. The channel used for dynamic docking was delineated by helices B′ and G′ and the β_1 sheet and corresponded to the access channel identified as pathway 2b by Cojocaru et al. observed in several mammalian P450 X-ray structures (*50*). Each substrate was docked three times by changing the initial substrate orientation. Using this protocol, the substrate positioning most often found (80% of the docking experiments) for all the studied compounds is shown in Figure 8 in the case of terfenadone. In this model of the CYP2J2−terfenadone complex, the hydrophobic terminal part of **1**, which involves the *tert*-butyl group, is in contact with some of the amino acid residues constituting the hydrophobic, narrow tunnel of access to the heme—i.e., I127, F310, I376, and V380. The keto function of **1** is well positioned to establish one or two hydrogen bonds with the guanidine moiety of R117. The $(CH_2)_3$ chain of **1** is in contact with M116. Finally, the two phenyl groups of the terminal Ph_2COH moiety are in a hydrophobic region formed by several leucine residues (L378, L402, and L83). The terminal OH group of **1** is located in a small, less hydrophobic pocket of this region containing T488, even though it seems to be too far away to establish a hydrogen bond with the oxygen atom of this threonine (O−O distance of 6 Å).

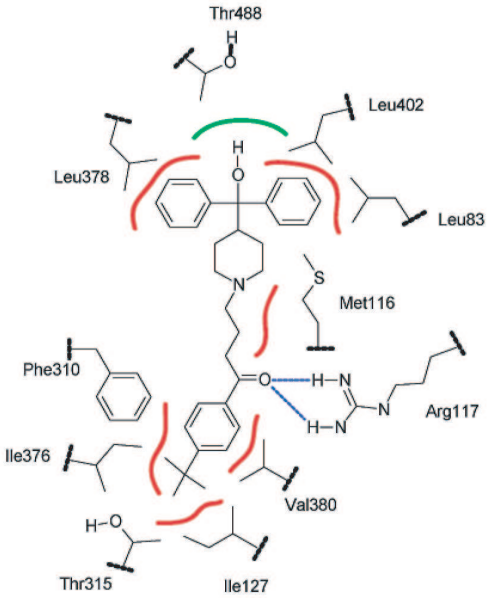


FIGURE 8: Schematic positioning of terfenadone, **1**, in the active site of CYP2J2. Hydrophobic interactions are shown in red, the hydrogen bond between the keto function of **1** and Arg117 is drawn in blue, and putative polar interaction with Thr488 is represented in green.

Table 3: Distances Calculated between Iron and the Carbon Atoms of R in CYP2J2−Terfenadone Derivative Complex Models[a]

substrate	distances (Å)		
	C_α	C_β	C_γ
3	5.1 ± 0.1 (2%)	3.9 ± 0.1 (98%)	
4	4.9 ± 0.2 (5%)	3.8 ± 0.1 (85%)	4.6 ± 0.1 (10%)
7	4.2 ± 0.5 (33%)	4.4 ± 0.5 (66%)	4.6 ± 0.5 (1%)

[a] α, β, and γ positions relative to the phenyl ring. Values are means ± SD from three structural models obtained from various docking procedures where the initial position of the substrate was changed. Values in parentheses, drawn from Table 2, refer to the regioselectivity of CYP2J2-catalyzed hydroxylation of the carbons of the R chain for each substrate.

Docking of compounds **2**−**4** led to positionings of these substrates in the CYP2J2 active site highly similar to that of terfenadone. The distances between the iron and the carbon atoms of the R group are compared in Table 3. Their absolute values must be considered cautiously as they derive from a model. However, they are in the range of distances (4−5 Å) expected for a hydroxylation of the corresponding C−H bonds by the P450 iron−oxo species (*48*). More interestingly, a comparison of the Fe−C distances for a given substrate allowed one to explain the surprising CYP2J2 regioselectivity mentioned above (see Table 3). Thus, the Fe−C_β distance found in the case of **3** is more than 1 Å shorter than the Fe−C_α distance, in agreement with the high regioselectivity that was observed in favor of homobenzylic hydroxylation. In the case of **4**, the order of the Fe−C distances completely corresponds to the hydroxylation regioselectivity: Fe−C_β < Fe−C_γ < Fe−C_α for an 85:10:5 regioselectivity.

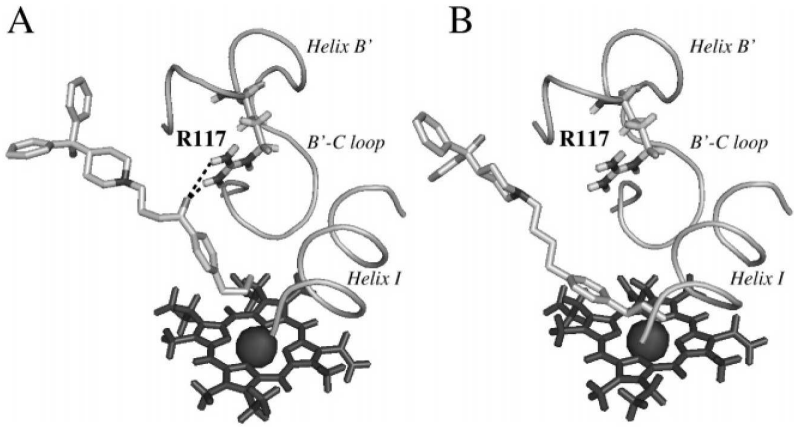


FIGURE 9: Comparison of the positioning of **4** (A) and **7** (B) in the CYP2J2 active site. H-bonding between the keto group of **4** and Arg117 is indicated by dashed lines.

Docking of compound **7** in the CYP2J2 model led to a slightly different positioning of the propyl chain relative to the heme, when compared to that of **4** (Figure 9). The loss of the interaction with R117, which was important in the CYP2J2−**4** complex, leads to a much greater flexibility of the terminal part of **7** in the active site and allows the benzylic carbon (C_α) to be closer to the iron, as shown by the Fe−C_α distance, which is shorter in the CYP2J2−**7** complex than in the CYP2J2 complexes with either **3** or **4** (Table 3). This should be at the origin of the lower regioselectivity of CYP2J2-dependent hydroxylation of **7**. Actually, in the case of **7**, the order of the Fe−C distances does not fit to the observed hydroxylation regioselectivity as well as in the case of **3** and **4**. However, presumably because of the greater flexibility of the aryl−R part of **7** in the CYP2J2 active site, the error in the Fe−C distance determination is much higher than in the case of **3** and **4**.

CONCLUSION

The specific behavior of CYP2J2, in terms of its recognition of terfenadone derivatives as inhibitors (*33*) and its regioselective oxidation of several of those derivatives (shown in Figure 1), can be explained by considering the CYP2J2 3D model described above.

The surprising regioselectivity of CYP2J2-catalyzed oxidation of compounds **3**−**5**, which is strongly in favor of the weakly reactive homobenzylic position of the R chain, can be explained by the shape of the CYP2J2 active site, leading to a severely restricted access to the iron. The presence of a small channel constituted by several bulky amino acid residues (I127, A311, I375, I376, and V380) just above the heme would only permit the access to iron of the terminal part of the R chain. This access would also be controlled by a hydrogen bond between the keto function of the terfenadone derivatives and arginine 117. This would explain the loss of regioselectivity observed in CYP2J2-catalyzed hydroxylation of compound **7**.

The main structural features that appear to be important for recognition of terfenadone derivatives, as inhibitors (*33*) or as substrates (this work) of CYP2J2, are (i) the existence of a small hydrophobic terminal chain (R = propyl leads to the highest affinity), (ii) the presence of a keto substituent on the phenyl ring, para to the R group, and (iii) the existence of a hydrophobic moiety at the other extremity of the substrate. The present 3D model of CYP2J2 explains the high affinity of compounds such as **4** (K_M = 0.14 μM (this work), K_I = 0.16 μM (*33*)), as they have the proper length and shape to fill the CYP2J2 active site cavity. The R = propyl chain of **4** is particularly well adapted to establish favorable hydrophobic interactions with the narrow hydrophobic protein channel close to the heme. Moreover, the keto group of **4** is well positioned to establish hydrogen bonds with R117 (Figure 8). Removal of this keto group (as in **7**) leads to a 10-fold increase of the IC_{50} value (*33*). Introduction of polar alcohol, ether, or amide functions into R was also shown to lead to a dramatic decrease of the affinity (*33*), presumably because of steric hindrance and loss of hydrophobic interactions in the narrow hydrophobic channel. Finally, removal of the $HOCPh_2$ terminal moiety of the molecule was found to cause a 19-fold decrease of affinity (*33*). On the basis of the model of Figure 8, this would be explained by the loss of several, favorable, hydrophobic interactions of the CPh_2 group with a series of leucines of the active site (Leu83, Leu378, and Leu402).

Supplementary experiments, using site-directed mutants, are required to confirm this molecular description of the interactions between CYP2J2 and its substrates and inhibitors. However, the aforementioned results, particularly the 3D model proposed for CYP2J2−substrate interactions, should be important tools (i) to find even more selective and high-affinity substrates and inhibitors, (ii) to interpret or to predict the metabolism of xenobiotics, including drugs, by CYP2J2, and (iii) to discover new possible endogenous substrates of this enzyme.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Didier Buisson (UMR 8601) for a gift of compound **2** and Dr. Gildas Bertho for his help in the ^{1}H NMR structure determination.

REFERENCES

1. Ortiz de Montellano, P. R. (2005) *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, 3rd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
2. Guengerich, F. P. (2005) Human cytochrome P450 enzymes, in *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry* (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.) 3rd ed., pp 377−530, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

3. 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.
4. 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.
5. 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-A resolution, *J. Biol. Chem. 279*, 35630−35637.
6. Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J., and Jhoti, H. (2004) Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone, *Science 305*, 683−686.
7. Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., and Johnson, E. F. (2004) The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution, *J. Biol. Chem. 279*, 38091−38094.
8. Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Lewis, C. J., Tennant, M. M., Modi, S., Eggleston, D. S., Chenery, R. J., and Bridges, A. M. (2005) Crystal structure of human cytochrome P450 2D6, *J. Biol. Chem. 281*, 7614−7622.
9. Yano, J. K., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Stout, C. D., and Johnson, E. F. (2005) Structures of human microsomal cytochrome P450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen, *Nat. Struct. Mol. Biol. 12*, 822−823.
10. Yano, J. K., Denton, T. T., Cerny, M. A., Zhang, X., Johnson, E. F., and Cashman, J. R. (2006) Synthetic inhibitors of cytochrome P-450 2A6: inhibitory activity, difference spectra, mechanism of inhibition, and protein cocrystallization, *J. Med. Chem. 49*, 6987−7001.
11. Ekroos, M., and Sjogren, T. (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103*, 13682−13687.
12. Chiang, C. W., Yeh, H. C., Wang, L. H., and Chan, N. L. (2006) Crystal structure of the human prostacyclin synthase, *J. Mol. Biol.* (in press).
13. Wu, S., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Falck, J. R., and Zeldin, D. C. (1996) Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart, *J. Biol. Chem. 271*, 3460−3468.
14. Zeldin, D. C., Foley, J., Ma, J., Boyle, J. E., Pascual, J. M., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Steenbergen, C., and Wu, S. (1996) CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance, *Mol. Pharmacol. 50*, 1111−1117.
15. Zeldin, D. C., Foley, J., Goldsworthy, S. M., Cook, M. E., Boyle, J. E., Ma, J., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Steenbergen, C., and Wu, S. (1997) CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance, *Mol. Pharmacol. 51*, 931−943.
16. Fleming, I., and Busse, R. (2006) Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function, *Hypertension 47*, 629−633.
17. Spector, A. A., and Norris, A. W. (2007) Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function, *Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292*, C996−1012.
18. Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D. C., and Liao, J. K. (1999) Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids, *Science 285*, 1276−1279.
19. Node, K., Ruan, X. L., Dai, J., Yang, S. X., Graham, L., Zeldin, D. C., and Liao, J. K. (2001) Activation of Ga s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids, *J. Biol. Chem. 276*, 15983−15989.
20. Seubert, J., Yang, B., Bradbury, J. A., Graves, J., Degraff, L. M., Gabel, S., Gooch, R., Foley, J., Newman, J., Mao, L., Rockman, H. A., Hammock, B. D., Murphy, E., and Zeldin, D. C. (2004) Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K+ channels and p42/p44 MAPK pathway, *Circ. Res. 95*, 506−514.
21. Yang, B., Graham, L., Dikalov, S., Mason, R. P., Falck, J. R., Liao, J. K., and Zeldin, D. C. (2001) Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells, *Mol. Pharmacol. 60*, 310−320.
22. Spiecker, M., Darius, H., Hankeln, T., Soufi, M., Sattler, A. M., Schaefer, J. R., Node, K., Borgel, J., Mugge, A., Lindpaintner, K., Huesing, A., Maisch, B., Zeldin, D. C., and Liao, J. K. (2004) Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2, *Circulation 110*, 2132−2136.
23. Xiao, Y. F., Ke, Q., Seubert, J. M., Bradbury, J. A., Graves, J., Degraff, L. M., Falck, J. R., Krausz, K., Gelboin, H. V., Morgan, J. P., and Zeldin, D. C. (2004) Enhancement of cardiac L-type Ca2+ currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of CYP2J2, *Mol. Pharmacol. 66*, 1607−1616.
24. Lu, T., Ye, D., Wang, X., Seubert, J. M., Graves, J. P., Bradbury, J. A., Zeldin, D. C., and Lee, H. C. (2006) Cardiac and vascular KATP channels in rats are activated by endogenous epoxyeicosatrienoic acids through different mechanisms, *J. Physiol. 575*, 627−644.
25. Wang, Y., Wei, X., Xiao, X., Hui, R., Card, J. W., Carey, M. A., Wang, D. W., and Zeldin, D. C. (2005) Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways, *J. Pharmacol. Exp. Ther. 314*, 522−532.
26. Michaelis, U. R., and Fleming, I. (2006) From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling, *Pharmacol. Ther. 111*, 584−595.
27. Jiang, J. G., Chen, C. L., Card, J. W., Yang, S., Chen, J. X., Fu, X. N., Ning, Y. G., Xiao, X., Zeldin, D. C., and Wang, D. W. (2005) Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors, *Cancer Res. 65*, 4707−4715.
28. Hashizume, T., Imaoka, S., Mise, M., Terauchi, Y., Fujii, T., Miyazaki, H., Kamataki, T., and Funae, Y. (2002) Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther. 300*, 298−304.
29. Liu, K. H., Kim, M. G., Lee, D. J., Yoon, Y. J., Kim, M. J., Shon, J. H., Choi, C. S., Choi, Y. K., Desta, Z., and Shin, J. G. (2006) Characterization of ebastine, hydroxyebastine, and carebastine metabolism by human liver microsomes and expressed cytochrome P450 enzymes: major roles for CYP2J2 and CYP3A, *Drug Metab. Dispos. 34*, 1793−1797.
30. Matsumoto, S., Hirama, T., Matsubara, T., Nagata, K., and Yamazoe, Y. (2002) Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole, *Drug Metab. Dispos. 30*, 1240−1245.
31. Parikh, S., Gagne, P., Miller, V., Crespi, C., Thummel, K., and Patten, C. (2003) CYP2J2 and CYP4F12 are active for the metabolism of non-sedating antihistamines: Terfenadine and astemizole, *Drug Metab. Rev. 35*, 190−190.
32. Lafite, P., Dijols, S., Buisson, D., Macherey, A. C., Zeldin, D. C., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2006) Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2, *Bioorg. Med. Chem. Lett. 16*, 2777−2780.
33. Lafite, P., Dijols, S., Zeldin, D. C., Dansette, P. M., and Mansuy, D. (2007) Selective, competitive and mechanism-based inhibitors of human cytochrome P450 2J2, *Arch. Biochem. Biophys.* (in press).
34. Oesch, F., Kaubisch, N., Jerina, D. M., and Daly, J. W. (1971) Hepatic epoxide hydrase. Structure-activity relations for substrates and inhibitors, *Biochemistry 10*, 4858−4866.
35. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res. 31*, 3381−3385.
36. Zhao, Y., White, M. A., Muralidhara, B. K., Sun, L., Halpert, J. R., and Stout, C. D. (2006) Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole: insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction, *J. Biol. Chem. 281*, 5973−5981.
37. 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 A resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding, *Biochemistry 42*, 9335−9345.
38. Melo, F., and Feytmans, E. (1998) Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy, *J. Mol. Biol. 277*, 1141−1152.
39. Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) Errors in protein structures, *Nature 381*, 272.

40. Powell, M. J. D. (1964) An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives, *Comput. J. 7*, 155−162.
41. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr. 26*, 283−291.
42. Kleywegt, G. J., and Jones, T. A. (1994) Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures, *Acta Crystallogr. D50*, 178−185.
43. André, F., Delaforge, M., and Loiseau, N. (2004) A method for performing restrained dynamics docking of one or multiple substrates on multi-specific enzymes, Patent WO2004038655.
44. Delaforge, M., Pruvost, A., Perrin, L., and Andre, F. (2005) Cytochrome P450-mediated oxidation of glucuronide derivatives: example of estradiol-17beta-glucuronide oxidation to 2-hydroxy-estradiol-17beta-glucuronide by CYP 2C8, *Drug Metab. Dispos. 33*, 466−473.
45. Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. (2000) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity, *Mol. Cell 5*, 121−131.
46. 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 A resolution: evidence for multiple substrate binding modes, *Biochemistry 42*, 6370−6379.
47. Scott, E. E., He, Y. A., Wester, M. R., White, M. A., Chin, C. C., Halpert, J. R., Johnson, E. F., and Stout, C. D. (2003) An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-A resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100*, 13196−13201.
48. Poulos, T. L., and Johnson, E. F. (2005) Structures of cytochromes P450 enzymes, in *Cytochrome P450: structure*, *mechanism*, *and biochemistry* (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.) 3rd ed., pp 87−114, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
49. de Graaf, C., Vermeulen, N. P., and Feenstra, K. A. (2005) Cytochrome P450 in silico: an integrative modeling approach, *J. Med. Chem. 48*, 2725−2755.
50. Cojocaru, V., Winn, P. J., and Wade, R. C. (2007) The ins and outs of cytochrome P450s, *Biochim. Biophys. Acta 1770*, 390−401.
51. Barth, S., Fischer, M., Schmid, R. D., and Pleiss, J. (2004) Sequence and structure of epoxide hydrolases: a systematic analysis, *Proteins 55*, 846−855.
52. Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol. 22*, 3099−3108.
53. Scott, E. E., and Halpert, J. R. (2005) Structures of cytochrome P450 3A4, *Trends Biochem. Sci. 30*, 5−7.
54. Bathelt, C., Schmid, R. D., and Pleiss, J. (2002) Regioselectivity of CYP2B6: homology modeling, molecular dynamics simulation, docking, *J. Mol. Model. 8*, 327−335.
55. Vidali, M., Hidestrand, M., Eliasson, E., Mottaran, E., Reale, E., Rolla, R., Occhino, G., Albano, E., and Ingelman-Sundberg, M. (2004) Use of molecular simulation for mapping conformational CYP2E1 epitopes, *J. Biol. Chem. 279*, 50949−50955.
56. Collom, S. L., Jamakhandi, A. P., Tackett, A. J., Radominska-Pandya, A., and Miller, G. P. (2007) CYP2E1 active site residues in substrate recognition sequence identified by photoaffinity labeling and homology modeling, *Arch. Biochem. Biophys. 459*, 59−69.
57. Sivozhelezov, V., and Nicolini, C. (2005) Homology modeling of cytochrome P450scc and the mutations for optimal amperometric sensor, *J. Theor. Biol. 234*, 479−485.
58. Scott, E. E., White, M. A., He, Y. A., Johnson, E. F., Stout, C. D., and Halpert, J. R. (2004) Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-Å resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding, *J. Biol. Chem. 279*, 27294−27301.
59. Johnson, E. F., and Stout, C. D. (2005) Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 338*, 331−336.

BI700876A

CHAPITRE V

EFFETS DE COMPOSÉS IMPLIQUÉS DANS LES VOIES DE RELAXATION VASCULAIRE SUR LE CYP 2J2.

Le CYP 2J2 est majoritairement exprimé dans le cœur et les tissus vasculaires. Il catalyse la formation des EETs qui sont des médiateurs importants dans de nombreuses cascades de signalisation ; ces EETs sont notamment impliqués dans la relaxation vasculaire (voie EDHF) et dans la protection du tissu vasculaire dans des situations de stress, en particulier oxydant (cf. chapitre **I**). Le but des études qui suivent a été de savoir quelles molécules impliquées dans les voies de relaxation vasculaire (voies de l'EDRF, de l'EDHF et des prostaglandines) et, de manière plus générale, dans la cascade arachidonique, étaient susceptibles d'interagir avec le CYP 2J2. Les effets de l'acide linoléique ont également été étudiés, car cet acide et les époxydes qui en dérivent ont des propriétés cytotoxiques importantes *(Bylund et al., 1998a,b; Moran et al., 2000).*

Les CI_{50} de ces molécules vis-à-vis d'une activité du CYP 2J2 (hydroxylation de l'ébastine) ont été mesurées. Certains de ces composés étaient connus comme substrats du CYP 2J2 (acides arachidonique et linoléique, 15-HPETE, cf chapitre **I**). Dans ces cas particuliers, le but de ce travail a été d'avoir une idée de l'affinité de ces substrats pour le CYP 2J2, dans la mesure où les résultats décrits dans la littérature ne donnaient pas accès aux K_m et k_{cat} de leur transformation par le CYP 2J2.

La biosynthèse des EETs au niveau vasculaire fait aussi intervenir d'autres P450s, en particulier les CYP 2C8 et 2C9. Nous avons réalisé une étude comparée des effets de ces molécules mentionnées plus haut sur les CYP 2C8, 2C9 et 2J2 (en complétant ce qui avait été fait précédemment au laboratoire sur le CYP 2C8 *(Marques-Soares, 2002)*).

V-1 Effets des dérivés issus de la voie de biosynthèse de NO sur les CYP 2C8, 2C9 et 2J2.

La synthèse du monoxyde d'azote NO est assurée dans les cellules endothéliales par la NO-synthase endothéliale (eNOS). Comme les deux autres isoformes de NO-synthases (NOS), la eNOS catalyse l'oxydation de l'arginine en N-hydroxyarginine (NOHA), puis en citrulline, comme l'indique le schéma V.1.

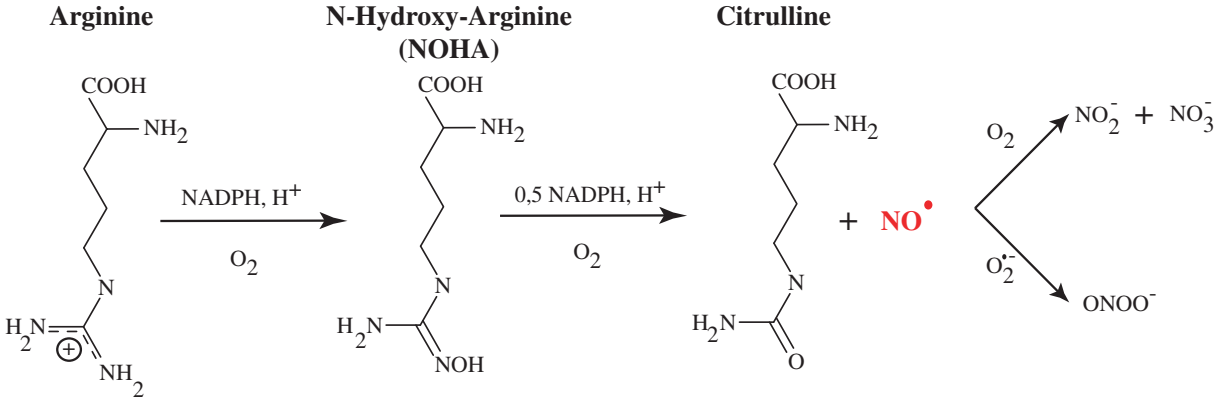


Figure V.1 – **Mécanisme réactionnel de synthèse du monoxyde d'azote par les NOS**.

Le monoxyde d'azote se dégrade rapidement dans les cellules endothéliales ($t_{1/2} \approx 5$ s), pour former très majoritairement des ions nitrites, qui sont généralement oxydés partiellement en nitrates en

milieu enzymatique oxydant *(Ignarro, 1990; Ignarro et al., 1993).* Par ailleurs, la présence simultanée d'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et de monoxyde d'azote peut mener à une réaction très rapide, dont la vitesse est limitée par la diffusion ($k \propto 10^9 M^{-1}.s^{-1}$), conduisant à l'ion peroxynitrite $ONOO^-$.

Les constantes d'inhibition CI_{50} vis-à-vis des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 ont été mesurées pour tous les dérivés impliqués dans la chaîne de biosynthèse et de dégradation du monoxyde d'azote (tableau V.1).

Tableau V.1 – **Constantes inhibitrices à 50 % des dérivés des voies de biosynthèse et de dégradation de NO**.

Inhibiteur	$CI_{50}(\mu M)$		
	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2J2
Arginine	> 550[a]	*n.d.*	> 200
Citrulline	> 550	*n.d.*	> 200
N-hydroxyarginine	> 550	*n.d.*	> 200
NO	6 ± 2	25 ± 5	260 ± 20
NO_2^-	> 550	*n.d.*	> 500
NO_3^-	360	*n.d.*	>500
$ONOO^-$	100 ± 12	*n.d.*	65 ± 4

(a) : Les valeurs limites indiquent une inhibition inférieure à 50 % pour la concentration indiquée.
n.d. : non déterminée.

Parmi tous les composés testés, seuls le monoxyde d'azote et le peroxynitrite présentent des CI_{50} inférieures à 100 μM :

– La CI_{50} de NO est environ 40 fois plus importante pour le CYP 2C8 que pour le CYP 2J2. Une étude précédente *(Marques-Soares, 2002)* a montré que l'inhibition du CYP 2C8 par le monoxyde d'azote était compétitive, par fixation réversible de NO sur le fer de l'hème. D'autre part, le tableau V.2 montre que, parmi les P450s vasculaires, le CYP 2C8 présente la meilleure affinité pour NO.

Tableau V.2 – **Inhibition de certaines isoformes de P450s par NO**.

P450	**2B1**[a]	**2C8**	**2C9**	**2E1**[b]	**2J2**	**3A4**
CI_{50}	8 à 60 μM	6 ± 2	25 ± 5	> 150[c]	260 ± 20	> 150[c]

Outre la valeur obtenue pour le CYP 2J2, les autres données proviennent de la thèse de C. Marques *(Marques-Soares, 2002)*, ou de la littérature (a) : *Wink et al., 1993* ; (b) : *Gergel et al., 1997.*
(c) moins de 50 % d'inhibition observée à 150 μM.

– On observe une tendance inverse pour l'ion peroxynitrite. La CI_{50} pour le CYP 2J2 est légèrement plus basse que celle mesurée pour le CYP 2C8. Cette inhibition semble dépendre peu de la concentration en substrat, comme l'indique le graphique V.2 et ne semble pas être compétitive, ce qui est peu surprenant, au vu de la très grande réactivité chimique de l'anion peroxynitrite, qui doit conduire à une inactivation de l'enzyme.

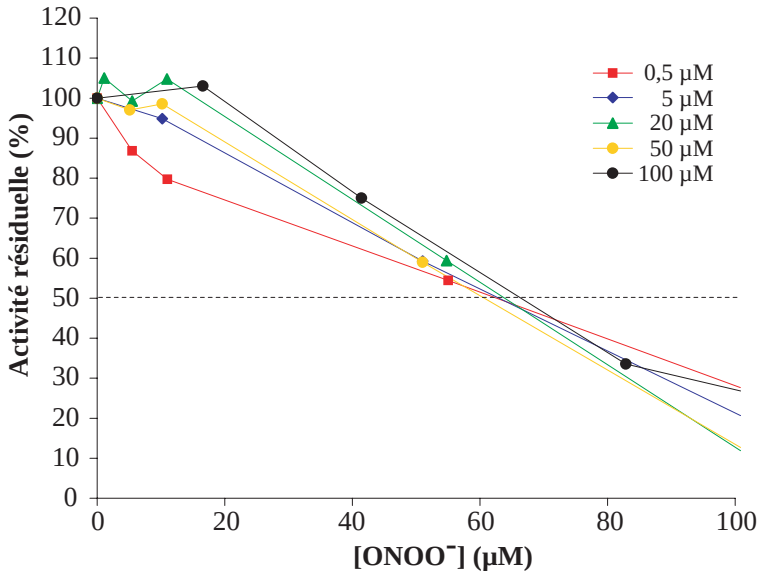


Figure V.2 – **Inhibition de l'hydroxylation de l'ébastine par $ONOO^-$.**

V-2 Effets des acides arachidonique et linoléique.

Pour savoir dans quelle mesure les différentes isoformes de P450s participaient à l'époxydation de l'acide arachidonique au niveau vasculaire, il nous a semblé important de déterminer l'affinité de cet acide gras vis-à-vis des P450s 2C8, 2C9 et 2J2. Par ailleurs, nous avons également déterminé l'affinité de l'acide linoléique, dont l'oxydation peut être reliée à une protection des tissus vasculaires *(Yang et al., 2001; Moran et al., 2000)*, mais également à une cytotoxicité, à haute concentration *(Moran et al., 2000)*.

Nous avons mesuré les CI_{50} de ces deux acides gras pour les trois isoformes de P450s étudiées. Les activités diclofénac 4'-hydroxylase et ébastine hydroxylase ont été utilisées comme activités enzymatiques de référence pour les cytochromes P450 2C9 et 2J2, respectivement. Dans le cas du CYP 2C8, la N-déséthylation de l'amodiaquine a été préférée à la 6α-hydroxylation du taxol, car la détection de l'hydroxy-taxol est rendue difficile par la présence des acides gras.

Le tableau V.3 compare les CI_{50} des acides arachidonique et linoléique vis-à-vis des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 exprimés dans des cellules d'insectes.

Tableau V.3 – **Constantes inhibitrices à 50 % des acides arachidonique et linoléique vis-à-vis des CYP 2C8, 2C9 et 2J2, exprimés dans des cellules d'insectes**.

P450	CI_{50} (μM)	
	Acide Arachidonique	Acide linoléique
2C8	14 ± 4	18 ± 1
2C9	18 ± 3	8 ± 2
2J2	48 ± 1	86 ± 5

Les valeurs obtenues pour l'acide arachidonique vis-à-vis des CYP 2C8 et 2C9 sont en accord avec les valeurs de K_m de l'époxydation de cet acide gras par ces P450s données par la littérature (6

et 14 μM, respectivement *(Barbosa-Sicard et al., 2005)*), si l'on admet une inhibition compétitive de ces P450s par l'acide arachidonique (dans ce cas $K_m \approx K_i \approx CI_{50}/2$). Il est à noter que les deux acides gras testés semblent être moins affins pour le CYP 2J2 que pour les P450s de la famille 2C.

V-3 Effets des dérivés de la cascade arachidonique sur les CYP 2C8, 2C9 et 2J2.

L'étude des effets éventuels des composés impliqués dans la cascade arachidonique sur les activités enzymatiques des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, un screening rapide des effets inhibiteurs de ces composés à une concentration de 50 μM a permis d'identifier des inhibiteurs potentiellement affins de ces CYPs. A la suite de cette étude préliminaire, une mesure des CI_{50} pour ces bons inhibiteurs a été réalisée pour comparer les affinités relatives vis-à-vis des P450s époxygénases vasculaires.

Deux groupes de dérivés ont été testés, au vu du métabolisme de l'acide arachidonique (voir figure I.22 de l'introduction). Une première série de composés a concerné les prostaglandines PGE_2 et PGH_2 et la prostacycline PGI_2 (figure V.3). La prostaglandine PGH_2, vasocontractante, est le composé précurseur de biosynthèse des deux prostaglandines PGE_2 et PGI_2. Aucune de ces trois prostaglandines (50 μM) ne semble inhiber les trois isoformes de P450s, indiquant une faible affinité de ces composés pour les CYP 2C8, 2C9 et 2J2.

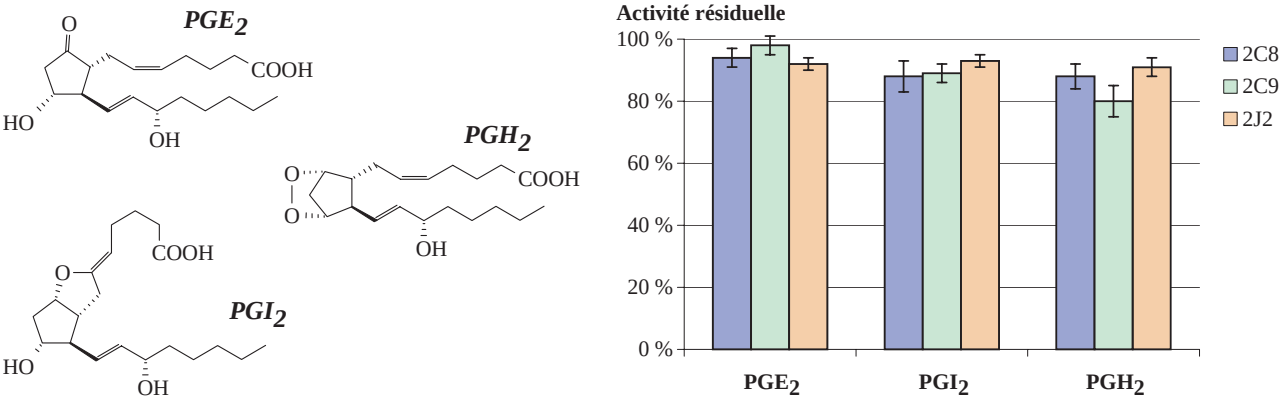


Figure V.3 – **Inhibition des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 par les prostaglandines PGE_2, PGH_2 et PGI_2 (50 μM)**.

Une autre série de composés testés comme inhibiteurs des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 a été constituée des dérivés issus des voies lipoxygénases et P450s époxygénases (hydroperoxydes HPETE, leucotriène LTB_4, alcools HETE et époxydes EET). Les variations d'activité observées pour une concentration en inhibiteur de 50 μM sont indiquées dans la figure V.4.

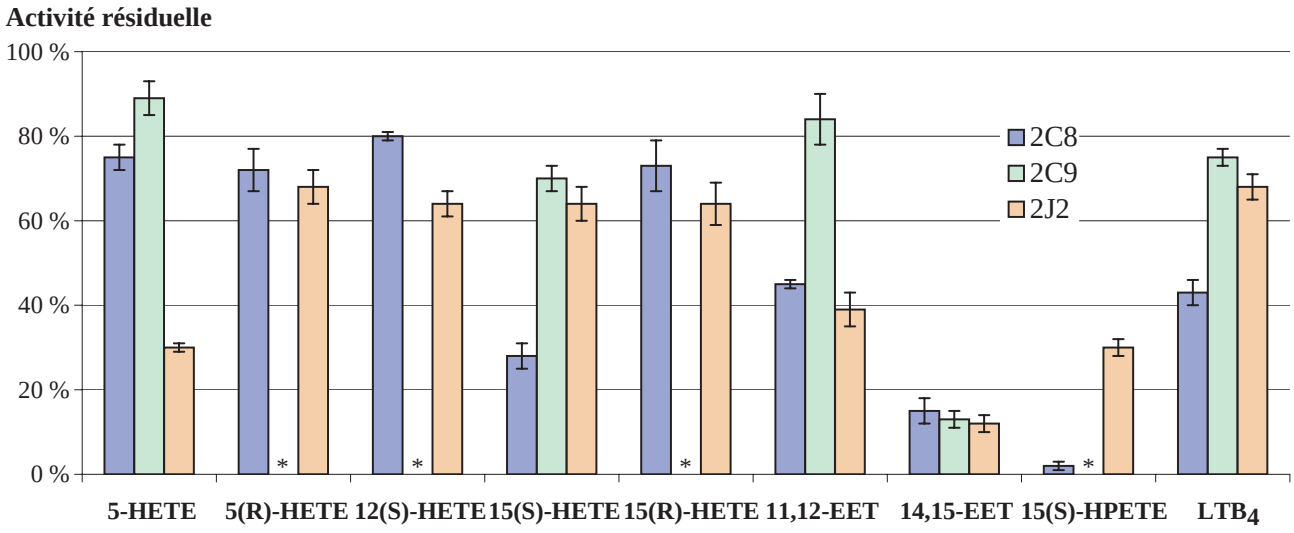


Figure V.4 – **Inhibition des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 par certains dérivés de la cascade arachidonique (concentration de 50 μM)**. * : non mesuré.

A partir de ces données, les composés les plus inhibiteurs de chacune des isoformes ont été sélectionnés et leur CI_{50} ont été déterminées (tableau V.4). Les concentrations en substrat étaient fixées à la valeur de la K_m, afin de pouvoir comparer les CI_{50}.

Tableau V.4 – **CI_{50} mesurées pour certains dérivés de la cascade arachidonique, vis-à-vis des CYP 2C8, 2C9 et 2J2**.

Inhibiteur	$CI_{50}(\mu M)$		
	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2J2
5-HETE	*n.d.*	*n.d.*	25 ± 2
15(S)-HETE	26 ± 4	*n.d.*	*n.d.*
15(R)-HETE	95 ± 8	*n.d.*	*n.d.*
11,12-EET	41 ± 7	*n.d.*	25 ± 4
14,15-EET	$7{,}5 \pm 1{,}2$	$7{,}0 \pm 1{,}8$	8 ± 2
15(S)-HPETE	8 ± 2	*n.d.*	34 ± 7
LTB_4	40 ± 3	*n.d.*	*n.d.*

n.d. : non déterminée

Plusieurs valeurs de CI_{50} sont remarquables :

– Le 15(S)-HPETE, malgré sa forte réactivité due à sa fonction hydroperoxyde, n'inhibe significativement le CYP 2J2 qu'à des concentrations relativement élevées (CI_{50} = 34 μM), alors que son pouvoir inhibiteur est plus important vis-à-vis du CYP 2C8 (CI_{50} = 8 μM). On peut noter que cet hydroperoxyde a un effet inhibiteur plus important que l'alcool correspondant. Cette fonction hydroperoxyde ROOH mise en présence d'un cytochrome Fe^{III} peut subir une coupure homolytique et former un radical $RO^{\bullet}$, qui peut dégrader l'hémoprotéine en se fixant irréversiblement sur l'hème ou sur l'apoprotéine *(Iba et al., 1993; Yao et al., 1993; Barr et al., 1996).*
– Le leucotriène B_4, impliqué dans les phénomènes d'inflammation, possède une affinité relativement moyenne pour le CYP 2C8, et est mal reconnu par le CYP 2J2.

– Les deux époxydes d'acide arachidonique testés sont relativement affins pour les trois isoformes. Il est à noter que le régioisomère 14,15-EET possède une meilleure affinité (de 2 à 5 fois) par rapport au 11,12-EET, pour les deux isoformes CYP 2C8 et CYP 2J2, alors que les deux isomères sont formés en quantité équivalente par les CYP 2C8, 2C9 et 2J2.

V-4 Discussion et conclusion.

De toutes **les molécules impliquées dans les voies de relaxation vasculaire** (voie EDRF, voie des prostaglandines et voie de l'EDHF) **dont les effets vis-à-vis des CYP 2C8, 2C9 et 2J2 ont été étudiés** ci-dessus, c'est-à-dire :

– les différents composés apparaissant lors de la biosynthèse et la biodégradation de NO (arginine, citruline, NOHA, NO, NO_2^-, NO_3^- et $ONOO^-$),
– certains composés apparaissant dans la cascade arachidonique, soit :
  • l'acide arachidonique lui-même,
  • via la voie des cyclooxygénases (PGE_2, PGH_2 et PGI_2),
  • via la voie des lipoxygénases (5-, 12- et 15-HETE, 15-HPETE et LTB_4)
  • via la voie des époxygénases (11,12- et 14,15-EET),

seules quelques unes ont des CI_{50} inférieures à 50 μM. Il s'agit de NO, des 15(S)-HETE et HPETE, du LTB_4, des 11,12- et 14,15-EET, ainsi que des acides arachidonique et linoléique pour le CYP 2C8. Il ne s'agit que du 5(S)-HETE, du 15(S)-HPETE, des 11,12- et 14,15-EET et de l'acide arachidonique pour le CYP 2J2 (voir tableau V.5).

Tableau V.5 – **Dérivés testés présentant une CI_{50} inférieure à 50 μM, vis-à-vis des CYP 2C8, 2C9 et 2J2**.

	CYP 2C8	CYP 2C9	CYP 2J2
NO	+	+	-
$ONOO^-$	-	*n.d.*	-
PGE_2, PGH_2, PGI_2	-	-	-
5-HETE	-	-	+
15(S)-HETE	+	-	-
15(R)-HETE	-	*n.d.*	-
15(S)-HPETE	+	*n.d.*	+
LTB_4	+	-	-
11,12-EET	+	*n.d.*	+
14,15-EET	+	+	+
Acide arachidonique	+	+	-
Acide linoléique	+	+	-

+ : $CI_{50} < 50$ μM ; - : $CI_{50} > 50$ μM.
n.d. : non déterminée

L'acide arachidonique est substrat des CYP 2C et du CYP 2J2 (cf. chapitre **I**). Il montre une plus grande affinité pour les CYP 2C que pour le CYP 2J2. Le rapport des CI_{50} mesurées est d'environ 4, ce qui suggère qu'à faibles concentrations en acide arachidonique, les CYP 2C8 et 2C9 pourraient être

les enzymes majoritairement responsables de la formation des EETs. Il faudrait toutefois connaître les constantes k_{cat} des réactions d'époxydation de l'acide arachidonique par ces P450s pour pouvoir conclure. Ces constantes ne sont pas connues à l'heure actuelle pour le CYP 2J2, et nous n'avons pas eu le temps, à la fin de ce travail de thèse, de faire les études (assez longues) correspondantes.

L'acide linoléique a une affinité aussi bonne (voire meilleure pour le CYP 2C9) que l'acide arachidonique pour les CYP 2C8 et 2C9. Dans certaines pathologies liées à un stress oxydant (brulûres, choc systémique, ...), cet acide gras semble jouer un rôle important dans la cytotoxicité résultante, à des concentrations élevées (100-500 μM). Des travaux montrent également l'implication possible des époxydes d'acide linoléique dans cette toxicité *(Moran et al., 2000)*. Mais à faibles concentrations (5nM-5μM), l'acide linoléique et ses époxydes peuvent diminuer la lyse cellulaire, et protéger ainsi les tissus *(Yang et al., 2001)*. Lors d'un stress oxydant, l'augmentation importante de l'acide linoléique aurait donc moins d'influence sur l'activité catalytique du CYP 2J2, par rapport aux CYP 2C, permettant ainsi à cette enzyme de jouer son rôle protecteur des vaisseaux, en formant les EETs.

NO et $ONOO^-$ sont les deux seules espèces impliquées dans la voie EDRF qui peuvent inhiber efficacement les CYP 2C8 et 2J2.

- **Le monoxyde d'azote NO** est un bien meilleur inhibiteur du CYP 2C8 que du CYP 2J2 (rapport des CI_{50} supérieur à 40). A des concentrations comprises entre 10 et 100 μM, NO inhibe très fortement le CYP 2C8 alors qu'il n'a pas d'effet significatif sur le CYP 2J2. Dans les vaisseaux présentant une forte activité de production de NO (voie EDRF très active), la formation des EETs devrait être majoritairement dépendante du CYP 2J2 dans la mesure où les CYP 2C seraient inhibés par NO. Dans cette situation, le CYP 2J2 ne serait que minoritairement impliqué dans la relaxation vasculaire via l'EDHF. Il pourrait par contre assurer une synthèse plus « basale » des EETs pour des rôles physiologiques autres que la relaxation (anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, cf chapitre **I**). A l'inverse, dans des situations vasculaires de trop faible production de NO (voie EDRF peu active dans des situations pathologiques de faible activité des eNOS, ou cas des vaisseaux de faible diamètre *(Nagao et al., 1992; Shimokawa et al., 1996)*), dans lesquelles la voie EDHF jouerait un rôle compensatoire pour la relaxation vasculaire *(Bauersachs et al., 1996)*, la biosynthèse des EETs pourrait être fortement dépendante des CYP 2Cs et ne dépendrait que de façon minoritaire du CYP 2J2. Ces suggestions qui dérivent de nos résultats restent à établir par des études de systèmes biologiques plus complexes (cellules endothéliales, tissus *in vivo*). De telles études sont d'autant plus nécessaires que d'autres effets peuvent intervenir dans l'interaction entre les voies EDRF et EDHF, comme l'effet inducteur de NO vis-à-vis de certains P450s (4A ou 2J4 chez le rat) *(Yaghi et al., 2004; Tunctan et al., 2006)*.
- **Le peroxynitrite** est une espèce chimique très réactive susceptible de modifier de façon irréversible de nombreuses protéines, par oxydation ou nitration *(Cassina et al., 2000; Daiber et al., 2000a,b)*. Ainsi, le K_i d'inactivation de la prostacycline synthase par $ONOO^-$ est de l'ordre de 50 nM *(Zou et Ullrich, 1996)*. Certains travaux ont montré que le CYP 2J2 pouvait être impliqué dans une protection des tissus vasculaires soumis à un fort stress oxydant, (hypoxie-réoxygénation, ...) *(Yang et al., 2001; Spiecker et Liao, 2005)*. La bonne résistance des CYP

2C8 et 2J2 à l'inhibition par $ONOO^-$ (CI_{50} supérieures à 60 μM, tableau V.1) suggère que, même en présence d'un stress oxydant important et à des concentrations en $ONOO^-$ de 1 à 50 μM, le CYP 2J2 pourrait continuer à jouer un rôle de protection en synthétisant les EETs qui ont des activités anti-inflammatoires et anti-thrombotiques.

Les composés issus de la voie **cyclooxygénase** testés ici, les prostaglandines PGH_2, PGE_2 et PGI_2 n'ont pas d'effet inhibiteur significatif sur les CYP 2C8, 2C9 et 2J2. Ils ne devraient pas avoir d'effets directs importants sur la biosynthèse des EETs dans le vaisseau. Cependant, les époxydes formés par le CYP 2C9 peuvent, eux, influer sur la formation des prostaglandines, notamment en induisant l'expression de la cyclooxygénase 2, catalysant la formation de la prostaglandine PGE_2 *(Michaelis et al., 2005).*

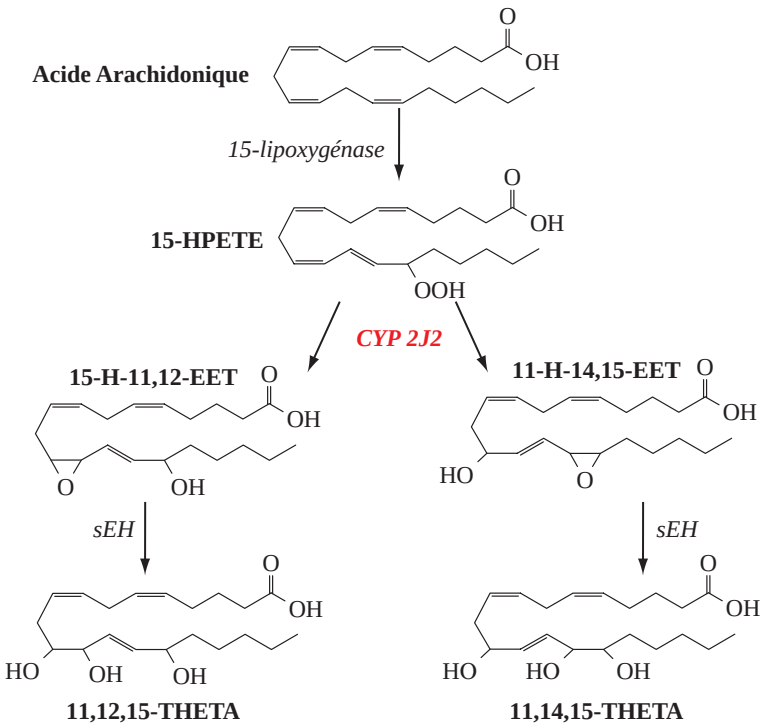


Figure V.5 – **Voies de synthèse des triols dérivés de l'acide arachidonique, d'après *(Pfister et al., 2003b)***. sEH : Epoxyde hydrolase soluble ; THETA : Acide Trihydroxyeicosatriènoïque.

Parmi les dérivés issus de la **voie lipoxygénase**, seuls les **5-HETE** et **15-HPETE** ont des CI_{50} inférieures à 50 μM vis-à-vis du CYP 2J2. Un travail réalisé en collaboration avec des équipes américaines, dont la publication correspondante *(Pfister et al., 2003b)* est insérée en annexe A a montré l'implication du CYP 2J2 dans l'isomérisation du 15-HPETE en deux hydroxy-époxydes d'acide arachidonique, les 11-hydroxy-14,15-EET et en 15-hydroxy-11,12-EET (voir figure V.5). Cette réaction est suivie d'une hydrolyse de ces époxydes, probablement catalysée par des époxydes hydrolases pour donner deux triols, les acides 11,14,15- and 11,12,15- trihydroxyeicosatrienoïques (THETA). Les deux hydroxy-époxydes et les deux triols correspondants sont vasorelaxants, et pourraient participer au mécanisme EDHF *(Pfister et al., 1998; Campbell et al., 2003).*

Le **leucotriène B_4** n'a pas d'effet significatif sur l'activité du CYP 2J2, alors qu'il inhibe le CYP 2C8 avec une CI_{50} de 40 μM (tableau V.4). Ce composé est un médiateur important de l'inflammation, son activité chimiotactique permettant d'attirer sur le site inflammatoire les polynucléraires et les

monocytes *(Devchand et al., 1996)*. A l'inverse, les époxydes d'acide arachidonique synthétisés par le CYP 2J2 ont des propriétés anti-inflammatoires *(Node et al., 1999; Spiecker et Liao, 2005)*. L'absence d'effet du LTB_4 sur le CYP 2J2 pourrait contribuer à expliquer l'importance de ce P450 dans la protection des tissus vasculaires.

Les **époxydes d'arachidonique** testés, les 11,12- et 14,15-EET, ont des affinités notables pour le CYP 2J2 et pour le CYP 2C8, le second étant le plus affin dans les deux cas (CI_{50} de 8 et 7 μM respectivement, tableau V.4). Ces deux époxydes sont présents en quantités équivalentes dans le coeur, l'endothélium ou le plasma humain *(Wu et al., 1996; Node et al., 1999; Spiecker et Liao, 2005)*, avec des concentrations intracellulaires variant entre 0,1 μM et 0,3 μM, selon les auteurs. Ces concentrations sont faibles si on les compare aux CI_{50} mesurées pour les CYP 2J2 et 2C8, ce qui suggère que ces EET devraient avoir peu d'effet sur les activités catalytiques de ces P450s. De plus, des quatre régioisomères issus de l'époxydation de l'acide arachidonique, celui qui présente les activités anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et vasorelaxantes les plus importantes est le 11,12-EET. Il est intéressant de noter, à cet égard, que des deux époxydes que nous avons testés, le 11,12-EET est celui qui inhibe le moins les CYP 2J2 et 2C8.

Il est à noter que les concentrations cellulaires locales des différents composés testés ne peuvent être déterminées en temps réel, et sont généralement plus faibles que les concentrations utilisées dans nos tests d'inhibition. De plus, ces concentrations cellulaires sont dépendantes de nombreux facteurs physiologiques dans des milieux assez complexes (membranes, ...), et la notion de **concentration locale** ainsi que les mécanismes de **flux métabolique** prennent toute leur importance pour définir une concentration d'un médiateur donné. Nous nous sommes attachés à étudier l'influence de concentrations usuellement utilisées dans le cas d'études sur les cytochromes P450, afin de pouvoir différencier les trois P450s (CYP 2C8, 2C9 et 2J2) qui sont susceptibles de synthétiser dans les tissus vasculaires les médiateurs très importants que sont les époxydes d'acide archidonique.

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse de la participation du CYP 2J2 dans les phénomènes liés à la protection des tissus vasculaires, *via*, en particulier, la formation d'EETs anti-inflammatoires. Le tableau récapitulatif V.5 illustre bien que contrairement aux CYP 2C, le CYP 2J2 semble très peu affecté par des médiateurs vasculaires importants comme NO, le LTB_4 et l'acide linoléique. Dans des situations de stress où ces médiateurs sont produits en quantités importantes, on peut s'attendre à une inhibition des CYP 2C, alors que le CYP 2J2 devrait l'être moins et pourrait continuer à produire des EETs protecteurs. Par contre, en ce qui concerne la voie de relaxation de l'EDHF, qui prend une grande importance dans le cas d'une déficience de production de NO (voie EDRF peu active), les CYP 2Cs, non inhibés par NO dans ces conditions, pourraient participer à une synthèse des EETs qui seraient médiateurs de l'EDHF. Ceci va dans le sens de divers résultats de la littérature, y compris venant d'études *in vivo*, qui privilégient un rôle majeur du CYP 2J2 dans la protection du tissu vasculaire *(Larsen et al., 2007; Seubert et al., 2007)*, et d'un rôle plus important des CYP 2Cs dans la relaxation des vaisseaux *(Fisslthaler et al., 1999; Bolz et al., 2000; Fisslthaler et al., 2000; Fleming, 2001; Fleming et al., 2001; Bauersachs et al., 2002; Larsen et al., 2006)*.

CHAPITRE VI
CONCLUSION GÉNÉRALE

Comme cela était indiqué à la fin du chapitre **I**, le but général de ce travail de thèse était de mieux connaître le CYP 2J2, cytochrome P450 de découverte beaucoup plus récente que la plupart des isoenzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques ou dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes. De façon plus précise, les deux objectifs visés à court terme étaient : (i) de mettre au point des substrats et des inhibiteurs sélectifs pour ce P450, qui soit utilisables comme outils pour la détermination des rôles biologiques de ce P450 chez l'homme et (ii) de déterminer la topologie de son site actif.

Pour atteindre le premier objectif, nous avons synthétisé 25 composés dérivant de l'ébastine et de la terfénadine. Une comparaison des effets inhibiteurs de ces composés vis-à-vis du CYP 2J2 et des autres principaux P450s humains présents dans les vaisseaux **nous a permis de sélectionner 4 molécules** :

- **4** est un inhibiteur compétitif sélectif et un substrat à haute affinité du CYP 2J2 (K_m et $K_i \simeq$ 150 nM).
- **5** et **13** sont des inhibiteurs sélectifs, de type substrat-suicide, du CYP 2J2, présentant des valeurs de k_{inact}/K_I de l'ordre de 3 000 L.mol^1.s^{-}1.
- **14** est un inhibiteur affin ($CI_{50} \simeq$ 400 nM), utilisable pour bloquer l'ensemble des P450s vasculaires et donc la formation des EETs dans les vaisseaux.

Une étude détaillée de l'oxydation de certains de ces dérivés de la terfénadone par le CYP 2J2 **a révélé une régiosélectivité surprenante de ce P450, qui favorise l'hydroxylation de ces dérivés en position homobenzylique**. A l'inverse, le CYP 3A4 hydroxyle ces mêmes substrats majoritairement en position benzylique, la plus réactive aux oxydations.

Pour interpréter ces résultats concernant ces nouveaux inhibiteurs et substrats du CYP 2J2, et pour **atteindre le deuxième objectif indiqué ci-dessus**, nous avons construit un modèle 3D par homologie du CYP 2J2 et nous avons *docké* divers dérivés de la terfénadone dans son site actif. L'utilisation de ce modèle qui **donne une première approche en 3D de ce que pourrait être le site actif de ce P450**, fournit une explication de la régiosélectivité surprenante du CYP 2J2 évoquée précédemment. Elle serait due à un positionnement très contraint des substrats dans le site actif, et à **une approche de l'hème du CYP 2J2 très restreinte**, d'une part, par une petite cavité hydrophobe due à des résidus encombrants au voisinage de l'hème, et d'autre part, par une liaison hydrogène possible entre l'arginine 117 et une fonction carbonyle des substrats.

De façon plus générale, l'étude des interactions entre les résidus du site actif du CYP 2J2 et des dérivés de la terfénadone a permis de comprendre l'origine des facteurs structuraux importants pour une bonne reconnaissance d'un composé par ce P450 :

- la présence d'un groupe terminal **R** hydrophobe et de petite taille (3 carbones),
- la présence d'une fonction CO en *para* de **R** sur le noyau aromatique porteur de **R**,
- la présence de groupes hydrophobes (phényles) à l'autre extrémité (non hydroxylée) du composé.

Pour confirmer nos hypothèses concernant la nature des aminoacides impliqués dans la reconnaissance des substrats, il conviendrait de construire les mutants correspondants et d'étudier leur régiosélectivité et leur affinité pour les dérivés de la terfénadone. Comme indiqué à la fin du chapitre

IV, la construction de certains mutants, notamment de l'arigine 117, est en cours dans le laboratoire de D. Zeldin (NIEHS, NIH, USA). L'obtention d'une structure RX du CYP 2J2 serait aussi un point important ; ceci a été discuté avec E.F. Johnson (Scripps Institute, La Jolla, USA).

Quoiqu'il en soit, des études de *docking* utilisant notre modèle devrait déjà permettre de mettre au point des substrats et/ou inhibiteurs encore plus affins et sélectifs du CYP 2J2. Elles devraient aussi être très utiles pour savoir **quelles molécules endogènes sont les plus susceptibles d'être substrats** (autres que l'acide arachidonique), ou, de façon plus générale, d'**interagir efficacement avec le CYP 2J2**. Ceci devrait permettre de déterminer les différents rôles de ce P450 humain particulier du fait de son tropisme pour le système cardiovasculaire. Ceci devrait être également utile pour comprendre les effets de diverses molécules endogènes, présentes en particulier au niveau vasculaire, susceptibles d'interagir avec les activités biologiques du CYP 2J2. Les études décrites dans le chapitre **V** constituent une première approche dans cette perspective. Elles doivent être confirmées par des études au niveau cellulaire, ou *in vivo*, mais elles suggèrent déjà les points suivants :

- **Le rôle majeur du CYP 2J2 au niveau vasculaire devrait être la protection des tissus vis-à-vis du stress oxydatif**, *via* la formation d'EETs anti-inflammatoires et anti-thrombotiques. En effet, le fait qu'il soit très peu inhibé par de nombreux médiateurs comme NO, le LTB_4 ou l'acide linoléique, fait qu'il peut continuer à produire des EETs protecteurs, au contraire des CYP 2C8 et 2C9 qui sont fortement inhibés par ces médiateurs.
- **Le rôle majeur des CYPs (2C8 et 2C9) dans le système cardiovasculaire pourrait se situer au niveau de la vasorelaxation (EDHF), pincipalement dans les situations de déficit de production de NO** (situations physiopathologiques où les eNOS ont une activité insuffisante, petits vaisseaux où la voie EDRF est peu active, ...). Dans ces conditions, les CYP 2Cs ne seraient pas inhibés par NO et pourraient être majoritairement responsables de la biosynthèse des EETs, qui participent fortement au mécanisme EDHF.

CHAPITRE VII
PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

VII-1 Méthodes Biochimiques.

VII-1.1 Produits et enzymes employées.

VII-1.1.1 Produits chimiques.

Le $NADP^+$, le glucose-6-phosphate (G6P) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et le NADPH proviennent de Boehringer-Mannheim (Mannheim, Allemagne). L'ébastine nous a été fournie par Pharmafarm (filiale de Almirall ProdesFarma, Barcelone, Espagne). L'amodiaquine, le diclofénac, le paclitaxel (taxol), la 7-benzyloxyrésorufine, la résorufine, la testostérone, le sulfaphénazole, la ticlopidine, le kétoconazole, la terfénadine, l'astémizole, la cinnarizine, la flunarizine, le GBR12909, le GBR12935, l'arginine, la nitro-arginine (NOHA), la citrulline, le nitrite de sodium, le nitrate de sodium, l'acide linoléique et l'acide arachidonique proviennent de Sigma Chemicals (St Quentin Fallavier, France). Le montélukast provient de Sequoia Research (Oxkord, UK). La majorité des différents métabolites des substrats utilisés pour les études quantitatives nous a été fournie par l'équipe de D. Buisson de l'UMR 8601. La solution de peroxynitrite a été préparée au laboratoire par J-L. Boucher, en suivant la méthode décrite par *(Pryor et al., 1995)*, à partir du peroxyde d'hydrogène et du nitrite.

(a) Synthèse des dérivés d'ébastine et de terfénadone.

Les protocoles de synthèse, ainsi que la caractérisation par RMN ^1H et spectrométrie de masse tandem des composés dérivés de la terfénadone, de l'ébastine et de la déhydroterfénadone utilisés dans les chapitres **III** et **IV** sont indiqués dans l'article 3 (partie III-2.9).

(b) Purification et dosage des acides gras.

L'acide linoléique et l'acide arachidonique sont purifiés sur cartouche de silice Sep-Pak (Waters, St Quentin en Yvelines). Pour éviter l'oxydation de l'acide gras au cours de sa purification, toutes les opérations sont effectuées sous argon et les solvants sont désaérés par un courant d'argon. La cartouche de silice est lavée par 5 mL d'éther puis équilibrée avec 10 à 15 mL d'hexane, premier solvant d'élution. 100 à 200 μmoles (soit environ 25 à 50 μL) d'acide gras sont déposés sur la colonne. Trois fractions d'élution sont recueillies : 5 ml d'hexane, 20 mL d'un mélange hexane/éther (95/5 v:v) et 5 ml d'éther. La fraction intermédiaire est évaporée sous vide sans chauffage. Le résidu peut être dissous dans 10 mL de tampon Tris 0,05 M pH = 9 contenant 0.1 mM de DETAPAC et 2 à 5 gouttes d'ammoniaque 2 M. La concentration (environ 10 mM) est déterminée en mesurant à partir d'un aliquot de la préparation purifiée la quantité de 13-HPOD (pour l'acide linoléique) ou de 15(S)-HPETE (pour l'acide arachidonique) formé totalement à pH = 9 sous l'action de la lipoxygénase 1 de soja à 5 nM (voir plus loin). La solution d'acide gras purifié est répartie en fractions aliquotées de 100 μL et conservée à -20˚C.

(c) Synthèse et dosage du 15(S)-HPETE.

L'incubation a lieu à pH=9 dans le tampon Tris 0,05 M (0,1 mM de DETAPAC) contenant de la lipoxygénase 1 de soja (5 à 10 nM). L'acide arachidonique (100 μM) est ensuite ajouté à la solution. Avant cette incubation, le tampon (100 mL) est d'abord saturé d'oxygène pendant 10 minutes par un courant d'oxygène et amené à environ 4°C dans la glace. Cette température, le courant d'oxygène ainsi qu'une agitation mécanique sont maintenus pendant toute la durée de l'incubation. La lipoxygénase puis l'acide gras sont ajoutés. La réaction est suivie en mesurant à intervalles réguliers, la DO à 234 nm. Lorsque la réaction est terminée et totale (DO maximale) la solution est aussitôt acidifiée à pH 4,5 avec une solution d'HCI à 1 M.

L'hydroperoxyde est extrait en utilisant une cartouche Sep-Pak de silice greffée C 18. La cartouche est d'abord lavée par 1 à 2 mL de méthanol, puis équilibrée avec 10 à 15 ml d'eau acidifiée à pH 4,5 avec HCl 1 M. L'incubation est alors passée à travers la cartouche qui est ensuite lavée à l'eau acide (10 mL), puis à l'eau pure (10 mL), puis séchée par aspiration sous vide. L'hydroperoxyde est élué par 1 mL de méthanol et stocké à -20°C.

Le dosage du 15(S)-HPETE est réalisé par spectrométrie UV-visible, à 234 nm (avec un coefficient d'extinction molaire ε = 25 000 $M^{-1}.cm^{-1}$).

VII-1.1.2 Microsomes exprimant les P450s humains.

(a) Cellules d'insectes.

Les microsomes de cellules d'insectes exprimant le cytochrome P450 2J2 humain nous ont été fournis par le laboratoire de D.C. Zeldin. L'expression simultanée du CYP2J2 et la cytochrome P450 réductase humaine dans des cellules d'insectes *Spodoptera Frugiperda* (*Sf9*) est réalisée en utilisant le vecteur d'expression pAcUw51 (Dr. Cosette Serabjit-Singh, GlaxoSmithKline, NC, USA) et le système d'expression baculovirus BaculoGold (BD PharMingen, San Diego, CA, USA). Le protocole d'obtention de la protéine recombinante est décrite dans plusieurs travaux précédents *(Wu et al., 1997; Ma et al., 1999; Qu et al., 2001; King et al., 2002).*

Les microsomes de cellules d'insectes exprimant les 15 P450s humains (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 2J2) qui sont utilisés dans le chapitre **II** nous ont été fournis par le laboratoire de H.V. Gelboin, et sont d'origine commerciale. Les CYPs 2C19, 3A4 et 3A5 sont des Baculosomes® fournis par Panvera (Invitrogen, CA, USA), les autres isoformes sont des Supersomes® de Gentest (BD Biosciences, CA, USA). Dans les deux cas, la cytochrome P450 réductase (de lapin pour les Baculosomes, humaine pour les Supersomes) est également exprimée dans les microsomes de cellules d'insectes. La concentration en P450 des microsomes de cellules, fournies par le fabriquant, variaient entre 1 à 2 μM.

(b) Microsomes de levures.

Les microsomes de levures exprimant les P450s ont été obtenus dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (les souches sont indiquées dans le tableau VII.1). Toutes les souches ont été construites

selon la méthode de D. Pompon au Centre de Génétique Moléculaire (Gif/Yvette, France) *(Urban et al., 1994; Pompon et al., 1996)*, soit par son équipe, soit par l'équipe de P. Beaune (U490 Inserm/Université Paris 5), soit par l'équipe de F. Broly (Université de Lille 1).

P450	Origine	Souche	[P450] (μM)	[Protéines] (mg.mL^{-1})	[CPR] (μM)
2B6	P. Beaune	W(R)	2,2	25	1,8
2C8	P. Beaune	W(R) Fur	2,5	65	11
2C9	D. Pompon	W(R) Fur	2,2	80	13
3A4	D. Pompon	W(hR)	6,9	40	6,8
4F12	F.Broly	W(R)	0,02	24	0,7

Tableau VII.1 – **Origines et composition des microsomes de levures utilisés**. CPR : Cytochrome P450 Réductase.

Les microsomes ont été préparés selon les méthodes précédemment décrites *(Bellamine et al., 1994; Peyronneau et al., 1992; Melet, 2004)*. Les microsomes des CYPs 2C et 3A4 ont été obtenus au laboratoire. Après culture et induction du P450 et de la P450-réductase dans les cellules de levure, 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 espacées de 30 secondes). Les billes sont ensuite retirées par filtration sur verre fritté. Le broyat est alors centrifugé à 10 000 tr/min pendant 10 minutes, afin de séparer les débris cellulaires (culot) du cytosol et des microsomes (surnageant). Le surnageant est centrifugé à 35 000 tr/min (100 000 g) pendant 1h30, puis le culot 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.

VII-1.1.3 Microsomes humains.

Les microsomes de foie humains ont été préparés par l'équipe de D.C. Zeldin, à partir de plusieurs échantillons de foie. Les microsomes intestinaux humains nous ont été fournis par Biopredic (Rennes).

VII-1.1.4 Anticorps monoclonaux.

La préparation des anticorps monoclonaux a été réalisée au sein du laboratoire de H. Gelboin par K. Krausz (Center for Cancer Research, NCI, MD, USA) dont le protocole d'obtention a été décrit précédemment *(Gelboin et al., 1998; Gelboin et Krausz, 2006)*. En résumé, trois souris Balb/c sont immunisées avec 10 μg de microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 dans 0,2 mL d'adjuvant, une fois par semaine pendant trois semaines. Les cellules de la rate sont isolées et fusionnées avec des cellules de myelomes de souris, et une détection par ELISA est réalisée pour déterminer une production d'anticorps. Parmi les 1000 hybridomes testés, trois clones spécifiques ont été isolés, pour être testés comme spécifiquement affins et inhibiteurs.

VII-1.2 Conditions d'incubation.

VII-1.2.1 Mesure d'activité hydroxylase.

Ce protocole a été utilisé dans le cas de l'hydroxylation de l'ébastine, de la terfénadone et de leurs dérivés, de la 4'-hydroxylation du diclofénac, de la 6α-hydroxylation du taxol, de la 6β-hydroxylation de la testostérone et de la N-déethylation de l'amiodaquine.

Le milieu d'incubation contient initialement des cytochromes P450 microsomaux (concentration finale entre 2 et 20 nM), le substrat dilué dans du DMSO, l'inhibiteur si nécessaire (dilué dans du DMSO), dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant de l'EDTA en concentration 1 mM. La quantité de solvant organique ajoutée avec le substrat et/ou l'inhibiteur ne doit pas dépasser 1 % du volume final d'incubation. Ce mélange est incubé 2 à 3 minutes à 28˚C ou 37˚C (pour les microsomes de levures ou de cellules d'insectes, respectivement). La réaction enzymatique est démarrée par l'ajout d'une solution contenant du système générateur de NADPH ($NADP^+$ 1mM, glucose-6-phosphate 10 mM, glucose-6-phosphate déshydrogénase 2U/mL) dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, préincubé 2 à 3 minutes à 37˚C ou 28˚C pour permettre la formation de NADPH, pour un volume total de 200 μL. Au temps désiré (voir tableau VII.2), 100 μL d'une solution précipitante (CH_3CN + CH_3COOH, 10 :1) à 4˚C sont ajoutés pour arrêter l'incubation. Le mélange est ensuite vortexé, puis centrifugé à 10 000 tours/min. Le surnageant (230-250 μL) est ensuite prélevé pour être injecté en CLHP-UV (voir partie VII-2.1).

Substrat	Activité	P450	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	Temps d'incubation (min.)
Taxol	6α-hydroxylation	CYP2C8	6	10	5
Amodiaquine	N-déethylation	CYP2C8	4	1	10
Diclofénac	4'-hydroxylation	CYP2C9	29	7	5
Ebastine	hydroxylation	CYP2J2	35	0,5	2, 4, 6
Testostérone	6β-hydroxylation	CYP3A4	56	25	5

Tableau VII.2 – **Données expérimentales des différentes activités enzymatiques mesurées**.

- Dans le cas de l'ébastine ou de ses dérivés, plusieurs temps d'incubation sont nécessaires pour s'assurer de la linéarité. Dans ce cas, le volume d'incubation est généralement de 600 μL. Aux temps désirés, 180 μL du milieu réactionnel sont prélevés et ajoutés à 90 μL de la solution d'arrêt.
- La concentration en substrat généralement utilisée est la valeur de la constante du complexe de Michaelis K_m (Tableau VII.2).
- Les incubations en présence d'acide arachidonique et linoléique sont faites en ajoutant au milieu réactionnel du glutathion (10 mM) et de la glutathion-peroxydase (0,1 U/ml), afin d'éviter l'inactivation rapide des P450s par les éventuels peroxydes présents dans la solution d'acide gras (en proportion faible, < 0,1 %, mais non négligeable par rapport à la concentration en P450).
- Les inhibitions par anticorps monoclonaux anti-CYP sont réalisées par pré-mélange des anticorps (0-1 μg protéine/pmol P450 dans le cas des microsomes hépatiques, 0-2 μg protéine/μg protéine pour les microsomes intestinaux et 0-5 μg protéine/pmol P450 pour le CYP 2J2 recom-

binant) avec les cytochromes P450 dilués dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant de l'EDTA 0,1 mM à 0˚C pendant 30 minutes. Puis le substrat et le système générateur sont ajoutés pour mesurer l'activité résiduelle.

VII-1.2.2 Mesure de l'inactivation des P450s par des inhibiteurs suicides 5, 12 et 13.

(a) Conditions générales d'incubation.

Toutes les incubations ont été réalisées à 37˚C, et contenaient les microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2, les substrats et le système générateur de NADPH, dans un tampon phosphate de 0,1M à pH 7,4 contenant 1mM d'EDTA.

*(b) Analyse de l'oxydation de **13** par le CYP 2J2.*

Le substrat est incubé à 37˚C en présence du CYP 2J2 recombinant (10nM), et la réaction est démarrée en ajoutant le système générateur de NADPH, préincubé à 37˚C pour permettre la formation de NADPH (1 mL d'incubation). A t_0 et à intervalles réguliers, des fractions de 200 μL sont prélevées et mélangées à la solution précipitante (100 μL, CH_3CN/CH_3COOH 10 :1), afin d'arrêter la réaction enzymatique. Après centifugation à 10000 tr/min pendant 10 minutes, le surnageant est prélevé pour être directement injecté pour une analyse CLHP/SM/UV, ou congelé à -40˚C.

(c) Mesures des constantes cinétiques d'inactivation.

Les protocoles expérimentaux de détermination des paramètres cinétiques sont basés sur des méthodes précédemment décrites *(Lopez-Garcia et al., 1994; Silverman, 1995; Ha-Duong et al., 2001).* Les microsomes de cellules d'insectes (30 nM de P450) sont incubés dans les conditions décrites plus haut, en présence de l'inhibiteur en concentrations variables (1 à 20 μM). Au temps t_0 et à intervalles réguliers par la suite, 25 μL sont prélevés et utilisés pour déterminer l'activité résiduelle. La corrélation entre inactivation et formation du métabolite est assurée par le prélèvement simultané d'un aliquot de 125 μL pour déterminer la concentration de métabolite formé, comme décrit dans le paragraphe précédent. Afin de corriger la contribution possible de la dégradation intrinsèque des microsomes, des incubations contrôles (sans substrat ou système générateur de NADPH) sont réalisées simultanément aux expériences présentées.

(d) Détermination de l'activité enzymatique résiduelle.

La procédure de routine pour déterminer l'activité enzymatique résiduelle à la suite d'une oxydation d'un inhibiteur suicide nécessite un substrat alternatif pour estimer l'activité lors d'une seconde incubation *(Silverman, 1995).* Pour diminuer l'influence de l'inhibiteur présent dans le milieu d'incubation, le prélèvement de 25 μL issu de la première incubation est dilué jusqu'à 20 fois dans la solution tampon. Le volume final de la seconde incubation est de 500 μL, contenant 20 μM d'ébastine et le système générateur de NADPH. A temps initial (dilution des aliquots), 150 μL de l'incubation sont prélevés et la réaction enzymatique stoppée par addition de 75 μL de solution d'arrêt à

4˚C (CH_3CN/CH_3COOH 10:1). Le mélange réactionnel restant est incubé à 37˚C et deux autres aliquots sont retirés au bout de 2 et 4 minutes. Dans toutes ces expériences, des incubations de contrôle avec le substrat suicide sont réalisées en conditions non-catalytiques (sans NADPH), pour déterminer l'activité résiduelle maximale (définie par 100 % d'activité).

(e) Influence d'un inhibiteur compétitif et du glutathion réduit sur l'inactivation.

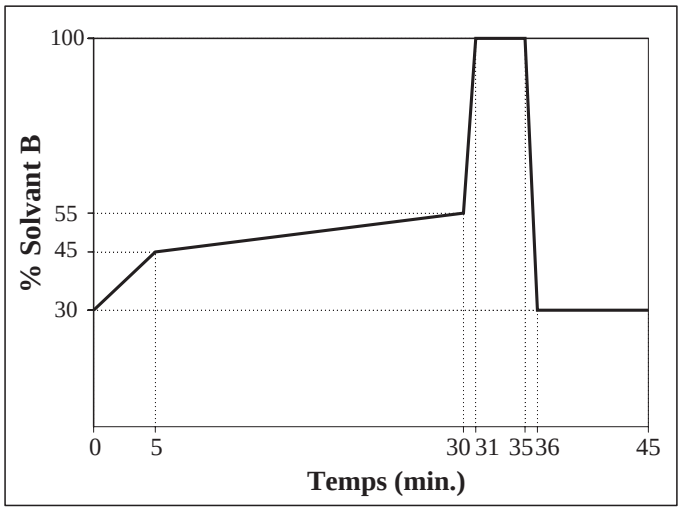
Les incubations précédemment décrites pour déterminer l'évolution de l'inactivation de l'enzyme au cours du temps ont été réalisées en présence d'un inhibiteur compétitif **4**, ou de glutathion réduit (GSH). L'inhibiteur compétitif (50 μM) ou le GSH (5 mM) sont ajoutés initialement dans le milieu d'incubation contenant 5 μM de **13**, avant l'ajout de système générateur de NADPH. L'activité maximale a été déterminée lors d'incubation témoin sans système générateur de NADPH.

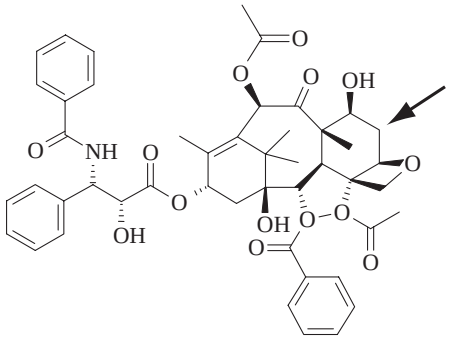
VII-2 Méthodes Analytiques.

VII-2.1 Analyse des activités enzymatiques par CLHP-UV.

Le matériel utilisé pour la détection des métabolites en CLHP-UV est constitué d'une chaîne Spectraphysics couplé à un détecteur UV Spectra FOCUS (Thermo Electron, Les Ulis, France).

VII-2.1.1 6-α-Hydroxylation du Taxol.



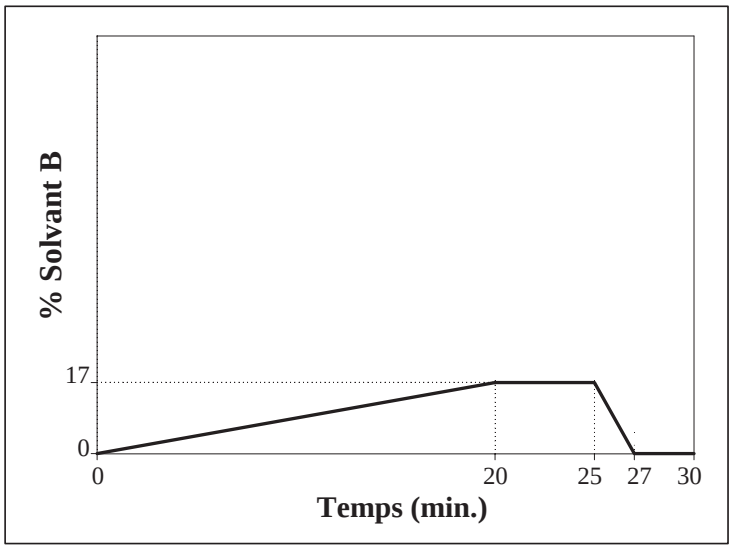


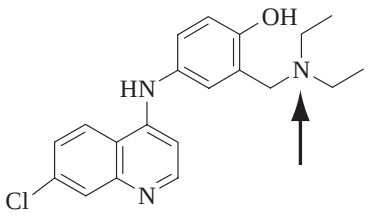
Colonne
XTerra MS C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μm)

Phase mobile	
Débit	1 mL/min
Solvant A	H_3PO_4 5mM
Solvant B	CH_3CN

Détection
Absorption UV à 230 nm

VII-2.1.2 N-Déséthylation de l'Amodiaquine.



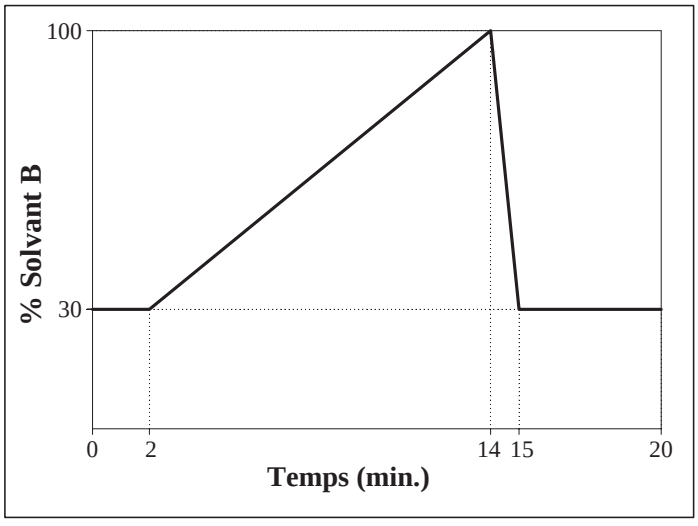


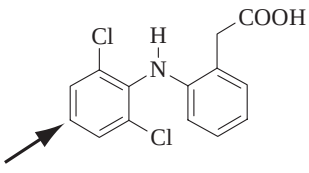
Colonne
XTerra MS C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)

Phase mobile	
Débit	1 mL/min
Solvant A	H_2O + TFA 0,1 %
Solvant B	CH_3CN + TFA 0,1 %

Détection
Absorption UV à 340 nm

VII-2.1.3 4'-Hydroxylation du Diclofénac.





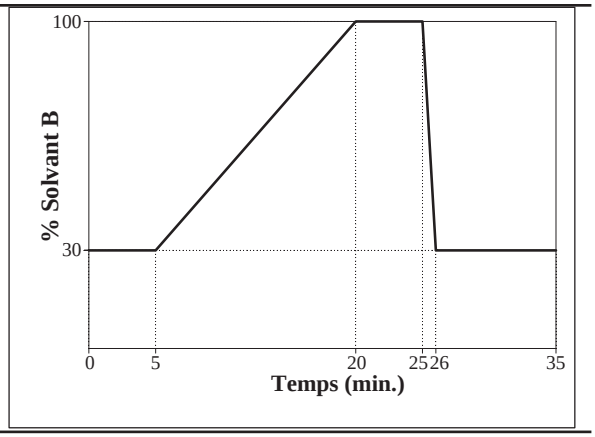
Colonne
Nucleosil C18 (125 × 4,6 mm, 5 μm)

Phase mobile	
Débit	1 mL/min
Solvant A	CH_3CN 30% + H_2O 70% + TFA 0,05%
Solvant B	CH_3OH

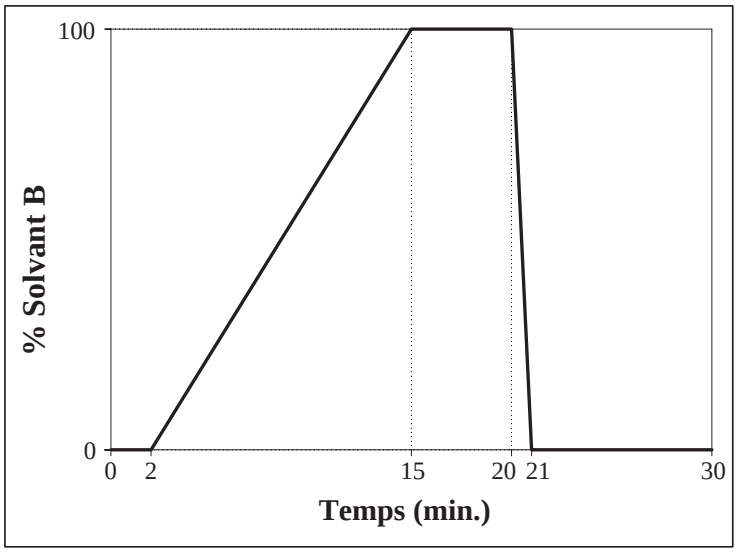
Détection
Absorption UV à 280 nm

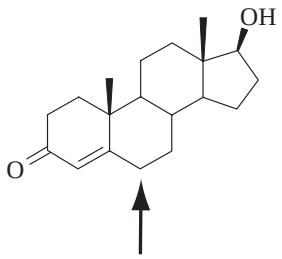
VII-2.1.4 Hydroxylation de l'ébastine, de la terfenadone et de leurs dérivés.

Colonne	
Hypersil MOS (250 × 4,6 mm, 5 μm)	
Phase mobile	
Débit	1 mL/min
Solvant A	Tampon Acétate 100mM pH 4,6
Solvant B	CH_3CN 70%/CH_3OH 20%/H_2O 10%
Détection	
Absorption UV à 254 nm	



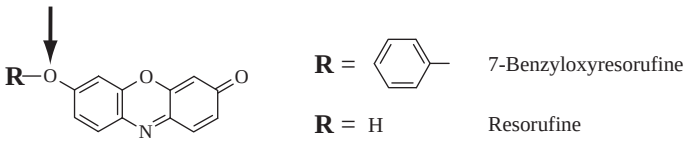
VII-2.1.5 6-β-Hydroxylation de la Testostérone.





Colonne	
Nucleosil C18 (125 × 4,6 mm, 5 μm)	
Phase mobile	
Débit	1 mL/min
Solvant A	H_2O 60% + CH_3OH 40%
Solvant B	CH_3OH
Détection	
Absorption UV à 247 nm	

VII-2.2 Analyse par fluorimétrie de l'activité O-débenzylation de la benzyloxyrésorufine.



Le protocole utilisé pour mesurer l'oxydation de la 7-benzyloxyrésorufine (BR) par le CYP 2B6 est adapté d'une méthode spectrofluorométrique décrite par Burke et Mayer *(Burke et Mayer, 1983).* Une solution contenant le substrat (0,5 μM de BR) et les microsomes de levures exprimant le CYP 2B6 (10 nM en P450) dans un tampon HEPES de 100 mM à pH 7,8 contenant 5 mM de $MgCl_2$ pour un volume total de 985 μL est incubée 3 minutes à 37˚C dans une cuve de fluorimètre, placée dans un fluorimètre Kontron SFM 25. La réaction enzymatique est démarrée en ajoutant 10 μL de NADPH à 10 mM. La formation de la résorufine, métabolite de cette réaction, est suivie en fluorescence en temps réel, à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et une longueur d'onde d'émission de 580 nm. Après 2 à 3 minutes d'incubation, l'inhibiteur (5 μL) est ajouté tout en continuant d'enregistrer la fluorescence. La présence de l'inhibiteur se traduit par un changement de pente de la courbe de formation du métabolite en fonction du temps (voir graphique VII.1). Il est à noter que les inhibiteurs dérivés de la terfénadone étudiés dans cette thèse n'absorbent pas aux longueurs d'ondes considérées, on peut donc négliger les interférences de l'inhibiteur dans la mesure de la fluorescence. La quantification de la résorufine formée est réalisée ensuite en ajoutant une quantité appropriée de résorufine (généralement 20 nM) dans la cuve, pour étalonner le graphique obtenu. Des incubations témoins sont réalisées au cours de l'expérience, dans lesquelles on ajoute du DMSO au cours de l'incubation, sans observer de variation de pente.

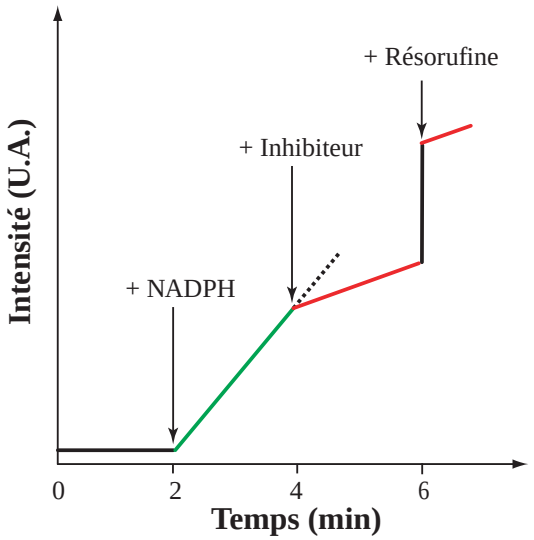


Figure VII.1 – **Evolution du signal de fluorescence de la résorufine au cours du test d'activité pour le CYP2B6**.

VII-2.3 CLHP-SM.

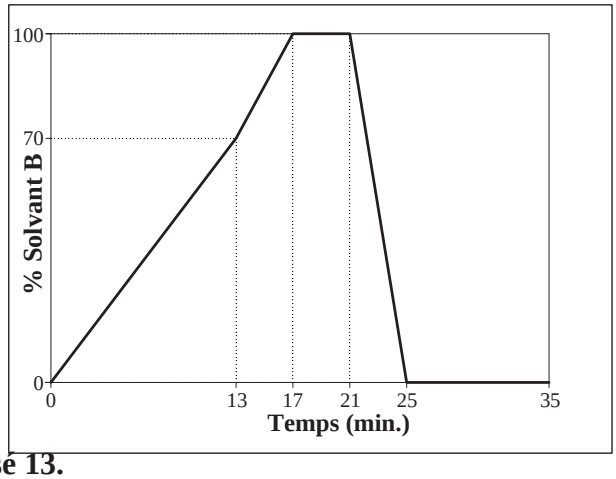
L'appareil utilisé de Chromatographie Liquide à Haute Pression (CHLP) est un système Surveyor CLHP couplé à un spectromètre de masse (SM) à trappe d'ions de Thermo Finnigan (Les Ulis). Les composés sont ionisés par électrospray (ESI) en mode positif. Un affinement des paramètres du spectromètre est réalisé en utilisant la procédure automatique du logiciel Tune Plus de l'appareil (Thermo Finnigan, Les Ulis). Les paramètres utilisés pour la détection des différents composés est indiquée dans le tableau VII.3. La fragmentation des ions est réalisée à une puissance définie par l'appareil entre 30 et 40 %, selon le produit à analyser.

Composé	Température (˚C) (capillaire)	Voltage	
		Source (kV)	Capillaire (V)
Astemizole	275	5	5
Cinnarizine	275	5	34
Flunarizine	275	5	34
GBR 12909	275	5	5
GRB 12935	275	5	5
Dérivés de la terfenadone	275	5	41

Tableau VII.3 – **Conditions de détection des différents composés par spectrométrie de masse**.

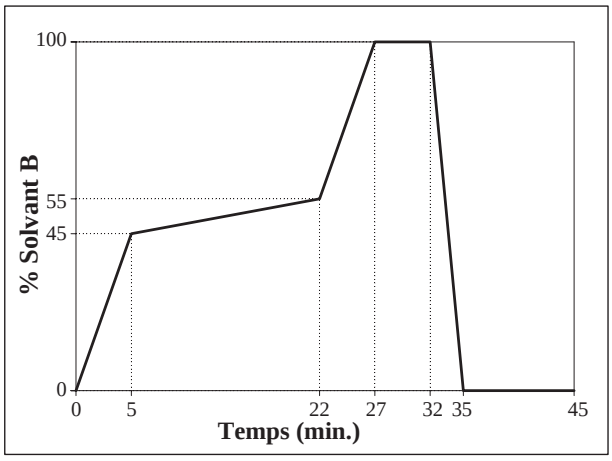
VII-2.3.1 Oxydation des dérivés d'ébastine par le CYP2J2.

Colonne	
Kromasil C18 (150 × 2,1 mm ; 3,5 μm)	
Phase mobile	
Débit	200 μL/min
Solvant A	$H_2O/CH_3CN/HCOOH$ (80 :20 :1)
Solvant B	$CH_3CN/HCOOH$ (99 :1)



VII-2.3.2 Formation du métabolite du composé 13.

Colonne	
Betabasic-18 (100 × 2,1 mm ; 3,5 μm)	
Phase mobile	
Débit	200 μL/min
Solvant A	$H_2O/CH_3CN/HCOOH$ (80 :20 :1)
Solvant B	$CH_3CN/HCOOH$ (99 :1)



VII-2.4 Spectrophotométrie UV.

VII-2.4.1 Caractérisation des préparations microsomales.

La détermination des concentrations en cytochrome P450, protéines et P450-Réductase n'a pas été réalisée dans le cas de microsomes de cellules d'insectes commerciaux, du fait de la faible quantité de microsomes disponibles. Les concentrations fournies par les sociétés Gentest ou Panvera ont été utilisées pour tous les calculs d'activité.

(a) Dosage des protéines microsomales.

La concentration en protéines des microsomes est mesurée par la méthode de Bradford *(Bradford, 1976)*, utilisant de l'albumine de sérum de bœuf comme étalon.

(b) Détermination de la concentration en cytochrome P450.

La concentration en cytochrome P450 est mesurée par spectrophotométrie différentielle (Uvikon 860) selon la méthode décrite par T. Omura et R. Sato *(Omura et Sato, 1964b)*. Les microsomes sont

dilués dans du tampon Tris 50 mM pH 7,4 contenant 50 mM d'EDTA, afin de réduire la turbidité (dilution de 1/20 à 1/40), puis sont répartis entre deux cuves de 500 μL (trajet optique de 1 cm). Une ligne de base est enregistrée entre 400 et 550 nm, puis le fer de l'hème est réduit par addition 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 correspondant est enregistré. La concentration en P450 est calculée en mesurant l'absorption caractéristique du complexe Fe^{II}-CO à 450 nm (ε = 91 000 $cm^{-1}.M^{-1}$). Une dénaturation de la protéine (notamment par perte du ligand cystéinate du fer) se traduit par une absorption dont le maximum est situé à 420 nm (avec un coefficient d'extinction molaire de ε = 183 000 $cm^{-1}.M^{-1}$).

(c) Dosage de l'activité de la NADPH-cytochrome P450-réductase.

L'activité de la NADPH-cytochrome P450-réductase (CPR) est mesurée en suivant par spectrophotométrie la réduction du cytochrome c par les électrons transférés par la CPR. 40 μL de cytochrome c 4mM et 4 μL de microsomes dilués (1/20) sont dilués dans 2 mL de tampon Tris 50 mM pH 7,4 contenant 50 mM d'EDTA, puis répartis dans deux cuves. Après avoir mesuré l'absorbance à 550 nm, la réaction est amorcée par l'addition de 5 μL 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 du cytochrome c réduit (ε = 21 000 $cm^{-1}.M^{-1}$). La pente de la droite obtenue permet de calculer l'activité réductasique, exprimée en nmol de cytochrome c réduit / min / mg de protéines.

VII-2.4.2 Spectres UV des interactions entre 13 et le CYP 2J2.

Le spectre d'interaction du composé **13** avec le CYP2J2 a été enregistré à température ambiante sur un spectrophotomètre Uvikon 941. Une solution de microsomes de cellules d'insectes exprimant le CYP 2J2 (100nM de P450) dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 contenant 0,1 mM d'EDTA est divisé en deux volumes de 150 μL entre deux cuves noires en quartz de 200 μL, dont la longueur optique est de 1 cm. 5 μL d'une solution du composé **13** à 30 mM dans le DMSO est ajouté dans la cuve échantillon, le même volume de DMSO étant rajouté à la cuve référence. On enregistre la ligne de base entre 350 nm et 500 nm, puis on ajoute 2 μL d'une solution de NADPH à 3 mM, et on enregistre un spectre toutes les 2 minutes entre 350 et 500 nm.

VII-2.4.3 Dosage des espèces activées de l'azote.

(a) Dosage de NO.

La réaction rapide du monoxyde d'azote avec l'oxyhémoglobine *(Feelisch et al., 1996)* permet de doser facilement NO (figure VII.2). L'apparition de la methémoglobine et la disparition concommitante de l'oxyhémoglobine sont suivies par spectrophotométrie UV-visible différentielle ($\lambda_{min} \approx$ 420 nm, $\lambda_{max} \approx$ 400 nm et ε = 77 000 $M^{-1}cm^{-1}$).

Une solution d'hémoglobine (Hb) (300 μM dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4) est partagée dans deux cuves en quartz de 1 mL (900 μL de la solution d'Hb). Le spectre de référence est tracé entre 350 et 500 nm. Puis, avec plusieurs additions successives (1 μL) de la solution de NO, on

enregistre le spectre différentiel obtenu pour mesurer la quantité de monoxyde d'azote présente (le faisceau de courbe possède un point isobestique à 410 nm).



Figure VII.2 – **Réaction du monoxyde d'azote avec l'oxyhémoglobine (Hb-Fe^{II}-O$_2$)**.

(b) Dosage du peroxynitrite ONOO$^-$.

La concentration du peroxynitrite dans une solution de soude (0,2 M) est mesurée par dosage spectrophotométrique (λ_{max} = 302 nm ; ε = 1 670 M^{-1}.cm^{-1}) *(Beckman et al., 1996).*

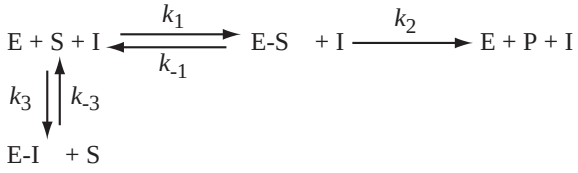
VII-2.5 Mesure de pouvoir inhibiteur.

VII-2.5.1 Calcul de la concentration inhibitrice à 50 % (CI_{50}).

La concentration nécessaire en inhibiteur pour inhiber 50 % de l'activité contrôle (sans inhibiteur) est appelée concentration inhibitrice 50 ou CI_{50}. Celle-ci est calculée en déterminant l'activité de plusieurs incubations contenant différentes quantités d'inhibiteur. La gamme de concentration en inhibiteur utilisée varie généralement entre 0,1 et 10 fois la valeur estimée de la CI_{50}. La courbe du pourcentage d'activité en fonction du logarithme de la concentration en inhibiteur est ensuite tracée et l'abscisse du point ayant pour ordonnée 50 % nous donne la valeur de la CI_{50}.

VII-2.5.2 Constante d'inhibition K_i pour un inhibiteur compétitif.

L'inhibition d'une activité enzymatique par un inhibiteur compétitif peut être représenté par le schéma cinétique suivant où S est le substrat, E l'enzyme et I l'inhibiteur.



La vitesse de la réaction enzymatique est définie alors par l'équation suivante, où [S] est la concentration en substrat, [I] celle en inhibiteur, $V_{\max}$ la vitesse maximale de la réaction. Dans cette équation, la constante de Michaelis du substrat K_{m} est définie par k_1/k_{-1} et la constante d'inhibition de l'inhibiteur K_i par k_3/k_{-3} :

$$v = V_{\max}\frac{[S]}{K_{\mathrm{m}}(1+\frac{[\mathrm{I}]}{K_i})+[S]}$$

La valeur de K_i peut être déterminée de deux façons différentes :

– Tracer, pour plusieurs concentrations en substrat, les courbes $\frac{1}{v} = [\mathrm{I}]$ et déterminer le point d'intersection de ces droites. L'abcisse de ce point donne la valeur de K_i *(Dixon et Webb, 1964).*
– En utilisant l'équation de Cheng-Prusoff *(Cheng et Prusoff, 1973),* valable dans le cas d'un inhibiteur purement compétitif :

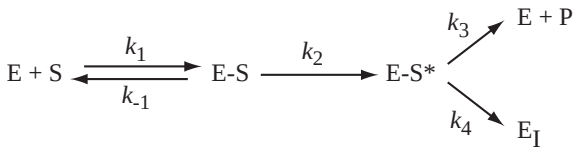
$$\mathrm{CI}_{50} = K_\mathrm{i} \times (1 + \frac{[S]}{K_\mathrm{m}})$$

et en se plaçant à une concentration en substrat égale à K_m, on peut en déduire que la CI_{50} vaut approximativement le double de la constante K_i.

VII-2.5.3 Mesure des constantes cinétiques d'une inactivation.

(a) Constante d'inactivation K_I et vitesse d'inactivation k_{inact}.

Les paramètres cinétiques de l'inactivation sont calculés en se basant sur les modèles de Walsh *(Walsh, 1982)* et de Silverman *(Silverman, 1995).* Ces modèles peuvent être représentés simplement par l'équation suivante :



où E-S est le complexe initial enzyme-substrat transformé en une entité activée, E-S*, qui peut réagir et donner l'enzyme libre et le produit (P), mais qui peut également réagir sur l'enzyme et l'inactiver ($\mathrm{E_I}$). Le rapport k_{-1}/k_1 représente la constante de dissociation K_S du complexe enzyme-substrat, et la valeur k_3/k_4 (appelée coefficient de partition) qui correspond au nombre de cycles productifs (menant à la formation du produit) effectués par l'enzyme avant de réaliser un cycle inactivant. La constante de pseudo-premier ordre du mécanisme d'inactivation (k_inact) est définie par le rapport $k_2k_4/(k_2 + k_3 + k_4)$. La seconde constante représentative du mécanisme d'inactivation est la constante K_I (différente de la constante d'inhibition K_i), qui correspond au quotient $[(k_{-1} + k_2)/k_1][(k_2 + k_4)/(k_2 + k_3 + k_4)]$.

Le calcul des constantes k_inact et K_I a été réalisé en utilisant la méthode décrite par Kitz et Wilson *(Kitz et Wilson, 1962).* On trace la courbe représentant le logarithme du pourcentage d'activité résiduelle en fonction du temps d'incubation, pour différentes concentrations en substrat suicide. Pour les faibles temps d'incubation, on peut linéariser les courbes et déterminer le temps nécessaire pour inactiver la moitié de l'enzyme, appelé $t_{1/2}$, dépendant de la concentration en substrat. On détermine ensuite la valeur minimale de ce temps de demi-réaction, valable pour une concentration infinie en substrat. Cette valeur, notée $t_{1/2}^{max}$ est estimée graphiquement, en traçant la droite $t_{1/2}$ = f(1/[Substrat]), et en déterminant l'ordonnée à l'origine, soit $t_{1/2}^{max}$. Cette droite coupe également l'axe des abscisses à la valeur K_I. La réaction enzymatique étant du pseudo-premier ordre, on retrouve la valeur de la

constante k_{inact} par l'équation :

$$k_{inact} = \frac{ln2}{t_{1/2}^{max}}$$

(b) Mesure du cœfficient de partition r.

Un autre paramètre important à déterminer dans le cas d'une inactivation est le coefficient de partition (défini par k_3/k_4). Cette valeur représente le nombre de cycles catalytiques productifs, rapporté au nombre de cycles menant à l'inactivation de la protéine. Dans un cas d'inactivation totale, le paramètre *r* correspond au rapport P_∞/E_0 où P_∞ représente la quantité finale de produit, et E_0 la quantité initiale d'enzyme *(Waley, 1980)*. Afin de déterminer la valeur de P_∞, et donc de *r*, deux méthodes peuvent être utilisées :

- En extrapolant à des temps infinis les courbes de formation du métabolite, on peut évaluer P_∞ et ainsi obtenir la valeur de *r*.
- Une technique plus précise consiste à représenter graphiquement le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme avec la quantité de métabolite formé. On extrapole la droite moyenne à 0 % d'activité résiduelle (intersection de la droite moyenne et de l'axe des abscisses) et la quantité de produit correspondante donne le nombre de cycles productifs, *r* correspond à cette valeur, augmentée de 1, le cycle ajouté correspondant au cycle d'inactivation de l'enzyme.

VII-3 Méthodes Bioinformatiques.

Tous les calculs de minimisation et de dynamique moléculaire ont été réalisés sur une console Octane 2 de Silicon Graphics (CA, USA), en utilisant le logiciel Sybyl 7.0 (Tripos Inc., Courtaboeuf). Le champs de force utilisé est le champs *tripos* (cut-off de 12 Å pour les minimisations, 8 Å pour les dynamiques), capable de prendre en charge des macromolécules, mais également les groupes prosthétiques contenant un atome métallique. Le système de calcul des charges des différents molécules ou protéines est le système Gasteiger-Hückel. Les énergies indiquées dans cette partie correspondent aux énergies relatives données par le logiciel Sybyl. Toutes les représentations de structures tri-dimensionnelles de ce manuscrit ont été réalisées en utilisant le logiciel PYMOL (*http://www.pymol.org*).

VII-3.1 Modélisation par homologie - Optimisation du modèle.

La construction du modèle par homologie par le serveur Swiss-Model (accessible sur *http://swissmodel.expasy.org/*) a été réalisée avec l'option *First Approach* du logiciel, et en indiquant les structures cristallographiques à utiliser. Aux coordonnées du modèle obtenu, on ajoute l'hème par simple ajout des coordonnées atomiques d'une structure template (dans ce cas, la structure du CYP 2C8 pdb 1PQ2 a fourni l'hème).

Lors de la validation de la méthode par homologie par Swiss-Model, et de la construction des modèles des CYP déjà cristallisés, le calcul de déviation des distances moyennes (Root Mean Square

Deviation ou RMSD) a été réalisé en utilisant le logiciel Swiss-pdb-Viewer, fourni par le serveur suisse Expasy, accessible à l'adresse *www.expasy.org/spdbv*. L'alignement des deux structures à comparer est également effectué avec ce logiciel, et la distance moyenne est calculée en considérant soit les carbones α, soit les atomes du squelette peptidique.

L'optimisation du modèle de CYP 2J2 est réalisé par des cycles successifs de minimisation (1000 pas, Powell *(Powell, 1964)*) et de courte dynamique (50 K, 0,5 ps), jusqu'à obtenir une énergie stabilisée. Cette technique a pour avantage, par rapport à une minimisation simple, de pouvoir relâcher la protéine, en facilitant le franchissement des petites barrières d'énergies nécessaires pour optimiser la structure. Le modèle est ensuite finalisé par une longue minimisation de 10 000 pas, jusqu'à obtenir une énergie minimum ($\approx$ - 6 000 kcal.mol^{-1}).

VII-3.2 Calcul de volume du site actif.

Le programme VOIDOO, accessible sur le site de l'université d'Uppsala en Suède (*http://alpha2.bmc.uu.se/usf/voidoo.html*) permet de calculer différentes cavités pour une même structure. Dans tous les cas, la technique utilisée est le balayage du site actif par une sphère ou « sonde », dont le rayon peut être défini par l'utilisateur. Deux surfaces peuvent être alors calculées (voir figure VII.3).

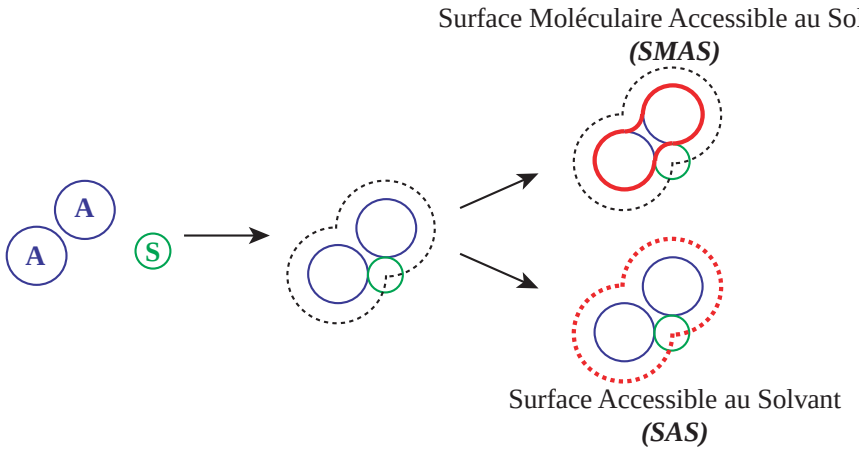


Figure VII.3 – **Surfaces moléculaires d'un composé A définies par le solvant S**. Le solvant explore tous les positionnement possibles autour de A. La surface moléculaire accessible au solvant (ou surface de Connoly) est définie par les contacts de Van der Waals entre la sonde et le composé A *(Connolly, 1983)*. La surface accessible au solvant est définie par la surface balayée par le centre de la sonde *(Lee et Richards, 1971)*

Les volumes indiqués par les différents auteurs des articles concernant les structures de P450s de mammifères sont calculés par l'une ou l'autre de ces méthodes. Le rayon de la sonde est défini à 1,4 Å (taille généralement utilisée pour une molécule d'eau). Il est nécessaire de définir un point de la cavité pour accélérer la recherche de la surface.

VII-3.3 Protocole de *docking* dynamique sous contraintes.

Le principe du *docking* dynamique sous contraintes douces à l'avantage de pouvoir tenir compte de l'évolution conformationnelle du ligand et de la protéine. Cependant, il est nécessaire de « geler » une partie de la protéine afin de maintenir la structure globale du P450, qui peut être fortement perturbée, notamment lors de l'entrée du substrat. Pour permettre un libre mouvement des résidus en contact avec le substrat, nous avons choisi de maintenir fixe quelques éléments de structure secondaire opposés aux différents canaux testés par rapport à l'hème (les résidus sont indiqués dans le tableau VII.4). Lorsque le substrat est entré dans le canal, les coordonnées de ces atomes ne sont plus maintenues, car les variations énergétiques sont alors peu importantes pour déstabiliser la protéine. Il est à noter que l'hème est également fixé durant le processus d'entrée du substrat dans le canal, pour éviter un déplacement de l'hème vers le substrat.

Canal	Résidus (*Eléments structuraux*)
Canal 1	39-57 (*Boucle N-terminale*) ; 82-87 (*feuillet* β_{1-1}) 94-109 (*Hélice B*) ; 131-148 (*Hélice C*) 231-246 (*Hélice G'*) ; 268-297 (*Hélice H*) 434-466 (*Hélice L*)
Canal 2	147-177 (*Boucle C-D/Hélice D*) ; 197-206 (*Boucle E-F*) 281-296 (*Hélice H*) ; 330-361 (*Hélices J/J'*) 448-481 (*Hélice L*) ; 494-502 (*Boucle C-terminale*)
Canal 3	94-104 (*Hélice B*) ; 153-173 (*Hélice D*) 330-376 (*Hélice J/J'*) ; 406-452 (*Boucle K"-L*)

Tableau VII.4 – **Eléments structuraux et résidus correspondants du CYP 2J2 « gelés » lors des différents *dockings* réalisés, en fonction des trois canaux d'entrée testés**.

Le *docking* des différents composés est réalisé en suivant un schéma de cinq étapes (figure VII.4) :

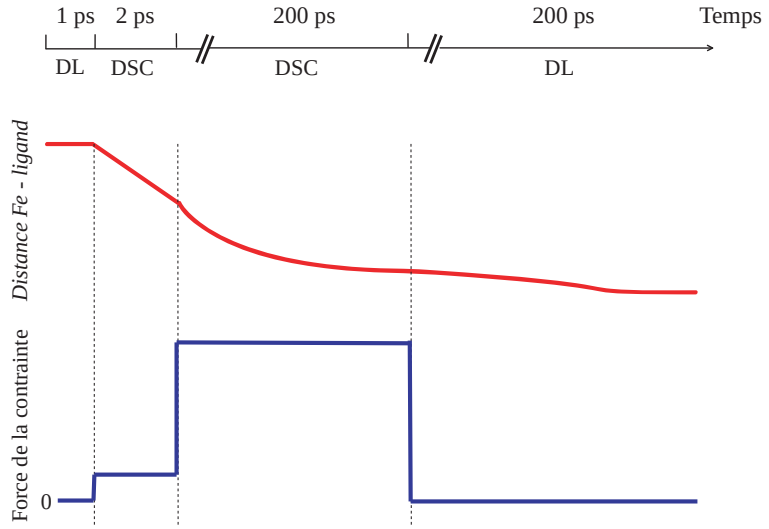


Figure VII.4 – **Représentation schématique de la séquence utilisée lors des *dockings***. DL : Dynamique Libre ; DSC : Dynamique Sous Contraintes.

– Le composé à *docker* est placé à l'extérieur de la protéine, le groupe **R** du composé orienté vers l'hème, distant d'environ 30 Å. On utilise 4 acides aminés de l'entrée du canal d'accès pour

orienter convenablement le substrat. On effectue ensuite une courte dynamique moléculaire (1 ps) à 50 K dans le vide pour équilibrer thermiquement le ligand et le P450.

– On ajoute ensuite une contrainte de distance entre le ligand et le fer de l'hème (2 ps). La somme des intensités de toutes ces contraintes est de l'ordre de 1,5 à 2 kcal/mol, pour que le substrat se rapproche lentement de l'hème. Dans le cas des dérivés de terfénadone, la contrainte était répartie sur plusieurs centres (généralement les trois points représentés en figure VII.5).

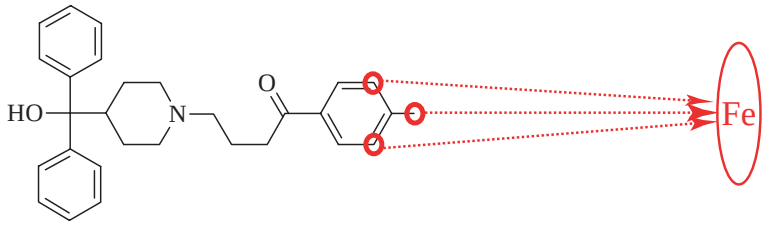


Figure VII.5 – **Points d'attache de la contrainte de distance généralement définis lors du *docking* des dérivés de la terfénadone**.

– Lorsque le substrat entre en contact avec les résidus de l'entrée du canal d'accès choisi, l'intensité de la contrainte est augmentée (généralement 9 kcal/mol), et on effectue une dynamique moléculaire à 50 K sur un temps plus long (200 ps). Le substrat pénètre ainsi dans le canal d'accès, et vient se positionner dans le site actif.
– Pour permettre une évolution libre du complexe enzyme-substrat formé, une dernière dynamique moculaire à 100 K pendant 200 ps est effectuée sans contrainte. Une vérification de la stabilité de ce complexe peut être effectuée en évaluant la distance fer-substrat. Si le substrat s'éloigne du fer, alors la reconnaissance par le site actif n'est pas optimale, et un nouveau *docking* est nécessaire. Dans le cas contraire, le complexe semble être stable, et la structure obtenue est ensuite optimisée.
– L'optimisation du modèle *docké* final est réalisée par plusieurs cycles de courtes dynamiques moléculaires (1ps) - minimisations énergétiques (500 pas, Powell).

ANNEXES

A Article 5

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Archives of Biochemistry and Biophysics 420 (2003) 142–152
ABB
www.elsevier.com/locate/yabbi

Rabbit aorta converts 15-HPETE to trihydroxyeicosatrienoic acids: potential role of cytochrome P450

Sandra L. Pfister,[a] Nancy Spitzbarth,[a] Darryl C. Zeldin,[b] Pierre Lafite,[c] Daniel Mansuy,[c] and William B. Campbell[a,*]

[a] *Department of Pharmacology and Toxicology, Medical College of Wisconsin, 8701 Watertown Plank Road, Milwaukee, WI 53226, USA*
[b] *Laboratory of Pulmonary Pathobiology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC 27709, USA*
[c] *Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 CNRS, Universite Paris V 45 Rue des Saints-Peres, 75270 Paris Cedex 06, France*

Received 17 July 2003, and in revised form 25 August 2003

Abstract

Previous work showed that rabbit aorta metabolizes arachidonic acid via 15-lipoxygenase to 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HPETE), which undergoes an enzymatic rearrangement to 11-hydroxy-14,15-epoxyeicosatrienoic acid (11-H-14,15-EETA) and 15-hydroxy-11,12-epoxyeicosatrienoic acid (15-H-11,12-EETA). Hydrolysis of the epoxy group results in the formation of 11,14,15- and 11,12,15-trihydroxyeicosatrienoic acids (THETAs). Endothelial cells have several heme-containing enzymes including cytochromes P450 (CYP), nitric oxide synthase (eNOS), and prostacyclin (PGI_2) synthase that catalyze the rearrangement of 15-HPETE to HEETAs. Incubation of arachidonic acid and 15-lipoxygenase, or 15-HPETE with rabbit aortic microsomes or rat liver microsomes, a rich source of CYP, resulted in the formation of a product that comigrated with THETAs and HEETAs on HPLC. Immunoblot analysis showed the presence of CYP2C8 and CYP2J2 in aortic tissue and when CYP2J2 or CYP2C8 was incubated with arachidonic acid and 15-lipoxygenase, the major products were 11,12,15- and 11,14,15-THETAs. Incubation of purified hematin, CYP2C11, eNOS or PGI_2 synthase enzymes with arachidonic acid and 15-lipoxygenase produced a different pattern of metabolites from rabbit aortic microsomes. Clotrimazole, a non-specific CYP inhibitor, and ebastine and terfenadone, specific CYP2J2 inhibitors, blocked the ability of aortic microsomes to produce THETAs while specific inhibitors of PGI_2 synthase, eNOS or CYP2C8/2C9 had no effect on THETA production. We suggest that a CYP, possibly CYP2J2, may function as the hydroperoxide isomerase converting 15-HPETE to HEETAs in rabbit vascular tissue. Further hydrolysis of the epoxy group of the HEETAs results in the formation of 11,12,15- and 11,14,15-THETAs. The HEETAs and THETAs are both vasodilators and may function as important regulators of vascular tone.
© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cytochrome P450; Lipoxygenase; Arachidonic acid; Rabbit aorta; Endothelium

Many studies have documented the importance of the vascular endothelium in the regulation of vascular tone. A number of endothelium-derived relaxing factors (EDRFs)[1] have been identified including NO [1], PGI_2 [2], and the epoxyeicosatrienoic acids [3]. Arachidonic acid causes relaxation of blood vessels, which is dependent on the presence of the endothelium [4–7]. Our previous work supported this observation and described an endothelium-dependent, lipoxygenase metabolite of arachidonic acid that elicited relaxation of rabbit aorta [8]. Lipoxygenases are non-heme, iron-containing enzymes that catalyze the conversion of arachidonic acid to hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HPETEs), which may be reduced to hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) [9–11]. The various lipoxygenases differ in positional specificity for oxidation. For example, the hydroperoxy group is added at C-12 by the platelet

* Corresponding author. Fax: 1-414-456-6545.
E-mail address: wbcamp@mcw.edu (W.B. Campbell).

[1] *Abbreviations used:* EDRFs, endothelium-derived relaxing factors; eNOS, nitric oxide synthase; HPETEs, hydroperoxyeicosatetraenoic acids; HETEs, hydroxyeicosatetraenoic acids; ODS, octadecylsilyl.

0003-9861/$ - see front matter © 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.abb.2003.09.026

12-lipoxygenase and at C-15 by reticulocyte 15-lipoxygenase [10,11]. Some tissues contain several lipoxygenases and synthesize several HETEs. We have previously shown that in rabbit aorta and aortic endothelial cells, arachidonic acid is metabolized by 15-lipoxygenase to 15(*S*)-HPETE, which undergoes an enzymatic rearrangement to hydroxy-epoxyeicosatrienoic acids (HEETA), either 11-H-14,15-EETA and 15-H-11,12-EETA [12]. Hydrolysis of the epoxy group results in the formation of 11,14,15- and 11,12,15-THETAs. The HEETAs and THETAs relax the rabbit aorta and one or both may mediate the relaxations to arachidonic acid [12].

Hydroxy-epoxy fatty acids are readily formed from fatty acid hydroperoxides by an intramolecular rearrangement with heme-containing proteins such as hematin [13]. However, Weiss et al. [14] provided the first evidence that the conversion of 15-HPETE to HEETAs occurs by CYPs. In this study, 15-HPETE was converted to 13-H-14,15-EETA and 11-H-14,15-EETA, which were hydrolyzed to 13,14,15-THETA and 11,14,15-THETA or 11,12,15-THETA, respectively. Pace-Asciak and co-workers [15,16] have shown in platelets and lungs that 12(*S*)-HPETE undergoes a similar rearrangement in the presence of a heme-containing protein, a hydroperoxide isomerase, to 8-H-11,12-EETA and 10-H-11,12-EETA, which are also called hepoxilin A_3 and B_3, respectively [15]. Hydrolysis of the 11,12-epoxide group by epoxide hydrolase leads to the formation of 8,11,12-THETA and 10,11,12-THETAs called trioxilin A_3 and B_3, respectively.

If the biosynthetic pathway in rabbit aorta is similar to the synthesis of hepoxilins and trioxilins, 15-HPETE will be converted to 11-H-14,15-EETA and 15-H-11,12-EETA by a hydroperoxide isomerase. Little is known about this enzyme. Several heme containing proteins, hemoglobin and hematin, can function as hydroperoxide isomerases and catalyze this rearrangement [13,15]. Similarly, PGI_2 synthase is a heme-containing CYP-like enzyme that catalyzes the rearrangement of PGH_2 to PGI_2 [17]. These rearrangements do not require cofactors such as O_2 or NADPH, or reductases. Endothelial cells have several enzymes that contain heme including CYPs, eNOS, and PGI_2 synthase. This study is designed to test the hypothesis that one of these heme-containing enzymes may function as a hydroperoxide isomerase and catalyze the formation of HEETAs and THETAs in vascular tissue.

Materials and methods

Animals

Two-month-old female or male New Zealand White (NZW) rabbits were obtained from New Franken Rabbitry (New Franken, WI). The animals were housed in the Medical College of Wisconsin Animal Care Facilities, maintained on a standard rabbit chow diet, and given tap water ad libitum.

Tissue preparation and incubations

Rabbits were sacrificed (pentobarbital 120 mg/kg, IV), thoracic aorta was removed and cleaned of adhering connective tissue and fat. In some cases, aortas were purchased from Pel-Frez Biologicals (Rogers, AR). The vessels were rinsed in Tris buffer (0.05 M, pH 7.5) and then cut into small pieces. Aortic tissue was homogenized in cold 0.25 M sucrose solution using a Potter–Elvehjem tissue grinder with a Teflon pestle. Subcellular fractions were prepared by differential centrifugation [18]. The homogenate was centrifuged at 5000*g* for 20 min to remove cellular debris, mitochondria, and nuclei. The supernatant was centrifuged further at 100,000*g* for 60 min. The microsomal pellet was resuspended in 1.15% KCl and homogenized. The homogenate was centrifuged at 100,000*g* for 60 min. The pelleted microsomes were resuspended in microsome incubation buffer (Tris 50 mM, KCl 150 mM, and $MgCl_2$ 10 mM, pH 7.5) and stored at −80 °C. Protein concentrations were determined using the Bradford technique (Bio-Rad) with IgG as the standard. Aliquots of microsomal protein (2 mg/ml) were incubated with [^{14}C(U)]arachidonic acid and 15-lipoxygenase (soybean lipoxidase, 0.2 mg/ml) or [^{14}C(U)]15-HPETE in Hepes buffer containing indomethacin (10^{-5} M) at 37 °C for 15 min.

In an additional series of experiments, aortic tissue was homogenized (five passes with a mechanical homogenizer) in Tris buffer (500 mg of tissue/10 ml of buffer). The homogenate was centrifuged at 750*g* for 15 min and the supernatant was used. Aliquots (5 mg/ml) of the homogenate were incubated for 20 min in Tris–HCl buffer containing indomethacin (10^{-5} M) and [^{14}C(U)]15-HPETE (77 μg/ml, 4.33×10^5 cpm/ml). In some incubations, 15-lipoxygenase was incubated with [^{14}C]arachidonic acid and the homogenate.

To investigate further the enzyme responsible for the conversion of 15-HPETE to HEETAs and THETAs, aliquots of microsomal protein (2 mg/ml) were incubated with [^{14}C(U)]arachidonic acid and 15-lipoxygenase in Hepes buffer at 37 °C for 15 min. Boiled microsomes were used as a control. These studies were repeated in the presence of inhibitors of eNOS (L-NA and L-NMMA 10–100 μM), CYP (clotrimazole, SKF 525a, sulfaphenazole, compound 11 [19], compound 24 [19], 10–100 μM), ebastine [20] (10–100 μM) or terfenadone (10–100 μM), and PGI_2 synthase (U-51605, 10–100 μM).

Additional experiments investigated the production of THETAs by [^{14}C(U)]arachidonic acid and

15-lipoxygenase in incubations containing hematin (20 μM), purified PGI_2 synthase (250 U/ml), eNOS or CYP isozymes. In some cases, rat liver microsomes were used as the source of CYP enzymes and prepared as described above for the rabbit aortic microsomes. In another series of experiments, purified CYP2C8 and CYP2C11 or recombinant CYP2J2 [21], CYP2J5 [22], and CYP2J9 [23] (0.3 μM each) were used in incubations with arachidonic acid and 15-lipoxygenase.

Following the incubations, all reactions were stopped by adding ethanol to a final concentration of 15%. The samples were acidified (pH < 3.5) and extracted using octadecylsilyl (ODS) extraction columns as previously described [8]. The extracted metabolites were evaporated to dryness under a stream of nitrogen and stored at −40 °C until analysis by high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Purification of THETAs and HEETAs by HPLC

The biological samples were first resolved by reverse phase (Nucleosil-C18 column, 5μ, 4.6 × 250 mm) HPLC using solvent system I. Solvent A was water and solvent B was acetonitrile containing 0.1% glacial acetic acid. The program was a 40 min linear gradient from 50% solvent B in A to 100% solvent B. The flow rate was 1 ml/min. The fractions (0.2 ml) corresponding to the THETAs (fractions 27–35, 5–7.5 min) and HEETAs (fractions 70–83, 14–16.5 min) were pooled, acidified, and extracted with cyclohexane/ethyl acetate (50/50). The THETA fraction was rechromatographed on reverse phase HPLC using solvent system II. In solvent system II, solvent A was water containing 0.1% glacial acetic acid and solvent B was acetonitrile. The program consisted of a 5 min isocratic phase with 35% B in A, followed by a 35 min linear gradient to 85% B. Flow rate was 1 ml/min. Radioactivity of the column eluate was collected in 0.2 ml aliquots and measured by liquid scintillation spectrometry. The fractions containing the THETAs (fractions 87–93) (17.5–18.5 min) were collected and extracted with cyclohexane/ethyl acetate (50/50). The THETA fraction was purified further by normal phase HPLC using a Nucleosil silica column (5μ, 4.6 × 250 mm). Solvent system III consisted of an isocratic separation using hexane, isopropanol, and glacial acetic acid (995:4:1) at a flow rate of 1 ml/min. The column eluate was collected in 0.5 ml fractions and the radioactivity was determined as described above.

Gas chromatography/mass spectrometry

The pooled fractions were isolated from solvent system II (fractions 88–94), which corresponded to the THETAs previously described [8]. The pooled fractions were extracted with cyclohexane/ethyl acetate, evaporated to dryness under nitrogen, and derivatized for gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) as previously described [24,25]. For positive ion chemical ionization (PCI) MS analysis, the sample was dissolved in 120 μl acetonitrile and then esterified with ethereal diazomethane for 6 min at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness under nitrogen and the hydroxyl groups were then silylated with 15 μl bis-TMS-trifluoroacetamide for 60 min at 37 °C. In some cases, the sample was saturated by reacting with rhodium on aluminum and bubbling for 1 min with hydrogen gas. After a 60 min incubation at room temperature, the sample was filtered through a Celite column and the fatty acids were eluted with diethyl ether. The reaction mixture was evaporated to dryness with nitrogen and reacted with ethereal diazomethane and bis-TMS-trifluoroacetamide as described above. GC/MS was performed with a Hewlett Packard 5989A mass spectrometer coupled with a 5890 Series 2 gas chromatograph. Ionization of the samples was performed chemically using methane as the reagent gas. The derivatized material was resolved using a 14 m capillary DB-5 column (J&W Scientific, Folsom, CA) with a linear gradient from 100 to 300 °C. Standards were derivatized and analyzed by GC/MS using the identical methods described for the biological samples.

Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Rabbit aorta was obtained as described above. Aortic tissue lysates were prepared by homogenizing samples in a buffer containing 20 mmol/L Hepes, 255 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, and 100 μmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.4. Aortic microsomes were prepared as described above. The protein lysates (30 μg) were analyzed by SDS–PAGE by the method of Laemmli [26] and Coligan et al. [27] using a 10% SDS–PAGE Ready gel (Bio-Rad). The proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose and the nitrocellulose membrane was blocked for 3 h at 25 °C with 5% non-fat dried milk in Tris-buffered saline (20 mmol/L Tris hydrochloride; 500 mmol/L NaCl, pH 7.5) with Tween 20 (TTBS) before incubation with an antibody to recombinant human CYP2J2 [28]. The CYP2J2 antibody has been previously shown to immunoreact with recombinant CYP2J2 in human, rat, and mouse but does not recognize other CYP isoforms including the members of the 1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, and 4A subfamilies [21]. The primary antibody was used at a dilution of 1:1000 for 1 h at 4 °C. Following washing, the blot was incubated for 1 h at 25 °C with the secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody) at a dilution of 1:5000. After washing again with TTBS, the blot was incubated for 1 min with Dupont Renaissance Chemiluminescent reagents. The membrane was subsequently exposed to Kodak Biomax MR imaging film and developed.

Prestained protein markers (Bio-Rad) were used for molecular mass determination. These experiments were repeated using a polyclonal CYP2C8 antibody [29] as the primary antibody.

Statistics

Data are expressed as means ± SEM. Statistical analysis of the data was performed with an analysis of variance to determine differences within the groups and a Student's *t* test to determine differences between groups.

Materials

Arachidonic acid, 15-lipoxygenase (soybean lipoxidase, Type I-B), hematin, clotrimazole, nitro-L-arginine, and indomethacin were all from Sigma Chemical, St. Louis, MO. PGI_2 synthase was from Oxford Biomedical Research, Oxford, MI. SKF 525A was from RBI, Natick, MA. U-51605 was from Cayman Chemical, Ann Arbor, MI. Sulfaphenazole and the two other inhibitors of CYP2Cs used in this study, compounds 11 and 24, were synthesized as described previously [19]. Anti-CYP2J2 antibody and recombinant CYP2J2, 2J5, and 2J9 were produced as previously described [21]. Anti-CYP2C8 antibody and purified CYP2C11 and 2C8 were obtained from Dr. Jorge H. Capdevila, Vanderbilt University, Nashville, TN [29]. Purified eNOS was obtained from Dr. Owen Griffith, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI. [^{14}C(U)]Arachidonic acid (specific activity 920 mCi/mmol) was obtained from New England Nuclear, Boston, MA. All solvents were of HPLC grade and purchased from Burdick and Jackson, Muskegan, MI. [^{14}C(U)]15-HPETE was synthesized by incubating [^{14}C]arachidonic acid in 4 ml of borate buffer, pH 9.0, with 15-lipoxygenase under a stream of oxygen for 30 min at room temperature. The reaction was acidified to pH 5 with 5% hydrochloric acid and extracted with diethyl ether. The combined extracts were washed with saturated NaCl, dried with $MgSO_4$, filtered, and evaporated to dryness. The extract was purified by silica gel column chromatography using hexane/diethyl ether/acetic acid (2.5/10/0.25) at 4 °C. The yield was approximately 50%.

Results

Aortic microsomes were incubated with [^{14}C(U)]arachidonic acid and 15-lipoxygenase, and extracted metabolites were analyzed by reverse phase HPLC using solvent system I (Fig. 1A). Radioactive products were observed that comigrated with THETAs, HEETAs, and HETEs. The conversion of the total added arachidonic acid to THETAs and HEETAs was 3 and 4.3%, respectively. Fractions 27–35 (5–7.5 min) were collected and analyzed further by reverse phase HPLC using solvent system II (Fig. 1B). The major peak migrated at 17.5–18.5 min (fractions 87–93) and comigrated with the THETAs. Fractions 87–93 were collected and analyzed further by normal phase HPLC using solvent system III. The THETAs were resolved into four radioactive products (peaks A–D) (Fig. 1C). There was a greater than 75% inhibition of THETA production in boiled rabbit aortic microsomes incubated with [^{14}C(U)]arachidonic acid and 15-lipoxygenase (data not shown). Additionally, the only product synthesized by 15-lipoxygenase alone (in the absence of added aortic tissue)

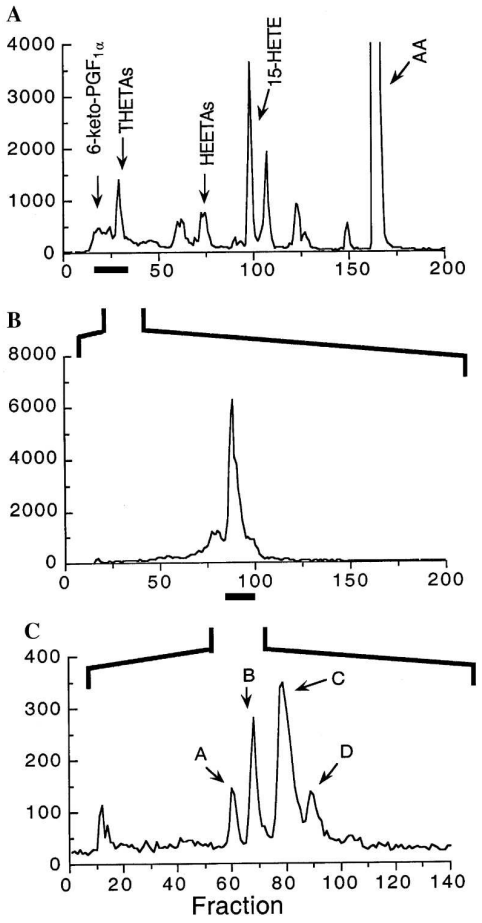


Fig. 1. Metabolism of ^{14}C-arachidonic acid by rabbit aortic microsomes. Aortic microsomes were incubated with [^{14}C]arachidonic acid and 15-lipoxygenase, and metabolites were separated using reverse phase HPLC with solvent system I (A). Metabolites corresponding to fractions 27–35 (5–7.5 min) were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, and rechromatographed using solvent system II (B). Metabolites corresponding to fractions 87–93 (17.5–18.5 min) were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, and rechromatographed using normal phase HPLC with solvent system III (C). Migration times of known standard eicosanoids are shown above the chromatogram and are not meant to identify the corresponding radioactive peaks.

comigrated with 15-HETE on HPLC using solvent system I [12].

Incubation of aortic tissue from rabbits with [^{14}C]15-HPETE resulted in the synthesis of radioactive products that migrated with authentic THETAs, HEETAs, and HETEs (Fig. 2A). The conversion of total added arachidonic acid to THETAs and HEETAs was 12.5 and 19.8%, respectively. Fractions 27–35 (5–7.5 min) were collected and analyzed further by reverse phase HPLC using solvent system II (Fig. 2B). The major peak migrated at 17.5–18.5 min (fractions 87–93) and comigrated with the THETAs. The 14–16.5 min fraction (fractions 70–83) isolated using solvent system I corresponds to the HEETAs (Fig. 2A).

The radioactive product comigrating with the THETAs was converted to its methyl ester-TMS ether derivative and analyzed by GC/MS (Fig. 3). The PCI GC/MS analysis of the methyl ester-TMS ether derivative showed major products eluting at 14.08 and 14.22 min (data not shown). The mass spectrum of the 14.08 min product (Fig. 3A) revealed the presence of major ions at m/z 569 (M^+—15; loss of CH_3), 405 (M^+—179; loss of $(CH_3)_3SiOH$ and $(CH_3)_3SiO$), 301 (M^+—283; loss of $(CH_3)_3SiO$—CH—$(CH_2$—CH=CH$)_2$—$(CH_2)_3$—$COOCH_3$), 283, and 173 (loss of $(CH_3)_3SiO$—$(CH_2)_4$— CH_3). The mass spectrum of the product that had a GC retention time of 14.22 min showed a similar mass spectrum (Fig. 3B). The two mass spectra differed in the intensities of the 173 and 283 m/z ions. The mass spectra indicated a molecular weight of 584 for the methyl ester-TMS ether of both products. Based on these mass spectra and the intensities of the 173 and 283 ions, the 14.08 min and 14.22 min products were identified as the methyl ester-TMS ether derivatives of 11,12,15-THETA and 11,14,15-THETA, respectively. In a separate study, PCI GC/MS analysis of products A-D isolated from normal phase HPLC (Fig. 1C) indicated that the mass spectra for peak A and B were consistent with these peaks being the

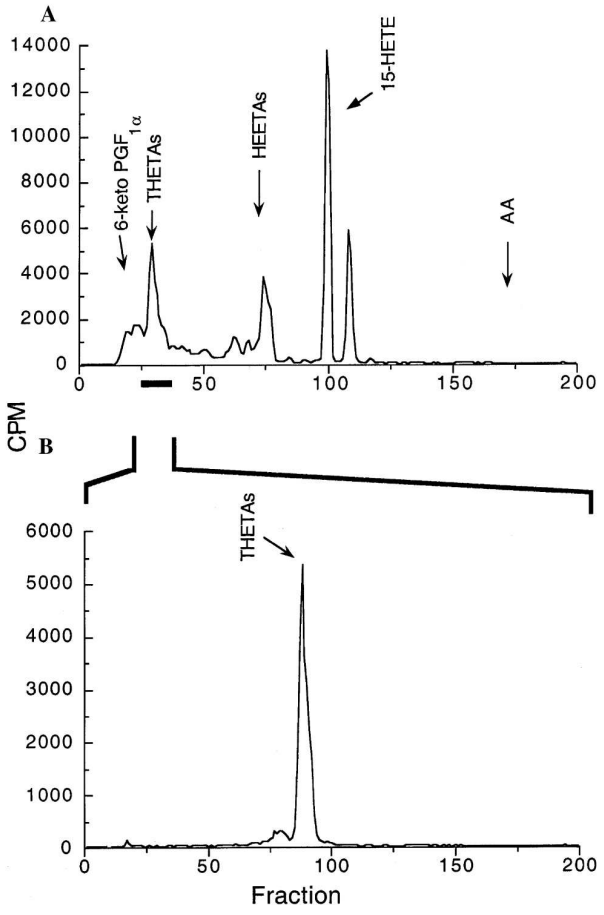


Fig. 2. Metabolism of [^{14}C]15-HPETE by rabbit aorta. Aortic homogenates were incubated with [^{14}C]15-HPETE for 20 min and metabolites were separated using reverse phase HPLC with solvent system I (A). Metabolites corresponding to fractions 27–35 (5–7.5 min) were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, and rechromatographed using solvent system II (B). Migration times of known standard eicosanoids are shown above the chromatogram and are not meant to identify the corresponding radioactive peaks.

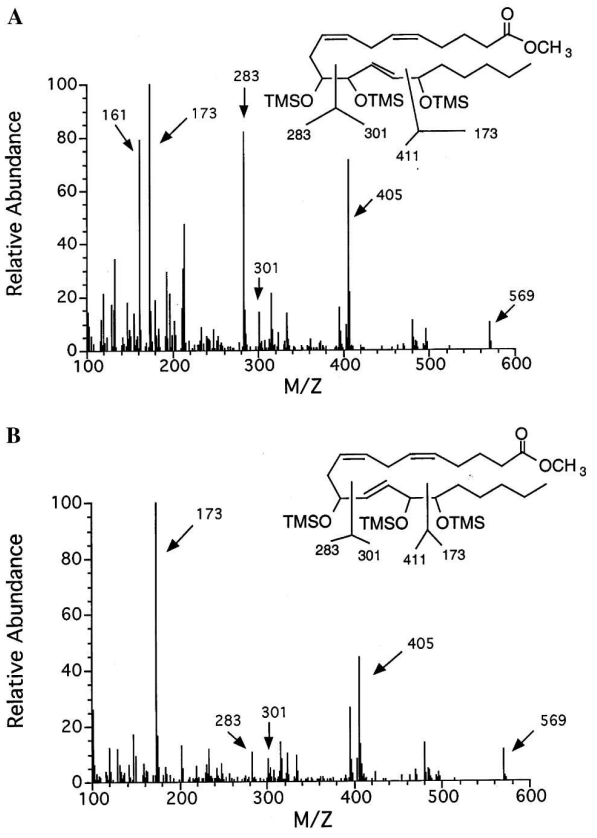


Fig. 3. Mass spectrum of THETAs (17.5-18.5 min) collected from reverse phase HPLC (Fig. 2B). THETAs were derivatized to the methyl ester-TMS ether and analyzed by PCI GC/MS. (A,B) show the PCI mass spectra for 11,12,15- and 11,14,15-THETA, respectively. The proposed structure of each derivatized compound is given and its prominent ions are indicated. m/z, mass/charge.

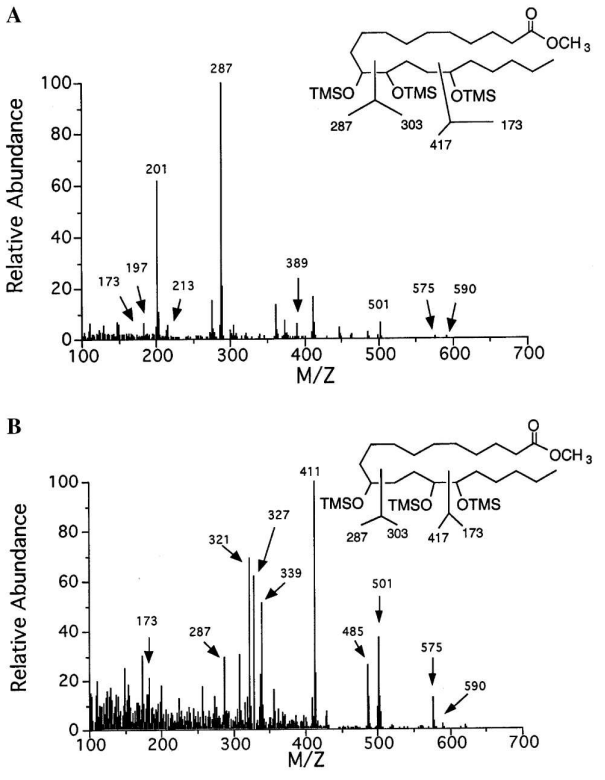


Fig. 4. Mass spectrum of saturated THETAs (17.5–18.5 min) collected from reverse phase HPLC (Fig. 2B). THETAs were saturated and derivatized to the methyl ester-TMS ether and analyzed by PCI GC/MS. (A,B) PCI mass spectra for 11,12,15- and 11,14,15-THETA, respectively. The proposed structure of each derivatized compound is given and its prominent ions are indicated. m/z, mass/charge.

11,12,15-THETA and 11,14,15-THETA, respectively (data not shown). Peaks C and D were a mixture of both 11,12,15-THETA and 11,14,15-THETA. These are probably stereoisomers of peaks A and B.

The mass spectra of the hydrogenated derivatives are shown in Fig. 4 and are consistent with the proposed structures for 11,12,15-THETA and 11,14,15-THETA. The molecular ion of the saturated derivatives is 590. The mass spectrum of 11,12,15-THETA (Fig. 4A) revealed the presence of major ions at m/z 575 (M^+—15; loss of CH_3), 417 (M^+—173; loss of $[(CH_3)_3SiO]$—$(CH_2)_4$—CH_3), 303 (M^+—287; loss of $(CH_3)_3SiO$—CH—$(CH_2)_9$—$COOCH_3$), 287 (M^+—303), and 173 (M^+—417). For the 11,14,15-THETA (Fig. 4B), the mass spectrum showed prominent ions at m/z 575 (M^+—15; loss of CH_3), 417 (M^+—173), 303 (M^+—287), 287 (M^+—303), and 173 (M^+—417). Based on these mass spectra and the intensities of the 173 and 287 ions, the products were identified as the saturated, methyl ester-TMS ether derivatives of 11,12,15-THETA and 11,14,15-THETA, respectively.

Since heme-containing enzymes and proteins can convert HPETEs to HEETAs and THETAs [13–15], we tested the effect of several heme proteins and endothelial heme-containing enzymes for this activity. [^{14}C]Arachidonic acid and 15-lipoxygenase were incubated with either hematin (Fig. 5A), rat liver microsomes as a source of CYP enzymes [18] (Fig. 5B), eNOS (Fig. 5C), or PGI_2 synthase (Fig. 5D). The metabolites were extracted and purified by reverse phase-HPLC using solvent system I followed by solvent system II and in some cases by

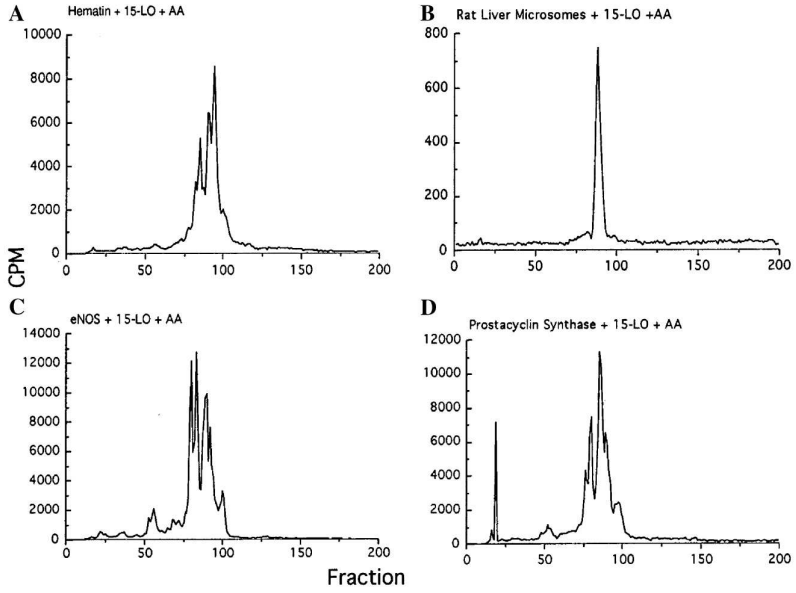


Fig. 5. Production of THETAs by heme-containing enzymes. [^{14}C]Arachidonic acid and 15-lipoxygenase were incubated with hematin (A), rat liver microsomes (B), eNOS (C) or PGI_2 synthase (D). Metabolites were separated using reverse phase HPLC with use of solvent system I (data not shown). Metabolites corresponding to fractions 27–35 were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, rechromatographed using solvent system II, and illustrated in the figure.

normal phase-HPLC using solvent system III. Using solvent system I, all of the proteins produced a pattern of metabolites similar to incubations of 15-lipoxygenase with the aortic homogenate (data not shown). Analysis of the 5–7.5 min peak (fractions 27–35) from system I by system II indicated a product that comigrated with the THETAs (Fig. 5). The conversion of total added arachidonic acid to THETAS incubated with microsomes, hematin, eNOS, and PGI_2 synthase was 18.3, 6.0, 6.4, and 3.6%, respectively. While incubations with rat liver microsomes produced only one radioactive metabolite that comigrated with the THETAs (Fig. 5B), incubations with hematin (Fig. 5A), eNOS (Fig. 5C), and PGI_2 synthase (Fig. 5D) produced a number of other radioactive products. The pattern of metabolite(s) observed with rat liver microsomes is similar to that observed with rabbit aortic microsomes (Fig. 1B).

We investigated the effect of specific inhibitors of eNOS, PGI_2 synthase, and CYPs on the production of THETAs by rabbit aortic microsomes incubated with arachidonic acid and 15-lipoxygenase. In the absence of any inhibitors, rabbit aortic microsomes produced a major radioactive product that comigrated with THETAs (Fig. 6, left panels). Pretreatment with the NOS inhibitor, L-NA or the PGI_2 synthase inhibitor, U-51605, did not affect the production of THETAs (Figs. 6B and C, and H and I). Similar results were obtained with another eNOS inhibitor, L-NMMA (10–100 μM) (data not shown). L-NA and L-NMMA did block the synthesis of THETAs by purified eNOS and U51605 blocked PGI_2 synthase catalyzed THETA synthesis (data not shown). In contrast, increasing concentrations of clotrimazole (Figs. 6E and F) blocked the synthesis of THETAs by rabbit aortic microsomes in a concentration-related manner. Clotrimazole binds the heme portion of CYP [30]. A different CYP inhibitor, SKF 525a, which does not bind heme, had no effect on THETA production (data not shown). When aortic microsomes were incubated with the specific CYP2C inhibitor sulfaphenazole (30 μM), THETA production also was not blocked (Fig. 7B). Pretreatment with compound 24, which selectively inhibits CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 at 100 μM [19] or compound 11, which selectively inhibits CYP2C8 at 10 μM [19] also did not block THETA production (Figs. 7C and D). Sulfaphenazole, compound 11, and compound 24 inhibited synthesis of THETAs by purified CYP2C8 and CYP2C9. These compounds were better inhibitors of CYP2C9 than CYP2C8 (data not shown). In contrast, when aortic microsomes were incubated with specific CYP2J2 inhibitors, ebastine or terfenadone [20], THETA production was reduced in a concentration-dependent manner (Fig. 8). Ebastine and terfenadone inhibited synthesis of THETAs by purified CYP2J2 (data not shown).

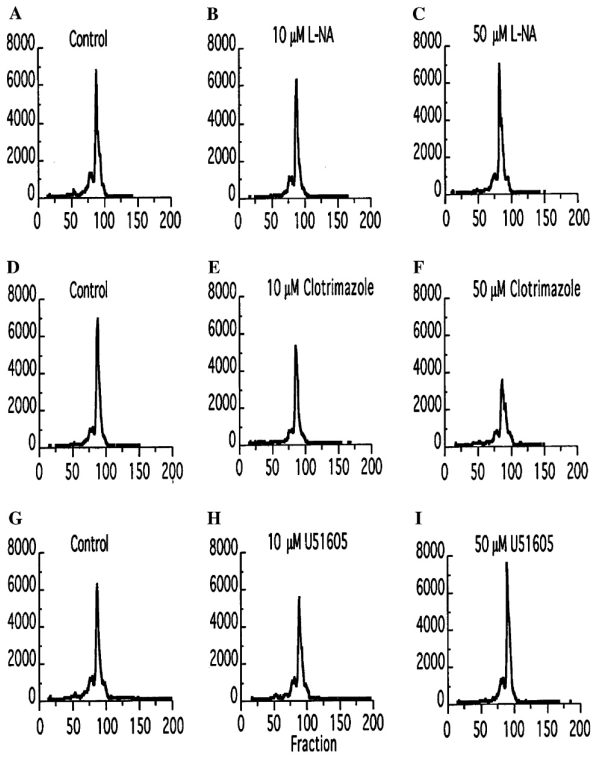


Fig. 6. Effect of various inhibitors on the synthesis of THETAs by rabbit aortic microsomes. Rabbit aortic microsomes were incubated with [^{14}C]arachidonic acid and 15-lipoxygenase in the presence of varying concentrations of L-NA (top panels A–C), clotrimazole (middle panels D–F) or U51605 (bottom panels G–I). Metabolites were separated using reverse phase HPLC with solvent system I (data not shown). Metabolites corresponding to fractions 27–35 were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, rechromatographed using solvent system II, and illustrated in the figure.

The next series of experiments looked specifically at which CYP isoforms may function as a hydroperoxide isomerase. Endothelial cells contain CYP enzymes of the 2J and 2C subfamilies [28,31]. Incubations were performed with [^{14}C]arachidonic acid and 15-lipoxygenase and CYP2J2 (Fig. 9A), CYP2J9 (Fig. 9B), or CYP2C8 (Fig. 9C). The metabolites were extracted and purified by reverse phase-HPLC using solvent system I, followed by solvent system II (top panel). The metabolites collected from solvent system II were purified further using normal phase-HPLC with solvent system III (bottom panels). Chromatograms showed a product that comigrated with the THETAs (Fig. 9) in all incubations with the CYP isoforms. The pattern of metabolites closely resembled the pattern of metabolites observed in rabbit aortic microsomes (Fig. 1C). Two other CYP isoforms, CYP2J5 and CYP2C11, were also tested. The pattern of metabolites observed with CYP2J5 was identical to that observed with the other CYP2J isoforms (data not shown). In contrast, the purified CYP2C11 enzyme produced a product that comigrated with the THETAs but many other unidentified radioactive products were

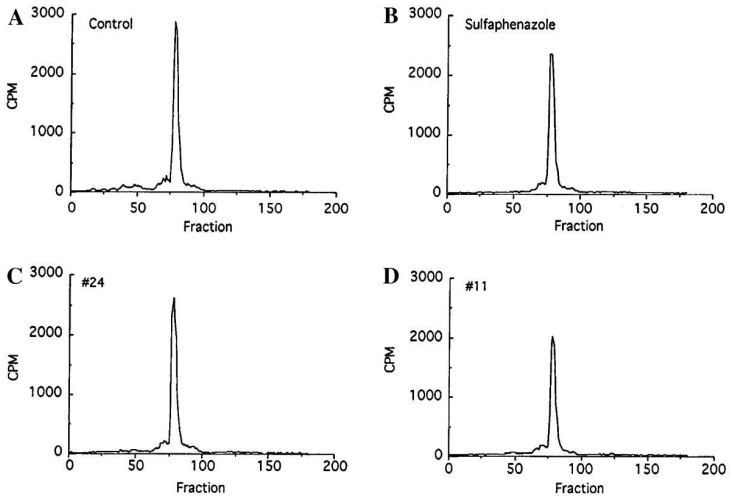


Fig. 7. Effect of specific inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9 on the production of THETAs. [^{14}C]Arachidonic acid and 15-lipoxygenase were incubated with sulfaphenazole (30 μM) (B), compound 24 (100 μM) (C) or compound 11 (10 μM) (D). Metabolites were separated using reverse phase HPLC with use of solvent system I (data not shown). Metabolites corresponding to fractions 27–35 were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, rechromatographed using solvent system II, and illustrated in the figure.

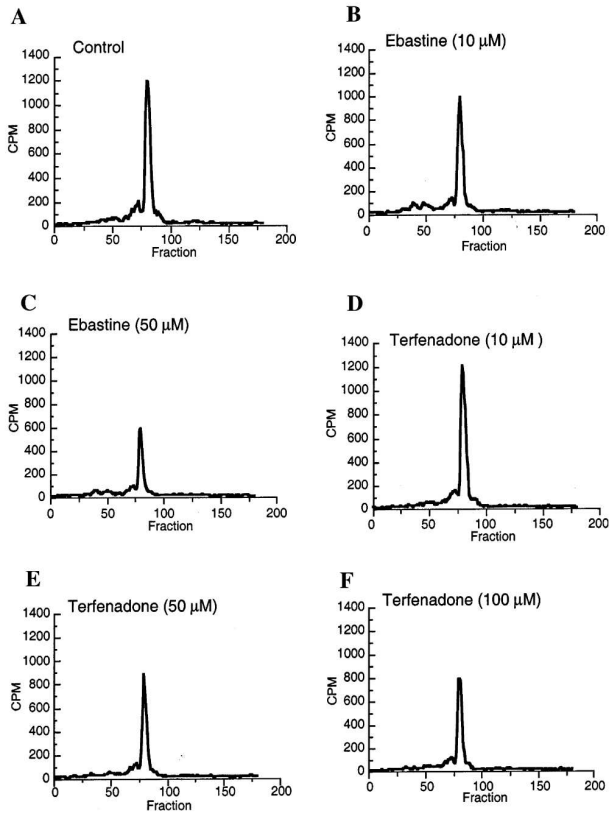


Fig. 8. Effect of specific inhibitors of CYP2J2 on the production of THETAs. [^{14}C]Arachidonic acid and 15-lipoxygenase were incubated with ebastine (10 and 50 μM) (B and C) or terfenadone (10, 50, and 100 μM) (D, E, and F). Metabolites were separated using reverse phase HPLC with use of solvent system I (data not shown). Metabolites corresponding to fractions 27–35 were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, rechromatographed using solvent system II, and illustrated in the figure.

also observed (data not shown). The pattern of metabolites with CYP2C11 more closely resembled the products observed with purified PGI_2 synthase and eNOS (Fig. 5). The radioactive metabolites from CYP2J2 and CYP2J9 were collected, derivatized, and analyzed by GC/MS. The mass spectra were identical to those shown in Fig. 3 confirming the production of 11,12,15- and 11,14,15-THETAs by these isozymes.

Specific polyclonal anti-CYP2C8 or anti-CYP2J2 antibodies were used for Western blot analysis in lysates prepared from rabbit aortas and rabbit aortic microsomes. Immunoreactive bands in the molecular weight range of 54–56 kDa were observed in the aortic lysates and microsomes with both the anti-CYP2J2 antibody and anti-CYP2C8 antibody (data not shown). This experiment was repeated two times and similar results were observed and indicate the presence of rabbit isoforms analogous to human CYP2C8 and CYP2J2 in the rabbit aorta. The expression of both enzymes was similar when equal amounts of protein were analyzed.

Discussion

The present study indicates that 15-HPETE is converted by a microsomal hydroperoxide isomerase to 11-H-14,15- and 15-H-11,12-EETA and their hydrolysis products, 11,14,15- and 11,12,15-THETAs. Several endothelial enzymes function as hydroperoxide isomerases including CYPs, NOS, and PGI_2 synthase. Results showed that incubation of arachidonic acid and 15-lipoxygenase with rat liver microsomes, a rich source of CYP enzymes, resulted in the formation of a product that comigrated with THETAs on HPLC. If rabbit

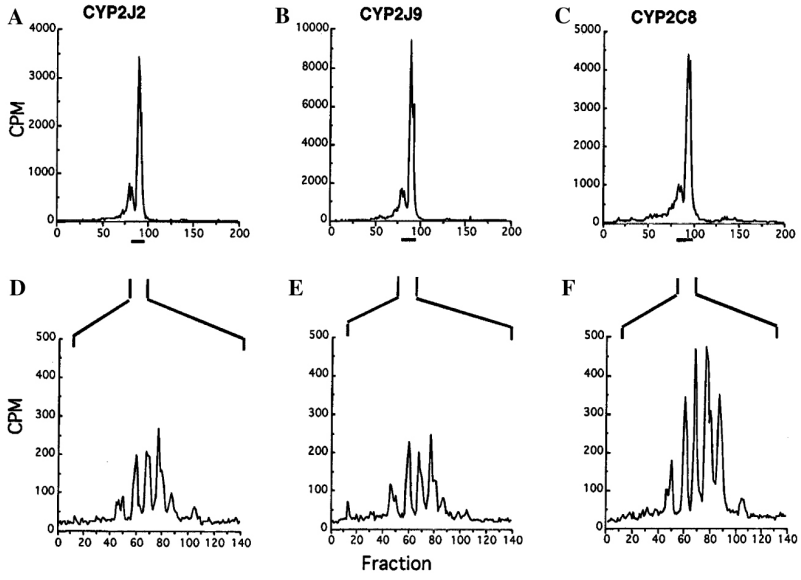


Fig. 9. Production of THETAs by CYP2J and CYP2C. [^{14}C]Arachidonic acid and 15-lipoxygenase was incubated with CYP2J2 (A), CYP2J9 (B), or CYP2C8 (C). Metabolites were separated using reverse phase HPLC with use of solvent system I (data not shown). Metabolites corresponding to fractions 27–35 were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, and rechromatographed using solvent system II (A, B, and C). Metabolites corresponding to fractions 87–93 (17.5–18.5 min) of (A), (B), and (C) were collected, extracted using cyclohexane/ethyl acetate, and rechromatographed using normal phase HPLC with solvent system III (D, E, and F).

aortic microsomes were used as the source of hydroperoxide isomerases, incubations with arachidonic acid and 15-lipoxygenase also produced THETAs. Futhermore, rabbit aortic microsomes converted 15-HPETE to THETAs. If purified CYP isozymes were incubated with arachidonic acid and 15-lipoxygenase, the major product comigrated with the THETAs. Finally, clotrimazole, a CYP inhibitor, blocked the ability of aortic microsomes to produce THETAs. Miconazole, another CYP inhibitor, also blocked THETA synthesis [12].

Since several other heme-containing enzymes besides CYPs can function as hydroperoxide isomerases and catalyze the rearrangement of 15-HPETE to the THETAs, we also examined the role of hematin, and two endothelial heme-containing enzymes, eNOS and PGI_2 synthase, in the production of THETAs. Cyclooxygenase was not tested, since previous studies indicate that indomethacin increases rather than inhibits THETA synthesis [8,12]. Reverse phase-HPLC analysis of the incubations with these enzymes indicated a pattern of metabolites similar to incubations of 15-lipoxygenase plus rabbit aortic microsomes. Further purification indicated that there was a product that comigrated with the THETAs. However, a number of other products were also produced by hematin, eNOS, and PGI_2 synthase. This was in contrast to the incubation of rat liver microsomes with 15-lipoxygenase and arachidonic acid, which produced only one major metabolite similar to that produced by rabbit aortic homogenates incubated with 15-HPETE. We used inhibitors of NOS and PGI_2 synthase to determine if these enzymes were involved in aortic THETA synthesis. Neither the NOS inhibitors, L-NA or L-NMMA, nor the PGI_2 synthase inhibitor, U-51605, affected THETA production by aortic microsomes. However, the synthesis of the THETAs by aortic microsomes was blocked by the heme-binding CYP inhibitor, clotrimazole. Another CYP inhibitor, SKF 525A, which does not bind to the heme portion of the enzyme, was ineffective as an inhibitor of THETA production from the rabbit aortic microsomes. Previous studies showed that miconazole, a CYP inhibitor that is similar in structure to clotrimazole, did not alter eNOS activity [32] but inhibited THETA synthesis [12]. Metyrapone, a CYP2B inhibitor, did not inhibit THETA synthesis [8]. These results would support the conclusion that clotrimazole is a specific inhibitor of CYPs and does not inhibit all heme-containing enzymes.

Weiss et al. [14] provided the first evidence that the conversion of 15-HPETE to HEETAs occurs by an enzymatic transformation involving CYPs. Chang et al. [33] looked at the CYP-dependent metabolism of 15(*S*)-HPETE and found that rat liver microsomes obtained from control or phenobarbital-treated rats, or purified CYP2B1 enzyme converted 15(*S*)-HPETE to 11-H-14,15-EETA. When they examined CYP-mediated metabolism using 15(*R*)-HPETE as a substrate, a different product was formed, 13-H-14,15-EETA. The results of their experiments are important in that they

present a model system for mammalian CYPs in the stereoselective synthesis of HEETAs and may be extended to the hydroperoxide isomerase in vascular tissue. We have previously shown that the major stereoisomer of 15-HETE in rabbit aorta was 15(*S*)-HETE [25], supporting other observations that a 15(*S*)-lipoxygenase is the enzyme producing 15(*S*)-HPETE in rabbit aorta. Consistent with 15(*S*)-HPETE synthesis and the aortic hydroperoxide isomerase having a CYP-like mechanism, rabbit aorta synthesizes 11-H-14,15-EETA and 15-H-11,12-EETA and not 13-H-14,15-EETA [12].

CYP is a family of enzymes with preferential specificity for different substrates [34]. Understanding the role of CYP in arachidonic acid metabolism is particularly important considering the vast array of biological activities associated with arachidonic acid metabolites. For example, the CYP2C8 isoform was isolated and cloned from human endothelial cells [35]. This isoform produces the vasodilator epoxyeicosatrienoic acid derivatives of arachidonic acid [28,35]. Wu and coworkers have recently reported the expression of CYP2J subfamily enzymes that also metabolize arachidonic acid [21,22,28]. In the human heart, CYP2J2 metabolizes arachidonic acid to EETs [21] while CYP2J5 is highly expressed in mouse kidney and catalyzes the formation of EETs [22]. CYP2J9 is expressed in mouse brain and converts arachidonic acid to 19-HETE [23]. There is recent evidence that the CYP2J2 isoform is responsible for EET biosynthesis in human endothelial cells [28,36]. Using rabbit aortic tissue, we examined the expression of CYP enzymes to determine which specific isoform may be responsible for the conversion of 15-HPETE to the HEETAs. Immunoblot analysis showed the presence of both CYP2C8 and CYP2J in aortic tissue. CYP2J2 and CYP2C8 are human isozymes; however, the presence of 55 kDa immunoreactive proteins to several anti-CYP2J2 and anti-CYP2C8 antibodies in rabbit aorta suggests the presence of orthologous rabbit isoforms. While CYP2C8 protein is expressed in the aortas, it does not appear to be the major isoform involved in the production of THETAs. This conclusion is based on the observation that incubation of purified CYP2C8 and CYP2C11 enzymes with arachidonic acid and 15-lipoxygenase did not produce a pattern of metabolites resembling those seen in rabbit aortic microsomes. Additionally, sulfaphenazole, compound 24, and compound 11 [19], specific inhibitors of CYP2C8 and 2C9, did not block THETA production. There is recent evidence that N-alkylated sulfaphenazole derivatives, similar to compounds 11 and 24, inhibit rabbit liver CYP2C5 [37]. There is evidence that CYP2J2 may represent the aortic hydroperoxide isomerase. CYP2J protein is expressed in rabbit aorta and the major products formed in incubations with recombinant CYP2J2, CYP2J5, and CYP2J9 enzymes were identified as 11,12,15- and 11,14,15-THETAs. There was no evidence of other metabolites as with rabbit vascular tissue. Additionally, two specific inhibitors of CYP2J2, ebastine and terfenadone, produced a concentration-dependent inhibition of THETA production in rabbit aortic microsomes. At the present time, it appears that CYP2J and not CYP2C represents the hydroperoxide isomerase in rabbit aorta.

While 15-lipoxygenase is a non-heme-containing enzyme [11], it would not be predicted to have hydroperoxide isomerase activity. However, there is evidence that under certain experimental conditions such as low oxygen, the enzyme can convert 15-HPETE to a short chain aldehyde, 14,15-epoxide, 15-ketone or a HEETA [11,38–40]. Specifically, when Bryant et al. [38] incubated purified rabbit reticulocyte 15-lipoxygenase-1 with arachidonic acid, 13-hydroxy-14,15-epoxyeicosatrienoic acid (13-H-14,15-EETA) was the only HEETA formed. Recently, epidermal 12-lipoxygenase-3 (ALOXE3) which is devoid of lipoxygenase activity was shown to have hydroperoxide isomerase activity and produce 13-H-14,15-EETA from 15-HPETE [41]. In the current study, 13-H-14,15-EETA was not produced by the rabbit aortic homogenates or homogenates incubated with 15-lipoxygenase, suggesting that aortic 15-lipoxygenase is not responsible for the hydroperoxide isomerase activity. Furthermore, we find that the aortic hydroperoxide isomerase activity is associated with the microsomal fraction. Since 15-lipoxygenase is a cytosolic enzyme [11], it cannot account for the microsomal hydroperoxide isomerase activity of aorta.

The degradation of 15-HPETE to 15-HETE may be catalyzed by glutathione peroxidase, phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin reductase [40,42]. Each of these enzymes is present in the vascular endothelium and may promote the degradation of 15-HPETE to 15-HETE rather than metabolism of 15-HPETE to HEETAs and THETAs [43,44]. In fact, in platelets and insulinoma cells, inhibition of glutathione peroxidase enhances the production of THETAs and hepoxilins [45–47]. These studies suggest that the presence of glutathione peroxidases and thioredoxin reductase in the endothelium may regulate the synthesis of THETAs and HEETAs and inhibition of these enzymes may increase their synthesis.

In summary, we propose that arachidonic acid is metabolized by 15-lipoxygenase to 15-HPETE, which undergoes an enzymatic rearrangement by a hydroperoxide isomerase to either 11-H-14,15-, 15-H-11,12-EETA or both. We provide evidence that a CYP, probably of the CYP2J subfamily, may act as a hydroperoxide isomerase. Further hydrolysis of the epoxy group results in the formation of 11,12,15- and 11,14,15-THETA. The HEETAs and THETAs are both vasodilators and may function as important regulators of vascular tone [12].

Acknowledgments

We thank Ms. Blythe Holmes, Mrs.Laura Kreckler, Mr. Erik Edwards, Ms. Sarah Hittner, and Mr. David Kachelmeyer for technical help and Mrs. Gretchen Barg for secretarial assistance. These studies were supported by a grant from the National Heart, Lung and Blood Institute (HL-37981) and the NIEHS Division of Intramural Research.

References

[1] R.F. Furchgott, P.M. Vanhoutte, FASEB J. 3 (1989) 2007–2018.
[2] S. Moncada, J.R. Vane, Pharmacol. Rev. 30 (1979) 293–331.
[3] W.B. Campbell, D. Gebremedhin, P.F. Pratt, D.R. Harder, Circ. Res. 78 (1996) 415–423.
[4] J.G. DeMey, M. Claeys, P.M. Vanhoutte, J. Pharmacol. Exp. Ther. 222 (1982) 166–173.
[5] A. Pinto, N.G. Abraham, K.M. Mullane, J. Pharmacol. Exp. Ther. 236 (1986) 445–451.
[6] G.M. Rubanyi, P.M. Vanhoutte, J. Pharmacol. Exp. Ther. 235 (1985) 81–86.
[7] H.A. Singer, M.J. Peach, J. Pharmacol. Exp. Ther. 226 (1983) 790–795.
[8] S.L. Pfister, N. Spitzbarth, W. Edgemond, W.B. Campbell, Am. J. Physiol. 270 (1996) H1021–H1030.
[9] C.R. Pace-Asciak, S. Asotra, Free Radic. Biol. Med. 7 (1989) 409–433.
[10] H. Kuhn, T. Schewe, S.M. Rapoport, Adv. Enzymol. Mol. Biol. 58 (1986) 273–311.
[11] H. Kuhn, S. Borngraber, Adv. Exp. Med. Biol. 447 (1999) 5–28.
[12] S.L. Pfister, N. Spitzbarth, K. Nithipatikom, W.S. Edgemond, J.R. Falck, W.B. Campbell, J. Biol. Chem. 273 (1998) 30879–30887.
[13] H.W. Gardner, Free Radic. Biol. Med. 7 (1989) 65–86.
[14] R.H. Weiss, J.L. Arnold, R.W. Estabrook, Arch. Biochem. Biophys. 252 (1987) 334–338.
[15] C.R. Pace-Asciak, E. Granstrom, B. Samuelsson, J. Biol. Chem. 258 (1983) 6835–6840.
[16] C.R. Pace-Asciak, Prostaglandins Leuk. Med. 22 (1986) 1–9.
[17] S.K. Shyue, K.H. Ruan, L.H. Wang, K.K. Wu, J. Biol. Chem. 272 (1997) 3657–3662.
[18] J.H. Capdevila, J.R. Falck, E. Dishman, A. Karara, Methods Enzymol. 187 (1990) 385–394.
[19] N.T. Ha-Duong, S. Dijols, C. Marques-Soares, C. Minoletti, P.M. Dansette, D. Mansuy, J. Med. Chem. 44 (2001) 3622–3631.
[20] T. Hashizume, S. Imaoka, M. Mise, Y. Terauchi, T. Fujii, H. Miyazaki, T. Kamataki, Y. Funae, J. Pharmacol. Exp. Ther. 300 (2002) 298–304.
[21] S. Wu, C.R. Moomaw, K.B. Tomer, J.R. Falck, D.C. Zeldin, J. Biol. Chem. 271 (1996) 3460–3468.
[22] J. Ma, W. Qu, P.E. Scarborough, K.B. Tomer, C.R. Moomaw, R. Maronpot, L.S. Davis, M.D. Breyer, D.C. Zeldin, J. Biol. Chem. 274 (1999) 17777–17788.
[23] W. Qu, J.A. Bradbury, C.C. Tsao, R. Maronpot, G.J. Harry, C.E. Parker, L.S. Davis, M.D. Breyer, M.P. Waalkes, J.R. Falck, J. Chen, R.L. Rosenberg, D.C. Zeldin, J. Biol. Chem. 276 (2001) 25467–25479.
[24] S.L. Pfister, J.M. Schmitz, J.T. Willerson, W.B. Campbell, Prostaglandins 36 (1988) 515–531.
[25] S.L. Pfister, J.R. Falck, W.B. Campbell, Am. J. Physiol. 261 (1991) H843–H852.
[26] U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680–685.
[27] J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, Curr. Prot. Immunol. 1 (1992) 8.4.1–8.4.17.
[28] K. Node, Y. Huo, X. Ruan, B. Yang, M. Spiecker, K. Ley, D.C. Zeldin, J.K. Liao, Science 285 (1999) 1276–1279.
[29] D.C. Zeldin, R.N. DuBois, J.R. Falck, J.H. Capdevila, Arch. Biochem. Biophys. 322 (1995) 76–86.
[30] H. Vanden Bossche, P. Marichal, J. Gorrens, M.C. Coene, G. Willemsens, D. Bellens, I. Roels, H. Moereels, P.A. Janssen, Mycoses 32 (1989) 35–52.
[31] B. Fisslthaler, R. Popp, L. Kiss, M. Potente, D.R. Harder, I. Fleming, R. Busse, Nature 401 (1999) 493–497.
[32] W.B. Campbell, D. Gebremadhin, P. Pratt, D.R. Harder, Circ. Res. 78 (1996) 415–423.
[33] M.S. Chang, W.E. Boeglin, F.P. Guengerich, A.R. Brash, Biochemistry 35 (1996) 464–471.
[34] J.H. Capdevila, V. Holla, C. Helvig, J.R. Falck, Mol. Aspects Med. 20 (1999) 42–137.
[35] J.H.C. Lin, Y. Kobari, Y. Zhu, M.B. Stemerman, K.A. Pritchard, Endothelium 4 (1995) 219–229.
[36] T.J. Yang, K.W. Krausz, Y. Sai, F.J. Gonzalez, H.Y. Gelboin, Drug Metab. Dispos. 27 (1999) 102–109.
[37] C. Marques-Soares, S. Dijols, A.C. Macherey, M.R. Wester, E.F. Johnson, P.M. Dansette, D. Mansuy, Biochemistry 42 (2003) 6363–6369.
[38] R.W. Bryant, T. Schewe, S.M. Rapoport, J.M. Bailey, J. Biol. Chem. 260 (1985) 3548–3555.
[39] G.J. Garssen, G.A. Veldink, J.F. Vliegenthart, J. Boldingh, Eur. J. Biochem. 62 (1976) 33–36.
[40] H. Kuhn, Prog. Lipid Res. 35 (1996) 203–226.
[41] Z. Yu, C. Schneider, W.E. Boeglin, L.J. Marnett, A.R. Brash, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100 (2003) 9162–9167.
[42] K. Schnurr, J. Belkner, F. Ursini, T. Schewe, H. Kuhn, J. Biol. Chem. 27 (1996) 4653–4658.
[43] M.H. Lewin, J.R. Arthur, R.A. Riemersma, F. Nicol, S.W. Walker, E.M. Millar, A.F. Howie, G.J. Beckett, Biochem. Biophys. Acta 1593 (2002) 85–92.
[44] S. Miller, S.W. Walker, J.R. Arthur, M.H. Lewin, K. Pickard, F. Nicol, A.F. Howie, G.J. Beckett, Biochim. Biophys. Acta 1588 (2002) 85–93.
[45] R.W. Bryant, M.J. Bailey, Biochem. Biophys. Res. Commun. 92 (1980) 268–276.
[46] M. Sutherland, P. Shankaranarayanan, T. Schewe, S. Nigam, Biochem. J. 353 (2001) 91–100.
[47] P. Shankaranarayanan, R. Ciccoli, S. Nigam, FEBS Lett. 538 (2003) 107–112.

B Spectres de masse obtenus pour les métabolites d'hydroxylation des dérivés 2, 4, 5 et 17 (cf. chapitre IV)

B. 1 Composé 2

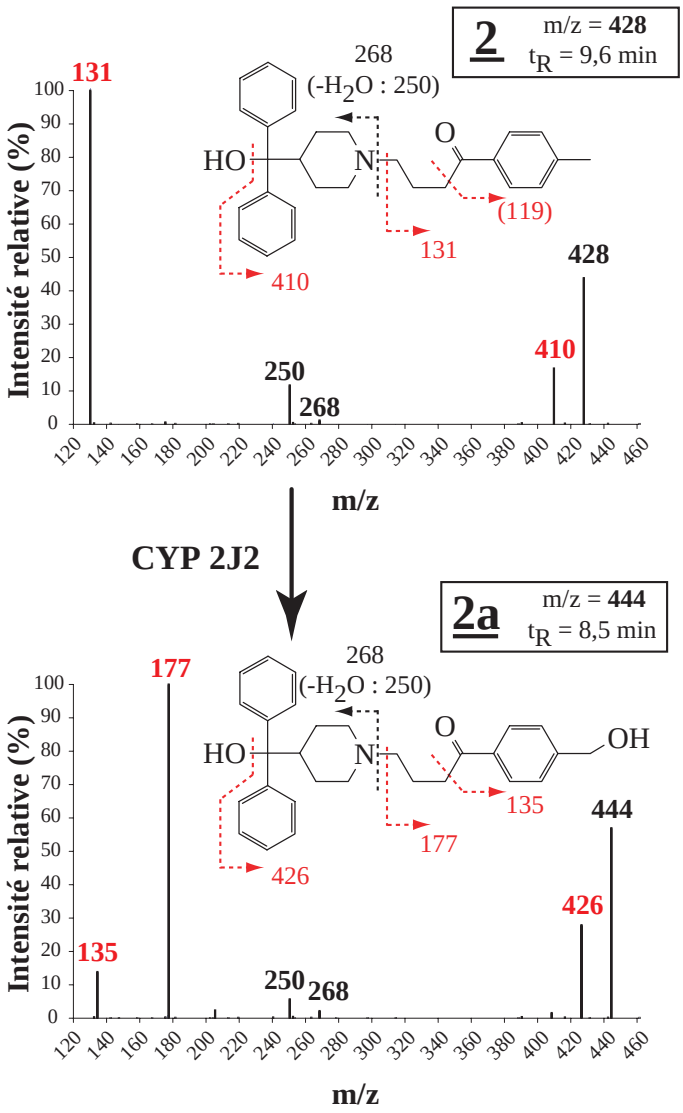


Figure 1 – **Spectres de fragmentation SM^2 et assignations structurales des fragments pour le substrat et le métabolite 2a (m/z = 444) formés après oxydation du composé 2 par le CYP 2J2.**
Les fragments indiqués en noir (respectivement en rouge) représentent les fragments dont la masse ne change pas (respectivement dont la masse augmente de 16) après oxydation.

B. 2 Composé 4

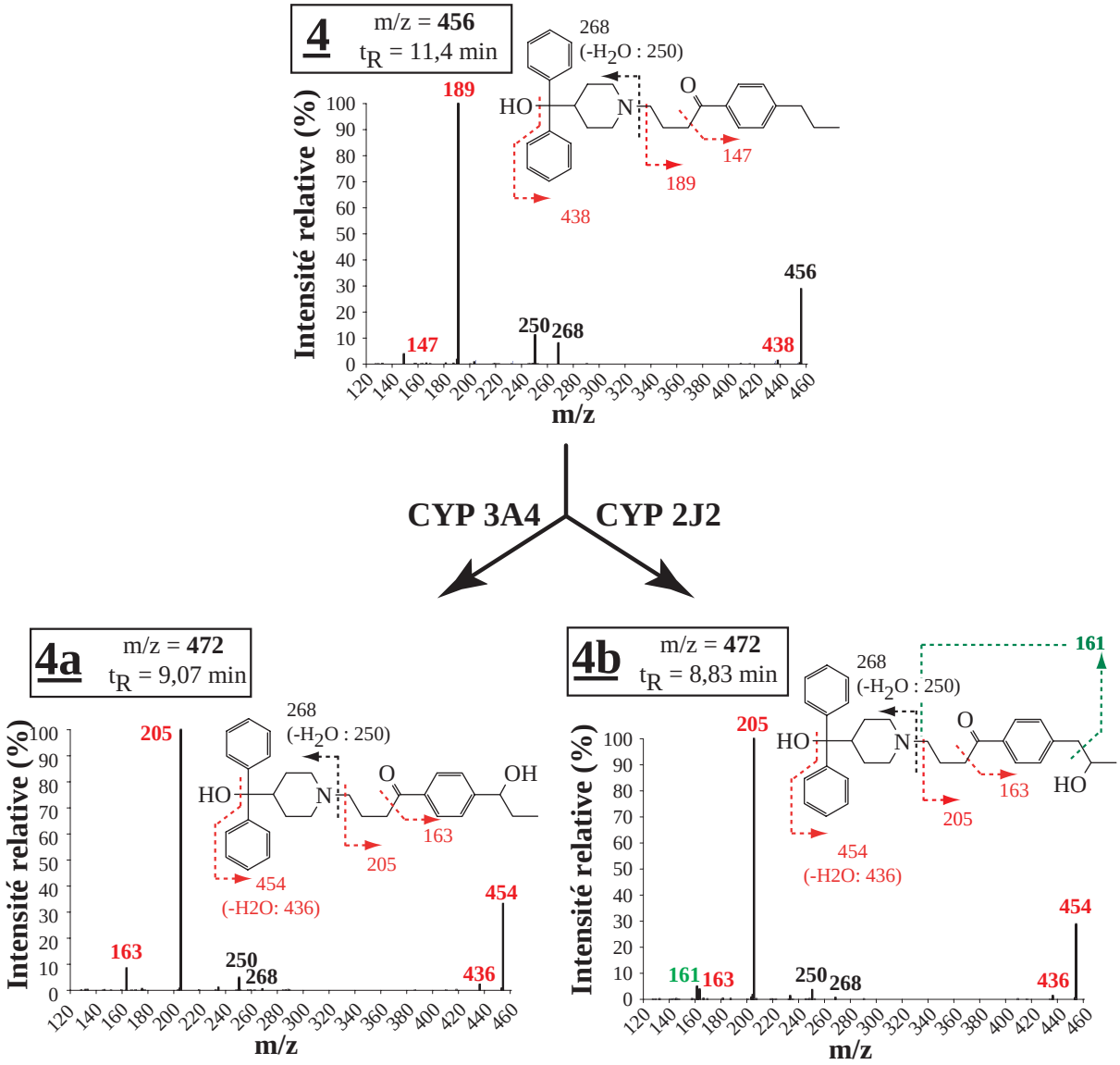


Figure 2 – **Spectres de fragmentation SM^2 et assignations structurales des fragments pour les deux métabolites inconnus 4a et 4b (m/z = 472) formés après oxydation du composé 4 par le CYP 2J2 et le CYP 3A4**. Les fragments indiqués en noir (respectivement en rouge) représentent les fragments dont la masse ne change pas (respectivement dont la masse augmente de 16) après oxydation. Le fragment caractéristique du métabolite **4b** est indiqué en vert.

B. 3 Composé 5

Dans ce cas, le chromatogramme CLHP/SM obtenu après injection d'une incubation de **5** avec des microsomes contenant le CYP 2J2 est présenté. Celui-ci montre bien la présence de deux métabolites majoritaires **5b** et **5c** :

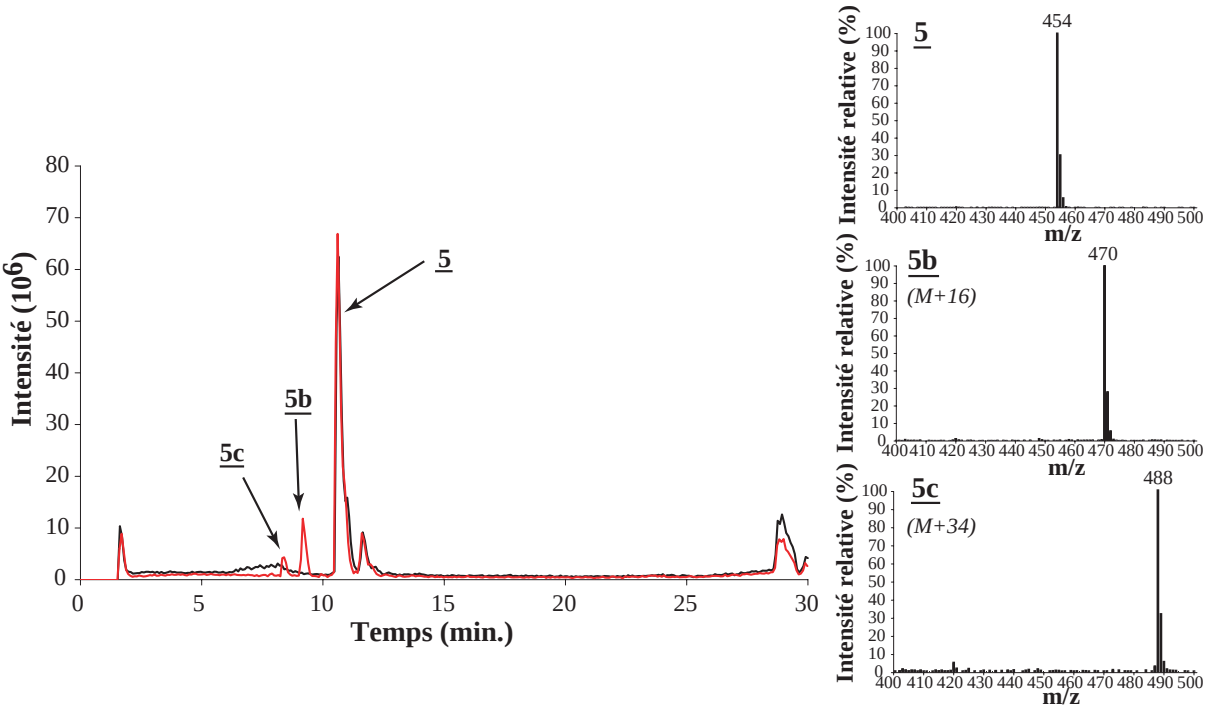


Figure 3 – **Chromatogrammes CLHP/SM obtenus par incubation du dérivé 5 avec le CYP 2J2 en présence de NADPH**. Les deux chromatogrammes indiqués ont été obtenus pour un temps d'incubation de 0 minute (noir) et de 30 minutes (rouge). Les spectres de masse des pics apparus au cours de l'incubation (**5b** et **5c**) ainsi que celui du substrat **5** sont indiqués en dessous des chromatogrammes.

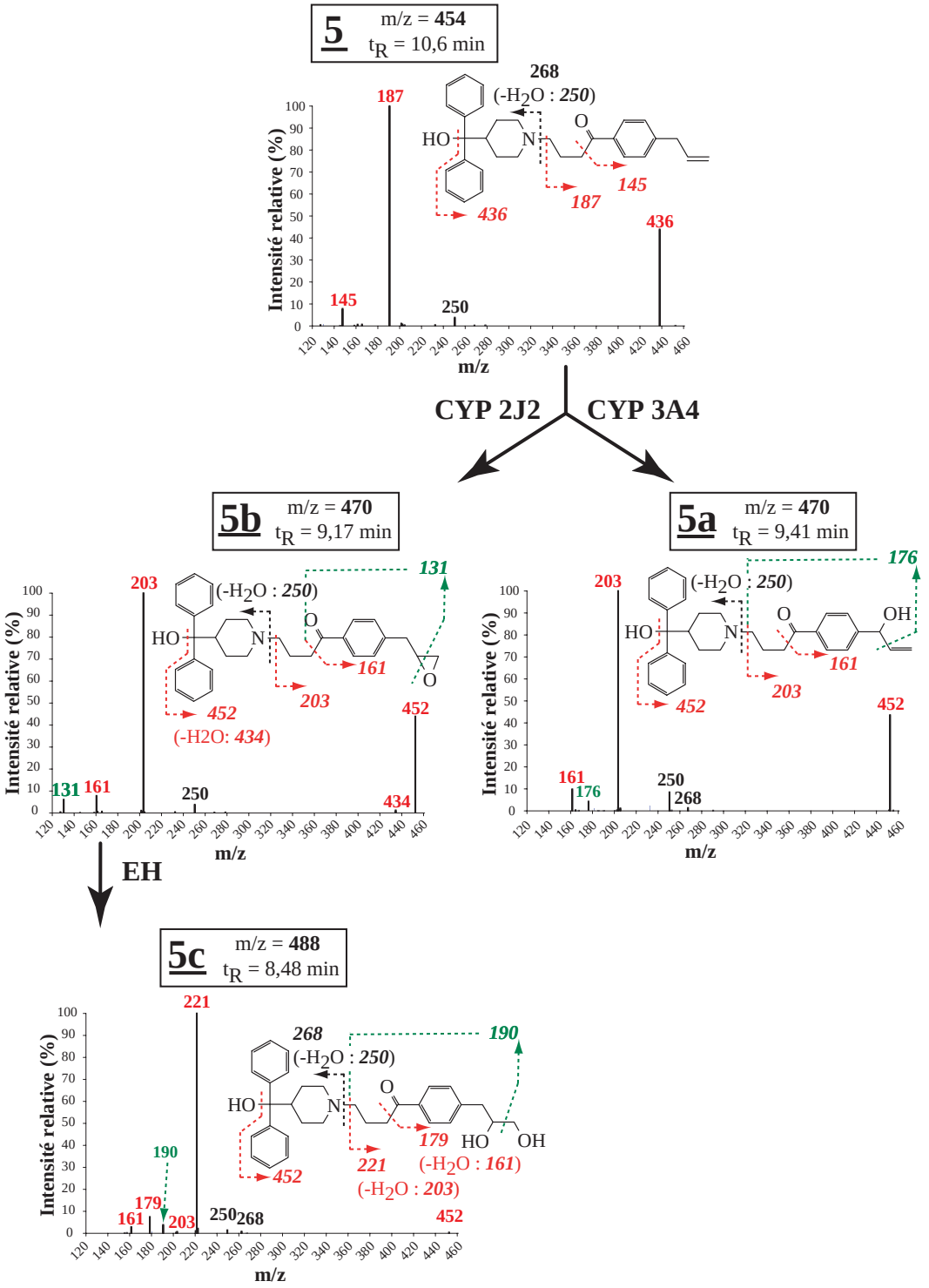


Figure 4 – **Spectres de fragmentation SM^2 et assignations structurales des fragments pour les deux métabolites 5a et 5b (m/z = 470) ainsi que le métabolite secondaire 5c (m/z = 488) formés après oxydation du composé 5 par le CYP 2J2 et le CYP 3A4.** Les fragments indiqués en noir (respectivement en rouge) représentent les fragments dont la masse ne change pas (respectivement dont la masse augmente de 16 ou de 34) après oxydation. Le fragment caractéristique de chaque métabolite est indiqué en vert.

B. 4 Composé 17

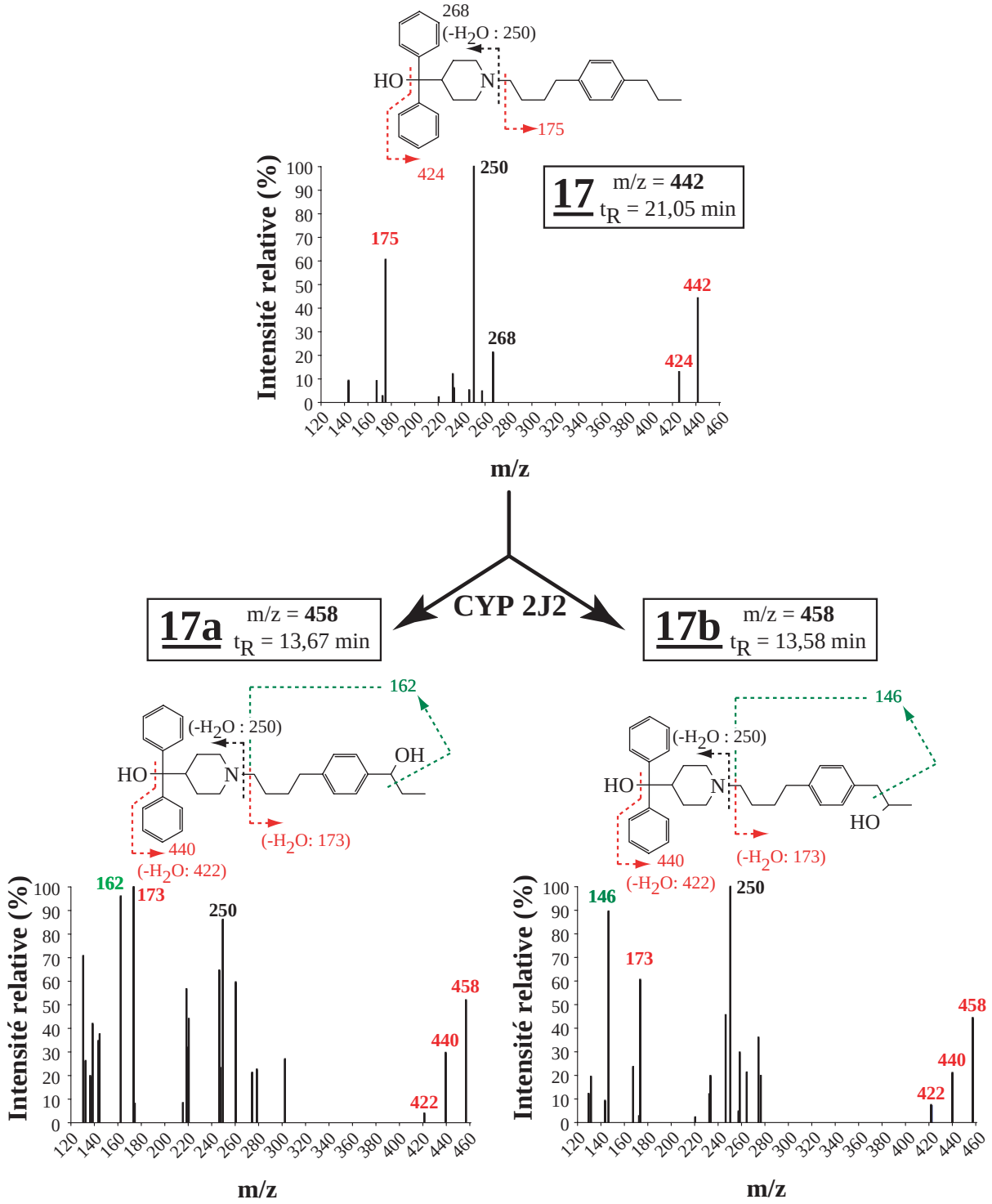


Figure 5 – **Spectres de fragmentation SM^2 et assignations structurales des fragments pour les deux métabolites 17a et 17b (m/z = 458) formés après oxydation du composé 17 par le CYP 2J2 et le CYP 3A4**. Les fragments indiqués en noir (respectivement en rouge) représentent les fragments dont la masse ne change pas (respectivement dont la masse augmente de 16) après oxydation. Le fragment caractéristique de chaque métabolite est indiqué en vert.

C Construction du modèle de CYP2J2

C. 1 Fichier d'évènements créé par Swiss-Model

```
AlignMaster output
============================================================
Length of target sequence: 502 residues
Reading user-defined template list
Extracting template sequences
Running pair-wise alignments with target sequence
Sequence identity of templates with target:
1z11A.pdb: 50.7 % identity
2bdmA.pdb: 51.9 % identity
1nr6A.pdb: 46.4 % identity
1pq2A.pdb: 40.76 % identity
2f9qA.pdb: 36.04 % identity
Looking for template groups
Global alignment overview:
Taget Sequence: |================================================|
1z11A.pdb |    ------------------------------------------
2bdmA.pdb |    ------------------------------------------
1nr6A.pdb |    ------------------------------------------
1pq2A.pdb |    ------------------------------------------
2f9qA.pdb |       ---------------------------------------
AlignMaster found 1 regions to model separately:
1: Using template(s)   1nr6A.pdb 1pq2A.pdb 1z11A.pdb 2bdmA.pdb 2f9qA.pdb
Creating Batch files for ProMod (if any):
Batch.1: residues 39 - 502 of submitted sequence.
Exiting AlignMaster

ProModII trace log for Batch.1
============================================================
ProModII: 3.70 (SP3)
ProModII: Loading Template: 1z11A.pdb
ProModII: Loading Template: 2bdmA.pdb
ProModII: Loading Template: 1nr6A.pdb
ProModII: Loading Template: 1pq2A.pdb
ProModII: Loading Template: 2f9qA.pdb
ProModII: Loading Raw Sequence
ProModII: Iterative Template Fitting
ProModII: Iterative Template Fitting
ProModII: Iterative Template Fitting
ProModII: Iterative Template Fitting
ProModII: Generating Structural Alignment
ProModII: Aligning Raw Sequence
ProModII: Refining Raw Sequence Alignment
ProModII: ProModII: doing complex assignment of backbone
ProModII: N-terminal overhang trimmed for chain ' '. Start at residue: 2
ProModII: ProModII: adding blocking groups
ProModII: Weighting Backbones
ProModII: Averaging Sidechains
ProModII: Adding Missing Sidechains
ProModII: Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
ProModII: GROMOS will repair it at residue PHE 32
ProModII: Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
ProModII: GROMOS will repair it at residue ALA 94
ProModII: Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
ProModII: GROMOS will repair it at residue SER 115
```

```
ProModII: Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
ProModII: GROMOS will repair it at residue ARG 161
ProModII: Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
ProModII: GROMOS will repair it at residue MET 198
ProModII: Trying Ligating with anchor residues GLU 390 and GLN 393
ProModII: Trying Ligating with anchor residues LEU 389 and GLN 393
ProModII:  Number of Ligations found: 57
ProModII: ACCEPTING loop    0: clash=   0 FF=       -192.8 PP= -2.00
ProModII: Optimizing Sidechains
ProModII: Dumping Preliminary Model
ProModII: Adding Hydrogens
ProModII: Optimizing loops and OXT (nb = 5)
ProModII: Final Total Energy:        5855.536 KJ/mol
ProModII: Removing Hydrogens
ProModII: Fixing Atom Nomenclature
ProModII: Dumping Sequence Alignment
```

C. 2 Validation par WHATCHECK du modèle issu de Swiss-Model

```
WhatCheck Report generated for your SWISS MODEL request
AC code:   Model: Batch.1.pdb
For details about the WhatCheck output, please see:
http://www.cmbi.kun.nl/gv/checkhelp/
------------------------------------------------------------
**********************************************************************
********** REPORT OF PROTEIN ANALYSIS  by the WHAT IF program **********
**********************************************************************
Date : 2006-03-07
This report was created by WHAT IF version 19970813-1517

(...)

# 51 # Note: Summary report for users of a structure
This is an overall summary of the quality of the structure as
compared with current reliable structures. This summary is most
useful for biologists seeking a good structure to use for modelling
calculations.

The second part of the table mostly gives an impression of how well
the model conforms to common refinement constraint values. The
first part of the table shows a number of constraint-independent
quality indicators.

 Structure Z-scores, positive is better than average:
  1st generation packing quality :  -1.074
  2nd generation packing quality :  -1.874
  Ramachandran plot appearance   :  -0.683
  chi-1/chi-2 rotamer normality  :   2.786
  Backbone conformation          :  -0.778

 RMS Z-scores, should be close to 1.0:
  Bond lengths                   :   1.336
  Bond angles                    :   1.308
  Omega angle restraints         :   0.986
  Side chain planarity           :   3.937 (loose)
  Improper dihedral distribution :   1.513 (loose)
  B-factor distribution          :   2.673 (loose)
  Inside/Outside distribution    :   1.113
```

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aiba, I., Yamasaki, T., Shinki, T., Izumi, S., Yamamoto, K., Yamada, S., Terato, H., Ide, H., et Ohyama, Y., "*Characterization of rat and human CYP2J enzymes as Vitamin D 25-hydroxylases*", Steroids **71**, 849–56 (2006).

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., et Lipman, D. J., "*Basic local alignment search tool*", J. Mol. Biol. **215**, 403–10. (1990).

André, F., Delaforge, M., et Loiseau, N., "*A Method for Performing Restrained Dynamics Docking of One or Multiple Substrates on Multi-specific Enzymes*", Patent WO2004038655 (2004).

Baldwin, S. J., Bloomer, J. C., Smith, G. J., Ayrton, A. D., Clarke, S. E., et Chenery, R. J., "*Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9*", Xenobiotica **25**, 261–70 (1995).

Barbosa-Sicard, E., Markovic, M., Honeck, H., Christ, B., Muller, D. N., et Schunck, W. H., "*Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily*", Biochem. Biophys. Res. Commun. **329**, 1275–81 (2005).

Barr, D. P., Martin, M. V., Guengerich, F. P., et Mason, R. P., "*Reaction of cytochrome P450 with cumene hydroperoxide : ESR spin-trapping evidence for the homolytic scission of the peroxide O-O bond by ferric cytochrome P450 1A2*", Chem. Res. Toxicol. **9**, 318–25 (1996).

Bathelt, C., Schmid, R. D., et Pleiss, J., "*Regioselectivity of CYP2B6 : homology modeling, molecular dynamics simulation, docking*", J. Mol. Model. **8**, 327–35 (2002).

Bauersachs, J., Hecker, M., et Busse, R., "*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**, 1548–53 (1994).

Bauersachs, J., Popp, R., Hecker, M., Sauer, E., Fleming, I., et Busse, R., "*Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor*", Circulation **94**, 3341–7 (1996).

Bauersachs, J., Christ, M., Ertl, G., Michaelis, U. R., Fisslthaler, B., Busse, R., et Fleming, I., "*Cytochrome P450 2C expression and EDHF-mediated relaxation in porcine coronary arteries is increased by cortisol*", Cardiovasc. Res. **54**, 669–75 (2002).

Baumann, E., "*Concerning the occurence of brenzcatechin in the urine.*", Pflüger's Arch. Physiol. **12**, 69 (1876).

Beckman, J., Wink, D. A., et Crow, J. "Nitric oxide and peroxynitrite". In *Methods in nitric oxide research*, (Feelisch, M. et Stamler, J., Eds.), pages 61–70. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, (1996).

Bednarski, P. J. et Nelson, S. D., "*Interactions of thiol-containing androgens with human placental aromatase*", J. Med. Chem. **32**, 203–13 (1989).

Bellamine, A., Gautier, J. C., Urban, P., et Pompon, D., "*Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability*", Eur. J. Biochem. **225**, 1005–13 (1994).

Beny, J. L. et Brunet, P. C., "*Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilatation of pig coronary arteries*", Blood Vessels **25**, 308–11. (1988).

Bertelsen, K. M., Venkatakrishnan, K., Von Moltke, L. L., Obach, R. S., et Greenblatt, D. J., "*Apparent mechanism-based inhibition of human CYP2D6 in vitro by paroxetine : comparison with fluoxetine and quinidine*", Drug Metab. Dispos. **31**, 289–93 (2003).

Bertrand-Thiebault, C., Ferrari, L., Boutherin-Falson, O., Kockx, M., Desquand-Billiald, S., Fichelle, J. M., Nottin, R., Renaud, J. F., Batt, A. M., et Visvikis, S., "*Cytochromes P450 are differently expressed in normal and varicose human saphenous veins : linkage with varicosis*", Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **31**, 295–301 (2004).

Bolton, T. B. et Clapp, L. H., "*Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle*", Br. J. Pharmacol. **87**, 713–23 (1986).

Bolz, S. S., Fisslthaler, B., Pieperhoff, S., De Wit, C., Fleming, I., Busse, R., et Pohl, U., "*Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries*", FASEB J. **14**, 255–60. (2000).

Borlak, J., Walles, M., Levsen, K., et Thum, T., "*Verapamil : metabolism in cultures of primary human coronary arterial endothelial cells*", Drug Metab. Dispos. **31**, 888–91 (2003).

Bradford, M. M., "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*", Anal. Biochem. **72**, 248–54 (1976).

Brand-Schieber, E., Falck, J. F., et Schwartzman, M., "*Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo*", J. Physiol. Pharmacol. **51**, 655–72 (2000).

Brandes, R. P., Schmitz-Winnenthal, F. H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P. L., Vanhoutte, P. M., Fleming, I., et Busse, R., "*An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 9747–52 (2000).

Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L. S., et Guengerich, F. P., "*Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in Saccharomyces cerevisiae*", Biochemistry **29**, 11280–92. (1990).

Brodie, B. B., Axelrod, J., Cooper, J. R., Gaudette, L., La Du, B. N., Mitoma, C., et Udenfriend, S., "*Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes*", Science **121**, 603–4 (1955).

Burke, M. D. et Mayer, R. T., "*Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P-450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins)*", Chem. Biol. Interact. **45**, 243–58 (1983).

Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., et Weston, A. H., "*EDHF : bringing the concepts together*", Trends Pharmacol. Sci. **23**, 374–80 (2002).

Bylund, J., Ericsson, J., et Oliw, E. H., "*Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic and linoleic acids by liquid chromatography-mass spectrometry with ion trap MS*", Anal. Biochem. **265**, 55–68 (1998a).

Bylund, J., Kunz, T., Valmsen, K., et Oliw, E. H., "*Cytochromes P450 with bisallylic hydroxylation activity on arachidonic and linoleic acids studied with human recombinant enzymes and with human and rat liver microsomes*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **284**, 51–60 (1998b).

Bylund, J., Bylund, M., et Oliw, E. H., "*cDna cloning and expression of CYP4F12, a novel human cytochrome P450*", Biochem. Biophys. Res. Commun. **280**, 892–7 (2001).

Campbell, W. B. et Falck, J. R., "*Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors*", Hypertension **49**, 590–6 (2007).

Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., et Harder, D. R., "*Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors*", Circ. Res. **78**, 415–23 (1996).

Campbell, W. B., Deeter, C., Gauthier, K. M., Ingraham, R. H., Falck, J. R., et Li, P. L., "*14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid relaxes bovine coronary arteries by activation of K(Ca) channels*", Am. J. Physiol. **282**, H1656–64 (2002).

Campbell, W. B., Spitzbarth, N., Gauthier, K. M., et Pfister, S. L., "*11,12,15-Trihydroxyeicosatrienoic acid mediates ACh-induced relaxations in rabbit aorta*", Am. J. Physiol. **285**, H2648–56 (2003).

Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A., et Radi, R., "*Cytochrome c nitration by peroxynitrite*", J. Biol. Chem. **275**, 21409–15 (2000).

Chataigneau, T., Feletou, M., Duhault, J., et Vanhoutte, P. M., "*Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery*", Br. J. Pharmacol. **123**, 574–80 (1998).

Chen, G., Suzuki, H., et Weston, A. H., "*Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels*", Br. J. Pharmacol. **95**, 1165–74 (1988).

Cheng, Y. et Prusoff, W. H., "*Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction*", Biochem. Pharmacol. **22**, 3099–108 (1973).

Chiang, C. W., Yeh, H. C., Wang, L. H., et Chan, N. L., "*Crystal Structure of the Human Prostacyclin Synthase*", J. Mol. Biol. **364**, 266–74 (2006).

Christ, G. J., Spray, D. C., El Sabban, M., Moore, L. K., et Brink, P. R., "*Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone*", Circ. Res. **79**, 631–46 (1996).

Ciaccio, P. J., Duignan, D. B., et Halpert, J. R., "*Selective inactivation by chloramphenicol of the major phenobarbital-inducible isozyme of dog liver cytochrome P-450*", Drug Metab. Dispos. **15**, 852–6 (1987).

Cojocaru, V., Winn, P. J., et Wade, R. C., "*The ins and outs of cytochrome P450s*", Biochim. Biophys. Acta **1770**, 390–401 (2007).

Coleman, H. A., Tare, M., et Parkington, H. C., "*EDHF is not K+ but may be due to spread of current from the endothelium in guinea pig arterioles*", Am. J. Physiol. **280**, H2478–83 (2001).

Collom, S. L., Jamakhandi, A. P., Tackett, A. J., Radominska-Pandya, A., et Miller, G. P., "*CYP2E1 active site residues in substrate recognition sequence 5 identified by photoaffinity labeling and homology modeling*", Arch. Biochem. Biophys. **459**, 59–69 (2007).

Connolly, M. L., "*Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids*", Science **221**, 709–13 (1983).

Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., et Estabrook, R. W., "*Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems*", Science **147**, 400–402 (1965).

Correira, M. et Ortiz de Montellano, P. R. "Inhibition of Cytochrome P450 enzymes". In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.), pages 247–322. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3ème édition, (2005).

Cowart, L. A., Wei, S., Hsu, M. H., Johnson, E. F., Krishna, M. U., Falck, J. R., et Capdevila, J. H., "*The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands*", J. Biol. Chem. **277**, 35105–12 (2002).

Cupp-Vickery, J., Anderson, R., et Hatziris, Z., "*Crystal structures of ligand complexes of P450eryF exhibiting homotropic cooperativity*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 3050–5 (2000).

Cupp-Vickery, J. R. et Poulos, T. L., "*Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis*", Nat. Struct. Biol. **2**, 144–53 (1995).

Daiber, A., Herold, S., Schoneich, C., Namgaladze, D., Peterson, J. A., et Ullrich, V., "*Nitration and inactivation of cytochrome P450BM-3 by peroxynitrite. Stopped-flow measurements prove ferryl intermediates*", Eur. J. Biochem. **267**, 6729–39 (2000a).

Daiber, A., Schoneich, C., Schmidt, P., Jung, C., et Ullrich, V., "*Autocatalytic nitration of P450CAM by peroxynitrite*", J. Inorg. Biochem. **81**, 213–20 (2000b).

Daikh, B. E., Lasker, J. M., Raucy, J. L., et Koop, D. R., "*Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **271**, 1427–33 (1994).

Davydov, R., Makris, T. M., Kofman, V., Werst, D. E., Sligar, S. G., et Hoffman, B. M., "*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**, 1403–15 (2001).

Davydov, R., Perera, R., Jin, S., Yang, T. C., Bryson, T. A., Sono, M., Dawson, J. H., et Hoffman, B. M., "*Substrate modulation of the properties and reactivity of the oxy-ferrous and hydroperoxo-ferric intermediates of cytochrome P450cam as shown by cryoreduction-EPR/ENDOR spectroscopy*", J. Am. Chem. Soc. **127**, 1403–13 (2005).

Delaforge, M., Pruvost, A., Perrin, L., et Andre, F., "*Cytochrome P450-mediated oxidation of glucuronide derivatives : example of estradiol-17beta-glucuronide oxidation to 2-hydroxy-estradiol-17beta-glucuronide by CYP 2C8*", Drug Metab. Dispos. **33**, 466–73 (2005).

Delozier, T. C., Kissling, G. E., Coulter, S. J., Dai, D., Foley, J. F., Bradbury, J. A., Murphy, E., Steenbergen, C., Zeldin, D. C., et Goldstein, J. A., "*Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues*", Drug Metab. Dispos. **35**, 682–8 (2007).

Deprez, E., Gerber, N. C., Di Primo, C., Douzou, P., Sligar, S. G., et Hui Bon Hoa, G., "*Electrostatic control of the substrate access channel in cytochrome P-450cam*", Biochemistry **33**, 14464–8 (1994).

Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., et Wahli, W., "*The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control*", Nature **384**, 39–43 (1996).

Dhanasekaran, A., Al-Saghir, R., Lopez, B., Zhu, D., Gutterman, D. D., Jacobs, E. R., et Medhora, M. M., "*Protective Effects of Epoxyeicosatrienoic Acids (EETs) on Human Endothelial Cells from the Pulmonary and Coronary Vasculature*", Am. J. Physiol. **291**, H517–531 (2006).

Ding, X. et Kaminsky, L. S., "*Human extrahepatic cytochromes P450 : function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts*", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **43**, 149–73 (2003).

Dixon, M. et Webb, E. *Enzymes*. Academic Press Inc., New York, 2nde édition, 1964.

Doughty, J. M., Boyle, J. P., et Langton, P. D., "*Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries*", Br. J. Pharmacol. **130**, 1174–82 (2000).

Dreisbach, A. W., Japa, S., Sigel, A., Parenti, M. B., Hess, A. E., Srinouanprachanh, S. L., Rettie, A. E., Kim, H., Farin, F. M., Hamm, L. L., et Lertora, J. J., "*The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and soluble epoxide hydrolase polymorphisms in African Americans with hypertension*", Am. J. Hypertens. **18**, 1276–81 (2005).

Du, L., Hoffman, S. M., et Keeney, D. S., "*Epidermal CYP2 family cytochromes P450*", Toxicol. Appl. Pharmacol. **195**, 278–87 (2004).

Dunn, A. R., Hays, A. M., Goodin, D. B., Stout, C. D., Chiu, R., Winkler, J. R., et Gray, H. B., "*Fluorescent probes for cytochrome P450 structural characterization and inhibitor screening*", J. Am. Chem. Soc. **124**, 10254–5 (2002).

Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., et Weston, A. H., "*K+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries*", Nature **396**, 269–72 (1998).

Ekins, S., Vandenbranden, M., Ring, B. J., Gillespie, J. S., Yang, T. J., Gelboin, H. V., et Wrighton, S. A., "*Further Characterization of the Expression in Liver and Catalytic Activity of CYP2B6*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **286**, 1253–1259 (1998).

Ekroos, M. et Sjogren, T., "*Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 13682–7 (2006).

Elbekai, R. H. et El-Kadi, A. O., "*Cytochrome P450 enzymes : Central players in cardiovascular health and disease*", Pharmacol. Ther. **112**, 564–87 (2006).

Elcombe, C. R., Bridges, J. W., Gray, T. J. B., Nimmo-Smith, R. H., et Netter, K. J., "*Studies on the interaction of safrole with rat hepatic microsomes*", Biochem. Pharmacol. **24**, 1427–1433 (1975).

Enayetallah, A. E., French, R. A., Thibodeau, M. S., et Grant, D. F., "*Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues*", J. Histochem. Cytochem. **52**, 447–54 (2004).

Enayetallah, A. E., French, R. A., et Grant, D. F., "*Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms*", J. Mol. Histol. **37**, 133–41 (2006).

Estabrook, R. W., Cooper, D. Y., et Rosenthal, O., "*The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition of the Steroid C21-Hydroxylase System of the Adrenal Cortex*", Biochem. Z. **338**, 741–55 (1963).

Evans, W. E. et Relling, M. V., "*Pharmacogenomics : translating functional genomics into rational therapeutics*", Science **286**, 487–91 (1999).

Faraci, F. M., Sobey, C. G., Chrissobolis, S., Lund, D. D., Heistad, D. D., et Weintraub, N. L., "*Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels*", Am. J. Physiol. **281**, R246–53 (2001).

Feelisch, M., Kubitzek, D., et Werringloer, J. "The oxyhemoglobin assay". In *Methods in nitric oxide research*, (Feelisch, M. et Stamler, J., Eds.), pages 455–478. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, (1996).

Feletou, M. et Vanhoutte, P. M., "*Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle*", Br. J. Pharmacol. **93**, 515–24 (1988).

Feletou, M. et Vanhoutte, P. M., "*Endothelium-derived hyperpolarizing factor : where are we now ?*", Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **26**, 1215–25 (2006).

Fischer, E., "*Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*", Ber. Dt. Chem. Ges. **27**, 2985–2993 (1894).

Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., et Busse, R., "*Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries*", Nature **401**, 493–7 (1999).

Fisslthaler, B., Hinsch, N., Chataigneau, T., Popp, R., Kiss, L., Busse, R., et Fleming, I., "*Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries*", Hypertension **36**, 270–5 (2000).

Fisslthaler, B., Michaelis, U. R., Randriamboavonjy, V., Busse, R., et Fleming, I., "*Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone : novel role for HMG-CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP 2C expression*", Biochim. Biophys. Acta **1619**, 332–9 (2003).

Fleming, I., "*Cytochrome P450 and vascular homeostasis*", Circ. Res. **89**, 753–62 (2001).

Fleming, I., Fisslthaler, B., Michaelis, U. R., Kiss, L., Popp, R., et Busse, R., "*The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells*", PflÃ$\frac{1}{4}$ger's Arch. Physiol. **442**, 511–8 (2001).

Fleming, I., "*Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s)*", Pharmacol. Res. **49**, 525–533 (2004).

Fontana, E., Dansette, P. M., et Poli, S. M., "*Cytochrome P450 enzymes mechanism based inhibitors : common sub-structures and reactivity*", Curr. Drug. Metab. **6**, 413–54 (2005).

Fujino, T., Park, S. S., West, D., et Gelboin, H. V., "*Phenotyping of Cytochromes P-450 in Human Tissues with Monoclonal Antibodies*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 3682–3686 (1982).

Fulton, D., McGiff, J. C., et Quilley, J., "*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 (1998).

Furchgott, R. F. et Zawadzki, J. V., "*The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*", Nature **288**, 373–6 (1980).

Furukawa, M., Nishimura, M., Ogino, D., Chiba, R., Ikai, I., Ueda, N., Naito, S., Kuribayashi, S., Moustafa, M. A., Uchida, T., Sawada, H., Kamataki, T., Funae, Y., et Fukumoto, M., "*Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver*", Cancer Sci. **95**, 520–9 (2004).

Gaedigk, A., Baker, D. W., Totah, R. A., Gaedigk, R., Pearce, R. E., Vyhlidal, C. A., Zeldin, D. C., et Leeder, J. S., "*Variability of CYP2J2 expression in human fetal tissues*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **319**, 523–32 (2006).

Garfinkel, D., "*Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions*", Arch. Biochem. Biophys. **77**, 493–509 (1958).

Gauthier, K. M., Deeter, C., Krishna, U. M., Reddy, Y. K., Bondlela, M., Falck, J. R., et Campbell, W. B., "*14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid : a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries*", Circ. Res. **90**, 1028–36 (2002).

Gebremedhin, D., Harder, D. R., Pratt, P. F., et Campbell, W. B., "*Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries : role of a cytochrome P450 metabolite*", J. Vasc. Res. **35**, 274–84 (1998).

Gelboin, H. V. et Krausz, K., "*Monoclonal antibodies and multifunctional cytochrome P450 : drug metabolism as paradigm*", J. Clin. Pharmacol. **46**, 353–72 (2006).

Gelboin, H. V., Krausz, K. W., Goldfarb, I., Buters, J. T., Yang, S. K., Gonzalez, F. J., Korzekwa, K. R., et Shou, M., "*Inhibitory and non-inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 3A3/4*", Biochem. Pharmacol. **50**, 1841–50 (1995).

Gelboin, H. V., Goldfarb, I., Krausz, K. W., Grogan, J., Korzekwa, K. R., Gonzalez, F. J., et Shou, M., "*Inhibitory and noninhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 2E1*", Chem. Res. Toxicol. **9**, 1023–30 (1996).

Gelboin, H. V., Shou, M., Goldfarb, I., Yang, T. J., et Krausz, K., "*Monoclonal antibodies to cytochromes P450*", Methods Mol. Biol. **107**, 227–37 (1998).

Gerber, N. C. et Sligar, S. G., "*A role for Asp-251 in cytochrome P-450cam oxygen activation*", J. Biol. Chem. **269**, 4260–6 (1994).

Gergel, D., Misik, V., Riesz, P., et Cederbaum, A. I., "*Inhibition of rat and human cytochrome P4502E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide*", Arch. Biochem. Biophys. **337**, 239–50. (1997).

Gotoh, O., "*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 (1992).

Graham, S. E. et Peterson, J. A., "*How similar are P450s and what can their differences teach us ?*", Arch. Biochem. Biophys. **369**, 24–9 (1999).

Grasso, E., Longo, V., Coceani, F., et Giovanni Gervasi, P., "*Cytochrome P450 expression and catalytic activity in coronary arteries and liver of cattle*", Biochim. Biophys. Acta **1722**, 116–23 (2005).

Griffith, T. M., "*Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization : do gap junctions provide a unifying hypothesis ?*", Br. J. Pharmacol. **141**, 881–903 (2004).

Guengerich, F. P., "*Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*", Chem. Res. Toxicol. **14**, 611–50 (2001).

Guengerich, F. P. "Human Cytochrome P450 Enzymes". In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.), pages 377–530. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3ème édition, (2005).

Guengerich, F. P. et Johnson, W. W., "*Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase : rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems*", Biochemistry **36**, 14741–50 (1997).

Guex, N. et Peitsch, M., "*SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer : An environment for comparative protein modeling*", Electrophoresis **18**, 2714–2723 (1997).

Ha-Duong, N. T., Dijols, S., Macherey, A. C., Goldstein, J. A., Dansette, P. M., et Mansuy, D., "*Ticlopidine as a selective mechanism-based inhibitor of human cytochrome P450 2C19*", Biochemistry **40**, 12112–22 (2001).

Hasemann, C. A., Ravichandran, K. G., Peterson, J. A., et Deisenhofer, J., "*Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 A resolution*", J. Mol. Biol. **236**, 1169–85 (1994).

Hashizume, T., Imaoka, S., Mise, M., Terauchi, Y., Fujii, T., Miyazaki, H., Kamataki, T., et Funae, Y., "*Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **300**, 298–304 (2002).

Hecker, M., Bara, A. T., Bauersachs, J., et Busse, R., "*Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals*", J. Physiol. **481 (Pt 2)**, 407–14 (1994).

Hiroya, K., Murakami, Y., Shimizu, T., Hatano, M., et Ortiz de Montellano, P. R., "*Differential roles of Glu318 and Thr319 in cytochrome P450 1A2 catalysis supported by NADPH-cytochrome P450 reductase and tert-butyl hydroperoxide*", Arch. Biochem. Biophys. **310**, 397–401 (1994).

Hoebel, B. G., Steyrer, E., et Graier, W. F., "*Origin and function of epoxyeicosatrienoic acids in vascular endothelial cells : more than just endothelium-derived hyperpolarizing factor ?*", Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **25**, 826–30 (1998).

Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., et Abola, E. E., "*Errors in protein structures*", Nature **381**, 272 (1996).

Huang, A., Sun, D., Smith, C. J., Connetta, J. A., Shesely, E. G., Koller, A., et Kaley, G., "*In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF*", Am. J. Physiol. **278**, H762–8 (2000).

Huang, A., Sun, D., Carroll, M. A., Jiang, H., Smith, C. J., Connetta, J. A., Falck, J. R., Shesely, E. G., Koller, A., et Kaley, G., "*EDHF mediates flow-induced dilation in skeletal muscle arterioles of female eNOS-KO mice*", Am. J. Physiol. **280**, H2462–9 (2001).

Iba, M. M., Gander, J. E., et Mannering, G. J., "*Lipid peroxidation-cytochrome P450 interactions. Use of linoleic acid hydroperoxide in the characterization of the spin-state of membrane-bound P450*", Xenobiotica **23**, 227–39 (1993).

Ignarro, L. J., "*Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide*", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **30**, 535–60 (1990).

Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., et Byrns, R. E., "*Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate : comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**, 8103–7 (1993).

Ingelman-Sundberg, M., "*Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity*", Toxicology **181-182**, 447–52 (2002).

Ingelman-Sundberg, M., "*The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research*", Toxicol. Appl. Pharmacol. **207**, 52–6 (2005).

Jean, P., Pothier, J., Dansette, P. M., Mansuy, D., et Viari, A., "*Automated multiple analysis of protein structures : application to homology modeling of cytochromes P450*", Proteins **28**, 388–404 (1997).

Jiang, J. G., Chen, C. L., Card, J. W., Yang, S., Chen, J. X., Fu, X. N., Ning, Y. G., Xiao, X., Zeldin, D. C., et Wang, D. W., "*Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors*", Cancer Res. **65**, 4707–15 (2005).

Kaergel, E., Muller, D. N., Honeck, H., Theuer, J., Shagdarsuren, E., Mullally, A., Luft, F. C., et Schunck, W. H., "*P450-dependent arachidonic acid metabolism and angiotensin II-induced renal damage*", Hypertension **40**, 273–9 (2002).

Kaminsky, L. S., Dunbar, D. A., Wang, P. P., Beaune, P., Larrey, D., Guengerich, F. P., Schnellmann, R. G., et Sipes, I. G., "*Human hepatic cytochrome P-450 composition as probed by in vitro microsomal metabolism of warfarin*", Drug Metab. Dispos. **12**, 470–7 (1984).

Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C. C., Suzuki, M., Kawai, J., Suzuki, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Frith, M., Ravasi, T., Pang, K. C., Hallinan, J., Mattick, J., Hume, D. A., Lipovich, L., Batalov, S., Engstrom, P. G., Mizuno, Y., Faghihi, M. A., Sandelin, A., Chalk, A. M., Mottagui-Tabar, S., Liang, Z., Lenhard, B., et Wahlestedt, C., "*Antisense transcription in the mammalian transcriptome*", Science **309**, 1564–6 (2005).

Keller, W., "*On the conversion of benzoic acid into hippuric acid*", Ann. Chem. Pharm. **43**, 108 (1842).

Kikuta, Y., Sogawa, K., Haniu, M., Kinosaki, M., Kusunose, E., Nojima, Y., Yamamoto, S., Ichihara, K., Kusunose, M., et Fujii-Kuriyama, Y., "*A novel species of cytochrome P-450 (P-450ib) specific for the small intestine of rabbits. cDNA cloning and its expression in COS cells*", J. Biol. Chem. **266**, 17821–5 (1991).

King, L. M., Ma, J., Srettabunjong, S., Graves, J., Bradbury, J. A., Li, L., Spiecker, M., Liao, J. K., Mohrenweiser, H., et Zeldin, D. C., "*Cloning of CYP2J2 gene and identification of functional polymorphisms*", Mol. Pharmacol. **61**, 840–52 (2002).

King, L. M., Gainer, J. V., David, G. L., Dai, D., Goldstein, J. A., Brown, N. J., et Zeldin, D. C., "*Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension*", Pharmacogenet. Genomics **15**, 7–13 (2005).

Kitz, R. et Wilson, I. B., "*Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase*", J. Biol. Chem. **237**, 3245–9 (1962).

Kleywegt, G. J. et Jones, T. A., "*Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures*", Acta Cryst. **D50**, 178–85 (1994).

Klingenberg, M., "*Pigments of rat liver microsomes*", Arch. Biochem. Biophys. **75**, 376–86 (1958).

Koike, K., Kusunose, E., Nishikawa, Y., Ichihara, K., Inagaki, S., Takagi, H., Kikuta, Y., et Kusunose, M., "*Purification and characterization of rabbit small intestinal cytochromes P450 belonging to CYP2J and CYP4A subfamilies*", Biochem. Biophys. Res. Commun. **232**, 643–7 (1997).

Kolars, J. C., Awni, W. M., Merion, R. M., et Watkins, P. B., "*First-pass metabolism of cyclosporin by the gut*", Lancet **338**, 1488–90 (1991).

Koshland, D. E., "*Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **44**, 98–104 (1958).

Krausz, K. W., Yang, T. J., Gonzalez, F. J., Shou, M., et Gelboin, H. V., "*Inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 2D6*", Biochem. Pharmacol. **54**, 15–7 (1997).

Krausz, K. W., Goldfarb, I., Buters, J. T., Yang, T. J., Gonzalez, F. J., et Gelboin, H. V., "*Monoclonal antibodies specific and inhibitory to human cytochromes P450 2C8, 2C9, and 2C19*", Drug Metab. Dispos. **29**, 1410–23 (2001).

Lacy, P. S., Pilkington, G., Hanvesakul, R., Fish, H. J., Boyle, J. P., et Thurston, H., "*Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries*", Br. J. Pharmacol. **129**, 605–11 (2000).

Lafite, P., Dijols, S., Buisson, D., Macherey, A. C., Zeldin, D. C., Dansette, P. M., et Mansuy, D., "*Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2*", Bioorg. Med. Chem. Lett. **16**, 2777–80 (2006).

Larsen, B. T., Gutterman, D. D., et Hatoum, O. A., "*Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function*", Eur. J. Clin. Invest. **36**, 293–300 (2006).

Larsen, B. T., Campbell, W. B., et Gutterman, D. D., "*Beyond vasodilatation : non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system*", Trends Pharmacol Sci. **28**, 32–8. (2007).

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., et Thornton, J. M., "*PROCHECK : a program to check the stereochemical quality of protein structures*", J. Appl. Cryst. **26**, 283–291 (1993).

Le Quere, V., Plee-Gautier, E., Potin, P., Madec, S., et Salaun, J. P., "*Human CYP4F3s are the main catalysts in the oxidation of fatty acid epoxides*", J. Lipid. Res. **45**, 1446–58 (2004).

Lee, B. et Richards, F. M., "*The interpretation of protein structures : estimation of static accessibility*", J. Mol. Biol. **55**, 379–400 (1971).

Lee, D. S., Yamada, A., Sugimoto, H., Matsunaga, I., Ogura, H., Ichihara, K., Adachi, S., Park, S. Y., et Shiro, Y., "*Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from Bacillus subtilis. Crystallographic, spectroscopic, and mutational studies*", J. Biol. Chem. **278**, 9761–7 (2003).

Lee, S. S., Jeong, H. E., Liu, K. H., Ryu, J. Y., Moon, T., Yoon, C. N., Oh, S. J., Yun, C. H., et Shin, J. G., "*Identification and functional characterization of novel CYP2J2 variants : G312R variant causes loss of enzyme catalytic activity*", Pharmacogenet. Genomics **15**, 105–13 (2005).

Lewis, D. F., "*The CYP2 family : models, mutants and interactions*", Xenobiotica **28**, 617–61 (1998).

Lewis, D. F., "*Modelling human cytochromes P450 involved in drug metabolism from the CYP2C5 crystallographic template*", J. Inorg. Biochem. **91**, 502–14 (2002).

Leys, D., Mowat, C. G., McLean, K. J., Richmond, A., Chapman, S. K., Walkinshaw, M. D., et Munro, A. W., "*Atomic structure of Mycobacterium tuberculosis CYP121 to 1.06 A reveals novel features of cytochrome P450*", J. Biol. Chem. **278**, 5141–7 (2003).

Li, P. L., Zhang, D. X., Ge, Z. D., et Campbell, W. B., "*Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K(Ca) channels in coronary arterial smooth muscle cells*", Am. J. Physiol. **282**, H1229–36 (2002).

Lin, J., Nishiguchi, K. M., Nakamura, M., Dryja, T. P., Berson, E. L., et Miyake, Y., "*Recessive mutations in the CYP4V2 gene in East Asian and Middle Eastern patients with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy*", J. Med. Genet. **42**, e38 (2005).

Lin, J. H.-C., Kobari, Y., Zhu, Y., Stemerman, M., et Pritchard, K., "*Human umbilical vein endothelial cells express P450 2C8 mRNA : cloning of endothelial P450 epoxygenase*", Endothelium **4**, 219–229 (1996).

Lopez-Garcia, M. P., Dansette, P. M., et Mansuy, D., "*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**, 166–75 (1994).

Lu, T., Hong, M. P., et Lee, H. C., "*Molecular determinants of cardiac K(ATP) channel activation by epoxyeicosatrienoic acids*", J. Biol. Chem. **280**, 19097–104 (2005).

Ludemann, S. K., Lounnas, V., et Wade, R. C., "*How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam ? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways*", J. Mol. Biol. **303**, 813–30 (2000).

Ma, J., Qu, W., Scarborough, P. E., Tomer, K. B., Moomaw, C. R., Maronpot, R., Davis, L. S., Breyer, M. D., et Zeldin, D. C., "*Molecular cloning, enzymatic characterization, developmental expression, and cellular localization of a mouse cytochrome P450 highly expressed in kidney*", J. Biol. Chem. **274**, 17777–88 (1999).

Ma, J., Bradbury, J. A., King, L., Maronpot, R., Davis, L. S., Breyer, M. D., et Zeldin, D. C., "*Molecular cloning and characterization of mouse CYP2J6, an unstable cytochrome P450 isoform*", Biochem. Pharmacol. **64**, 1447–60 (2002).

Makris, T. M., Denisov, I. G., Schlichting, I., et Sligar, S. G. "Activation of molecular oxygen by cytochrome P450". In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.), pages 149–182. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3ème édition, (2005).

Mancy, A., Antignac, M., Minoletti, C., Dijols, S., Mouries, V., Duong, N. T., Battioni, P., Dansette, P. M., et Mansuy, D., "*Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromes P450 active sites : particular efficiency and regioselectivity of P450 2Cs*", Biochemistry **38**, 14264–70 (1999).

Mansuy, D. et Battioni, P. "Diversity of reactions catalyzed by heme-thiolate proteins". In *Biochemistry and binding : activation of small molecules*, (Kadish, K., Smith, K., et Guilard, R., Eds.), volume 4, pages 1–15. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, (2000).

Mansuy, D. et Ullrich, V., "*Proceedings : P-450 carbene-complexes*", Z Klin. Chem. Klin. Biochem. **13**, 376 (1975).

Mansuy, D., Beaune, P., Cresteil, T., Bacot, C., Chottard, J. C., et Gans, P., "*Formation of complexes between microsomal cytochrome P-450-Fe(II) and nitrosoarenes obtained by oxidation of arylhydroxylamines or reduction of nitroarenes in situ*", Eur. J. Biochem. **86**, 573–9 (1978).

Mansuy, D., Battioni, J. P., Chottard, J. C., et Ullrich, V., "*Preparation of a porphyrin-iron-carbene model for the cytochrome P 450 complexes obtained upon metabolic oxidation of the insecticide synergists of the 1,3-benzodioxole series*", J. Am. Chem. Soc. **101**, 3971–3973 (1979).

Mansuy, D., Battioni, P., et Battioni, J. P., "*Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases*", Eur. J. Biochem. **184**, 267–85 (1989).

Marden, N. Y. et Murray, M., "*Characterization of a c-Jun-responsive module in the 5'-flank of the human CYP2J2 gene that regulates transactivation*", Biochem. J. **391**, 631–40 (2005).

Marden, N. Y., Fiala-Beer, E., Xiang, S. H., et Murray, M., "*Role of activator protein-1 in the down-regulation of the human CYP2J2 gene in hypoxia*", Biochem. J. **373**, 669–80 (2003).

Marques-Soares, C. *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*. Thèse de Doctorat, Université Paris XI, 2002.

Marques-Soares, C., Dijols, S., Macherey, A. C., Wester, M. R., Johnson, E. F., Dansette, P. M., et Mansuy, D., "*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**, 6363–9 (2003).

Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., et Takeshita, A., "*Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice*", J. Clin. Invest. **106**, 1521–30 (2000).

Matoba, T., Shimokawa, H., Kubota, H., Morikawa, K., Fujiki, T., Kunihiro, I., Mukai, Y., Hirakawa, Y., et Takeshita, A., "*Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries*", Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 909–13 (2002).

Matoba, T., Shimokawa, H., Morikawa, K., Kubota, H., Kunihiro, I., Urakami-Harasawa, L., Mukai, Y., Hirakawa, Y., Akaike, T., et Takeshita, A., "*Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels*", Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **23**, 1224–30 (2003).

Matsumoto, S., Hirama, T., Kim, H. J., Nagata, K., et Yamazoe, Y., "*In vitro inhibition of human small intestinal and liver microsomal astemizole O-demethylation : different contribution of CYP2J2 in the small intestine and liver*", Xenobiotica **33**, 615–23 (2003).

Melet, A. *Etude par mutagenèse dirigée de la topologie des sites actifs et des spécificités de substrats des cytochromes P450 2C8 et 2C9 humains*. Thèse de Doctorat, Université Paris 5 - René Descartes, 2004.

Melet, A., Assrir, N., Jean, P., Pilar Lopez-Garcia, M., Marques-Soares, C., Jaouen, M., Dansette, P., Sari, M. A., et Mansuy, D., "*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 (2003).

Melo, F. et Feytmans, E., "*Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy*", J. Mol. Biol. **277**, 1141–52 (1998).

Melo, F., Devos, D., Depiereux, E., et Feytmans, E., "*ANOLEA : a www server to assess protein structures*", Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. **5**, 187–90 (1997).

Michaelis, U. R., Fisslthaler, B., Barbosa-Sicard, E., Falck, J. R., Fleming, I., et Busse, R., "*Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis*", J. Cell Sci. **118**, 5489–98 (2005).

Michaud, V., Masse, R., et Turgeon, J., "*CYP2J2 metabolizes domperidone in guinea pig hearts*", Clin. Pharmacol. Ther. **77**, P75 (2005).

Minoletti, C. *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.* Thèse de Doctorat, Université Paris XI, 1998.

Monahan, B. P., Ferguson, C. L., Killeavy, E. S., Lloyd, B. K., Troy, J., et Cantilena, L. R., "*Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use*", JAMA **264**, 2788–90 (1990).

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., et Vane, J. R., "*An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation*", Nature **263**, 663–5. (1976).

Moraes, L. A., Piqueras, L., et Bishop-Bailey, D., "*Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation*", Pharmacol. Ther. **110**, 371–85 (2006).

Moran, J. H., Mitchell, L. A., Bradbury, J. A., Qu, W., Zeldin, D. C., Schnellmann, R. G., et Grant, D. F., "*Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450s*", Toxicol. Appl. Pharmacol. **168**, 268–79 (2000).

Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., et Thornton, J. M., "*Stereochemical quality of protein structure coordinates*", Proteins **12**, 345–64 (1992).

Mueller, E., Loida, P., et Sligar, S. G. "Twentyfive Years of P450cam Research : Mechanistic Insights into Oxygenase Catalysis". In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.), pages 83–124. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2ème édition, (1995).

Mueller, G. C. et Miller, J. A., "*The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver : the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for triphosphopyridine nucleotide*", J. Biol. Chem. **180**, 1125–1136 (1949).

Murphy, P. J., "*Xenobiotic metabolism : a look from the past to the future*", Drug Metab. Dispos. **29**, 779–80 (2001).

Murray, M., Wilkinson, C. F., Marcus, C., et Dube, C. E., "*Structure-activity relationships in the interactions of alkoxymethylenedioxybenzene derivatives with rat hepatic microsomal mixed-function oxidases in vivo*", Mol. Pharmacol. **24**, 129–36 (1983).

Nagano, S., Li, H., Shimizu, H., Nishida, C., Ogura, H., De Montellano, P. R., et Poulos, T. L., "*Crystal Structures of Epothilone D-bound, Epothilone B-bound, and Substrate-free Forms of Cytochrome P450epoK*", J. Biol. Chem. **278**, 44886–93 (2003).

Nagao, T., Illiano, S., et Vanhoutte, P. M., "*Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats*", Am. J. Physiol. **263**, H1090–1094 (1992).

Nebert, D. W. et Russell, D. W., "*Clinical importance of the cytochromes P450*", Lancet **360**, 1155–62 (2002).

Nelson, D. R., "*Cytochrome P450 and the individuality of species*", Arch. Biochem. Biophys. **369**, 1–10 (1999).

Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D. C., et Liao, J. K., "*Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids*", Science **285**, 1276–9 (1999).

Node, K., Ruan, X. L., Dai, J., Yang, S. X., Graham, L., Zeldin, D. C., et Liao, J. K., "*Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids*", J. Biol. Chem. **276**, 15983–9 (2001).

Oku, Y., Ohtaki, A., Kamitori, S., Nakamura, N., Yohda, M., Ohno, H., et Kawarabayasi, Y., "*Structure and direct electrochemistry of cytochrome P450 from the thermoacidophilic crenarchaeon, Sulfolobus tokodaii strain 7*", J. Inorg. Biochem. **98**, 1194–9 (2004).

Omura, T. et Sato, R., "*A new cytochrome in liver microsomes*", J. Biol. Chem. **237**, 1375–6 (1962).

Omura, T. et Sato, R., "*The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties*", J. Biol. Chem. **239**, 2379–85 (1964b).

Omura, T. et Sato, R., "*The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature*", J. Biol. Chem. **239**, 2370–8 (1964a).

Ortiz de Montellano, P. R. *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3ème édition, 2005.

Ortiz de Montellano, P. R. et Mico, B. A., "*Destruction of cytochrome P-450 by ethylene and other olefins*", Mol. Pharmacol. **18**, 128–35 (1980).

Paine, M. F., Shen, D. D., Kunze, K. L., Perkins, J. D., Marsh, C. L., McVicar, J. P., Barr, D. M., Gillies, B. S., et Thummel, K. E., "*First-pass metabolism of midazolam by the human intestine*", Clin. Pharmacol. Ther. **60**, 14–24 (1996).

Paine, M. F., Hart, H. L., Ludington, S. S., Haining, R. L., Rettie, A. E., et Zeldin, D. C., "*The human intestinal cytochrome P450 "pie"*", Drug Metab. Dispos. **34**, 880–6 (2006).

Paine, M., Scrutton, N., Munro, A., Gutierrez, A., Roberts, G., et Wolf, C. R. "Electron transfert partners of cytochromes P450". In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.), pages 115–148. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3ème édition, (2005).

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., et Moncada, S., "*Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*", Nature **327**, 524–6 (1987).

Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., et Williams, D. P., "*The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity*", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **45**, 177–202 (2005).

Park, S. Y., Shimizu, H., Adachi, S., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Obayashi, E., Nakamura, H., Iizuka, T., et Shiro, Y., "*Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus Fusarium oxysporum*", Nat. Struct. Biol. **4**, 827–32 (1997).

Patten, C., Gagne, P., Miller, V., Crespi, C., et Thummel, K., "*Terfenadine hydroxylation by recombinant CYP2J2 and 4F12*", 8th European ISSX Conference **35**, 242 (2003).

Peitsch, M. C., "*ProMod and Swiss-Model : Internet-based tools for automated comparative protein modelling*", Biochem. Soc. Trans. **24**, 274–9. (1996).

Petersson, J., Zygmunt, P. M., et Hogestatt, E. D., "*Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery*", Br. J. Pharmacol. **120**, 1344–50 (1997).

Peyronneau, M. A., Renaud, J. P., Truan, G., Urban, P., Pompon, D., et Mansuy, D., "*Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by coexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b5*", Eur. J. Biochem. **207**, 109–16 (1992).

Pfister, S. L., Spitzbarth, N., Edgemond, W., et Campbell, W. B., "*Vasorelaxation by an endothelium-derived metabolite of arachidonic acid*", Am. J. Physiol. **270**, H1021–30 (1996).

Pfister, S. L., Spitzbarth, N., Nithipatikom, K., Edgemond, W. S., Falck, J. R., et Campbell, W. B., "*Identification of the 11,14,15- and 11,12, 15-trihydroxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived relaxing factors of rabbit aorta*", J. Biol. Chem. **273**, 30879–87 (1998).

Pfister, S. L., Spitzbarth, N., Nithipatikom, K., Falck, J. R., et Campbell, W. B., "*Metabolism of 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid to vasodilatory trioxilin C3 by rabbit aorta*", Biochim. Biophys. Acta **1622**, 6–13 (2003a).

Pfister, S. L., Spitzbarth, N., Zeldin, D. C., Lafite, P., Mansuy, D., et Campbell, W. B., "*Rabbit aorta converts 15-HPETE to trihydroxyeicosatrienoic acids : potential role of cytochrome P450*", Arch. Biochem. Biophys. **420**, 142–52 (2003b).

Pikuleva, I. A., "*Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis*", Pharmacol. Ther. **112**, 761–73 (2006).

Podust, L. M., Poulos, T. L., et Waterman, M. R., "*Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis in complex with azole inhibitors*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**, 3068–73 (2001).

Podust, L. M., Kim, Y., Arase, M., Neely, B. A., Beck, B. J., Bach, H., Sherman, D. H., Lamb, D. C., Kelly, S. L., et Waterman, M. R., "*The 1.92-A structure of Streptomyces coelicolor A3(2) CYP154C1. A new monooxygenase that functionalizes macrolide ring systems*", J. Biol. Chem. **278**, 12214–21 (2003).

Podust, L. M., Bach, H., Kim, Y., Lamb, D. C., Arase, M., Sherman, D. H., Kelly, S. L., et Waterman, M. R., "*Comparison of the 1.85 A structure of CYP154A1 from Streptomyces coelicolor A3(2) with the closely related CYP154C1 and CYPs from antibiotic biosynthetic pathways*", Protein Sci. **13**, 255–68 (2004).

Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., et Urban, P., "*Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments*", Methods Enzymol. **272**, 51–64 (1996).

Popp, R., Bauersachs, J., Hecker, M., Fleming, I., et Busse, R., "*A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells*", J. Physiol. **497**, 699–709 (1996).

Porter, T. D., "*The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions*", J. Biochem. Mol. Toxicol. **16**, 311–6 (2002).

Poulos, T. L. et Johnson, E. F. "Structures of cytochromes P450 enzymes". In *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P. R., Ed.), pages 87–114. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3ème édition, (2005).

Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., et Kraut, J., "*The 2.6-A crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450*", J. Biol. Chem. **260**, 16122–30 (1985).

Poulos, T. L., Finzel, B. C., et Howard, A. J., "*High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam*", J. Mol. Biol. **195**, 687–700 (1987).

Powell, M. J. D., "*An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives*", The Computer Journal **7**, 155–162 (1964).

Pryor, W. A., Cueto, R., Jin, X., Koppenol, W. H., Ngu-Schwemlein, M., Squadrito, G. L., Uppu, P. L., et Uppu, R. M., "*A practical method for preparing peroxynitrite solutions of low ionic strength and free of hydrogen peroxide*", Free Radic. Biol. Med. **18**, 75–83 (1995).

Pylypenko, O., Vitali, F., Zerbe, K., Robinson, J. A., et Schlichting, I., "*Crystal structure of OxyC, a cytochrome P450 implicated in an oxidative C-C coupling reaction during vancomycin biosynthesis*", J. Biol. Chem. **278**, 46727–33 (2003).

Qi, X., Bakht, S., Qin, B., Leggett, M., Hemmings, A., Mellon, F., Eagles, J., Werck-Reichhart, D., Schaller, H., Lesot, A., Melton, R., et Osbourn, A., "*A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family : from essential sterols to plant defense*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 18848–53 (2006).

Qu, W., Bradbury, J. A., Tsao, C. C., Maronpot, R., Harry, G. J., Parker, C. E., Davis, L. S., Breyer, M. D., Waalkes, M. P., Falck, J. R., Chen, J., Rosenberg, R. L., et Zeldin, D. C., "*Cytochrome P450 CYP2J9, a new mouse arachidonic acid omega-1 hydroxylase predominantly expressed in brain*", J. Biol. Chem. **276**, 25467–79 (2001).

Rahman, A., Korzekwa, K. R., Grogan, J., Gonzalez, F. J., et Harris, J. W., "*Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8*", Cancer Res. **54**, 5543–6. (1994).

Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A., et Deisenhofer, J., "*Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's*", Science **261**, 731–6 (1993).

Rendic, S., "*Summary of information on human CYP enzymes : human P450 metabolism data*", Drug Metab. Rev. **34**, 83–448 (2002).

Richter, T., Murdter, T. E., Heinkele, G., Pleiss, J., Tatzel, S., Schwab, M., Eichelbaum, M., et Zanger, U. M., "*Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **308**, 189–97 (2004).

Roberts, E. S., Hopkins, N. E., Alworth, W. L., et Hollenberg, P. F., "*Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 2-ethynylnaphthalene : identification of an active-site peptide*", Chem. Res. Toxicol. **6**, 470–9 (1993).

Roberts, G. A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S. L., et Turner, N. J., "*Identification of a new class of cytochrome P450 from a Rhodococcus sp*", J. Bacteriol. **184**, 3898–908 (2002).

Roman, R. J., "*P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function*", Physiol. Rev. **82**, 131–85 (2002).

Rosolowsky, M. et Campbell, W. B., "*Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells*", Biochim. Biophys. Acta **1299**, 267–77 (1996).

Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Lewis, C. J., Tennant, M. M., Modi, S., Eggleston, D. S., Chenery, R. J., et Bridges, A. M., "*Crystal structure of human cytochrome P450 2D6*", J. Biol. Chem. **281**, 7614–7622 (2005).

Sai, Y., Yang, T. J., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J., et Gelboin, H. V., "*An inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2A6 defines its role in the metabolism of coumarin, 7-ethoxycoumarin and 4-nitroanisole in human liver*", Pharmacogenetics **9**, 229–37 (1999).

Sandow, S. L., "*Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor*", Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **31**, 563–70 (2004).

Sandow, S. L. et Hill, C. E., "*Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses*", Circ. Res. **86**, 341–6 (2000).

Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., et Johnson, E. F., "*Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2*", J. Biol. Chem. **282**, 14348–55 (2007).

Scarborough, P. E., Ma, J., Qu, W., et Zeldin, D. C., "*P450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues*", Drug Metab. Rev. **31**, 205–34 (1999).

Schleinkofer, K., Sudarko, Winn, P. J., Ludemann, S. K., et Wade, R. C., "*Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling ?*", EMBO Rep. **6**, 584–9 (2005).

Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., et Sligar, S. G., "*The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution*", Science **287**, 1615–22 (2000).

Schmiedeberg, O. et Meyer, H., "*On the metabolic product after feeding camphor*", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **3**, 442 (1879).

Schoch, G. A., Yano, J. K., Wester, M. R., Griffin, K. J., Stout, C. D., et Johnson, E. F., "*Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 2C8 : Evidence for a Peripheral Fatty Acid Binding Site*", J. Biol. Chem. **279**, 9497–9503 (2004).

Schultzen, O. et Naunyn, "*The behavior of benzene-derived hydrocarbons in the animal organism.*", duBois-Reymond's Arch. Anat. Physiol. **349** (1867).

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., et Peitsch, M. C., "*SWISS-MODEL : An automated protein homology-modeling server*", Nucleic Acids Res. **31**, 3381–5 (2003).

Scott, E. E. et Halpert, J. R., "*Structures of cytochrome P450 3A4*", Trends Biochem. Sci. **30**, 5–7 (2005).

Scott, E. E., He, Y. A., Wester, M. R., White, M. A., Chin, C. C., Halpert, J. R., Johnson, E. F., et Stout, C. D., "*An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-A resolution*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**, 13196–201 (2003).

Scott, E. E., White, M. A., He, Y. A., Johnson, E. F., Stout, C. D., et Halpert, J. R., "*Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 1.9-A resolution : insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding*", J. Biol. Chem. **279**, 27294–301 (2004).

Scott, W., Hunenberger, P., Tironi, I., Mark, A., Billeter, S., Fennen, J., Torda, A., Huber, T., Kruger, P., et van Gunsteren, W., "*The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package*", J. Phys. Chem. A **103**, 3596–3607 (1999).

Segel, I. *Enzyme kinetics*. Wiley-Interscience, New York, 1993.

Seifert, A., Tatzel, S., Schmid, R. D., et Pleiss, J., "*Multiple molecular dynamics simulations of human P450 monooxygenase CYP2C9 : the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin*", Proteins **64**, 147–55 (2006).

Seubert, J., Yang, B., Bradbury, J. A., Graves, J., Degraff, L. M., Gabel, S., Gooch, R., Foley, J., Newman, J., Mao, L., Rockman, H. A., Hammock, B. D., Murphy, E., et Zeldin, D. C., "*Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K+ channels and p42/p44 MAPK pathway*", Circ. Res. **95**, 506–14 (2004).

Seubert, J. M., Zeldin, D. C., Nithipatikom, K., et Gross, G. J., "*Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury*", Prostaglandins Other Lipid Mediat. **82**, 50–9 (2007).

Shimokawa, H. et Matoba, T., "*Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor*", Pharmacol. Res. **49**, 543–9 (2004).

Shimokawa, H., Yasutake, H., Fujii, K., Owada, M. K., Nakaike, R., Fukumoto, Y., Takayanagi, T., Nagao, T., Egashira, K., Fujishima, M., et Takeshita, A., "*The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation*", J. Cardiovasc. Pharmacol. **28**, 703–11 (1996).

Silverman, R. "Mechanism-based enzyme inactivators Methods in Enzymology". In *Enzyme Kinetics and Mechanism Part D : Developments in Enzyme Dynamics*, (Purich, D. L., Ed.), pages 240–283. Academic Press, (1995).

Sivozhelezov, V. et Nicolini, C., "*Homology modeling of cytochrome P450scc and the mutations for optimal amperometric sensor*", J. Theor. Biol. **234**, 479–485 (2005).

Smith, D. A. et Jones, B. C., "*Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes*", Biochem. Pharmacol. **44**, 2089–98 (1992).

Spector, A. A. et Norris, A. W., "*Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function*", Am. J. Physiol. **292**, C996–1012. (2007).

Spector, A. A., Fang, X., Snyder, G. D., et Weintraub, N. L., "*Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) : metabolism and biochemical function*", Prog. Lip. Res. **43**, 55–90 (2004).

Spiecker, M. et Liao, J. K., "*Vascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids*", Arch. Biochem. Biophys. **433**, 413–20 (2005).

Spiecker, M. et Liao, J. K., "*Cytochrome P450 Epoxygenase CYP2J2 and the Risk of Coronary Artery Disease*", Trends Cardiovasc. Med. **16**, 204–208 (2006).

Spiecker, M., Darius, H., Hankeln, T., Soufi, M., Sattler, A. M., Schaefer, J. R., Node, K., Borgel, J., Mugge, A., Lindpaintner, K., Huesing, A., Maisch, B., Zeldin, D. C., et Liao, J. K., "*Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2*", Circulation **110**, 2132–6 (2004).

Stresser, D. M., Broudy, M. I., Ho, T., Cargill, C. E., Blanchard, A. P., Sharma, R., Dandeneau, A. A., Goodwin, J. J., Turner, S. D., Erve, J. C., Patten, C. J., Dehal, S. S., et Crespi, C. L., "*Highly selective inhibition of human CYP3Aa in vitro by azamulin and evidence that inhibition is irreversible*", Drug Metab. Dispos. **32**, 105–12 (2004).

Sun, J., Sui, X., Bradbury, J. A., Zeldin, D. C., Conte, M. S., et Liao, J. K., "*Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids*", Circ. Res. **90**, 1020–7 (2002).

Taddei, S., Versari, D., Cipriano, A., Ghiadoni, L., Galetta, F., Franzoni, F., Magagna, A., Virdis, A., et Salvetti, A., "*Identification of a Cytochrome P450 2C9-Derived Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Essential Hypertensive Patients*", J. Am. Coll. Cardiol. **48**, 508–515 (2006).

Takaya, N., Suzuki, S., Kuwazaki, S., Shoun, H., Maruo, F., Yamaguchi, M., et Takeo, K., "*Cytochrome P450nor, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus Fusarium oxysporum*", Arch. Biochem. Biophys. **372**, 340–6 (1999).

Thum, T. et Borlak, J., "*Gene expression in distinct regions of the heart*", Lancet **355**, 979–83 (2000).

Tunctan, B., Yaghini, F. A., Estes, A., et Malik, K. U., "*Inhibition by nitric oxide of cytochrome P450 4A activity contributes to endotoxin-induced hypotension in rats*", Nitric Oxide **14**, 51–7 (2006).

Urban, P., Truan, G., Bellamine, A., Laine, R., Gautier, J. C., et Pompon, D., "*Engineered yeasts simulating P450-dependent metabolisms : tricks, myths and reality*", Drug Metabol. Drug Interact. **11**, 169–200 (1994).

Ure, A., "*On gouty concretions ; with a new method of treatment*", Pharm. J. Transac. **1**, 24 (1841).

VanRollins, M., Kaduce, T. L., Fang, X., Knapp, H. R., et Spector, A. A., "*Arachidonic acid diols produced by cytochrome P-450 monooxygenases are incorporated into phospholipids of vascular endothelial cells*", J. Biol. Chem. **271**, 14001–9 (1996).

Vaz, A. D., McGinnity, D. F., et Coon, M. J., "*Epoxidation of olefins by cytochrome P450 : evidence from site-specific mutagenesis for hydroperoxo-iron as an electrophilic oxidant*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 3555–60 (1998).

Vidali, M., Hidestrand, M., Eliasson, E., Mottaran, E., Reale, E., Rolla, R., Occhino, G., Albano, E., et Ingelman-Sundberg, M., "*Use of Molecular Simulation for Mapping Conformational CYP2E1 Epitopes*", J. Biol. Chem. **279**, 50949–50955 (2004).

von Richter, O., Greiner, B., Fromm, M. F., Fraser, R., Omari, T., Barclay, M. L., Dent, J., Somogyi, A. A., et Eichelbaum, M., "*Determination of in vivo absorption, metabolism, and transport of drugs by the human intestinal wall and liver with a novel perfusion technique*", Clin. Pharmacol. Ther. **70**, 217–27 (2001).

Wade, R. C., Winn, P. J., Schlichting, I., et Sudarko, "*A survey of active site access channels in cytochromes P450*", J. Inorg. Biochem. **98**, 1175–82 (2004).

Wade, R. C., Motiejunas, D., Schleinkofer, K., Sudarko, Winn, P. J., Banerjee, A., Kariakin, A., et Jung, C., "*Multiple molecular recognition mechanisms. Cytochrome P450-a case study*", Biochim. Biophys. Acta **1754**, 239–44 (2005).

Waley, S. G., "*Kinetics of suicide substrates*", Biochem. J. **185**, 771–3 (1980).

Walsh, C., "*Suicide substrates : mechanism-based enzyme inactivators*", Tetrahedron **38**, 871–909 (1982).

Walsky, R. L., Obach, R. S., Gaman, E. A., Gleeson, J. P., et Proctor, W. R., "*Selective inhibition of human cytochrome P4502C8 by montelukast*", Drug Metab. Dispos. **33**, 413–8 (2005).

Wang, H., Lin, L., Jiang, J., Wang, Y., Lu, Z. Y., Bradbury, J. A., Lih, F. B., Wang, D. W., et Zeldin, D. C., "*Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase by endothelium-derived hyperpolarizing factor involves mitogen-activated protein kinase and protein kinase C signaling pathways*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **307**, 753–64 (2003).

Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., et Kim, J. J., "*Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase : prototype for FMN- and FAD-containing enzymes*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 8411–6 (1997).

Wang, M. Z., Saulter, J. Y., Usuki, E., Cheung, Y. L., Hall, M., Bridges, A. S., Loewen, G., Parkinson, O. T., Stephens, C. E., Allen, J. L., Zeldin, D. C., Boykin, D. W., Tidwell, R. R., Parkinson, A., Paine, M. F., et Hall, J. E., "*CYP4F Enzymes Are the Major Enzymes in Human Liver Microsomes That Catalyze the O-Demethylation of the Antiparasitic Prodrug DB289*", Drug Metab. Dispos. **34**, 1985–94 (2006).

Wang, Y., Wei, X., Xiao, X., Hui, R., Card, J. W., Carey, M. A., Wang, D. W., et Zeldin, D. C., "*Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways*", J. Pharmacol. Exp. Ther. **314**, 522–32 (2005).

Wang, Y. J., Yu, C. F., Chen, L. C., Chen, C. H., Lin, J. K., Liang, Y. C., Lin, C. H., Lin, S. Y., Chen, C. F., et Ho, Y. S., "*Ketoconazole potentiates terfenadine-induced apoptosis in human Hep G2 cells through inhibition of cytochrome P450 3A4 activity*", J. Cell Biochem. **87**, 147–59 (2002).

Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., et Nilius, B., "*Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels*", Nature **424**, 434–8 (2003).

Webster, K. A., Discher, D. J., et Bishopric, N. H., "*Regulation of fos and jun immediate-early genes by redox or metabolic stress in cardiac myocytes*", Circ. Res. **74**, 679–86 (1994).

Weintraub, N. L., Fang, X., Kaduce, T. L., VanRollins, M., Chatterjee, P., et Spector, A. A., "*Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids*", Circ. Res. **81**, 258–67 (1997).

Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dansette, P. M., Mansuy, D., et Stout, C. D., "*Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 A resolution : evidence for multiple substrate binding modes*", Biochemistry **42**, 6370–9 (2003a).

Wester, M. R., Johnson, E. F., Marques-Soares, C., Dijols, S., Dansette, P. M., Mansuy, D., et Stout, C. D., "*Structure of Mammalian Cytochrome P450 2C5 Complexed with Diclofenac at 2.1 A Resolution : Evidence for an Induced Fit Model of Substrate Binding*", Biochemistry **42**, 9335–9345 (2003b).

Wester, M. R., Yano, J. K., Schoch, G. A., Yang, C., Griffin, K. J., Stout, C. D., et Johnson, E. F., "*The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-A resolution*", J. Biol. Chem. **279**, 35630–7 (2004).

Widmann, M. D., Weintraub, N. L., Fudge, J. L., Brooks, L. A., et Dellsperger, K. C., "*Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo*", Am. J. Physiol. **274**, H283–9 (1998).

Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., et McRee, D. E., "*Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase : structural adaptations for membrane binding and functional diversity*", Mol. Cell. **5**, 121–31 (2000).

Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D., et Jhoti, H., "*Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin*", Nature **424**, 464–8 (2003).

Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vonrhein, C., Tickle, I. J., et Jhoti, H., "*Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone*", Science **305**, 683–6 (2004).

Williams, R. *Detoxication Mechanism*. Chapman and Hall, London, 1ère édition, 1947.

Wink, D. A., Osawa, Y., Darbyshire, J. F., Jones, C. R., Eshenaur, S. C., et Nims, R. W., "*Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent*", Arch. Biochem. Biophys. **300**, 115–23 (1993).

Winn, P. J., Ludemann, S. K., Gauges, R., Lounnas, V., et Wade, R. C., "*Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine*", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**, 5361–6 (2002).

Wu, S., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Falck, J. R., et Zeldin, D. C., "*Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart*", J. Biol. Chem. **271**, 3460–8 (1996).

Wu, S., Chen, W., Murphy, E., Gabel, S., Tomer, K. B., Foley, J., Steenbergen, C., Falck, J. R., Moomaw, C. R., et Zeldin, D. C., "*Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes*", J. Biol. Chem. **272**, 12551–9 (1997).

Xiao, Y. F., Ke, Q., Seubert, J. M., Bradbury, J. A., Graves, J., Degraff, L. M., Falck, J. R., Krausz, K., Gelboin, H. V., Morgan, J. P., et Zeldin, D. C., "*Enhancement of cardiac L-type Ca2+ currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of CYP2J2*", Mol. Pharmacol. **66**, 1607–16 (2004).

Yaghi, A., Bend, J. R., Webb, C. D., Zeldin, D. C., Weicker, S., Mehta, S., et McCormack, D. G., "*Excess nitric oxide decreases cytochrome P-450 2J4 content and P-450-dependent arachidonic acid metabolism in lungs of rats with acute pneumonia*", Am. J. Physiol. **286**, L1260–7 (2004).

Yang, B., Graham, L., Dikalov, S., Mason, R. P., Falck, J. R., Liao, J. K., et Zeldin, D. C., "*Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells*", Mol. Pharmacol. **60**, 310–20 (2001).

Yang, S., Lin, L., Chen, J. X., Lee, C. R., Seubert, J. M., Wang, Y., Wang, H., Chao, Z. R., Tao, D. D., Gong, J. P., Lu, Z. Y., Wang, D. W., et Zeldin, D. C., "*Cytochrome P450 Epoxygenases Protect Endothelial Cells from Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor-alpha via MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways*", Am. J. Physiol. **23**, 23 (2007).

Yang, T. J., Krausz, K. W., Shou, M., Yang, S. K., Buters, J. T., Gonzalez, F. J., et Gelboin, H. V., "*Inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2B6*", Biochem. Pharmacol. **55**, 1633–40 (1998).

Yang, T. J., Krausz, K. W., Sai, Y., Gonzalez, F. J., et Gelboin, H. V., "*Eight inhibitory monoclonal antibodies define the role of individual P-450s in human liver microsomal diazepam, 7-ethoxycoumarin, and imipramine metabolism*", Drug Metab. Dispos. **27**, 102–9 (1999).

Yano, J. K., Koo, L. S., Schuller, D. J., Li, H., Ortiz de Montellano, P. R., et Poulos, T. L., "*Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon Sulfolobus solfataricus*", J. Biol. Chem. **275**, 31086–92 (2000).

Yano, J. K., Blasco, F., Li, H., Schmid, R. D., Henne, A., et Poulos, T. L., "*Preliminary characterization and crystal structure of a thermostable cytochrome P450 from Thermus thermophilus*", J. Biol. Chem. **278**, 608–16 (2003).

Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., et Johnson, E. F., "*The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution*", J. Biol. Chem. **279**, 38091–4 (2004).

Yano, J. K., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Stout, C. D., et Johnson, E. F., "*Structures of human microsomal cytochrome P450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen*", Nat. Struct. Mol. Biol. **12**, 822–3 (2005).

Yano, J. K., Denton, T. T., Cerny, M. A., Zhang, X., Johnson, E. F., et Cashman, J. R., "*Synthetic inhibitors of cytochrome P-450 2A6 : inhibitory activity, difference spectra, mechanism of inhibition, and protein cocrystallization*", J. Med. Chem. **49**, 6987–7001. (2006).

Yao, K., Falick, A. M., Patel, N., et Correia, M. A., "*Cumene hydroperoxide-mediated inactivation of cytochrome P450 2B1. Identification of an active site heme-modified peptide*", J. Biol. Chem. **268**, 59–65 (1993).

Yu, C. et Gunsalus, I. C., "*Crystalline cytochrome P-450cam*", Biochem. Biophys. Res. Commun. **40**, 1431–6 (1970).

Yu, Z., Huse, L. M., Adler, P., Graham, L., Ma, J., Zeldin, D. C., et Kroetz, D. L., "*Increased CYP2J expression and epoxyeicosatrienoic acid formation in spontaneously hypertensive rat kidney*", Mol. Pharmacol. **57**, 1011–20 (2000).

Yun, C. H., Okerholm, R. A., et Guengerich, F. P., "*Oxidation of the antihistaminic drug terfenadine in human liver microsomes. Role of cytochrome P-450 3A(4) in N-dealkylation and C-hydroxylation*", Drug Metab. Dispos. **21**, 403–9 (1993).

Zeldin, D. C., "*Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism*", J. Biol. Chem. **276**, 36059–62 (2001).

Zeldin, D. C., DuBois, R. N., Falck, J. R., et Capdevila, J. H., "*Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform*", Arch. Biochem. Biophys. **322**, 76–86 (1995).

Zeldin, D. C., Foley, J., Ma, J., Boyle, J. E., Pascual, J. M., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Steenbergen, C., et Wu, S., "*CYP2J subfamily P450s in the lung : expression, localization, and potential functional significance*", Mol. Pharmacol. **50**, 1111–7 (1996).

Zeldin, D. C., Foley, J., Boyle, J. E., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Parker, C., Steenbergen, C., et Wu, S., "*Predominant expression of an arachidonate epoxygenase in islets of Langerhans cells in human and rat pancreas*", Endocrinology **138**, 1338–46 (1997a).

Zeldin, D. C., Foley, J., Goldsworthy, S. M., Cook, M. E., Boyle, J. E., Ma, J., Moomaw, C. R., Tomer, K. B., Steenbergen, C., et Wu, S., "*CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract : expression, localization, and potential functional significance*", Mol. Pharmacol. **51**, 931–43 (1997b).

Zerbe, K., Pylypenko, O., Vitali, F., Zhang, W., Rouset, S., Heck, M., Vrijbloed, J. W., Bischoff, D., Bister, B., Sussmuth, R. D., Pelzer, S., Wohlleben, W., Robinson, J. A., et Schlichting, I., "*Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis*", J. Biol. Chem. **277**, 47476–85 (2002).

Zhang, Q. Y., Ding, X., et Kaminsky, L. S., "*CDNA cloning, heterologous expression, and characterization of rat intestinal CYP2J4*", Arch. Biochem. Biophys. **340**, 270–8 (1997).

Zhao, B., Guengerich, F. P., Bellamine, A., Lamb, D. C., Izumikawa, M., Lei, L., Podust, L. M., Sundaramoorthy, M., Kalaitzis, J. A., Reddy, L. M., Kelly, S. L., Moore, B. S., Stec, D., Voehler, M., Falck, J. R., Shimada, T., et Waterman, M. R., "*Binding of two flaviolin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of Streptomyces coelicolor A3(2) cytochrome P450 158A2*", J. Biol. Chem. **280**, 11599–607 (2005a).

Zhao, Q., Modi, S., Smith, G., Paine, M., McDonagh, P. D., Wolf, C. R., Tew, D., Lian, L. Y., Roberts, G. C., et Driessen, H. P., "*Crystal structure of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 A resolution*", Protein Sci. **8**, 298–306 (1999).

Zhao, X., Pollock, D. M., Zeldin, D. C., et Imig, J. D., "*Salt-sensitive hypertension after exposure to angiotensin is associated with inability to upregulate renal epoxygenases*", Hypertension **42**, 775–80 (2003).

Zhao, Y. et Halpert, J. R., "*Structure-function analysis of cytochromes P450 2B*", Biochim. Biophys. Acta **1770**, 402–12 (2006a).

Zhao, Y., White, M. A., Muralidhara, B. K., Sun, L., Halpert, J. R., et Stout, C. D., "*Structure of microsomal cytochrome P450 2B4 complexed with the antifungal drug bifonazole : insight into P450 conformational plasticity and membrane interaction*", J. Biol. Chem. **281**, 5973–81 (2006b).

Zou, M. H. et Ullrich, V., "*Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase*", FEBS Lett. **382**, 101–4 (1996).

Zygmunt, P. M. et Hogestatt, E. D., "*Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery*", Br. J. Pharmacol. **117**, 1600–6 (1996).

Résumé :

Ce manuscrit présente une étude fonctionnelle et structurale du cytochrome P450 2J2 humain (CYP2J2), enzyme exprimée dans les tissus cardiovasculaires, dont les rôles biologiques sont mal connus. En utilisant la terfénadone comme base structurale, qui est un composé oxydé régiosélectivement par le CYP2J2, plusieurs composés ont été synthétisés se sont révélés être des inhibiteurs affins et sélectifs du CYP2J2. En particulier, un inhibiteur très affin et compétitif (Ki = 160 nM) et deux substrats suicides efficaces du CYP2J2 (kinact/Ki ~ 3000 L/mol/s) ont été mis en évidence. L'étude de l'oxydation de ces composés par le CYP2J2 a révélé une régiosélectivité surprenante, en faveur d'une position chimiquement moins réactive vis-à-vis des oxydations. La caractérisation du site actif du CYP2J2 et l'identification de résidus importants pour la reconnaissance des dérivés de terfénadone a pu être réalisée en construisant un modèle par homologie 3D de cette enzyme et par le docking de certains dérivés dans le site actif du CYP2J2. Enfin, une étude préliminaire des rôles biologiques possibles du CYP2J2 a été réalisée en étudiant les effets inhibiteurs de ce P450. En conclusion, ce travail a permis de caractériser les premiers outils biochimiques d'étude des rôles biologiques du CYP2J2, de proposer une première topologie du site actif du CYP2J2, et d'affiner les rôles biologiques du CYP2J2.

Mots clés : Hémoprotéines, monooxygénases, terfénadine, ébastine, docking sous contraintes douces, époxydation de l'acide arachidonique.

Abstract :

This manuscript deals with the functional and structural study of human cytochrome P450 2J2 (CYP2J2), an enzyme mainly expressed in cardiovascular tissues, whose biological roles are not well-known. We used terfenadone, regioselectively oxydized by CYP2J2, as a starting point for design and synthesis of several compounds, which revealed to be affine and selective inhibitors of this P450. In particular, one affine and selective inhibitor (Ki = 160 nM) and two efficient mechanism-based inactivators (kinact/Ki ~ 3000 L/mol/s) of CYP2J2 were identified. The study of the CYP2J2-catalyzed oxidation of some of these compounds revealed a surprising regioselectivity, favoring a less reactive position, regarding the reactivity towards oxidation. The characterization of the active site and the identification of important residues for terfenadone derivatives recognition by CYP2J2 was achieved using an homology 3D model of this enzyme, and docking of several substrates in the active site. Finally, a preliminary study of the potential biological roles of CYP2J2 was performed by looking at the inhibitory effect of several compounds involved in the vascular relaxation pathways. In conclusion, this work provides the characterization of the first biochemical tools to study the biological roles of CYP2J2, the first description of the active site topology and a study on CYP2J2 biological roles.

Keywords : Hemeproteins, monooxygenases, terfenadine, ebastine, soft-restrained dynamic docking, arachidonic acid epoxidation.