

OLIVIER LAROUCHE

**CLONAGE ET CARACTÉRISATION DES  
URIDINE  
DIPHOSPHO-GLUCURONOSYLTRANSFERASES  
(UGT) EFFECTUANT LA GLUCURONIDATION  
DES HORMONES STÉROÏDIENNES CHEZ LA  
SOURIS.**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Physiologie-endocrinologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

Quand le sage pointe la lune, l'idiot regarde le doigt.

## Résumé

La sous-famille Uridine diphosphoglucuronosyltransférases 2B (UGT2B) par son activité enzymatique de glucuronoconjugaison participe à l'élimination des stéroïdes. Les études *in vitro* faites sur les différentes UGT2B humains, notamment UGT2B15, et le génotypage de cette dernière sur différentes populations humaines ont permis de démontrer que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans le cancer de la prostate. Représentant une cible thérapeutique potentielle, une compréhension plus exacte de son rôle physiologique ainsi que des études *in vivo* s'imposent. Actuellement aucun modèle animal n'existe pour faire l'étude *in vivo* de UGT2B15. La souris, grâce au génie génétique, représente la meilleure avenue. Jusqu'à maintenant, aucune caractérisation enzymatique du métabolisme des hormones androgènes à partir des Ugt2b murin n'a été faite. Les présents travaux exposent la caractérisation enzymatique de cinq enzymes Ugt2b murins et tentent d'établir un parallèle entre elles et l'enzyme humain UGT2B15, notamment entre leurs expressions tissulaires et leurs activités de conjugaisons des hormones androgènes. La perspective globale de ces travaux est de déterminer un orthologue sur lequel sera basé la création de souris déficientes.

## Avant-propos

Le premier chapitre de ce présent mémoire est une introduction générale englobant tous les aspects de mon projet de maîtrise et précède le deuxième chapitre qui lui expose les hypothèses et les objectifs de l'étude. Le troisième chapitre correspond à un manuscrit scientifique rédigé en anglais qui fera l'objet d'une publication durant l'année 2009 dans « *Journal of Endocrinology* », il est divisé en plusieurs sections selon l'ordre suivant : résumé, introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion, bibliographie, remerciements, légendes des figures, tableaux et figures. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont issus du clonage et de la caractérisation enzymatique de sept Ugt2b de souris. J'ai effectué la très grande majorité des manipulations qui ont mené aux résultats de cinq des sept Ugt2b c'est-à-dire, Ugt2b1, Ugt2b5, Ugt2b34, Ugt2b35 et Ugt2b36. Les manipulations sur HPLC-MS/MS ont été effectuées par Patrick Caron, j'ai cependant effectué l'analyse des résultats provenant de ces manipulations pour les cinq Ugt2b mentionnés ci-haut. Les résultats provenant des travaux exécutés sur les Ugt2b37 et Ugt2b38 sont l'œuvre de Laurent Grosse c'est pourquoi nous partageons la place de premier auteur. À la suite du manuscrit, on retrouve un quatrième chapitre constitué d'une discussion et conclusion générale qui résume et discute de l'ensemble des résultats obtenus pour les cinq Ugt2b qui ont été la source de mes travaux. Enfin, une liste des références de l'introduction générale et de la discussion termine ce mémoire.

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma mère, Hélène, qui m'a toujours épaulé durant mon parcours universitaire surtout dans mes moments sombres de doutes et de remises en questions, sincèrement, merci.

À Jérémie, Patrick, Christian, Olivier et Raphaël merci pour votre amitié vraie et loyale.

Je tiens à remercier mon directeur de projet, le Dr. Alain Bélanger, pour m'avoir supporté moralement et financièrement durant mon projet de maîtrise. Je le remercie aussi d'avoir cru en moi et de m'avoir offert l'incroyable chance de travailler dans un univers scientifique d'excellence, ce qui m'a permis d'en apprendre beaucoup sur la vie et surtout, sur moi-même. Mon projet de maîtrise n'aurait pas été une réussite sans l'aide de mon co-directeur, le Dr. Olivier Barbier, que je tiens à remercier pour ses précieux et généreux conseils scientifiques et humains, pour sa très grande disponibilité et son humour parfois insaisissable mais rempli d'affection. Aussi, je tiens à vous remercier tout les deux, car chacun à votre manière, vous m'avez permis d'augmenter mon affirmation personnelle et ma confiance, merci.

Je veux aussi souligner la très grande contribution de Sarah Chouinard, étudiante au doctorat sous la supervision du Dr. Alain Bélanger, de Jenny Keading et de Jocelyn Trottier, étudiants au doctorat sous la supervision du Dr. Olivier Barbier, pour leur grande patience et gentillesse face à mes questions et aussi pour leurs judicieux conseils. Je tiens à remercier Kim Journeault, professionnelle de recherche auprès du Dr. Alain Bélanger, qui à cause de nos différends, m'a fait grandir.

En terminant, je tiens à remercier le Dr. Chantale Guillemette ainsi que son équipe, particulièrement pour leur collaboration à mon projet de maîtrise. Je tiens aussi à remercier le Dr. Fernand Labrie, directeur du centre de recherche en Endocrinologie moléculaire et oncologique de l'Université Laval, sans qui, je n'aurais pu vivre mon aventure dans le monde de la recherche biomédicale.

## Table des matières

	Page
Résumé.....	III
Avant-propos.....	IV
Remerciements.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures.....	VIII
CHAPITRE I : Introduction.....	1
1.1 Les hormones stéroïdiennes.....	2
1.1.1 Synthèse des hormones stéroïdiennes.....	2
1.1.2 Synthèse et fonctions des hormones stéroïdiennes au niveau du cortex surrénalien.....	4
1.1.2.1 Synthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes.....	5
1.1.2.2 Synthèse des stéroïdes-C19.....	6
1.1.3 Synthèse et fonctions des hormones stéroïdiennes au niveau des ovaires.....	6
1.1.4 Synthèse et fonctions des hormones stéroïdiennes au niveau des testicules.....	7
1.2 La prostate humaine.....	8
1.2.1 La prostate humaine et les stéroïdes.....	9
1.2.2 Le cancer de la prostate.....	10
1.2.2.1 Traitements contre le cancer de la prostate.....	12
1.3 Les Uridine 5'-diphosphate-Glucuronosyltransférases (UGT).....	14
1.3.1 Rôle des UGT et importance de la glucuronidation.....	14
1.3.2 La réaction de glucuronidation.....	15
1.3.3 La structure des UGT.....	17
1.3.4 Nomenclature et spécificité de substrats des UGT.....	18
1.3.4.1 UGT1A.....	20
1.3.4.2 UGT2.....	23
1.3.5 Distribution tissulaire.....	24
1.3.6 UGT2B15 et UGT2B17.....	26
1.3.6.1 UGT2B15, UGT2B17 et la prostate humaine.....	27
1.3.7 UGT2B15 et le cancer de la prostate.....	29
1.4 La souris un excellent modèle animal.....	30
1.4.1 La famille des UGT2 murin.....	30
1.4.1.1 Distribution tissulaire des UGT2 chez la souris.....	31
1.4.2 Androgènes chez la souris.....	32
1.4.3 Cancer de la prostate et souris génétiquement modifiées.....	32
CHAPITRE II : Hypothèse et objectifs du projet.....	34
2.1 Hypothèse et objectifs du projet.....	35
CHAPITRE III : Résultats.....	37
3.1 ANDROGEN GLUCURONIDATION IN MICE: WHEN, WHERE AND HOW.....	39
CHAPITRE IV : Discussion et Conclusion.....	75
Références.....	82

## Liste des figures et tableaux

	Page
<b>Figure 1</b> : Voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes humaines.....	3
<b>Figure 2</b> : Schéma de l'appareil génital masculin.....	9
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'effet du blocage androgénique combiné avec un agoniste de la LH-RH et un antiandrogène pur (flutamide) sur la croissance du cancer prostatique.....	13
<b>Figure 4</b> : Principaux enzymes impliqués dans les phases I et II de la détoxification des composés endogènes et exogènes chez l'humain.....	14
<b>Figure 5</b> : Réaction de glucuronidation catalysée par les UGT.....	16
<b>Figure 6</b> : Localisation et structure protéique schématique des UGT dans le réticulum endoplasmique.....	18
<b>Figure 7</b> : Classification des UGT humaines.....	20
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de l'épissage alternatif du gène UGT1 comprenant le nouvel exon 5b.....	22
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique de la famille UGT2 humaine.....	23
<b>Figure 10</b> : Schéma de stéréospécificité de conjugaison des UGT2B15 et UGT2B17 pour les androgènes 3 $\alpha$ -DIOL, ADT et DHT.....	27
<b>Figure 11</b> : Métabolisme et glucuronidation des androgènes dans la prostate humaine.....	28
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique de la famille Ugt2 murine.....	30
<b>Figure 13</b> : Distribution tissulaire dans différents tissus de souris mâle et femelle des enzymes UGT2B murins.....	31
<b>Tableau 1</b> : Expression des UGT1A, des UGT2A et des UGT2B dans les tissus humains.....	24



# **CHAPITRE I**

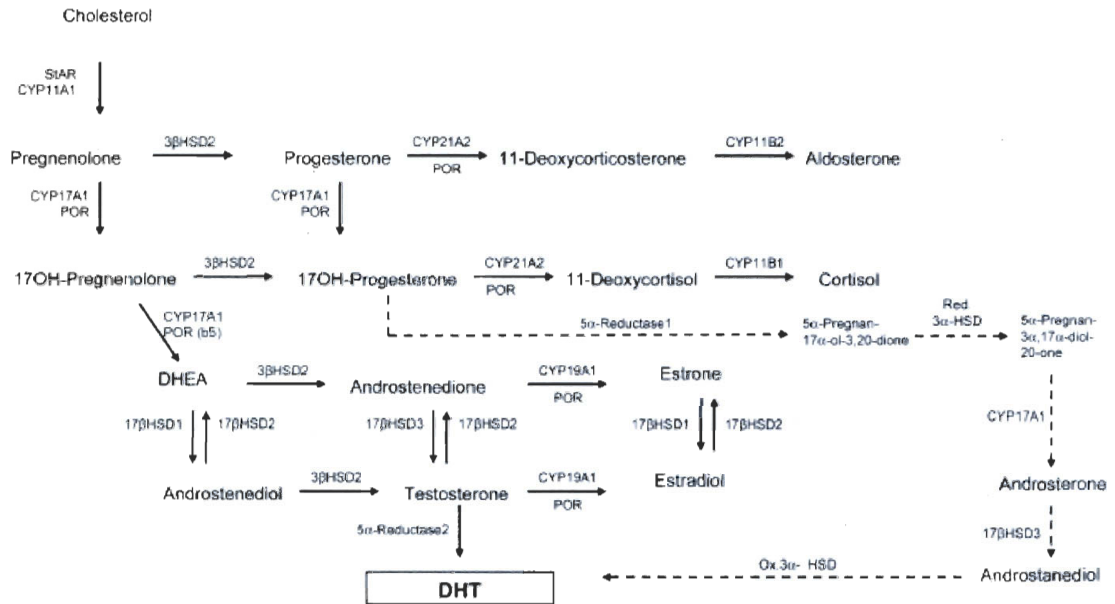
## **Introduction**

## **1.1 Les hormones stéroïdiennes**

Les hormones stéroïdiennes sont très diversifiées, elles jouent un rôle majeur dans l'exécution des programmes de développement et des programmes cycliques variés (comme, par exemple, la différenciation sexuelle, la maturation, le cycle menstruel et la grossesse) et dans l'homéostasie du glucose et de certains électrolytes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ).

### **1.1.1 Synthèse des hormones stéroïdiennes**

Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol (figure 1) [1]. Chez l'humain certains tissus sont reconnus pour leur capacité de biosynthèse de ces hormones, notamment, le cortex surrénalien et les gonades (testicules et ovaires) [1]. Ces tissus sont les sites majeurs de la biosynthèse des principales hormones stéroïdiennes, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les progestatifs, les androgènes et les estrogènes (figure 1) [1]. La biosynthèse complexe de ces hormones est rendue possible grâce à des enzymes aussi diverses que spécifiques, les cytochromes P450 (CYPs), les hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSDs) et les stéroïdes réductases (figure 1) [2]. La figure 1 est un schéma simplifié exposant la biosynthèse des hormones stéroïdiennes humaines et les enzymes associées à leur production.



**Figure 1 : Voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes humaines.**

Le sentier métabolique des hormones stéroïdiennes commence par la conversion du cholestérol en pregnénolone. En fonction de la localisation cellulaire et des différentes enzymes présentes, la finalité de la biosynthèse diffère d'un tissu à l'autre. L'aldostérone (minéralocorticoïde), le cortisol (glucocorticoïde) et le DHEA (stéroïde-C19) sont respectivement produits par la zone glomérulée, fasciculée et réticulée du cortex surrénalien. Alors que la testostérone (androgène), la progestérone et l'estradiol (estrogène) sont produits par les gonades [3].

La stimulation de la stéroïdogénèse *de novo* s'exécute dans le cortex surrénalien et les gonades sous l'action respective de l'hormone corticotrope (ACTH) et de l'hormone lutéinisante (LH) [4]. Ces hormones par l'intermédiaire de l'AMPc vont augmenter le transport du cholestérol situé sur la membrane externe mitochondriale, vers la membrane interne mitochondriale [3]. Ce déplacement du cholestérol est assuré par la protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein) et constitue l'étape de régulation limitante dans la stimulation aigue de la stéroïdogénèse [4]. Le cholestérol situé dans la membrane interne devient alors disponible pour sa conversion en pregnénolone par la P450sc (cholesterol side chain cleavage) appelée aussi CYP11A (figure 1) [5]. Cette étape réalisée par CYP11A est divisée en trois phases : 22(R)-

hydroxylation, 20(R)-hydroxylation et, finalement, une coupure oxydative de la chaîne latérale au niveau des carbones 20 et 22 ; chacune de ces phases nécessite une molécule de nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (NADPH) [4].

Seulement certaines cellules humaines peuvent produire de la pregnénolone : les cellules trophoblastes du placenta, certaines cellules neuronales du cerveau, les cellules de Leydig des testicules, les cellules de la thèque et du corps lutéal des ovaires et les cellules du cortex surrénalien [3]. Les cellules des testicules, des ovaires et du cortex surrénalien sont les principales cellules productrices de pregnénolone [3]. Par la suite, la pregnénolone, est convertie en progestérone par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes déshydrogénases (3 $\beta$ -HSD) (figure 1) [1]. Il existe deux isoenzymes de la 3 $\beta$ -HSD, lesquelles sont régulées de manière tissu spécifiques. On retrouve la 3 $\beta$ -HSD de type 1 dans le placenta et dans des tissus non stéroïdogéniques comme le foie, le rein et la peau, alors que le type 2 se retrouve exprimé de manière pratiquement exclusive dans les tissus stéroïdogéniques comme les gonades et le cortex surrénalien [1]. La pregnénolone et la progestérone sont les précurseurs de toutes les autres hormones stéroïdiennes (figure 1) [1]. Elles sont métabolisées en différentes hormones stéroïdiennes intermédiaires, notamment le dehydroepiandrosterone et son sulfate (DHEA[S]). Le résultat de ce métabolisme est tissu spécifique et dépend des enzymes de la stéroïdogénèse présentes dans les cellules où les précurseurs se trouvent [3].

### **1.1.2 Synthèse et fonctions des hormones stéroïdiennes au niveau du cortex surrénalien**

Le cortex surrénalien est le tissu stéroïdogénique le plus important chez l'humain. À l'inverse des gonades, le cortex surrénalien est indispensable à la survie [1]. Le cortex surrénalien se divise en trois zones : glomérulée, fasciculée et réticulée [3]. Chacune de ces zones est respectivement responsable de la biosynthèse spécifique d'un groupe d'hormones stéroïdiennes, les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les stéroïdes-C19 (figure 1). Les représentants respectifs de ces familles d'hormones sont

l'aldostérone, le cortisol et le DHEA[S] (figure 1) [3]. La production de glucocorticoïdes et de stéroïdes-C19 est principalement sous le contrôle de l'ACTH via le sentier métabolique AMPc/protéine kinase A (PKA) [6], alors que celle des minéralocorticoïdes est davantage sous l'influence de l'angiotensine II et du potassium [7] via la voie du triphosphate-inositol-diacylglycérol/protéine kinase C (PKC) [6]. Les minéralocorticoïdes sont essentiels pour la survie puisqu'ils régulent de façon étroite l'homéostasie des ions Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dans l'organisme. Les glucocorticoïdes sont pour leur part importants dans l'homéostasie du glucose et dans la réponse de l'organisme au stress, de plus ils sont importants dans le développement pulmonaire du fœtus et dans la modulation du système immunitaire [1]. Quant à eux, les stéroïdes-C19, sont utilisés comme précurseurs des androgènes et des estrogènes dans les tissus périphériques [3].

#### **1.1.2.1 Synthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes**

On retrouve dans la biosynthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes l'enzyme stéroïde 21-hydroxylase (CYP21) (figure 1), unique au cortex surrénalien, elle est exprimée dans le réticulum endoplasmique des deux zones du cortex [1]. Elle est responsable de la conversion de la progestérone en 11-déoxycorticostérone (sentier métabolique des minéralocorticoïdes), et de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone en 11-déoxycortisol (sentier métabolique des glucocorticoïdes) (figure 1) [8]. Par la suite, la 11-déoxycorticostérone est convertie en aldostérone, l'hormone biologiquement active des minéralocorticoïdes, par l'enzyme aldostérone synthase (CYP11B2) ; alors que la 11-déoxycortisol est convertie en cortisol, l'hormone biologiquement active des glucocorticoïdes, par l'enzyme stéroïde 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) (figure 1) [1]. CYP11B1 et B2 sont des enzymes mitochondriales exclusives au cortex surrénalien[1]. CYP11B1 est exprimée au niveau de la zone réticulée et fasciculée du cortex [9] et possède strictement une activité 11 $\beta$ -hydroxylase [1], alors que CYP11B2 est exprimée seulement au niveau de la zone glomérulée [10] et possède une activité 11 $\beta$ -hydroxylase et 18-hydroxylase/aldostérone synthétase [1].

### 1.1.2.2 Synthèse des stéroïdes-C19

Les stéroïdes-C19 sont formés par l'enzyme CYP17 (figure 1) [1]. Exprimée dans le réticulum endoplasmique, CYP17 possède une activité, 17 $\alpha$ -hydroxylase et 17,20-lyase [1]. CYP17 est aussi retrouvée dans les ovaires et les testicules mais est absente du placenta humain [11]. CYP17 par son activité 17 $\alpha$ -hydroxylase produit deux 17 $\alpha$ -hydroxystéroïdes en hydroxylant la pregnénolone et/ou la progestérone (figure 1), ce processus a lieu dans les zones fasciculée et réticulée mais pas dans la zone glomérulée [12]. Par la suite, CYP17 à l'aide de son activité 17,20-lyase, exclusive à la zone réticulée, convertit les deux 17 $\alpha$ -hydroxystéroïdes en DHEA (si ceux-ci proviennent de l'hydroxylation de la pregnénolone) ou en androstenedione (si ceux-ci proviennent de l'hydroxylation de la progestérone) (figure 1) [1]. La conversion par CYP17 de la pregnénolone en DHEA est une étape importante dans la biosynthèse des stéroïdes. Le dérivé sulfaté du DHEA, le DHEA[S] peut être convertit en différents androgènes et/ou estrogènes dans les tissus périphériques (figure 1) [3]. Par exemple, cette voie métabolique de la biosynthèse de la testostérone est la source majeure de testostérone chez la femme [3].

### 1.1.3 Synthèse et fonctions des hormones stéroïdiennes au niveau des ovaires

Le rôle principal des ovaires est la production d'ovules fertiles et d'hormones stéroïdiennes afin d'assurer les fonctions reproductrices [1], notamment en préparant l'endomètre de l'utérus à l'implantation et au maintien de l'ovule en cas de fécondation [13]. La stéroïdogénèse dans le tissu ovarien a principalement lieu dans une couche de cellules externe entourant le follicule, les cellules de la thèque [1, 14]. Les cellules de la thèque vont produire une grande quantité de progestérone et d'androgènes qui serviront de précurseur pour la synthèse d'estrogène au niveau des cellules granulosas [1, 14]. En effet, la testostérone et l'androstenedione produit par les cellules de la thèque vont diffuser dans les cellules granulosas où ils seront principalement convertis en estradiol grâce à l'action de l'aromatase et de la 17 $\beta$ -HSD de types 1 et 7, lesquelles

favorisent la conversion de l'estrone en estradiol (figure 1) [15]. Dans la phase folliculaire préovulatoire, phase de maturation des follicules, la synthèse d'estrogène augmente graduellement suite à l'augmentation de la régulation de l'aromatase par la LH et la FSH. Durant cette phase critique, le niveau d'estrogène est responsable de l'augmentation de la régulation des récepteurs LH, ainsi que de l'initiation de la boucle de rétroaction positive responsable de l'élan de LH et de FSH qui déclencherait l'ovulation [16]. Interférer avec la synthèse d'estrogènes durant cette période critique de temps prévient l'ovulation [1]. Après l'élan de LH, le follicule entre dans la phase lutéale et devient un corpus luteum lequel fait principalement la synthèse de progestérone [1]. Une diminution de la concentration de LH et subséquemment, une diminution de l'expression de l'aromatase a comme résultat une diminution de la production d'estrogène [17] ; simultanément une augmentation de l'activité de CYP11A et de la 3 $\beta$ -HSD favorise la synthèse de progestérone, laquelle par ces récepteurs initie le processus de rupture du follicule [1]. En cas de non fécondation de l'ovule, le corpus luteum dégénère, se flétrit, entraînant avec lui une diminution de la sécrétion de la progestérone et finalement l'apparition des règles correspondant au début d'un nouveau cycle. Si l'embryon se fixe, le corpus luteum va se maintenir et produire de la progestérone pendant le début de la grossesse.

#### **1.1.4 Synthèse et fonctions des hormones stéroïdiennes au niveau des testicules**

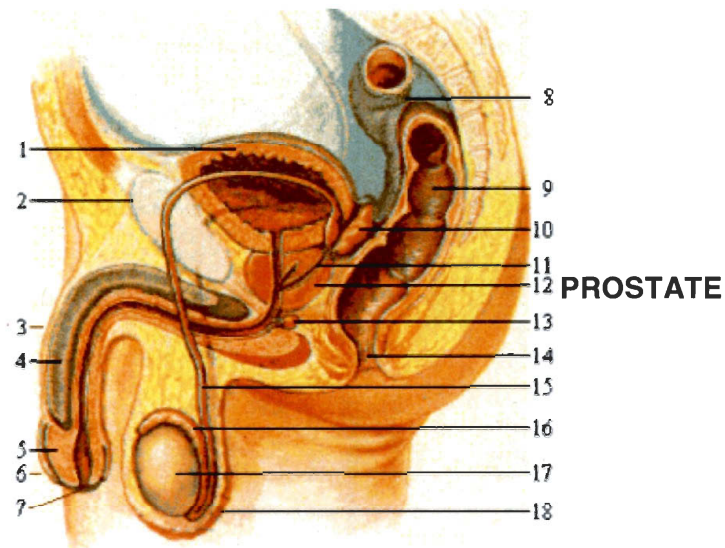
Le rôle des testicules est de produire des spermatozoïdes fertiles pour la fécondation et des stéroïdes pour la réalisation des fonctions reproductives et sexuelles [1]. La FSH stimule la différenciation cellulaire des cellules germinales mâles en spermatozoïdes, ce processus est appelé spermatogénèse [1]. Les cellules germinales utilisées dans la spermatogénèse sont renouvelées par mitose tout au long de la vie du mâle humain [1]. La liaison de la FSH à son récepteur situé sur les cellules de Sertoli provoque la production de spermatides via un second messenger l'AMPc ; alors que, l'hormone lutéinisante (LH), aussi par le médiateur AMPc, se lie aux cellules de Leydig via son récepteur, stimule la production de testostérone *de novo* à partir du cholestérol [1]. De concert avec les actions de la FSH, la testostérone produite est nécessaire pour

obtenir une production optimale de spermatozoïdes ainsi que le bon fonctionnement des fonctions sexuelles. La LH induit les cellules de Leydig qui sont impliquées dans la biosynthèse de la testostérone [18]. Le stéroïde-C19, androsténédione, est converti en testostérone par la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (17 $\beta$ -HSD) et le ratio entre ces deux androgènes dépend de la nature de la 17 $\beta$ -HSD [1]. Les 17 $\beta$ -HSD de types 3 et 5 sont exprimées dans les cellules de Leydig et catalysent la conversion de l'androsténédione en testostérone [19], alors que le type 2 réalise la réaction inverse [15]. Les cellules germinales, de Sertoli et de Leydig expriment une faible quantité d'aromatase, laquelle, convertie la testostérone produite par les cellules de Leydig en estradiol, une étape qui semble nécessaire au succès de l'initiation de la spermatogénèse et de la mitose des spermatogonies [20]. L'enzyme 5 $\alpha$ -réductase est responsable de la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) [1]. Bien que la DHT soit l'androgène le plus actif chez l'homme, cette réaction de conversion est faible dans le testicule adulte mais est prédominant dans des tissus comme l'épididyme et la prostate où la DHT possède un important rôle physiologique dans le maintien des fonctions sexuelles [1].

## **1.2 Prostate humaine**

La prostate est une large glande de l'appareil génital masculin (figure 2). Sa fonction principale est de sécréter et de stocker le liquide séminal, l'un des constituants du sperme. La prostate saine est approximativement de la taille d'une noix, de 15 à 25 g à l'âge adulte, très petite à la naissance, c'est lors de la puberté qu'elle prend du volume. Cette glande va subir une seconde période de croissance après l'âge de 50 ans. Elle entoure l'urètre juste au-dessous de la vessie et est située devant le rectum (figure 2).





**Figure 2. Schéma de l'appareil génital masculin:** 1. Vessie 2. Pubis (os) 3. Pénis 4. Corps caverneux 5. Gland 6. Prépuce 7. Méat urétral 8. Colon sigmoïde 9. Rectum 10. Vésicule séminale 11. Canal éjaculateur 12. **PROSTATE** 13. Glande de Cowper 14. Anus 15. Canal déférent 16. Épидidyme 17. Testicule 18. Scrotum

### 1.2.1 La prostate humaine et les stéroïdes

Les alvéoles de la prostate humaine sont composées de deux types de cellules. Le premier type cellulaire correspond aux cellules basales qui sont petites et en périphéries des alvéoles prostatiques, elles font contact avec la circulation sanguine. Le deuxième type cellulaire, les cellules luminales, sont de grosses cellules en contact avec la lumière alvéolaire (figure 11). Ces deux types cellulaires possèdent des rôles distincts quant à la formation et l'action des androgènes [21]. En effet, la  $3\beta$ -HSD, la  $17\beta$ -HSD de types 1 et 2, ainsi que la  $5\alpha$ -réductase sont trouvées dans les cellules basales, alors qu'au niveau luminal une présence prédominante de la  $5\alpha$ -réductase et une présence exclusive du récepteur des androgènes sont détectées (figure 11) [22, 23]. Or la  $5\alpha$ -réductase est responsable de la conversion de la testostérone en DHT [1], ce faisant les cellules luminales sont un endroit privilégié de la conversion de testostérone en DHT et le seul lieu d'activation du récepteur des androgènes.

In vitro, la DHT est reconnue pour être un androgène plus puissant que la testostérone à cause de sa faible dissociation [24] et de sa grande efficacité de transactivation du récepteur des androgènes [25]. De plus, le complexe récepteur des androgènes-DHT est plus rapide à produire l'activation des gènes sous son contrôle que peut le faire la testostérone [26]. La conséquence finale est que la DHT amplifie plus efficacement l'action et la réponse androgénique que la testostérone [27]. Le rôle central que joue la DHT dans le développement et le fonctionnement de la prostate est clairement établi [27]. Les hommes qui possèdent une déficience congénitale en  $5\alpha$ -réductase de type 2, donc une perte de conversion de la testostérone en DHT, ont une glande prostatique beaucoup plus petite [27].

Cependant, la conversion de la testostérone testiculaire en DHT par la  $5\alpha$ -réductase ne peut à elle seule être responsable du niveau de la DHT. En effet, après la castration, le niveau de la DHT dans la prostate chute de 60% [21]. Ce phénomène indique clairement que les précurseurs de la testostérone, comme le DHEA, ont un rôle important dans la présence de la DHT au sein du tissu prostatique [28]. Ainsi la DHT retrouvée dans la prostate provient : 1) de la conversion de la testostérone testiculaire par la  $5\alpha$ -réductase au niveau des cellules luminales, et 2) de la conversion des précurseurs de la testostérone, comme le DHEA et l'androsténédione, grâce à la cascade enzymatique retrouvée dans les cellules basales (figure 1 et 11) [28].

### **1.2.2 Le cancer de la prostate**

Le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué chez les Canadiens et représente la seconde cause de mortalité chez les mâles Caucasiens. Les données épidémiologiques, cliniques et expérimentales indiquent un rôle prédominant des androgènes dans le développement, la maintenance et la progression de ce cancer [29]. Les évidences qui placent les androgènes en premier plan sont nombreuses : 1) les mâles castrés en bas âge ne développent pas de cancer de la prostate [30, 31], 2) une forte incidence du cancer de la prostate a été corrélée avec des niveaux élevés d'androgènes plasmatiques [32-34], et 3) l'inhibition ou le blocage de la synthèse des

androgènes induit l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate ce qui est identifié par une régression de la tumeur chez une majorité de patients [35-37]. L'action des androgènes dans le cancer de la prostate, en particulier celle de la DHT, est réalisée par l'entremise du récepteur des androgènes. Plusieurs altérations de ce récepteur ont été trouvées dans le cancer de la prostate [29], le rendant plus actif ou élargissant son spectre de ligand, lui permettant ainsi d'être activé par d'autres molécules que les androgènes [38, 39]. Jusqu'à maintenant plus de 300 gènes régulés par les androgènes couvrant diverses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, le transport, la réponse du réticulum endoplasmique au stress, etc., ont été étudiés afin de mieux cerner le rôle des androgènes dans le cancer de la prostate [29].

Dans les phases précoces du cancer de la prostate, l'épithélium accumule des changements phénotypiques et génotypiques au niveau de la prolifération et la différenciation cellulaire [40]. La prolifération anormale des cellules de la prostate est associée à une forte expression du récepteur des facteurs de croissances p185<sup>erbB-3</sup>, p180<sup>erbB-2</sup>, c-met, et aux gènes suppresseur de tumeurs comme nm23-H1 [41, 42]. De plus, une surexpression du gène Bcl-2, un puissant suppresseur de la programmation de la mort cellulaire, permet aux cellules de résister aux messages d'apoptose apportés via les androgènes, ce qui cause une augmentation de l'instabilité génétique au sein des cellules [43, 44].

L'un des points déterminants dans la progression du cancer est la différenciation exclusive des cellules souches de la prostate en cellules exocrines, les cellules luminales de la prostate [40]. Or, la prolifération de ces cellules est sous le contrôle du récepteur des androgènes et il arrive dans certaines tumeurs que ce récepteur puisse être activé par l'œstrogène, la progestérone ou d'autres types de stéroïdes [40]. Le résultat final est que la croissance de la tumeur devient indépendante des androgènes et donc, que les traitements actuels basés sur une inhibition de la production d'androgènes ne peuvent plus être aussi efficaces.

Le second phénotype important dans les tumeurs de la prostate, est celui montré par la différenciation neuroendocrine, lequel a des implications dans le pronostic du cancer de la prostate [45]. Les cellules tumorales endocrines dérivent probablement des cellules exocrines, changement qui s'effectue durant la progression de la tumeur, lequel n'est qu'un reflet de la différenciation possible des cellules souches prostatiques [46]. La différenciation neuroendocrinienne arrive exclusivement en phase G0 du cycle cellulaire, ce qui indique que ces cellules tumorales sont plus résistantes aux thérapies par radiation et aux agents cytotoxiques que les cellules tumorales exocrines (luminales) [47]. De plus, l'absence détectable du récepteur des androgènes indique clairement que les cellules tumorales endocrines sont insensibles aux androgènes [48]. Ces résultats suggèrent que la différenciation des cellules tumorales prostatiques en cellules tumorales endocrines peut affecter l'historique et le pronostic du cancer de la prostate [40].

#### **1.2.2.1 Traitements contre le cancer de la prostate**

Jusqu'en 1980, le traitement standard du cancer de la prostate au stade avancé a été limité au blocage des androgènes testiculaires par castration chirurgicale ou par administration de fortes doses d'œstrogènes tel qu'il avait été initié en 1941 [49]. Cependant, l'œstrogénothérapie entraînait des complications cardiovasculaires tellement importantes que leur usage est devenu fort limité et la castration chirurgicale rencontrait des objections d'ordre psychologique chez la plupart des patients [49]. Rapidement il a été démontré que les agonistes de la LH-RH pouvaient remplacer la castration chirurgicale et l'administration d'œstrogènes dans le cancer de la prostate [50]. Bien que les agonistes LH-RH diminuent de 80 à 90% les niveaux circulants de testostérone, les niveaux intraprostatiques de la DHT ne sont diminués que de 50 à 70%, et ce à cause de la capacité du tissu prostatique à convertir les précurseurs de la testostérone (DHEA et androsténédione) en DHT [49].

Ainsi, la seule façon d'avoir un impact majeur sur la survie est un diagnostic précoce couplé à un traitement du cancer au stade localisé. Actuellement un diagnostic

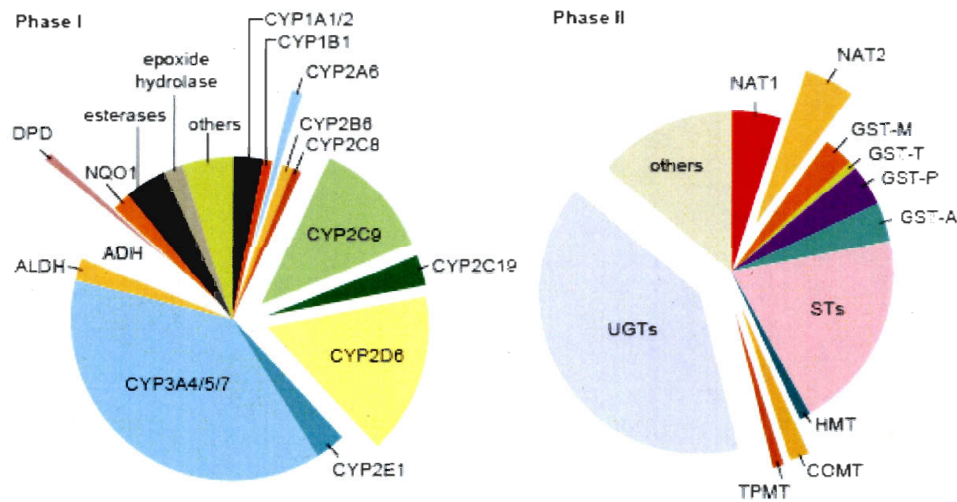




### 1.3 Les Uridine 5'-diphosphate-Glucuronosyltransférases (UGT)

#### 1.3.1 Rôle des UGT et importance de la glucuronidation

Chez l'humain, le processus de détoxification des composés endogènes ou exogènes se divise principalement en trois phases enzymatiques. La phase I, principalement réalisée par les cytochromes P450 (CYP) (figure 4), correspond à l'ajout d'un groupement fonctionnel réactif sur un composé hydrophobe à l'aide d'une réaction d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Plusieurs substrats comme les drogues, les polluants, les produits chimiques, les acides gras, les acides biliaires, les dérivés de la vitamine D3 et les stéroïdes sont métabolisés durant cette phase [54]. D'autres enzymes, comme les amines oxydases, les peroxydases et les déshydrogénases, sont aussi impliquées dans le métabolisme de ces différents substrats en permettant leur oxydation (figure 4) [55].



**Figure 4. Principaux enzymes impliqués dans les phases I et II de la détoxification des composés endogènes et exogènes chez l'humain [56].**

Pour sa part, la phase II possède diverses classes d'enzymes telles que les sulfotransférases (SULT), les N-acétyltransférases (NAT), les glutathione-S-transférases

(GST), les catéchol-O-méthyltransférases (COMT) et les UDP-glucuronosyltransferases (UGT) (Figure 4). Ces différentes enzymes permettent l'ajout de charges polaires sur des groupements réactifs de types hydroxyles, amines, thioles ou carboxyles retrouvés sur des molécules hydrophobes [55]. Cette phase produit un métabolite dont l'hydrosolubilité et le poids moléculaire sont augmentés, modifiant ainsi l'activité biologique et pharmacologique des composés tout en favorisant leur élimination de l'organisme [57].

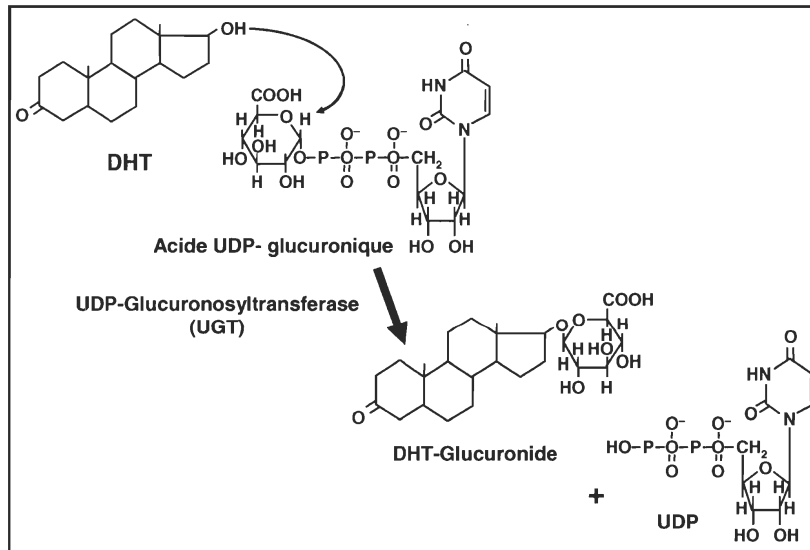
La glucuronidation exercée par les UGT est généralement considérée comme un mécanisme de contrôle et de détoxification important dans plusieurs tissus tels que le foie et l'intestin. Elles permettent l'élimination de composés exogènes et endogènes comme les médicaments, les polluants environnementaux, les acides biliaires, les acides gras, la bilirubine, les hormones thyroïdiennes et les stéroïdes [58].

Finalement, les transporteurs membranaires constituent les molécules de la phase III du métabolisme. Plusieurs transporteurs permettent l'excrétion des molécules des cellules vers la bile ou l'urine.

### **1.3.2 La réaction de glucuronidation**

La glucuronidation consiste en l'ajout d'un groupement polaire glucuronosyl à une molécule hydrophobe afin d'augmenter son hydrosolubilité et ainsi favoriser son excrétion par la bile ou l'urine [21]. L'ajout du groupement glucuronosyl provenant de l'acide UDP-glucuronique (UDPGA) peut se produire sur différents groupements fonctionnels, comme les hydroxyles (-OH), les carboxyles (-COOH), les thiols (-SH) et les amines (-NH<sub>2</sub>) [59]. Le groupement accepteur du substrat attaque le carbone C1 situé dans le groupement pyranose de l'acide UDP-glucuronique (UDPGA), formant ainsi un acide β-D-glucopyranosiduronique (glucuronide) (Figure 5). De plus, il a été observé sur les stéroïdes que l'ajout d'un groupement glucuronosyl provoque un encombrement stérique sur la molécule, ce qui réduit généralement son activité biologique, elle n'a alors plus la

conformation lui permettant d'entrer dans le domaine de liaison du ligand des récepteurs nucléaires [60].



**Figure 5. Réaction de glucuronidation catalysée par les UGT. La réaction enzymatique implique deux molécules : un co-facteur, l'acide UDP-glucuronique (UDPGA), et un substrat, comme par exemple, la dihydrotestostérone (DHT), adapté de [60].**

Dans le cas des stéroïdes, les sites les plus fréquents de conjugaison sont les fonctions hydroxylées du cycle A (position 3) et du cycle D (position 16 et 17) (figure 5) [61]. L'orientation  $\alpha$  ou  $\beta$  de chacun de ces sites de conjugaison est également très importante, puisque les UGT capables d'agir sur les stéroïdes démontrent une grande spécificité stérique (figure 10) [60]. Cependant, il est reconnu que les UGT peuvent présenter des réactions croisées avec leurs substrats, tout particulièrement avec les hormones stéroïdiennes (figure 10) [61].

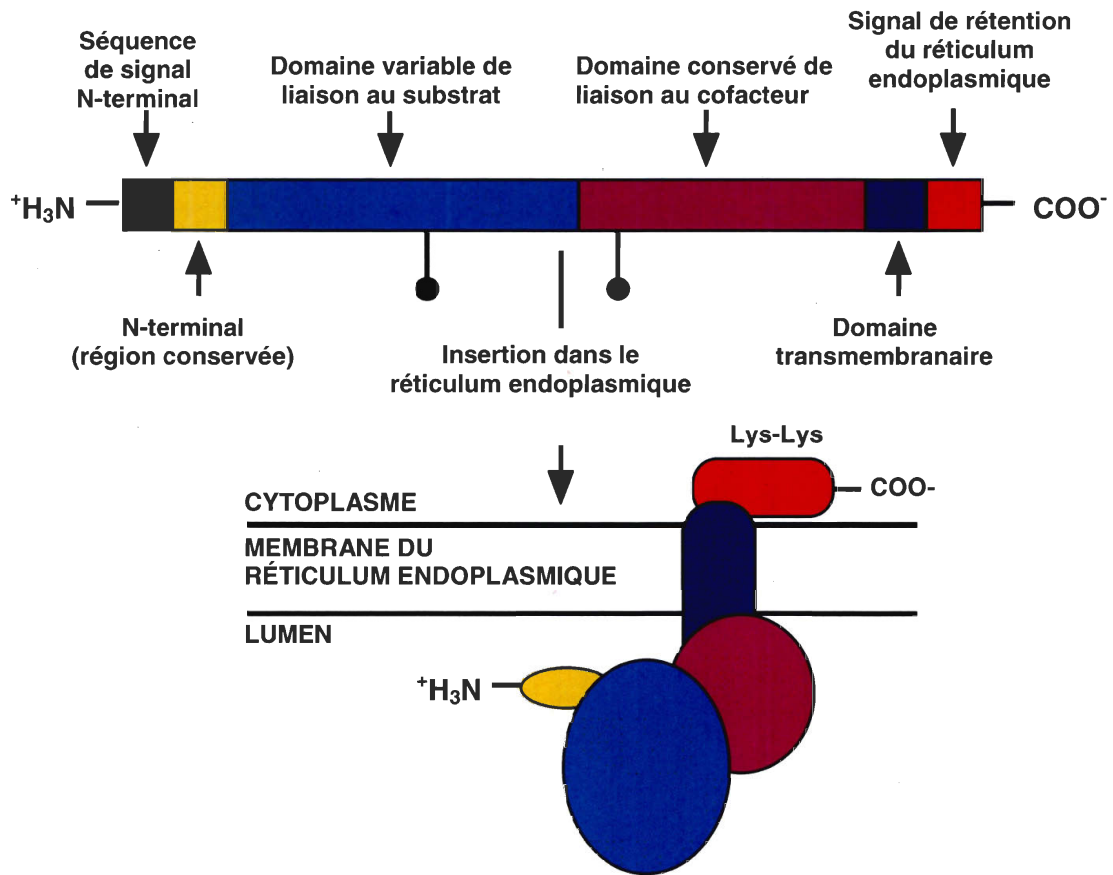
Bien que cette réaction soit majoritairement impliquée dans l'élimination des molécules, la glucuronidation peut aussi permettre l'activation de certaines substances.



C'est le cas pour la morphine et la codéine [62]. Ce phénomène d'activation reste cependant exceptionnel. De plus, la réaction de glucuronidation peut par contre être renversée par des enzymes d'*Escherichia coli* ou *Clostridium perfringens*. Ces bactéries intestinales ont la capacité de produire l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase qui enlève le groupement glucuronide des molécules conjuguées afin de former des acides biliaires libres [63].

### 1.3.3 La structure des UGT

Les UGT sont des enzymes transmembranaires retrouvées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (figure 6) [64]. Elles sont composées de 529 à 534 acides aminés contenant un peptide signal en N-terminal, à l'exception de l'UGT1A10, permettant de diriger les protéines vers le RE [65, 66]. Une fois mature, au clivage du peptide signal, les UGT possèdent environ 505 acides aminés [67]. Ces protéines transmembranaires possèdent un domaine luminal représentant environ 95% de la chaîne polypeptidique (figure 6). Cette région amino-terminale semble être impliquée dans la spécificité de substrat de chacune des enzymes [68]. La région carboxy-terminale des UGT, qui est beaucoup plus conservée, est responsable de la liaison au cofacteur UDPGA [69] (figure 6). Une portion de cette région est transmembranaire, elle comporte dix-sept résidus et est conservée entre les différentes enzymes UGT, cette région possède aussi une portion cytosolique qui fait seulement vingt acides aminés (figure 6).

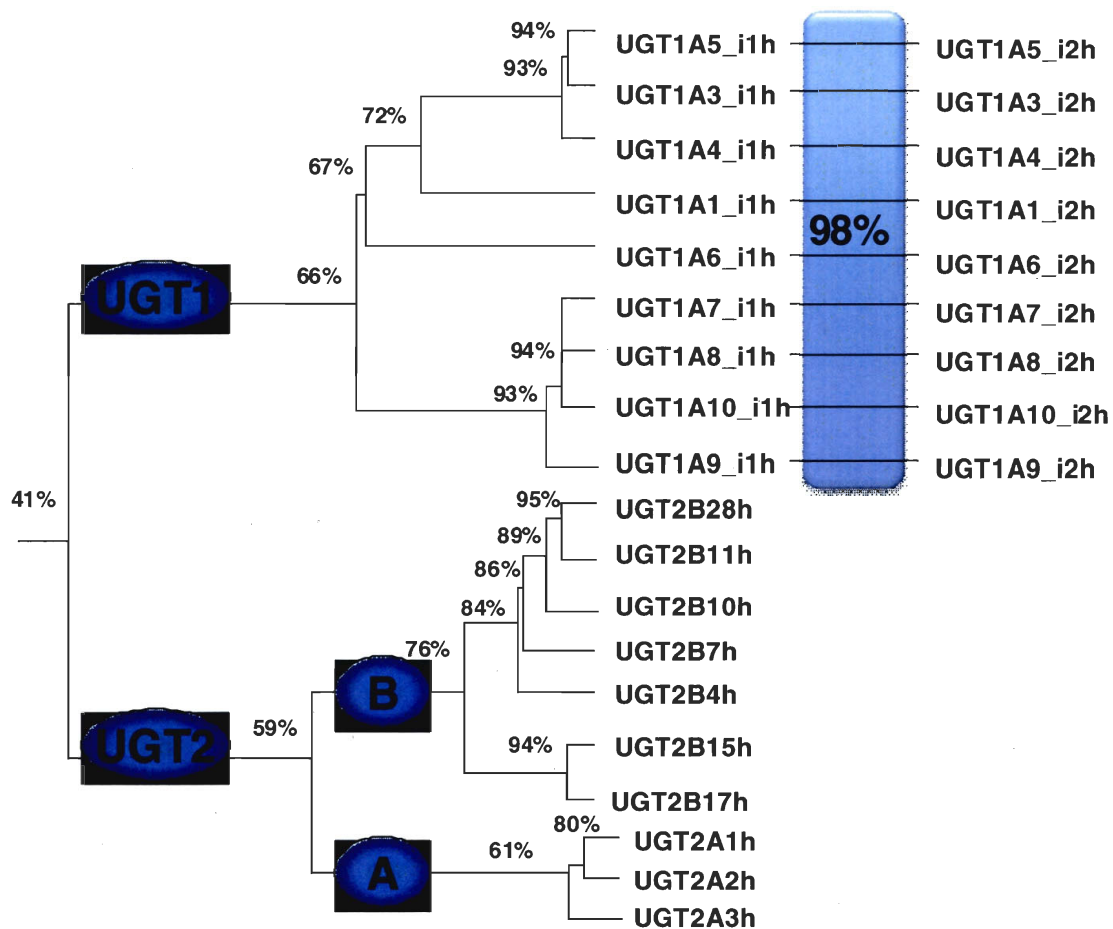


**Figure 6. Localisation et structure protéique schématique des UGT dans le réticulum endoplasmique. La région amino-terminale des UGT est impliquée dans la liaison au substrat alors que la région carboxy-terminale permet la fixation du co-substrat, l'UDPGA [70].**

### 1.3.4 Nomenclature et spécificité de substrats des UGT

Jusqu'à maintenant, 117 enzymes UGT ont été identifiées chez les mammifères, dont 19 protéines fonctionnelles chez l'homme [71]. Les UGT sont classées en quatre grandes familles, les UGT1, les UGT2, les UGT3 et les UGT8 [71]. Cependant, les familles UGT1 et UGT2 sont les représentantes majeures des UGT et elles sont les seules dont la caractérisation enzymatique a été réalisée (figure 7) [71]. Ces deux familles sont

divisées en cinq sous-familles, les UGT1A, UGT1B, UGT2A, UGT2B et UGT2C, selon leur homologie de séquence en acides aminés et ont été nommées selon leur évolution divergente. Les sous-familles UGT1A et UGT2B sont les plus importantes, notamment à cause de leur rôle dans la conjugaison des acides biliaires, des acides gras, des drogues et des stéroïdes (figure 7) [65]. Les membres de la famille des UGT possèdent au moins 41% d'homologie alors que les membres d'une même famille possèdent au moins 59% d'homologie dans leur séquence en acides aminés. Certaines protéines, qui ont des identités beaucoup plus élevées, dépassent parfois les 90%, ont été regroupées en sous-familles [64] (figure 7). Une grande variété de substrats endogènes et exogènes peut être conjuguée par les différentes UGT, plusieurs isoformes peuvent conjuguer un même substrat (figure 10) [72].



**Figure 7. Classification des UGT humaines.**

Les enzymes sont classées en deux grandes familles selon leur homologie de séquence en acides aminés (adapté de [21]).

### 1.3.4.1 UGT1A

Les UGT1A sont codées par un seul gène situé sur le chromosome 2q37. Ce gène, qui s'étend sur une région de 200 kb, contient treize promoteurs et dix-sept exons (treize exons 1 différents, et les exons 2 à 5) (figure 8) [73]. Les différents ARN messagers des

UGT1A sont produits par épissage alternatif des exons 1 et partagent les exons 2 à 5 (figure 8) [71]. Deux récentes études ont montré la présence de deux exons 5 (5a et 5b) utilisés de façon alternative ou conjointe lors de l'épissage alternatif [74, 75] (figure 8). Il existerait donc trois possibilités de transcrits pour les UGT1A : (1) à partir de l'exon 5a pour générer les protéines UGT1A\_v1 (classique), (2) à partir de l'exon 5b pour générer les protéines UGT1A\_v2 (nouvelles) et (3) à partir des exons 5a et 5b pour générer les protéines UGT1A\_v3 (figure 8) [75]. La sous-famille UGT1A compte neuf membres fonctionnels UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10, ainsi que les différentes possibilités de transcription résultant de l'épissage alternatif de l'exon 5 (figure 7 et 8) [71, 75]. De plus, parmi les treize exons 1, quatre (UGT1A2P, 1A11P, 1A12P et 1A13P) contiennent des mutations non-sens, ce qui provoque l'arrêt de leur traduction. Ils sont ainsi désignés comme étant des pseudogènes [71]. Les UGT1A catalysent la glucuronidation de la bilirubine et d'une vaste gamme de substrats à caractère pharmaceutique comme les analgésiques, les hormones sexuelles, des drogues anticancer (comme l'irinotecan et flavopiridol) et des agents carcinogènes spécifiques du tabac comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ainsi que le 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) [76]. Aussi une variation dans l'expression de l'UGT1A1 à cause de différents polymorphismes est associée à certains troubles physiologiques importants, notamment l'hyperbilirubinemia observée dans le syndrome de Crigler-Najjar et celui de Gilbert [21].

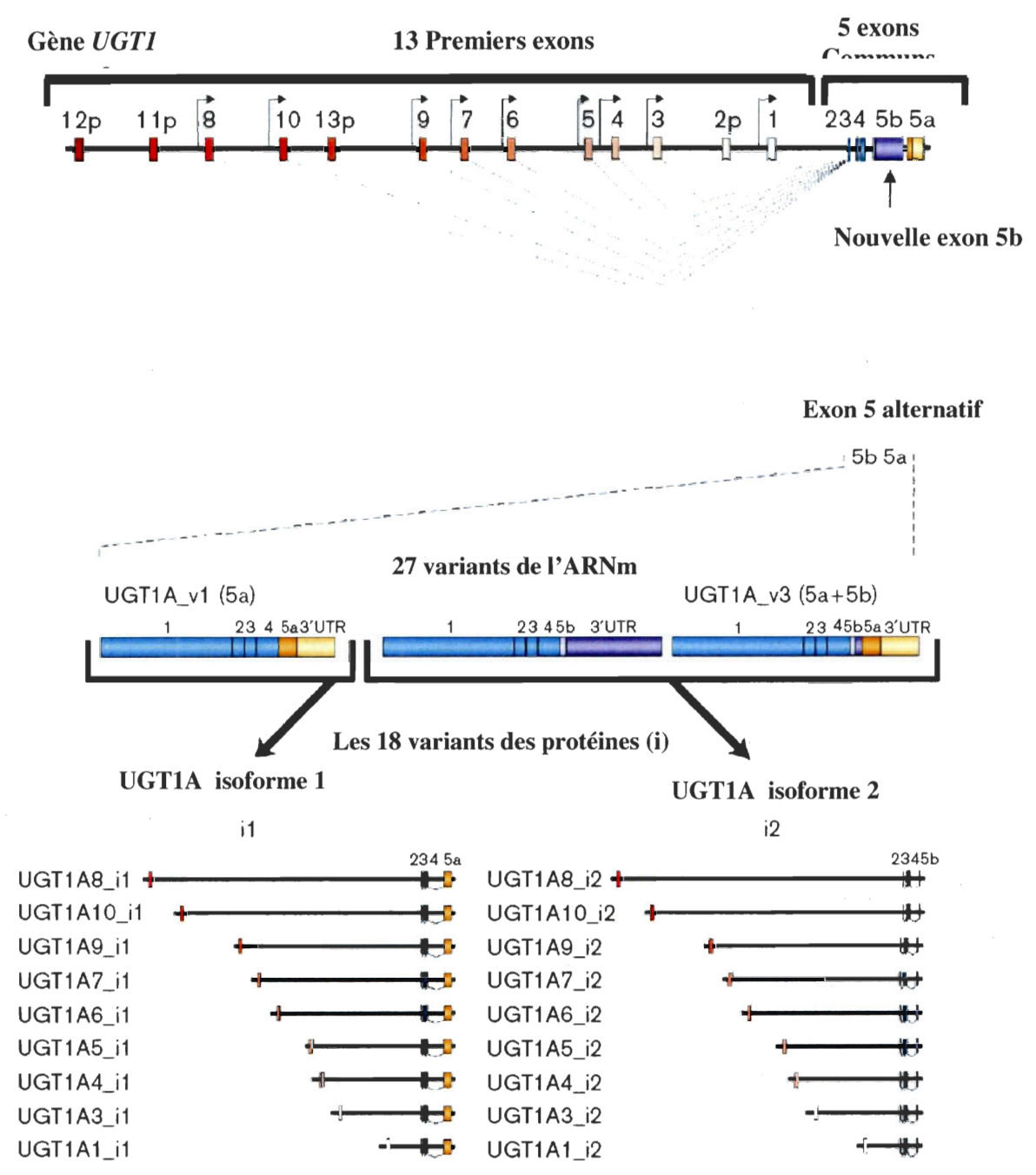
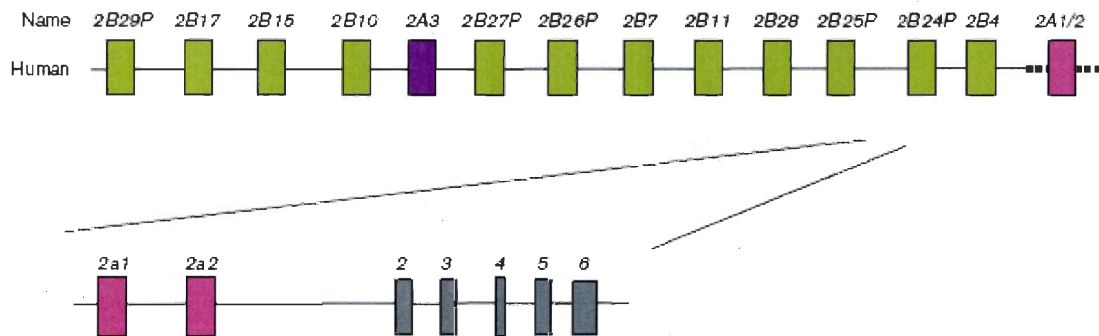


Figure 8. Représentation schématique de l'épissage alternatif du gène UGT1 comprenant le nouvel exon 5b [75].

### 1.3.4.2 UGT2

La famille des UGT2 se divise en deux sous-familles UGT2A et UGT2B (figure 7) [71]. Contrairement à la sous-famille UGT1A, les membres de la famille UGT2 possèdent chacun six exons qui ne sont pas partagés entre les différents UGT2, à l'exception des UGT2A1 et 2A2 qui ont le même arrangement que les gènes de la sous-famille UGT1A (figure 9) [71]. Chez l'homme, les gènes de la famille UGT2 se trouvent sur le chromosome 4q13-21.1 et partagent de façon générale plus de 70% d'homologie entre eux (figure 7) [71].



**Figure 9. Représentation schématique de la famille UGT2 humaine. La sous-famille UGT2A, est représentée par les rectangles mauves, alors que la sous-famille UGT2B est représentée par ceux en vert. Tous les gènes possèdent six exons non partagés, à l'exception de l'UGT2A1 et 2A2 qui possèdent un exon 1 unique et qui partagent les exons 2 à 6 illustrés en gris [71].**

Jusqu'à maintenant, trois membres de la sous-famille UGT2A ont été identifiés (figure 9). Les UGT2A1 et 2A2 sont issus d'un processus d'épissage alternatif semblable à celui retrouvé chez la famille UGT1 : chacun possède un exon 1 unique et ont en commun les exons 2 à 5 [71]. Le troisième membre de cette sous-famille, l'UGT2A3, est quant à lui le produit de six exons uniques non partagés [71]. Les isoformes UGT2A1 et 2A2 sont reconnus pour conjuguer une multitude de molécules odorantes et ne sont

exprimées que dans le système olfactif [21]. Ces deux UGT seraient une protection pour le corps humain contre différentes substances aériennes exogènes, en plus de contribuer à la terminaison olfactive du stimulus [21].

La sous-famille humaine des UGT2B compte présentement une douzaine de membres (figure 9). Jusqu'à maintenant sept protéines fonctionnelles ont été identifiées : UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28, ainsi que cinq pseudogènes : UGT2B24, 2B25, 2B26, 2B27, 2B29 [71]. L'activité enzymatique de cette sous-famille est diversifiée et est relativement propre à chacun de ses membres. La principale activité enzymatique de l'UGT2B4 est la conjugaison de la bile et des acides gras, alors que celle de l'UGT2B10 et de l'UGT2B11 est plus spécifique pour les acides gras, notamment les métabolites eicosanoïdes [21]. L'UGT2B28, lequel n'est exprimé que dans le foie, participerait à la conjugaison de l'estradiol et du 3 $\alpha$ -DIOL [21]. Cependant, cette sous-famille est surtout reconnue pour sa grande capacité de conjugaison des androgènes, notamment par l'activité enzymatique de l'UGT2B7, de l'UGT2B15 et de l'UGT2B17 (figure 10) [21]. Ces trois enzymes peuvent conjuguer le 3 $\alpha$ -DIOL mais seul l'UGT2B15 et l'UGT2B17 peuvent conjuguer la DHT et la testostérone (figure 10) [21, 65].

### 1.3.5 Distribution tissulaire

La distribution tissulaire des différentes isoformes d'UGT s'étend à presque tous les tissus du corps humain (tableau 1). Cependant, tous les tissus ne contiennent pas toutes les isoformes et chaque enzyme peut être exprimée dans plusieurs tissus (tableau 1).

**Tableau 1. Expression des UGT1A, des UGT2A et des UGT2B dans les tissus humains[77].**

Isoforme UGT	Expression dans les différents tissus
UGT1A1	Côlon, Estomac, Foie, Intestin, Vésicules biliaires



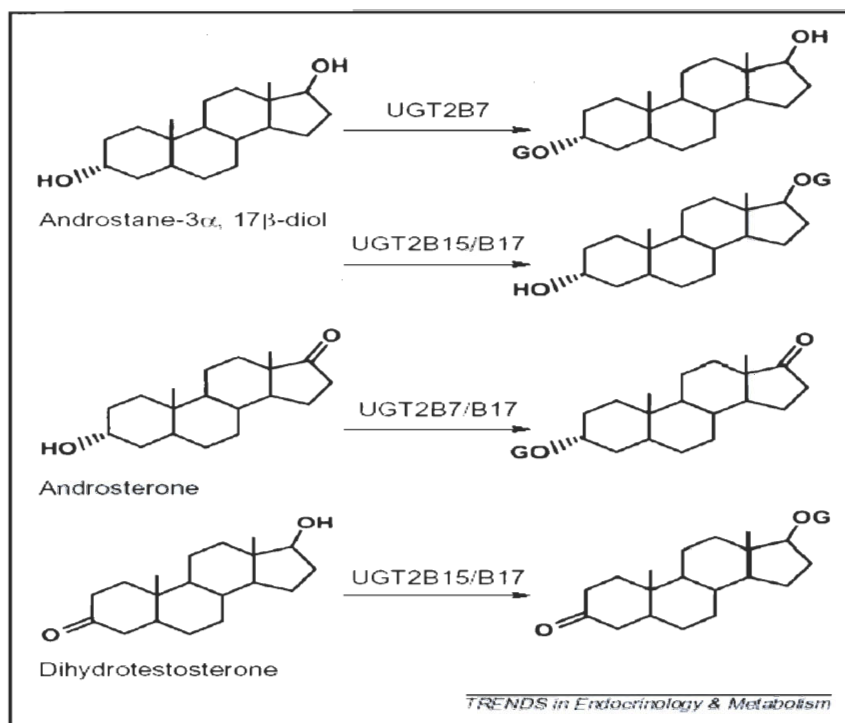
<b>UGT1A3</b>	Côlon, Estomac, Foie, Vésicules biliaires
<b>UGT1A4</b>	Côlon, Foie, Intestin, Vésicules biliaires
<b>UGT1A5</b>	Absence complète d'expression
<b>UGT1A6</b>	Côlon, Cerveau, Estomac, Foie, Intestin, Larynx, Poumon, Rein, Vésicules biliaires
<b>UGT1A7</b>	Foie, œsophage, Tissu laryngale
<b>UGT1A8</b>	Côlon, Intestin, larynx, Rein
<b>UGT1A9</b>	Côlon, Foie, Œsophage, Sein, Peau, Prostate, Rein, Ovaires, Testicules
<b>UGT1A10</b>	Côlon, Estomac, Intestin, Œsophage, Tissu laryngal, Vésicules biliaires
<b>UGT2A1</b>	Cerveau, Épithélium olfactif, Poumon fœtal,
<b>UGT2A2</b>	Côlon, Estomac, Foie, Intestin
<b>UGT2B4</b>	Cortex surrénalien, Foie, Peau, Placenta, Poumon, Prostate, Ovaires, Rein, Sein, Testicules, Tissu adipeux
<b>UGT2B7</b>	Cerveau, Côlon, Foie, Intestin, Pancréas, Poumon, Œsophage, Rein, Sein
<b>UGT2B10</b>	Foie, Placenta, Poumon, Prostate, Œsophage, Rein, Sein, Testicules
<b>UGT2B11</b>	Cortex surrénalien, Foie, Peau, Poumon, Prostate, Rein, Sein, Tissu adipeux
<b>UGT2B15</b>	Foie, Peau, Placenta, Poumon, Prostate, Œsophage, Ovaires, Rein, Sein, Testicules, Tissu adipeux, Utérus
<b>UGT2B17</b>	Cortex surrénalien, Foie, Peau, Placenta, Poumon, Prostate, Ovaires, Rein, Sein, Testicules, Tissu adipeux, Utérus
<b>UGT2B28</b>	Foie, Sein

À cause de leurs fonctions d'élimination et d'inactivation (figure 4 et 5), les UGT sont retrouvés dans les tissus où les agents chimiques peuvent pénétrer dans l'organisme : côlon, intestin, estomac, œsophage, peau, poumon, etc.[65]. L'expression des UGT a aussi été démontrée dans de nombreux tissus périphériques, souvent ciblés par les stéroïdes, tels que le cerveau, le placenta, la prostate, le sein, les ovaires, le tissu adipeux et l'utérus[77].

Cependant, de façon générale, le foie correspond au site majeur de conjugaison chez l'homme.

### 1.3.6 UGT2B15 et UGT2B17

La séquence en acides aminés des gènes UGT2B15 et UGT2B17 est à 96% homologue, cependant leur spécificité de conjugaison pour les androgènes est différente (figure 10) [21]. L'UGT2B15 est spécifique pour la conjugaison des androgènes en position 17-hydroxy, alors que la protéine UGT2B17 présente une spécificité à la fois en position 17-hydroxy mais aussi en 3-hydroxy [61]. Les protéines UGT2B15 et UGT2B17 sont spécifiques pour la conjugaison du 3 $\alpha$ -DIOL et de la DHT en position 17-hydroxy, mais en plus, l'UGT2B17 conjugue l'ADT en position 3-hydroxy. L'UGT2B15 possède une capacité de conjugaison élevée pour le 3 $\alpha$ -DIOL et présente une capacité modérée pour la DHT [78]. Bien que l'UGT2B17 puisse conjuguer le 3 $\alpha$ -DIOL et qu'il possède une haute capacité de conjugaison pour la DHT, il est surtout très spécifique pour l'ADT, environ quatre fois plus que l'UGT2B7, qui lui est spécifique pour la conjugaison de l'ADT et du 3 $\alpha$ -DIOL en 3-hydroxy (figure 10), ce qui fait de la protéine UGT2B17 l'enzyme majeur pour la conjugaison de l'ADT [21].



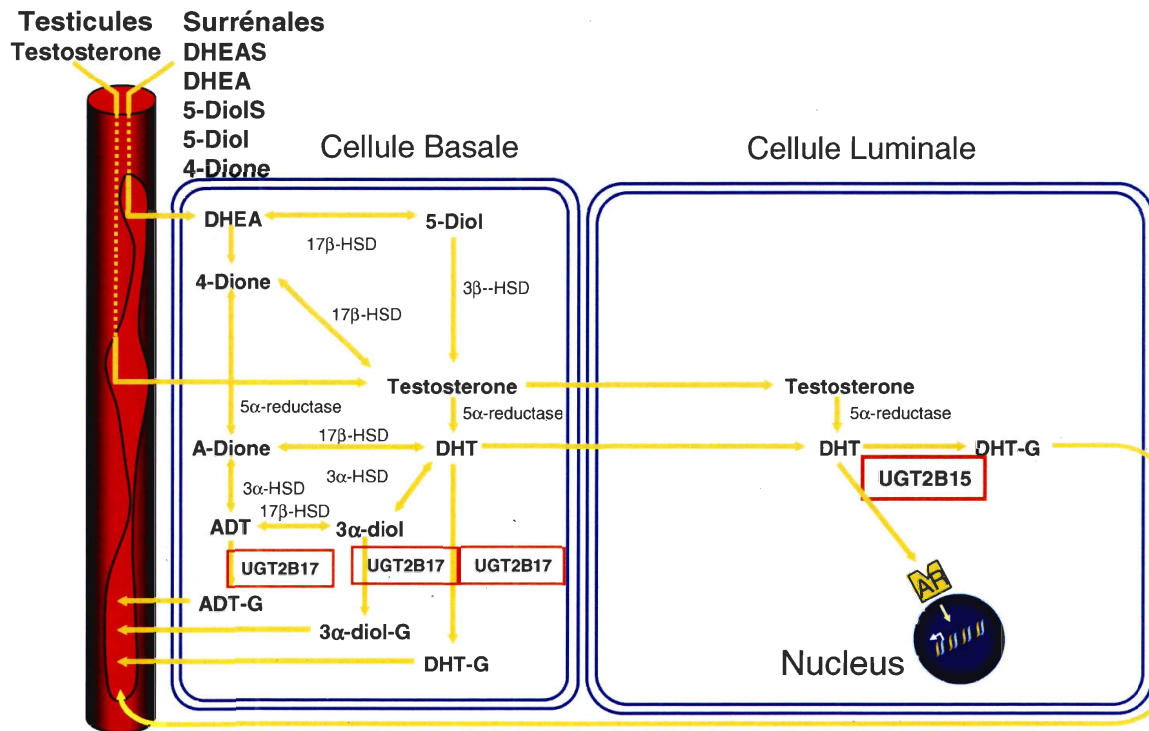
**Figure 10.** Schéma de stéréospécificité de conjugaison des UGT2B15 et UGT2B17 pour les androgènes 3 $\alpha$ -DIOL, ADT et DHT. La couleur indique la position de conjugaison des androgènes. Le 3 $\alpha$ -DIOL et la DHT sont conjugués en position 17-hydroxy, alors que l'ADT est conjugué en position 3-hydroxy [21].

L'UGT2B15, à cause d'un polymorphisme nucléotidique simple changeant l'acide aminé en position 85, compterait deux variants l'UGT2B15 D85 et l'UGT2B15 Y85 [79]. Bien que les deux variants possèdent la même spécificité de substrats, elles diffèrent significativement par leur habilité à conjuguer efficacement le 3 $\alpha$ -DIOL et la DHT, le variant UGT2B15 Y85 est deux fois plus efficace que l'UGT2B15 D85 [79].

### 1.3.6.1 UGT2B15, UGT2B17 et la prostate humaine

En 1978, Chung et Coffey ont démontré la présence de conjugaison de la DHT dans un homogénat de tissu prostatique [80]. De plus l'activité de conjugaison dans ce tissu fut aussi démontrée par la présence de 3 $\alpha$ -DIOLG et d'ADTG [81]. Finalement, l'expression

du gène UGT2B15 et UGT2B17 ont été établies dans la prostate par Turgeon et al. en 2001 [78]. Comme illustré à la figure 11, la protéine de l'UGT2B17 est détectée dans les cellules basales, alors que l'UGT2B15 est seulement trouvée dans les cellules luminales de la prostate [82].



**Figure 11. Métabolisme et glucuronidation des androgènes dans la prostate humaine. L'UGT2B15 est en position luminale, alors que l'UGT2B17 se trouve au niveau basal de l'épithélium prostatique (adapté de [82]).**

Ainsi par leur localisation respective dans l'épithélium prostatique, l'UGT2B15 et l'UGT2B17 permettent un métabolisme localisé des androgènes au niveau des différents types de cellules. L'UGT2B17 serait responsable de la conjugaison du 3 $\alpha$ -DIOL et de l'ADT retrouvé dans les cellules basales, alors que l'action de conjugaison de l'UGT2B15 serait limitée à la DHT dans les cellules luminales (figure 11) [21]. L'affinité entre la DHT et le récepteur des androgènes est environ 1000 fois supérieure à celle entre la DHT et la protéine UGT2B15 [21]. L'UGT2B15 peut donc conjuguer qu'une petite proportion de la DHT formée dans les cellules luminales, la grande majorité se liant au récepteurs des androgènes [21].

### 1.3.7 UGT2B15 et cancer de la prostate

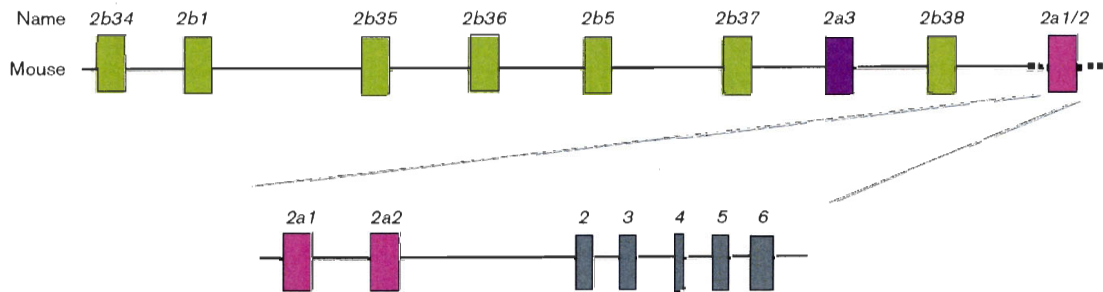
Les androgènes jouent un rôle déterminant dans la différenciation et le développement prostatique, de plus ils stimulent la croissance des cellules cancéreuses de la prostate [21]. La co-localisation de la 5 $\alpha$ -réductase, l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT, du récepteur des androgènes et de l'UGT2B15 permet une très fine régulation de la concentration et de l'action de la DHT au niveau des cellules luminales (figure 11) [21]. Parce qu'il existe deux variants de l'UGT2B15 avec des efficacités différentes à conjuguer la DHT, il est raisonnable de postuler que la présence de l'allèle ayant une faible efficacité de conjugaison, l'UGT2B15\*D85, ait un impact sur la concentration intraprostatique de la DHT [79]. Hypothèse fortement supportée par l'étude de Chouinard et al, qui a démontré *in vitro* à l'aide de sonde ARNi et de cellules LNCaP (cellules cancéreuses de la prostate humaine sensibles aux androgènes), une augmentation de la concentration de la DHT, de la prolifération cellulaire et de l'expression de huit gènes connus pour être sensibles aux androgènes, notamment à la DHT [83].

Durant les dernières années, cinq groupes ont conduit des études épidémiologiques pour déterminer l'impact de l'UGT2B15 dans le cancer de la prostate [84-88]. Quatre d'entre elles concluent favorablement à l'existence d'un lien entre le cancer de la prostate et l'UGT2B15, comme par exemple l'étude de MacLeod et al. réalisée avec 64 participants tous atteints du cancer de la prostate ainsi qu'avec 64 participants contrôles, tous recrutés dans la région de l'Arkansas [84]. L'allèle UGT2B15\*D85 était significativement plus prévalant chez les participants atteints du cancer de la prostate (40.6%) que chez les participants contrôles (18.8%) [84]. De plus, le risque de développer un cancer de la prostate chez les participants UGT2B15\*D85 homozygotes était trois fois plus élevé [84]. Cependant, la cinquième étude, conduite avec 380 participants Caucasiens provenant d'Autriche (190 participants souffrant d'hyperplasie bénigne de la prostate et 190 participants souffrant de cancer de la prostate), n'a pu démontrer d'association positive entre l'une des deux isoformes de l'UGT2B15 et le cancer de la prostate [87]. Le rôle exact de l'UGT2B15 dans le cancer de la prostate reste encore à éclaircir.

## 1.4 La souris un excellent modèle animal pour l'étude du cancer de la prostate

### 1.4.1 La famille des UGT2 murin

Jusqu'à maintenant 10 membres de la famille Ugt2 murin ont été identifiés, tous se trouvant sur le chromosome 5E1 et sont composés de six exons (figure 12) [71]. Cependant aucune caractérisation de la régulation ou de l'activité enzymatique du métabolisme des hormones stéroïdiennes n'a été faite [71]. Il existe deux sous-familles d'Ugt2 appelées Ugt2a et Ugt2b. La sous-famille Ugt2a est composée de trois membres Ugt2a1, Ugt2a2 et Ugt2a3. Les Ugt2a1 et Ugt2a2, comme chez l'humain, sont issus de l'épissage alternatif (figure 12). Quant à lui, l'Ugt2a3 possède une structure qui lui est propre. La sous-famille Ugt2b est composée de sept membres : Ugt2b1, Ugt2b5, Ugt2b34, Ugt2b35, Ugt2b36, Ugt2b37, Ugt2b38, chaque enzyme possède sa propre structure (figure 12).



**Figure 12.** Représentation schématique de la famille Ugt2 murine. La sous-famille Ugt2a, est représentée par les rectangles mauves, alors que la sous-famille Ugt2b est représentée par ceux en vert. Tous les gènes possèdent six exons non partagés, à l'exception de l'Ugt2a1 et 2a2, chacun possède un exon 1 unique et partage les exons 2 à 6 illustrés en gris [71].

### 1.4.1.1 Distribution tissulaire des UGT2 chez la souris

Une seule étude quant à la distribution tissulaire des Ugt2 murins existe, celle de Buckley et Klaassen (figure 13) [89]. Selon cette étude, le foie est le site majeur d'expression des Ugt2b chez la souris mâle et femelle. De plus, pour les deux sexes, ils ont remarqué une présence de l'Ugt2b5, 2b34, 2b35, 2b36, 2b37 et 2b38 dans les reins. Toujours selon ces auteurs, l'Ugt2b34 et 2b35 affichent une très forte présence dans différentes parties du système digestif murin tel que l'estomac et le gros intestin. Seul l'Ugt2b35 est présent dans les gonades et le placenta. L'Ugt2b36, est quant à lui, présent dans beaucoup de tissus mais à de faibles niveaux.

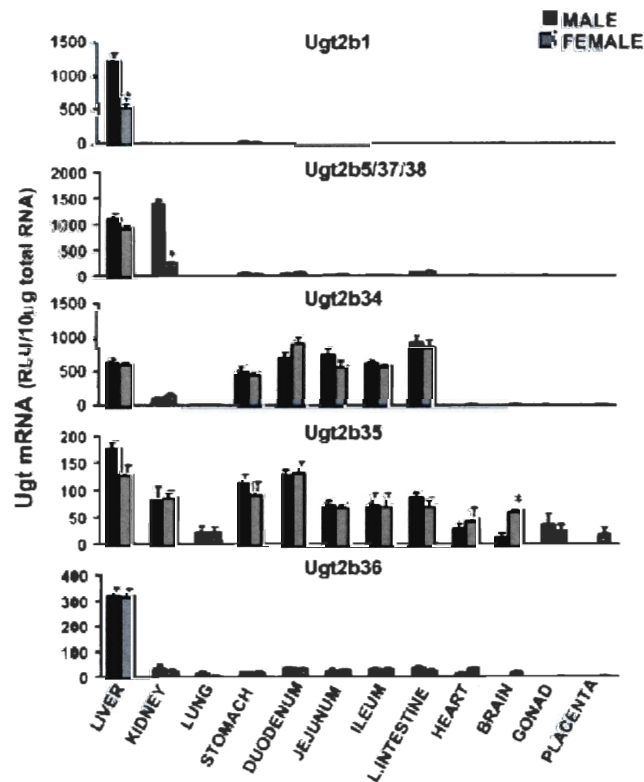


Figure 13. Distribution tissulaire dans différents tissus de souris mâle et femelle des enzymes UGT2B murins [89].

#### **1.4.2 Androgènes chez la souris**

Chez la souris les stéroïdes actifs sont uniquement produits par les gonades. Chez le mâle et la femelle le stéroïde circulant le plus abondant est, respectivement, la testostérone et l'estradiol [90]. On retrouve aussi en circulation chez le mâle, de l'ADT et du 3 $\alpha$ -DIOL, alors que chez la femelle le DHEA et le 5-DIOL sont présents [90]. De plus, la femelle présente des niveaux sulfate de DHEA et d'ADT très élevés, tandis que chez le mâle ces sulfates sont absents [90]. Il y a aussi absence de détection de stéroïdes conjugués dans la circulation murine mâle et femelle [90].

#### **1.4.3 Cancer de la prostate et souris génétiquement modifiées**

Le cancer de la prostate n'est pas un cancer qui se développe de façon spontanée chez la souris, cependant il existe plusieurs modèles de souris transgéniques qui ont pour but son étude [91]. Le faible niveau de pathologies retrouvées dans la prostate des souris sauvages suggère que les lésions observées dans la prostate des souris génétiquement modifiées seraient des conséquences directes de ces manipulations [91]. Certains modèles de souris sont basés sur la transgénèse comme le modèle TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Model) qui exprime l'oncogène SV40 [92]. Alors que d'autres modèles sont basés sur la technologie du «knock out gene» comme les souris PTEN +/-, et les ARKO (androgen receptor Knock out) [91, 93]. Il n'existe cependant aucun modèle de souris génétiquement modifiées pour les UGT2B murins.

Il existe une distinction majeure entre la prostate humaine et murine. La prostate humaine est formée d'un lobe simple entourant l'urètre, alors que la prostate murine est composée de plusieurs lobes distincts (antérieur, dorsolatéral et ventral) [92]. De plus, la prostate humaine et murine contiennent toutes deux trois types de cellules épithéliales (les cellules sécrétrices, les cellules basales, les cellules souches épithéliales) et une petite



population de cellules neuroendocrines, mais leur ratio diffère d'une espèce à l'autre [92]. Ces différences compliquent l'étude du cancer de la prostate fait à partir de modèles murins. Afin de pouvoir transposer chez l'humain les résultats obtenus avec les souris génétiquement modifiées, plusieurs critères de comparaison ont du être identifiés en se référant à l'anatomie et à l'histopathologie des deux espèces [91]. Ainsi, le lobe unique de la prostate humaine a été divisé en trois zones (transitoire, périphérique et centrale) chacune possédant des caractéristiques histologiques distinctes et, le plus important, des prédispositions spécifiques favorisant l'apparition de tumeurs bénignes et malignes [91]. Un travail similaire basé sur la caractérisation histologique des différentes pathologies observées sur les lobes prostatiques de souris sauvages et de souris génétiquement modifiées a aussi été exécuté [91]. Les parallèles établis entre ces travaux permettent d'utiliser plus efficacement la prostate de souris comme modèle dans l'étude du cancer de la prostate [91]. De plus, une attention particulière doit être portée à l'âge de comparaison entre les souris servant de contrôles et celles génétiquement modifiées, ainsi qu'à leur bagage génétique, à eux seuls ces deux critères de comparaisons peuvent représenter une grande source de variabilité [91].

**CHAPITRE II**  
**Hypothèse et objectifs du projet**

## 2.1 Hypothèse et objectifs du projet

Il est clairement démontré que les androgènes, de par leur action directe sur le récepteur des androgènes, jouent un rôle majeur dans le cancer de la prostate, notamment en favorisant la croissance des cellules cancéreuses de la prostate [21]. L'utilisation de perturbations dans le métabolisme des androgènes prostatiques, par exemple un dysfonctionnement de l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase ou un blocage du récepteur des androgènes, ont été trouvés efficaces comme thérapie contre le cancer de la prostate [49, 94]. Le métabolisme des androgènes prostatiques est complexe et finement régulé par une importante cascade enzymatique dans laquelle on retrouve l'UGT2B15 [21]. Par son activité enzymatique et sa localisation dans les cellules luminales de la prostate, l'UGT2B15, contribue directement à l'élimination locale de la DHT et influence la quantité disponible de la DHT capable de se fixer sur le récepteur des androgènes [21]. De plus, avec les récentes études de génotypages qui exposent un lien potentiel entre le risque d'avoir un cancer de la prostate et la présence du variant UGT2B15\*D85 [84-86, 88], il devient raisonnable de considérer l'UGT2B15 comme un joueur sérieux dans le cancer de la prostate. À ce jour, aucune étude *in vivo* portant sur l'UGT2B15 n'a été réalisée faute de posséder un modèle animal adéquat pour ce type de recherche.

Basée sur ces observations, la nécessité de développer un modèle animal pour l'étude de l'UGT2B15 est bien présente et augmentera notre compréhension de son rôle potentiel dans le cancer de la prostate. L'hypothèse avancée par notre laboratoire est que la souris, grâce au génie génétique, représente un excellent modèle animal pour l'étude *in vivo* de l'activité enzymatique de conjugaison de l'UGT2B15 sur les hormones androgènes. Pour développer un tel modèle animal, il est nécessaire de caractériser l'activité enzymatique des sept enzymes Ugt2b retrouvées chez la souris [71]. En effet, l'activité enzymatique de ces enzymes pourrait influencer les résultats obtenus à partir de souris transgéniques, en particulier si l'une des sept enzymes Ugt2b présente une activité enzymatique semblable à celle de l'UGT2B15. De plus, la mise en évidence d'une telle similarité entre l'activité enzymatique de l'UGT2B15 et une enzyme Ugt2b pourra nous amener à faire la création de souris déficiente.

Mon projet de maîtrise a porté sur l'étude de la caractérisation des Ugt2b de souris. L'objectif premier de ce projet était l'identification d'un orthologue murin du gène humain UGT2B15. Pour ce faire, cet objectif fut divisé en trois. Premièrement, il fut question de réaliser le clonage des sept Ugt2b de souris à l'aide d'ADN complémentaire provenant de différents tissus de souris, de la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et du plasmide de clonage pcDNA4. Deuxièmement, grâce aux microsomes protéiques obtenus à la suite de transfections stables du plasmide de clonage pcDNA4 dans des cellules HK-293, il s'agissait de déterminer les caractéristiques enzymatiques de ces protéines en utilisant des essais enzymatiques d'affinité et de vitesse ayant comme substrats les androgènes, les résultats furent analysés par HPLC-MS/MS. Finalement, le dernier sous-objectif de ce projet était de déterminer la distribution tissulaire des protéines Ugt2b. Pour ce faire, la méthode de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, ainsi que divers ADN complémentaires provenant d'une grande variété de tissus mâle et femelle de souris ont été utilisés.

## **CHAPITRE III**

### **Résultats**

## Résumé

Chez l'humain, la formation des androgènes par les enzymes de phase I et l'élimination des stéroïdes par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) sont des mécanismes impliqués dans le control de l'homéostasie des tissus périphériques. L'inactivation des androgènes par l'addition d'un groupement glucuronique est catalysée chez l'humain par trois enzymes majeurs : UGT2B7, 2B15 et 2B17. Chez la souris, la glucuronidation des androgènes est très peu documentée et la caractérisation des 7 enzymes Ugt2b (Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35, 2b36, 2b37 et 2b38) reste à faire. La présente étude porte sur la distribution tissulaire des 7 enzymes Ugt2b et sur la caractérisation de leur activité de glucuronidation sur les androgènes dans les tissus murin (foie, reins et les tissus périphériques). L'ADNc de chacun des Ugt2b murin a été amplifié par PCR à partir d'ARNm de foie de souris puis cloné et transfecté stablement dans des cellules HK-293. Les cellules exprimant individuellement et stablement les Ugt2b ont été utilisées pour déterminer l'activité enzymatique de glucuronidation des Ugt2b sur quatre androgènes majeurs (testostérone, dihydrotestostérone (DHT), androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -Diol (3 $\alpha$ -Diol)), les résultats obtenus furent analysés par HPLC-MS/MS. Nos résultats concernant l'expression de l'ARNm, des niveaux protéiques et des activités enzymatiques de glucuronidation et d'excrétion (par la bile et l'urine) des androgènes démontrent que chez la souris, le foie (mâle et femelle) plutôt que le rein mâle est le site majeur de la glucuronidation des androgènes. La position prédominante de glucuronidation des androgènes dans le foie mâle est la 17 $\beta$ -hydroxy, cela est démontré par la grande présence de Ugt2b1 et Ugt2b5 dans le foie mâle et de leur haute capacité à former respectivement de la DHT-G et du 3 $\alpha$ -Diol-17G. Par ailleurs, seulement les 3 $\alpha$ -hydroxystéroïdes sont glucuronidés dans les reins mâles comme le démontre la formation d'ADT-G et de 3 $\alpha$ -Diol-3G. De plus les enzymes principalement exprimées dans les reins mâles sont Ugt2b37 et Ugt2b38 suggérant que ces enzymes seraient impliquées dans la glucuronidation des androgènes en position 3 $\alpha$ -hydroxy. Finalement, l'expression de l'ARNm de Ugt2b5, les niveaux protéiques Ugt2b et la formation du 3 $\alpha$ -Diol-17G, augmentent durant l'âge allant de 14 à 23 jours et se stabilisent dans la période allant de 23 à 90 jours. Dans le foie murin Ugt2b5 semble être l'enzyme majeur impliqué dans l'inactivation des androgènes en position 17 $\beta$ -hydroxy, de plus Ugt2b5 présente dans son activité et sa spécificité de glucuronidation des androgènes des similarités à l'enzyme humain UGT2B15.

# ANDROGEN GLUCURONIDATION IN MICE: WHEN, WHERE AND HOW.

Olivier Larouche\*<sup>2</sup>, Laurent Grosse\*<sup>1</sup>, Sarah Chouinard<sup>2</sup>, Sophie Pâquet<sup>1</sup>, Josiane Tremblay-Rochette<sup>1</sup>, Kim Journault<sup>1</sup>, Olivier Barbier<sup>1</sup> and Alain Bélanger<sup>2</sup>

\*These authors contributed equally.

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, and <sup>2</sup>Endocrinology and Genomic, CHUQ Research Center and Faculty of Pharmacy, Université Laval, Québec, Canada.

Corresponding authors: Alain Bélanger, Ph.D.,

or Olivier Barbier, Ph. D.,

Laboratory of Endocrinology and Genomic

Laval University Hospital Research Center,

2705 Laurier Boulevard

Québec, Canada, G1V 4G2,

Phone: (418) 654-2296

Fax: (418) 654-2761

Email: [alain.belanger@ap.ulaval.ca](mailto:alain.belanger@ap.ulaval.ca)

[olivier.barbier@pha.ulaval.ca](mailto:olivier.barbier@pha.ulaval.ca)

Running title: Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in mouse.

Keywords: mouse, UDP-glucuronosyltransferase, androgen, androgen metabolism

This article will be published during 2009 in *Journal of Endocrinology*.

## Abstract

In human, formation of androgens by phase I enzymes and elimination of steroids by UDP-glucuronosyltransferases (UGT) are mechanisms implicated in the control of androgen homeostasis in peripheral tissues. Inactivation of androgens by the addition of the glucuronic group is catalysed in human by three major enzymes named UGT2B7, 2B15 and 2B17. In mouse, androgen glucuronidation has been poorly studied and enzymatic characterization of the 7 Ugt2b enzymes (Ugt2b1, 2b5, 2b34-2b38) has never been performed. This study investigated the tissue distribution of these 7 Ugt2b enzymes in addition to the characterization of the androgen-glucuronidating activity in mouse liver, kidney and peripheral tissues. The mouse Ugt2b cDNAs have been PCR-amplified from liver mRNA, cloned and stably transfected into HK293 cells. These Ugt2b-expressing cells were used for glucuronidation activity toward four major androgens (testosterone, dihydrotestosterone (DHT), androsterone (ADT) and androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Diol (3 $\alpha$ -Diol)). Androgen-glucuronidating activities of mouse tissues and stably transfected cells were quantified by HPLC-MS/MS. Our results demonstrated that male and female livers as well as male kidney are the major sites of androgen glucuronidation in mouse as demonstrated by the Ugt2b mRNA expression, Ugt2b protein levels, glucuronidation activities and excretion of androgen-glucuronides by bile and urine. Male liver preferentially glucuronidates 17 $\beta$ -hydroxyl position of androgens and these results are supported by the highest activity of Ugt2b1 and 2b5 for the formation of DHT-G and 3 $\alpha$ -Diol-17G respectively, and by their major presence in male liver. On the other hand, only 3 $\alpha$ -hydroxysteroids are conjugated in male kidney as demonstrated by the formation of ADT-G and 3 $\alpha$ -Diol-3G. In addition, the enzymes mainly expressed in male kidney are Ugt2b37 and 2b38, suggesting that these enzymes are implicated in the glucuronidation of 3 $\alpha$ -hydroxyl position of androgens. Finally, mRNA expression of Ugt2b5 in addition to mouse Ugt2b protein levels and formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G are increased between 14 and 23 days of age to reach stable level between 23 and 90 days old. Ugt2b5 seems to be the major enzyme implicated in the inactivation of 17 $\beta$ -hydroxyl androgens in mouse liver and presents similarities with the human UGT2B15 for its androgen-glucuronidating specificity.



## Introduction

Conjugation by UDP-glucuronosyltransferases (UGT) is characterized by the addition of the glucuronic moiety of the UDP-glucuronic acid (UDPGA) to various endogenous and exogenous compounds to increase their solubility (Dutton 1980). Generally, the glucuronide molecules are inactive and more easily excreted by the bile or urine (Dutton 1980). This reaction represents more than 40% of the detoxification pathway for exogenous compounds and has a major importance for drug pharmacokinetic studies (Evans and Relling 1999). UGT enzymes catalyze glucuronidation of xenobiotics but are also implicated in the inactivation of endogenous molecules as steroid hormones, bile acids and fatty acids (Hum, Belanger et al. 1999; Turgeon, Carrier et al. 2001; Turgeon, Chouinard et al. 2003; Lepine, Bernard et al. 2004; Nagar and Remmel 2006).

Based on the amino acid sequence homology, UGT enzymes have been categorised into two families, UGT1 and UGT2 (Mackenzie, Bock et al. 2005). The UGT1 family members are implicated in the inactivation of various drugs but also catalyzed the inactivation of bilirubin and estrogens (Owens and Ritter 1992; Ritter, Chen et al. 1992; Lepine, Bernard et al. 2004). UGT2 members were classified into two sub-families, UGT2A and UGT2B (Mackenzie, Bock et al. 2005). The first one is predominantly expressed in the olfactory epithelium and is implicated in the inactivation of odorant molecules (Lazard, Zupko et al. 1991; Mackenzie, Bock et al. 2005). Human UGT2B enzymes are encoded by different genes on chromosome 4q13-4q21.1 and inactivate steroid hormones in addition to bile, fatty and retinoic acids (Hum, Belanger et al. 1999; Jude, Little et al. 2001; Jude, Little et al. 2001; Turgeon, Carrier et al. 2001; Little, Williams et al. 2002; Turgeon, Chouinard et al. 2003; Mackenzie, Bock et al. 2005; Trottier, Milkiewicz et al. 2006). Seven UGT2B have been characterized to date, UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17 and 2B28 (Mackenzie, Bock et al. 2005). C19-steroids as testosterone, dihydrotestosterone (DHT), androsterone (ADT) and androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -Diol (3 $\alpha$ -Diol) are preferentially eliminated by UGT2B7, 2B15 and 2B17. Glucuronidation on 3 $\alpha$ -hydroxyl position of ADT and 3 $\alpha$ -Diol is performed by UGT2B7 whereas UGT2B15 is specifically implicated in the addition of glucuronide on position

17 $\beta$ -hydroxyl of testosterone, DHT and 3 $\alpha$ -Diol. In addition to glucuronidation of 17 $\beta$ -hydroxysteroids, UGT2B17 enzyme can also conjugate ADT (Belanger, Pelletier et al. 2003). Human UGT2B enzymes are expressed in the liver, the major site of glucuronidation, but also in extra-hepatic tissues as prostate, breast, skin, testis and adipose tissue (Turgeon, Carrier et al. 2001; Nakamura, Nakajima et al. 2008). Activity of these enzymes in peripheral tissues has been demonstrated by the quantification of androgen-glucuronides in prostate, breast cyst fluid and ovarian follicular fluid (Prevost, Brochu et al. 1987; Belanger, Couture et al. 1990; Belanger, Labrie et al. 1990). These results suggested that glucuronidation activity occurs in peripheral tissues and that androgens can be inactivated locally in target tissues.

The interests of developing an animal model to study the glucuronidation *in vivo* lead the investigators to study laboratory animals as monkey, rat, mouse and dog. Characterization of six UGT2B enzymes in cynomolgus monkey demonstrated a homology in amino acid sequence of 62-92% between human and simian UGT2B (Barbier and Belanger 2003). As for human, simian UGT2B are expressed in liver and peripheral tissues and demonstrated activity toward C19-steroids. In circulation, androgen-glucuronides have been quantified in cynomolgus monkey as in human but a complete absence of androgen-glucuronides has been observed in mouse, rat and dog (Guillemette, Hum et al. 1996; Barbier and Belanger 2003). Administration of androgens to rodents could not allow quantification of androgen-glucuronides in prostate and plasma but presence of glucuronides in bile of rats suggested that inactivation principally occurs in the liver of rodents (Guillemette, Hum et al. 1996). These results suggested that cynomolgus monkey is the best model to study androgen glucuronidation *in vivo* but the possibility to genetically modify mouse animal lead different investigators to study this model.

The mouse Ugt2b sub-family contains seven members named Ugt2b1, 2b5, 2b34-2b38 but only tissue-distribution and some glucuronidating activities have been investigated for these enzymes. These enzymes are expressed in gastro-intestinal tract in addition to liver, kidney, lung, brain, heart, placenta and gonad. The highest Ugt2b expressions have been characterized in liver, kidney and intestinal tract (Buckley and

Klaassen 2007). The Ugt2b5 enzyme has been demonstrated as a glucuronidating enzyme toward testosterone and 3 $\alpha$ -Diol (Kimura and Owens 1987) but no more studies have been done to characterize the activity of these seven mouse Ugt2b enzymes.

This study was aimed to investigate the implication of mouse Ugt2b in the inactivation of androgens by studying the tissue-distribution of these enzymes and by cloning and characterizing liver Ugt2b enzymes. These results demonstrated that all mouse Ugt2b enzymes can conjugate androgens and tissue-distribution of these enzymes correlates with the androgen glucuronidating activity of liver and kidney.

## Materials and methods

### Materials

UDP-glucuronic acid and all aglycons were obtained from Sigma (St.Louis, MO) and ICN Pharmaceuticals, Inc. (Québec, Canada). [<sup>35</sup>S]-methionine was obtained from Perkin Elmer (Waltham, MA). Lipofectin, Zeocin and expression vectors were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Proteins assay reagents were obtained from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Richmond, CA). The Pfu Turbo DNA polymerase was obtained from Stratagene (La Jolla, CA) and the restriction enzymes and other molecular biology reagents were purchased from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN). Human embryonic kidney 293 cells (HK293) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). 3 $\alpha$ -Diol, DHT, ADT, testosterone and DHT-glucuronide (DHT-G) were purchased from Steraloids (Newport, RI). 3 $\alpha$ -Diol-3glucuronide and 3 $\alpha$ -Diol-17glucuronide were provided by the Medicinal Chemistry Division of our laboratory (Chouinard, Pelletier et al. 2006). Ammonium formate was from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI), and high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol was provided by VWR Canlab (Montréal, Québec, Canada).

### Animal experiments and tissue collection

Animal studies were performed in compliance with Guidelines for Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council for Laboratory Animal Care and all experiments were approved by the Animal Care Council of the CHUL research center. To analyze androgen glucuronidation during aging, 3 C57BL/6N male mice at 14, 23, 42, 65 and 90 days and 3 female at 90 days were sacrificed. For the quantification of androgen-glucuronides, 6 male mice of 90 days old were castrated and received buprenorphin on day 0 (operation) and two days later. Seven days after castration, mice received subcutaneous injection of DHT (0.1 mg/mouse) and were sacrificed after 0 minute (3 mice) and 30 minutes (3 mice). At the end of all experiments, mice were anesthetized with isoflurane and blood was collected through cardiac puncture and was added to 50-100  $\mu$ l

of EDTA 100 mM. Plasma was obtained by centrifugation at 10,000g for 5 minutes. Urine and bile were collected and each fluid was pooled together for each group. Tissues were collected and freed from fat connective tissue immediately after death. Tissues were washed in KCl 1.15% and quickly frozen on dry iced. Tissues were kept at -80°C for subsequent RNA and protein isolations.

### **RNA Isolation and Reverse Transcription (RT)**

Total RNA was isolated from mouse mammary gland, ovary, uterus, peri-gonadal adipose tissue, liver, small intestine, kidney, epididymis, bulbo, prostate, testis and seminal vesicle, according to the TriReagent acid:phenol protocol as recommended by the supplier (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH). Thereafter, 1µg of RNA was reverse-transcribed for 50 minutes at 42°C using random hexamer primers (150 ng) and 200 units of Superscript II reverse-transcriptase (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). The reaction was performed into a final volume of 30µL.

### **Real Time PCR analyses**

The mRNA levels of the 7 Ugt2b were quantified through real time PCR experiments, using sets of forward and reverse primers specific for each of Ugt2b1, b5, b34, b35, b36, b37 and b38 (Table 1). The real time PCR reactions were performed using an ABI Prism 7500 instrument from Applied Biosystems (Foster City, CA). For each reaction, the final volume of 20 µL was composed of 10 µL of Sybr Green PCR mix, 2 µL of each primer (Table 1), and 6 µL of a RT product diluted 1/50. Conditions for real time PCR were 95°C for 10 minutes, 95°C for 15 seconds and 60°C (Ugt2b1, 2b34, 2b35, 2b37, 2b38), 56°C (Ugt2b5, 2b36) or 54°C (PPIA) for 60 seconds for 40 cycles. The Ugt2b copy numbers in all tissues were obtained using linear regression with a standard curve encompassing five log concentrations of the Ugt2b plasmids. Integrity of the reverse transcription reaction was also assessed by analyzing mRNA levels of the house keeping

gene PPIA. Specificity of each Ugt2b amplification was ensured by testing PCR strategies with all mouse Ugt2b cDNAs (1.0 ng) and by direct sequencing of PCR products.

### **Murine Ugt2b cDNAs cloning**

Specific forward and reverse primers were elaborated for mouse Ugt2b1, b5, b34, b35, and b36 genes to include the previously reported open reading frames (Table 1). Using bioinformatics (Webcutter 2.0 software, Max Heiman, Yale University, New Haven, CO), NheI and XhoI cloning sites were selected and their DNA sequences were added to the 5'-untranslated extremity of forward and reverse primers respectively (Table 1). The amplification of Ugt2b cDNAs was performed using Pfu Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) with liver cDNA as template. Between 200 and 400 ng of cDNA was used in the following PCR conditions: 95°C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 3 minutes (denaturation at 95°C for 30 seconds, hybridization for 30 seconds at 57°C (Ugt2b1), 54°C (Ugt2b5, 2b35 and 2b36) or 55°C (Ugt2b34) and elongation at 72°C for 2 minutes. PCR products were subsequently purified with the QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and inserted into the pCR®II-TOPO® (Invitrogen) vector, as recommended by the supplier. The plasmids produced were digested with NheI and XhoI and the Ugt2b cDNA fragments were inserted into the corresponding sites into the eukaryotic expression pcDNA4 vector (Invitrogen) by using the Rapid DNA Ligation Kit (Roche).

### ***In vitro* Transcription/translation of Ugt2b cDNAs**

The entire Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35 and 2b36 cDNAs, as well as the UGT2B15 cDNA (positive control) (Levesque, Beaulieu et al. 1997) were transcribed and translated *in vitro* using the T7 RNA polymerase of the transcription/translation-coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega Madison, WI) in the presence of [<sup>35</sup>S]-methionine (Perkin Elmer) for 90 minutes at 30°C. The synthesized polypeptides were resolved on a

10% SDS-polyacrylamide gel and revealed after Hyperfilm-MP exposure (Kodak Corp., Rochester, NY).

### **Stable expression of mouse Ugt2b cDNA:**

Two micrograms of plasmids encoding Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35 and 2b36 were transfected into the UGT-deficient HK293 cells using the Lipofectine reagent (Invitrogen) as recommended by the supplier. Expressing cells were selected for 1 month with Zeocin (32.5 µg/ml; Invitrogen), and cultured in the Dulbecco's modified Eagle medium containing 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 110 µg/ml sodium pyruvate, 100 IU penicillin/ml, 100 µg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. At the end of selection, 20 clones for each Ugt2b-HK293 cell lines were evaluated for their contents of the corresponding Ugt2b proteins by western blot, and clones expressing the highest levels were used in subsequent experiments.

### **Microsome purification and western blot**

Frozen tissues or HK293 cells expressing Ugt2b enzymes were homogenized with a polytron (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY). Microsomal protein purification was performed by differential centrifugations at 12,000 g for 20 minutes and the supernatant was then centrifuged at 105,000 g for 60 minutes. The protein content was determined using the Bradford's reagent (Bio-Rad) and bovine serum albumine for standard curve (Bio-Rad). Samples were aliquoted and kept at -80°C until Western blot analyses and enzymatic assays (see below). Thereafter, 5-30 µg of microsomal proteins were separated by SDS-polyacrylamide (10%) electrophoresis gel, and transferred on a nitrocellulose membrane, and incubated with an anti-UGT2B antibody (EL-93, dilution 1/2000) as previously reported (Levesque, Beaulieu et al. 1997). An anti-rabbit IgG antibody coupled with peroxidase (dilution 1/10000) (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON, Canada) was used as the second antibody, and the resulting

immunocomplexes were detected with ECL (Perkin Elmer) and exposed on a Hyperfilm-TM for 15 seconds (Kodak Corp., Rochester, NY). The relative levels of Ugt2b allozymes were determined by integrated optical density using the BioImage programs visage 110S (Genomic Solution Inc., Ann Arbor, MI).

### **Glucuronidation assay**

*In vitro* glucuronidation assays were performed in the presence of 5 to 40 µg of microsomal proteins or with 40 µg of tissues homogenates. These homogenates were obtained through homogenization using a polytron (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) in PBS buffer and centrifugation at 1000 g for 15 min at 4°C. The protein content was determined by the Bradford method. Proteins were incubated at 37°C for 2 hours in the following assay buffer: Tris-HCL 50mM, pH7.5; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; Saccharolactone 50 mM; phosphatidylcholine 2 mg/ml; Pepstatine 2.5 µg/mL; Leupeptine 0.5 µg/mL and UDP-glucuronic acid 2 mM, in the presence of increasing concentrations (1-200 µM) of substrates (Testosterone, DHT, 3α-Diol and ADT) into a final volume of 100 µL. Assays were ended by the addition of 100 µL of methanol, centrifuged at 14,000 g for 10 minutes and supernatants were collected for glucuronidation analysis.

### **Steroid quantification**

The contents of glucuronide conjugates in glucuronidation assays and biological fluids (bile, plasma and urine) were resolved on high-performance liquid chromatography system consisted of a mass spectrometer (model API 3200; Perkin Elmer/MDS Sciex, Thornhill, ON, Canada). This apparatus is equipped with an electrospray ionization interface in negative or positive ion mode and a high-performance liquid chromatography pump plus autosampler model 1200 series (Agilent, Montréal, QC, Canada). Biological fluids were first added to a solution of water + 1% formic acid and loaded on Strata X columns (Phenomenex, Torrance, CA) for extraction of androgen-glucuronides. Columns were washed with water, and after with methanol:water (30:70) + 1% formic acid and



then androgen-glucuronides were eluted in methanol. Elution solution was evaporated and reconstituted in methanol:water (50:50). Chromatographic separation of biological fluids and enzymatic assays was achieved with a 100 mm x 4.6 mm, 4 µm particle size Synergy Hydro-RP column at a flow rate of 1.0 ml/min (Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase A was water + 1 mM ammonium formate; B was methanol + 1 mM ammonium formate and C was tetrahydrofurane. Separation was achieved using a isocratic condition of 48% A, 48% B and 4% C in 7 min at a flow rate of 0.9 ml/min. Afterward, the column was flushed 1 min with 4% A, 92% B and 4% C and re-equilabrated to initial conditions over 3 min.

### **Statistical analysis**

A nonparametric Student t test was used to analyze significant difference between two groups, by using the JMP V5.0.2 software (SAS Institute, Cary, NC).

## Results

### **Sexual differences in androgen glucuronidation, Ugt2b mRNA expression and protein levels.**

Contribution of liver and extrahepatic tissues in the glucuronidation of androgens was determined by performing enzymatic glucuronidating assays using protein preparations from 3 male (Figure 1A) and 3 female (Figure 1B) adult mice (90 days old). Enzymatic assays were performed by using liver, kidney, small intestine, adipose tissue, prostate, seminal vesicle, testis, bulbo, ovary and uterus proteins with testosterone, DHT, ADT and 3 $\alpha$ -Diol as substrates (100  $\mu$ M). Liver proteins from male and female mice showed activity towards all androgen substrates tested whereas all the other tissues, with the exception of male kidney, were unable to inactivate androgens (Figure 1A and B). Male liver formed 2-fold more testosterone-G, DHT-G and 3 $\alpha$ -Diol-17G compared to female liver but glucuronidation of ADT and 3 $\alpha$ -Diol on position 3 $\alpha$ -hydroxyl was higher in female liver compared to male liver (Figure 1A and B). Moreover, glucuronidation of ADT and 3 $\alpha$ -Diol was relatively low in male liver compared to the formation of testosterone-G and DHT-G (Figure 1A). Male liver proteins formed 50% less glucuronide of 3 $\alpha$ -hydroxyl position of 3 $\alpha$ -Diol compared to 17 $\beta$ -hydroxyl position of this substrate (Figure 1A). When proteins from male kidney were incubated in the presence of androgens, only formation of ADT-G and 3 $\alpha$ -Diol-3G was observed but these glucuronides were formed at a higher level than in liver, demonstrating a differential activity toward hydroxyl position between liver and kidney (Figure 1A). On the other hand, female liver demonstrated similar glucuronidation activity toward ADT, testosterone and DHT with a lower formation of 3 $\alpha$ -Diol-3G and a poor formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G (Figure 1B). Moreover, female kidney was unable to form glucuronides with all the substrates tested, suggesting a strong sexual difference for androgen glucuronidation in this tissue (Figure 1B). Overall, these results suggesting differential expression in Ugt2b enzymes implicated in the glucuronidation of androgens between male and female tissues.

Subsequently, the Ugt2b protein levels were ascertained by performing western blot with microsomal proteins from liver, kidney, small intestine, adipose tissue, testis and uterus with the anti-UGT2B antibody (Figure 1C-E). As previously observed with enzymatic activities, Ugt2b proteins were significantly detected in liver from male and female in addition to male kidney. No Ugt2b proteins were detected in female kidney and in all the other tissues (Figure 1C-E). Furthermore, level of Ugt2b proteins was higher in male liver compared to female one (Figure 1D) and similarly, Ugt2b enzymes were detected in male kidney with no expression in female kidney (Figure 1E).

To further investigate the sexual difference in Ugt2b expression in mice, the mRNA levels of each Ugt2b was quantified in 9 male and 6 female tissues. No expression of the 7 Ugt2b was detected in adipose tissue, prostate, epididymis, bulbo, seminal vesicle, mammary gland, uterus and ovary (Figure 2A), which confirmed the absence of Ugt2b proteins and activities in these tissues (Figure 1A-C). Similarly, high level of Ugt2b mRNA was detected in male and female livers in addition to male kidney (Figure 2A). All Ugt2b mRNA were detected in hepatic tissues and male liver demonstrated higher expression than female liver (Figure 2B). Interestingly, the most abundant Ugt2b enzymes in the male liver are Ugt2b1 and 2b5 with a 600-fold higher expression compared to the lowest abundant enzyme, Ugt2b37 (Figure 2A). In addition to the liver, Ugt2b1, 2b5 and 2b36 are also expressed in the testis but with a 100-fold lower level (Figure 2A). Ugt2b5 presented an expression in small intestine and kidney in the same range as testis (Figure 2A). In addition to the tissue distribution of Ugt2b5, Ugt2b34 is also expressed in female kidney whereas Ugt2b35 showed a specific-hepatic expression (Figure 2A). Finally, Ugt2b37 and 2b38 demonstrated the highest expression in mouse kidney but have a lower expression than Ugt2b1, 2b5, 2b34 and 2b36 in the liver (Figure 2C). The most abundant Ugt2b enzymes in male liver are the Ugt2b1 and 2b5 whereas in female liver, expression of Ugt2b1, 2b5, 2b34 and 2b36 is at a similar level.

Specific high expression of Ugt2b in mouse liver and kidney suggested that only these tissues are responsible for the glucuronidation of androgens. These data suggested that elevated androgen-glucuronides will be present in bile and urine from mice with low level in circulation. Glucuronides formed in liver will be eliminated by the bile whereas

kidney glucuronidation favours elimination through the urine. In human, it has been demonstrated that androgen-glucuronides in circulation reflected the conjugation activity in peripheral tissues, suggesting that absence of Ugt2b enzymes in mouse peripheral tissues will result in an absence of glucuronide in plasma. To test this hypothesis, castration of male mice was executed to remove endogenous source of androgens and seven days after, administration of DHT by sub-cutaneous injections was performed. Thirty minutes after injection, biological fluids were collected and androgen-glucuronides were quantified. Whereas androgen glucuronides were absent from plasma of all animals, administration of DHT in castrated mice resulted in the appearance of 74.1 ng/ml of 3 $\alpha$ -DIOL-17G in bile, and of 9.5 ng/ml of 3 $\alpha$ -DIOL-17G in urine (Table 2). These observations confirm the major role that liver and kidney exerts on androgen metabolism in mice.

#### **Characterization of the androgen-conjugating activity of the hepatic mouse Ugt2b enzymes**

To ensure that the 5 hepatic Ugt2b cDNAs cloned in the pcDNA4 vector encoded the predicted Ugt2b proteins, *in vitro* transcription by the T7 polymerase and translation by rabbit reticulocyte lysates were performed for these 5 Ugt2b in addition to human UGT2B15 plasmid as positive control (Figure 3C). The resultant Ugt2b proteins had apparent molecular masses of 50-55 kDa and were similar to human UGT2B15 proteins (Figure 3C).

To further characterize the glucuronidation activity of these 5 Ugt2b proteins, HK293 cells were stably transfected with the Ugt2b cDNAs and cell lines expressing Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35 and 2b36 were established. Microsomal proteins of each cell line were separated on polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membrane and revealed with an anti-UGT2B antibody. As observed for *in vitro* transcription/translation assays, Ugt2b proteins resulting of the transfection of HK293 cells demonstrated molecular masses of 50-55 kDa (Figure 4A). To determine specificity of substrates of the hepatic Ugt2b enzymes toward androgens, microsomal proteins were extracted from stably transfected HK293 cells and glucuronidating enzymatic assays were performed by incubation with testosterone, ADT, DHT and 3 $\alpha$ -Diol (Figure 4B). As previously

demonstrated, mouse liver microsomes are able to form glucuronides of each of these four substrates. Glucuronidation rates observed in the presence of each Ugt2b clone were subsequently normalized by Ugt2b protein levels quantified by optical density of the western blot experiment (Figure 4A).

Ugt2b1 conjugates testosterone and 17 $\beta$ -hydroxyl position of 3 $\alpha$ -Diol and was the most efficient enzyme for the inactivation of DHT. Ugt2b5 demonstrated glucuronidation activity for all androgen metabolites tested, with a major activity for the formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G. Low glucuronidation activity toward androgens was observed in the presence of Ugt2b34 protein but this enzyme was specific for inactivation of 17 $\beta$ -hydroxyl position of DHT and 3 $\alpha$ -Diol. On the other hand, Ugt2b35 demonstrated ability to form 3 $\alpha$ -Diol-3G whereas Ugt2b36 glucuronidated only testosterone at low level (Figure 4B). Ugt2b1 presented the highest efficiency for the inactivation of DHT whereas Ugt2b5 demonstrated the largest substrate specificity for androgen with the most efficient capacity to form 3 $\alpha$ -Diol-17G. Furthermore, the high level in the formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G by Ugt2b5 suggested similar activity to human UGT2B15 (Turgeon, Carrier et al. 2001). Thus, we next intended to further characterize the kinetic parameters of Ugt2b5 glucuronidation activity toward androgens (Figure 5). These kinetic parameters for glucuronidation activity were evaluated by incubation of microsomal proteins from Ugt2b5-HK293 cells with increasing concentrations (1-200  $\mu$ M) of testosterone, ADT, DHT and 3 $\alpha$ -Diol (Figure 5A-E). The lowest affinity of the Ugt2b5 enzyme toward androgens was obtained for testosterone whereas the other tested androgens presented  $K_m$  value between 30 and 39  $\mu$ M (Figure 5F). As expected, the highest glucuronidation efficiency ( $V_{max}/K_m$ ) was obtained for the formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G and testosterone, whereas glucuronidation of other substrates is less efficient.

### **Expression and activity of Ugt2b5 during aging**

In human, androgen glucuronidation is increased at the puberty (Brochu and Belanger 1987) and to determine if hepatic androgen glucuronidation in mice sustains same variations, we have analyzed the level of Ugt2b5 mRNA in mice liver at 14, 23, 42, 65 and 90 days of age. Expression was significantly lower in young mice (14 days old)

and Ugt2b5 expression is increased between 14 and 23 days to reach a constant expression between 23 and 90 days (Figure 6A). Interestingly, formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G by liver microsomes followed a similar pattern as Ugt2b5 mRNA expression during mouse maturation (Figure 6B). Finally, we also observed the same tendency in the Ugt2b protein expression using an anti-UGT2B antibody (Figure 6C). Overall, these observations indicated that Ugt2b5 expression and activity increase between birth and 23 days old which represented mouse weaning period.

## Discussion

In the present study, the expression and the characterization of 5 Ugt2b toward glucuronidation of androgens have been investigated. Data demonstrated that the liver is the major site of inactivation, with the highest androgen glucuronide level quantified in the bile, whereas kidney glucuronidation results in a significant excretion of androgen-glucuronides in the urine. Characterization of enzymatic activities of mouse Ugt2b toward androgens demonstrated that Ugt2b5 is an important inactivating enzyme and its activity showed similar identities to human UGT2B15 activity.

Quantification of Ugt2b proteins and Ugt2b mRNA levels in addition to androgen glucuronidation activity revealed an important sexual difference in mouse liver and kidney. Ugt2b enzymes are expressed at a higher level in male tissues compared to female. In male liver, predominance for the inactivation of testosterone and DHT was observed, suggesting the importance to have a fine regulation of these two metabolites in male mouse. By contrast, glucuronidation activity in female liver is in a similar range between ADT, testosterone, DHT and 3 $\alpha$ -Diol. Sexual differences in rodents have been previously demonstrated for the glucuronidation of morphine (Baker and Ratka 2002) and p-nitrophenol (Conte, Figalgo-Neto et al. 2007). First of all, glucuronidation of p-nitrophenol is higher in male liver of Swiss Webster mice compared to female liver (Conte, Figalgo-Neto et al. 2007) but glucuronidation activity in female rat liver is superior for the morphine compared to male liver (Baker and Ratka 2002). These results suggested sexual differences in liver glucuronidation activity which are influenced by substrates and by animals used. Further investigations of estrogen glucuronidation by male and female livers had been performed to assess the importance of estrogen elimination in female liver compare to male liver. On the other hand, formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G is 2-fold higher in male liver compared to female one but we observed the inverse relation for the formation of 3 $\alpha$ -Diol-3G. These results suggested a differential expression of enzymes implicated in the glucuronidation of 17 $\beta$ - and 3 $\alpha$ -hydroxyl positions of 3 $\alpha$ -Diol between male and female livers. Finally, only male kidney is able to form glucuronide and the interesting fact is that compared to male liver, kidney formed

preferentially ADT-G and 3 $\alpha$ -Diol-3G, suggesting a differential expression of enzymes implicated in these activities between liver and kidney.

Study of the mRNA expression and of the substrate specificity demonstrated that Ugt2b1 and 2b5 are the predominant enzymes expressed in male liver and these enzymes are the major ones for the formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G, testosterone-G and DHT-G. These data confirm the higher glucuronidation rates of testosterone and DHT in male liver compared to the other androgen metabolites but also in comparison to female liver. Ugt2b5 is also the predominant enzyme for the formation of 3 $\alpha$ -Diol-17G and this enzyme is more expressed in male than in female liver but Ugt2b5 is also more present in male liver than Ugt2b35, the major enzyme for the formation of 3 $\alpha$ -Diol-3G. In female liver, expressions of Ugt2b1, 2b5, 2b34 and 2b36 are in a similar range and enzymatic assays demonstrated that these Ugt2b are mainly implicated in the formation of ADT-G, testosterone-G and DHT-G. The expression level of Ugt2b1, 2b5, 2b34 and 2b36 resulted in a similar amount of ADT, testosterone and DHT glucuronides formed in this tissue. Enzymatic assays demonstrated that Ugt2b1 and 2b5 preferentially glucuronidate 17 $\beta$ -hydroxyl position of androgens whereas other isoforms as Ugt2b35, 2b37 and 2b38 probably demonstrated a stronger formation of glucuronides on position 3 $\alpha$ -hydroxyl of ADT and 3 $\alpha$ -Diol. Predominant expression of Ugt2b37 and 2b38 in kidney and preferential formation of ADT-G and 3 $\alpha$ -Diol-3G in this tissue suggested that these enzymes are implicated in the conjugation on position 3 $\alpha$ -hydroxyl of C19-steroids.

Interestingly, a recent study also suggested a high expression of Ugt2b37 and 2b38 isoforms in the kidney (Buckley and Klaassen 2007). However, the use of common strategy for the quantification of Ugt2b5, 2b37 and 2b38 impaired these authors to observe the lower expression level of Ugt2b37 and 2b38 in the liver compared to Ugt2b5. These 3 enzymes shared more than 90% homology both in nucleic and amino acid sequences, render generation of specific primer sets for PCR amplification very difficult. All together, these 7 mouse Ugt2b enzymes shared more than 63% homology in amino acid sequences whereas Ugt2b1 and 2b34 presented the lower affinity with the other member of this sub-family. The high homology between Ugt2b5, 2b37 and 2b38 suggested that these enzymes probably share similar glucuronidation activities. However,



as demonstrated above, data suggested that Ugt2b5 is mainly implicated in the addition of glucuronide on position 17 $\beta$ -hydroxyl of androgens whereas Ugt2b37 and 2b38 might be implicated in the glucuronidation on position 3 $\alpha$ -hydroxyl. So these enzymes display significantly different stereospecificities of substrates, at least for 3 $\alpha$ -Diol and ADT glucuronidation. While further investigations have to be performed to compare the activity of Ugt2b5 enzyme with Ugt2b37 and 2b38, such a likely difference in substrate specificities for highly homologous enzymes is not surprising. Indeed, human UGT2B15 and 2B17 also share 97% homology while displaying differences in ADT, etiocholanolone and various xenobiotics glucuronidation (Green, Otoru et al. 1994; Turgeon, Carrier et al. 2001; Turgeon, Carrier et al. 2003). In addition, a study implicating change of a single amino-acid inversion within the UGT2B15 and 2B17 enzymes can strongly affect the stereospecificity of androgen glucuronidation of these 2 enzymes (Dubois, Beaulieu et al. 1999). Also, the specificity of Ugt2b1 for the 17 $\beta$ -hydroxyl position of androgens is consistent with data from rat because this rat enzyme is also mainly implicated in the inactivation of 17 $\beta$ -hydroxysteroids (Green, Clarke et al. 1995). On the other hand, the high efficiency in the formation of testosterone-G and 3 $\alpha$ -Diol-17G obtained with Ugt2b5-HK293 cells confirmed the capacity of this enzyme to conjugate 17 $\beta$ -hydroxysteroids as previously reported (Kimura and Owens 1987). With its ability to conjugate the 17 $\beta$ -hydroxyl position of 3 $\alpha$ -Diol, DHT and testosterone, Ugt2b5 presents a similar glucuronidating-activity as the human UGT2B15 enzyme (Turgeon, Carrier et al. 2001; Belanger, Pelletier et al. 2003; Chouinard, Pelletier et al. 2006). The mouse Ugt2b5 shared a higher homology in amino acid sequence with UGT2B15 (68%) and 2B17 (69%) compared to the other UGT2B enzymes. These data suggested that Ugt2b5 could be a major enzyme in the elimination of androgen in mouse liver.

This study supported the idea that inactivation of androgen in mice is mainly performed by the glucuronidation in liver and kidney for a subsequent elimination of the glucuronidated hormones into bile or urine, respectively. By contrast, and accordingly with previous reports (Guillemette, Hum et al. 1996), no androgen-glucuronide were detected in circulation. In addition, no mRNA expression and no glucuronidation activity was observed in mouse androgen-target tissues (testis, prostate, epididymis, bulbo, seminal vesicle, adipose tissue, uterus and ovary), suggesting that liver and kidney are the major tissues for the elimination of androgens. Our results demonstrated that

administration of DHT in castrated male mice resulted in the elimination of 3 $\alpha$ -Diol-17G in bile and urine of these mice without presence of glucuronide in circulation. These observations suggested that elimination of androgens is different between rodents and humans. As previously demonstrated in human, circulating androgen-glucuronides are influenced by the level of androgens and precursors in circulation, but are also highly linked to the glucuronidation activity in peripheral tissues (Belanger, Brochu et al. 1986; Belanger, Brochu et al. 1986; Brochu and Belanger 1987; Brochu, Belanger et al. 1987; Belanger, Candas et al. 1994). However, androgen glucuronidation also takes place at high level in the human liver, and this conjugation pathway is of major importance in the control of androgen level (Rittmaster 1993). Thus, this suggests that elimination of androgens through glucuronidation exists in all mammalian species. In human, it is accepted that target tissues are involved in the elimination of androgen as well as liver and kidney, but the glucuronidation of androgens in mouse only occurs in liver in addition to kidney.

Finally, our results demonstrated that Ugt2b5 mRNA, Ugt2b protein levels and 3 $\alpha$ -Diol-17G production increase between 14 and 23 days of age and remain stable until 90 days of age (the end of the experiments). These observations suggest that the expression and activity of this androgen-conjugating enzyme are low at birth and increase during maturation of mice to reach a maximum in young adult and then remain stable. Interestingly, it was previously reported that plasma levels of androgen-glucuronides in men follow a similar increase during sexual maturation (Brochu and Belanger 1987). First of all, UGT1A1 presented a lower expression level at birth compared to adult level but this expression increased rapidly to reach adult level 3 to 6 months after birth. Also, UGT1A3 activity is present at 30% of the adult level immediately after birth whereas UGT2B7 and 2B17 activities represent 10-20% of adult level at birth and all of these enzymes reach the adult level at childhood (McCarver and Ronald 2002). In mouse, p-nitrophenol glucuronidation activity is present in foetal liver and at birth, represents 60% of the adult level (Chauhan, Millers et al. 1991). Thus, the observation that Ugt2b5 expression and activity increase between 14 and 23 days could suggest that 1) this gene is regulated by hormonal factors to control androgen homeostasis or 2) this gene is influenced by exogenous components of solid food, because young mice are separated from their mother at 21 days. Further investigations using modulation of hormone levels

or using different solid food will allow to determine the impact of each of these components on Ugt2b5 expression and activity.

The present study demonstrates that hepatic glucuronidation and the subsequent elimination through the bile is the major elimination pathway for androgens in mice. We demonstrated that Ugt2b1 is the major enzyme implicated in the glucuronidation of DHT whereas Ugt2b5, by this specificity of substrates toward  $17\beta$ -hydroxysteroid, has a glucuronidation activity similar to human UGT2B15. Before 14 days of age, we observed partial Ugt2b5 expression and activity levels compared to adult but these parameters reach adult levels at 23 days of age. Finally, future investigations will have to be performed to determine specificity of substrates for mouse Ugt2b37 and 2b38 in addition to endogenous or exogenous factors implicated in the stimulation of Ugt2b5 during maturation.

## References

- Baker, L. and A. Ratka (2002). "Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats." Pain **95**: 65-74.
- Barbier, O. and A. Belanger (2003). "The cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) is the best animal model for the study of steroid glucuronidation." J Steroid Biochem Mol Biol **85**(2-5): 235-45.
- Belanger, A., M. Brochu, et al. (1986). "Levels of plasma steroid glucuronides in intact and castrated men with prostatic cancer." J Clin Endocrinol Metab **62**(5): 812-5.
- Belanger, A., M. Brochu, et al. (1986). "Plasma levels of steroid glucuronides in prepubertal, adult and elderly men." J Steroid Biochem **24**(5): 1069-72.
- Belanger, A., B. Candas, et al. (1994). "Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men." J Clin Endocrinol Metab **79**(4): 1086-90.
- Belanger, A., J. Couture, et al. (1990). "Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns." Ann N Y Acad Sci **595**: 251-9.
- Belanger, A., F. Labrie, et al. (1990). "Unconjugated and glucuronide steroid levels in human breast cyst fluid." Ann N Y Acad Sci **586**: 93-100.
- Belanger, A., G. Pelletier, et al. (2003). "Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans." Trends Endocrinol Metab **14**(10): 473-9.
- Brochu, M. and A. Belanger (1987). "Increase in plasma steroid glucuronide levels in men from infancy to adulthood." J Clin Endocrinol Metab **64**(6): 1283-7.
- Brochu, M., A. Belanger, et al. (1987). "Plasma levels of C-19 steroids and 5 alpha-reduced steroid glucuronides in hyperandrogenic and idiopathic hirsute women." Fertil Steril **48**(6): 948-53.
- Buckley, D. B. and C. D. Klaassen (2007). "Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice." Drug Metab Dispos **35**(1): 121-7.
- Chauhan, D. P., M. S. Millers, et al. (1991). "Gene expression, ontogeny and transplacental induction of hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity in mice." Dev Pharmacol Ther **16**(3): 139-149.
- Chouinard, S., G. Pelletier, et al. (2006). "Isoform-specific regulation of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B enzymes in the human prostate: differential consequences for androgen and bioactive lipid inactivation." Endocrinology **147**(11): 5431-42.
- Conte, F. P., A. A. Figalco-Neto, et al. (2007). "Activity of liver microsomal enzymes during the chronic phase of murine schistosomiasis." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **40**: 657-662.
- Dubois, S. G., M. Beaulieu, et al. (1999). "Alteration of human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B17 regio-specificity by a single amino acid substitution." J Mol Biol **289**(1): 29-39.
- Dutton, G. J. (1980). "Glucuronidation of drugs and other compounds." CRC Press.
- Evans, W. E. and M. V. Relling (1999). "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." Science **286**(5439): 487-91.
- Green, M. D., D. J. Clarke, et al. (1995). "Cloning and expression of a rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferase (2B12) with specificity for monoterpenoid alcohols." Arch Biochem Biophys **322**: 460-468.

Green, M. D., E. M. Oturu, et al. (1994). "Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates." Drug Metab Dispos **22**(5): 799-805.

Guillemette, C., D. W. Hum, et al. (1996). "Levels of plasma C19 steroids and 5 $\alpha$ -reduced C19 steroid glucuronides in primates, rodents, and domestic animals." Am J Physiol **271**: 348-353.

Hum, D. W., A. Belanger, et al. (1999). "Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones." J Steroid Biochem Mol Biol **69**(1-6): 413-23.

Jude, A. R., J. M. Little, et al. (2001). "13-hydroxy- and 13-oxooctadecadienoic acids: novel substrates for human UDP-glucuronosyltransferases." Drug Metab Dispos **29**(5): 652-5.

Jude, A. R., J. M. Little, et al. (2001). "Glucuronidation of linoleic acid diols by human microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases: identification of UGT2B7 as the major isoform involved." Arch Biochem Biophys **389**(2): 176-86.

Kimura, T. and I. S. Owens (1987). "Mouse UDP glucuronosyltransferase. cDNA and complete amino acid sequence and regulation." Eur J Biochem **168**(3): 515-21.

Lazard, D., K. Zupko, et al. (1991). "Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase." Nature **349**(6312): 790-3.

Lepine, J., O. Bernard, et al. (2004). "Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5222-32.

Levesque, E., M. Beaulieu, et al. (1997). "Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene." Pharmacogenetics **7**(4): 317-25.

Little, J. M., L. Williams, et al. (2002). "Glucuronidation of the dietary fatty acids, phytanic acid and docosahexaenoic acid, by human UDP-glucuronosyltransferases." Drug Metab Dispos **30**(5): 531-3.

Mackenzie, P. I., K. W. Bock, et al. (2005). "Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily." Pharmacogenet Genomics **15**(10): 677-85.

McCarver, G. D. and H. N. Ronald (2002). "The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **300**(2): 361-366.

Nagar, S. and R. P. Remmel (2006). "Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer." Oncogene **25**(11): 1659-72.

Nakamura, A., M. Nakajima, et al. (2008). "Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines." Drug Metab Dispos.

Owens, I. S. and J. K. Ritter (1992). "The novel bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase UGT1 gene locus: implications for multiple nonhemolytic familial hyperbilirubinemia phenotypes." Pharmacogenetics **2**(3): 93-108.

Prevost, J., M. Brochu, et al. (1987). "Conjugated and unconjugated C-21, C-19 and C-18 steroid concentrations in human follicular fluid from hyperstimulated follicles." Gynecol Endocrinol **1**(4): 331-8.

Ritter, J. K., F. Chen, et al. (1992). "A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini." J Biol Chem **267**(5): 3257-61.

Rittmaster, R. S. (1993). "Androgen conjugates: physiology and clinical significance." Endocr Rev **14**(1): 121-32.

- Trottier, J., P. Milkiewicz, et al. (2006). "Coordinate regulation of hepatic bile acid oxidation and conjugation by nuclear receptors." Mol Pharm **3**(3): 212-22.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, et al. (2003). "Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics." Drug Metab Dispos **31**(5): 670-6.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, et al. (2001). "Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members." Endocrinology **142**(2): 778-87.
- Turgeon, D., S. Chouinard, et al. (2003). "Glucuronidation of arachidonic and linoleic acid metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases." J Lipid Res **44**(6): 1182-91.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-64273) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Sarah Chouinard is holder of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research. Olivier Barbier is granted by the Health Research Foundation of Rx&D-CIHR.

We thank Patrick Caron for their technical assistances with liquid chromatography.



## Figure legends

### *Figure 1: Tissue distribution of Ugt2b proteins and glucuronidation activity in male and female mice*

(A & B) Glucuronidation assays were performed with homogenates (40 µg) of male (A) and female (B) mouse tissues in the presence of 50 µM of androgens for 2 hours. Assays were performed in triplicates with tissues from 3 animals. The formation of androgen-glucuronides was quantified by LC-MS/MS analyses.

(C-E) Western blot experiments using 10% SDS poly-acrylamide gel and the anti-UGT2B antibody (EL-93, 1/2000) were performed with 40µg of proteins from adult male and female homogenates from liver, kidney, small intestine, adipose tissue, testis and uterus (C) or 10 µg of microsomal protein from male and female liver (D) or kidney (E).

### *Figure 2: Tissue distribution of mouse Ugt2b transcripts*

Total mRNA from mouse (n=3) tissues: liver (A & B), kidney (A & C), small intestine, adipose tissues, prostate, epididymis, bulbo, seminal vesicle, uterus and ovary (A) were extracted, reverse-transcribed and analyzed for the expression of the 7 Ugt2b enzymes using real time PCR analyses. The Ugt2b copy numbers in all tissues were obtained using linear regression with a standard curve that included five log concentrations of the Ugt2b plasmids. Experiments were performed in triplicate. SI, small intestine; AT, adipose tissue; SV, seminal vesicle; MG, mammary gland. ND: not detected.

### *Figure 3: Cloning and characterization of hepatic Ugt2b enzymes from mice.*

A) Homology between each member of mouse Ugt2b sub-family was calculated for C-terminus (1-290 amino acids); N-terminus (291-end amino acids) and total protein sequences. Homology values > 90% are represented in **bold**.



**B)** Complete protein homology between mouse and human UGT2B proteins. Percentages of Ugt2b5 homology with human UGT2B protein are in **bold**.

**C)** Transcription/translation *in vitro* of Ugt2b expressed in the mouse liver (Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35 and 2b36) were performed in the presence of [<sup>35</sup>S]-methionine as detailed in the Material and Methods section, and the radiolabeled proteins were size-separated on 10% SDS polyacrylamide gel.

**Figure 4: Stable expression of the hepatic Ugt2bs and analyses of their androgen glucuronidation activity.**

**A)** Microsomal proteins from human liver (5 µg), mouse liver (5 µg) and HK293 cells expressing or not the mouse Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35 and 2b36 or the human UGT2B15 enzyme (40 µg) were size separated on 10% SDS polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membranes and hybridized with the anti-UGT2B antibody (EL-93; 1/2000).

**B)** Enzymatic activities were performed for 2 hours with microsomal proteins (40 µg) from mouse liver, Ugt2b1, 2b5, 2b34, 2b35 and 2b35 in the presence of 50 µM of the different aglycones: ADT, DHT, testosterone and 3α-Diol. Glucuronides were separated and quantified by LC-MS/MS analyses. Enzymatic assays were performed 2 times in triplicate. BLQ: below limit of quantification; nd: not detected.

**Figure 5: Kinetic analysis of androgen glucuronidation by the mouse Ugt2b5 enzyme**

Enzymatic assays were performed for 2 hours with 40 µg of Ugt2b5 microsomal proteins in the presence of increasing concentrations (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µM) of aglycones: ADT (**A**), DHT (**B**), Testosterone (**C**) and 3α-Diol (**D & E**). Velocities for glucuronide formation were calculated and kinetic parameters (Km, Apparent Vmax and enzymatic efficiencies (Km/Vmax)) were estimated using the Sigma Plot software (**F**). The data shown (1 experiment) are representative of the analyses performed twice in triplicates.

***Figure 6: Ugt2b5 mRNA expression, 3 $\alpha$ -Diol-17G formation and mouse Ugt2b protein levels vary during aging and castration.***

Liver from male mice at 14, 23, 42, 65 and 90 days of age were analyzed for Ugt2b5 mRNA levels (**A**), 3 $\alpha$ -Diol-17G production (**B**) and Ugt2b protein levels (**C**).

**A)** Total mRNA from mouse (n=3) liver was extracted, reverse-transcribed and analyzed for the expression of the Ugt2b5 enzyme using real time PCR. The copy numbers were obtained using linear regression with a standard curve that included five log concentrations of the Ugt2b5 plasmid.

**B)** Enzymatic activities were performed for 2 hours with microsomal proteins (5  $\mu$ g) from mouse liver (n=3) in the presence of 100  $\mu$ M 3 $\alpha$ -Diol. The 3 $\alpha$ -Diol-17G formed was quantified by LC-MS/MS. Enzymatic assays were performed twice in triplicate.

**C)** Five micrograms of liver microsomes were separated on 10% SDS poly-acrylamide gel, transferred onto nitro-cellulose membranes and hybridized with the anti-UGT2B antibody (EL-93; 1/2000).

Statistical analyses, Student T test. \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

## Tables and figures

**Table 1: Primer sequences for cloning and real time PCR analyses of mouse *Ugt2b*.**

Cloning primers		
Ugt2b1	Forward: 5'-GCAAGATGTCTATGAAACAGG-3' Reverse: 5'-AGACAACAGGTTTCTGCTGGAAGCA-3'	
Ugt2b5	Forward: 5'-CTAGGCTAGCAGCAAATGGACTGTGAGAGAAGGAT-3' Reverse: 5'-TCGACTCGAGAGGCTGAAAGTTTGTTCATGTAGTT-3'	
Ugt2b34	Forward: 5'-CTAGGCTAGCGGAAGGCAGGCCTGAAGTTAACCAA-3' Reverse: 5'-TCGACTCGAGGACCATGTGTCAGTCTTCCCCAGTT-3'	
Ugt2b35	Forward: 5'-CTAGGCTAGCACACAGTTAACAGAAGCCCTTTGAC-3' Reverse: 5'-TCGACTCGAGGATAAAGTCATCATTGAATGC-3'	
Ugt2b36	Forward: 5'-CTAGGCTAGCCACTCTGAAGAGAAGAACA-3' Reverse: 5'-TCGACTCGAGATGCATTATCAATGAGT-3'	
Real Time PCR primers		
	Primer forward	Primer reverse
PPIA	5'-TCCTGGCATCTTGTCATG-3'	5'-CATCCAGCCATTCAGTCTTG-3'
Ugt2b1	5'-TATGTTGCAGGTGTTGCT-3'	5'-GTCCCAGAAGGTTCCGAAC-3'
Ugt2b5	5'-GGGACTCATTTTACAGTGAG-3'	5'-CATGTTACTAACCATTGACC-3'
Ugt2b34	5'-AGCCCCTGCCTAAGGAAATA-3'	5'-GAGTGTGGAGCCCAATGTC-3'
Ugt2b35	5'-CCAGACATTTACAGAGAAGG-3'	5'-CTGTCATGTTACTGACCATC-3'
Ugt2b36	5'-TTGTTACAGAGCTCTGGAGAG-3'	5'-GATGACCAAGAAGATCATT-3'
Ugt2b37	5'-ATTTGGAGTTTCCTCACCCGA-3'	5'-TAGATTGCCTCATAGACACTG-3'
Ugt2b38	5'-GCAACTTTAGGACACAATACG-3'	5'-ACTTCCTCCAGTGCATTGAGT-3'

**Table 2: Quantification of 3 $\alpha$ -Diol-17G in castrated male mice after sub-cutaneous injection of DHT (0.1 mg).**

Time after injection (min)	Plasma (ng/ml)	Bile (ng/ml)	Urine (ng/ml)
30	ND	74.1	9.5

Figure 1

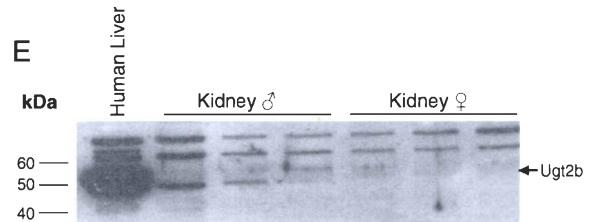
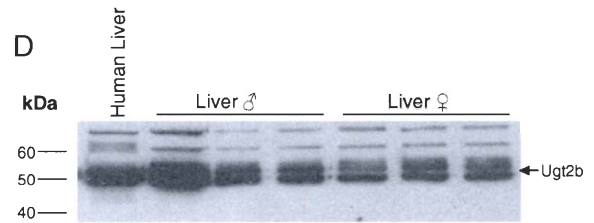
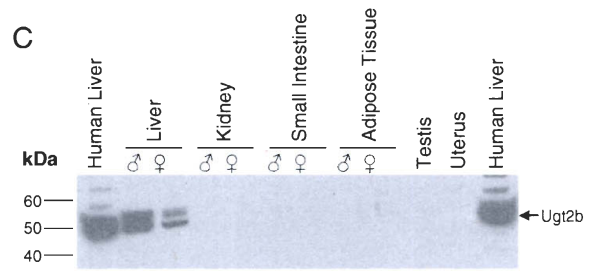
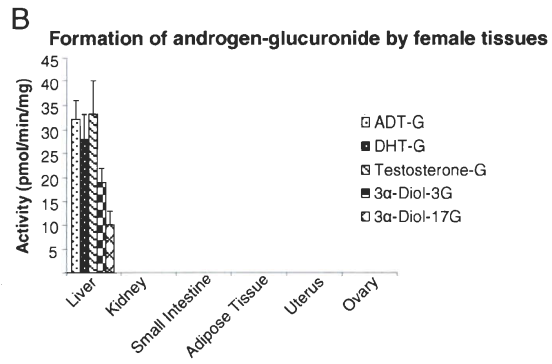
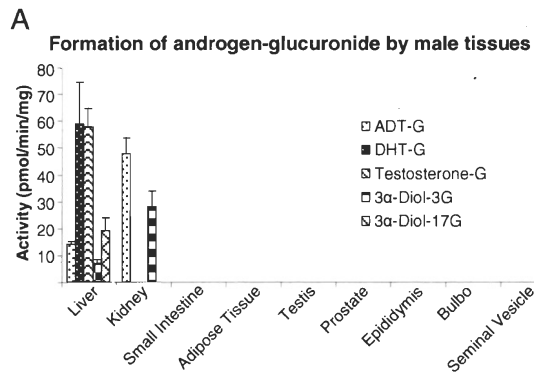


Figure 2

**A**

Tissues	Ugt2b1 Copies/ug RNA	Ugt2b5 Copies/ug RNA	Ugt2b34 Copies/ug RNA	Ugt2b35 Copies/ug RNA	Ugt2b36 Copies/ug RNA	Ugt2b37 Copies/ug RNA	Ugt2b38 Copies/ug RNA	
♂	Liver	3.61E+05 ± 2.00E+04	3.54E+05 ± 1.51E+04	1.52E+05 ± 2.64E+04	1.95E+04 ± 2.56E+03	1.43E+05 ± 3.23E+04	5.91E+02 ± 3.13E+01	2.66E+03 ± 3.39E+02
	Kidney	ND	6.65E+03 ± 2.01E+02	6.96E+03 ± 2.31E+02	ND	ND	3.16E+04 ± 9.88E+03	1.21E+05 ± 8.03E+03
	SI	ND	1.54E+03 ± 3.65E+02	1.59E+02 ± 5.96E+01	ND	ND	ND	ND
	AT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Testis	6.22E+02 ± 5.74E+01	3.66E+03 ± 4.85E+02	1.40E+03 ± 8.60E+01	ND	1.49E+03 ± 2.88E+02	ND	ND
	Prostate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Epididymis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Bulbo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	SV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	♀	Liver	4.26E+04 ± 1.06E+04	5.72E+04 ± 9.31E+02	7.54E+04 ± 8.28E+03	6.20E+03 ± 8.86E+02	6.89E+04 ± 2.96E+04	5.41E+02 ± 2.20E+02
Kidney		ND	ND	1.98E+02 ± 5.63E+01	ND	ND	ND	6.09E+01 ± 1.48E+01
SI		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MG		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Uterus		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ovary		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

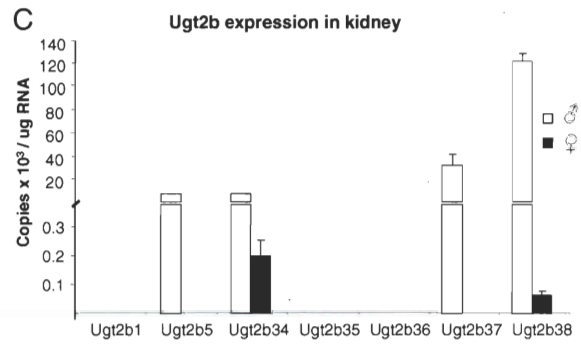
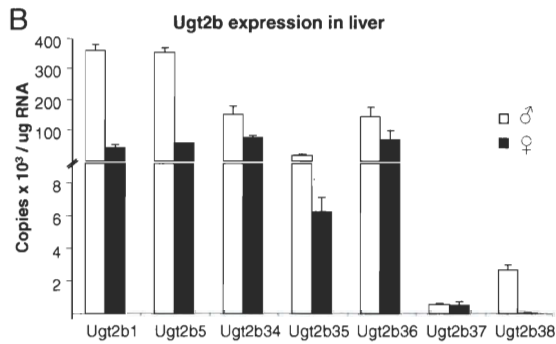


Figure 3

A) Mouse Ugt2b

	<i>b5</i>			<i>b34</i>			<i>b35</i>			<i>b36</i>			<i>b37</i>			<i>b38</i>		
	N-T	C-T identity %	Overall	N-T	C-T identity %	Overall	N-T	C-T identity %	Overall	N-T	C-T identity %	Overall	N-T	C-T identity %	Overall	N-T	C-T identity %	Overall
<i>b1</i>	58	74	65	60	<b>82</b>	70	59	71	65	60	74	66	56	71	63	59	72	64
<i>b5</i>				59	68	63	<b>81</b>	<b>85</b>	<b>83</b>	<b>81</b>	<b>88</b>	<b>84</b>	<b>91</b>	<b>93</b>	<b>92</b>	<b>99</b>	<b>94</b>	<b>97</b>
<i>b34</i>							57	69	63	60	70	65	57	67	62	59	66	62
<i>b35</i>										<b>81</b>	<b>89</b>	<b>84</b>	77	<b>83</b>	<b>80</b>	<b>81</b>	<b>82</b>	<b>82</b>
<i>b36</i>													78	<b>88</b>	<b>83</b>	<b>82</b>	<b>86</b>	<b>84</b>
<i>b37</i>																<b>91</b>	<b>92</b>	<b>91</b>

B) Human UGT2B

	<b>B4</b>	<b>B7</b>	<b>B10</b>	<b>B11</b>	<b>B15</b>	<b>B17</b>	<b>B28</b>
	%	%	%	%	%	%	%
<b>b1</b>	71	71	71	70	71	71	68
<b>b5</b>	<b>67</b>	<b>66</b>	<b>64</b>	<b>64</b>	<b>68</b>	<b>69</b>	<b>63</b>
<b>b34</b>	70	69	69	68	69	70	67
<b>b35</b>	67	67	65	64	69	69	63
<b>b36</b>	68	67	66	66	70	70	65
<b>b37</b>	65	65	63	63	67	67	62
<b>b38</b>	66	66	64	64	67	68	63

C) TNT

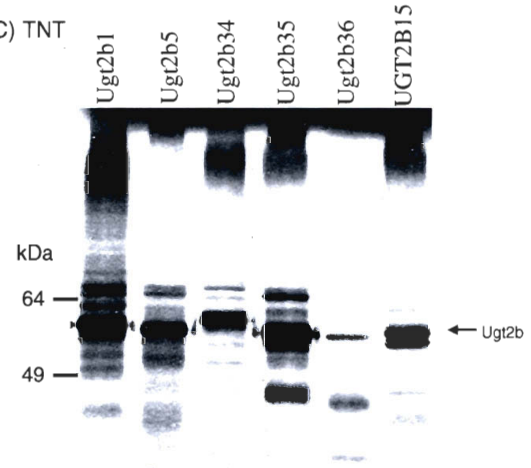
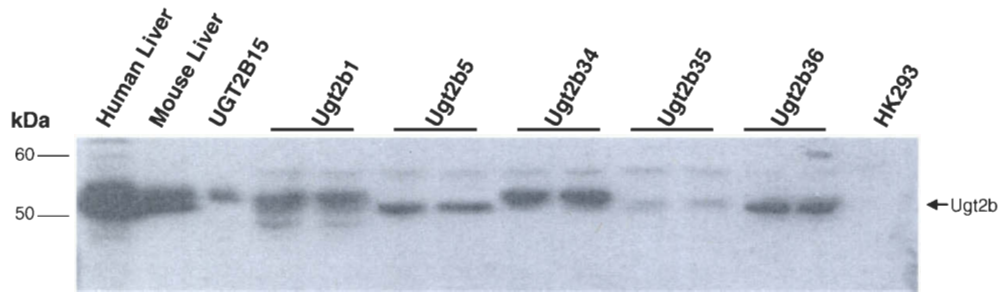


Figure 4

A



B

	Ugt2b relative Vmax (pmol/min/mg protein)					
	Mouse liver	Ugt2b1	Ugt2b5	Ugt2b34	Ugt2b35	Ugt2b36
<b>ADT</b>	3.0 ± 0.5	nd	0.23	nd	BLQ	nd
<b>DHT</b>	66 ± 9	2.8	0.34	0.21	nd	BLQ
<b>TESTO</b>	18 ± 1	0.49	0.95	BLQ	nd	0.08
<b>3α-DIOL-3G</b>	1.4 ± 0.1	nd	BLQ	nd	0.54	BLQ
<b>3α-DIOL-17G</b>	17 ± 3	0.5	1.3	0.13	nd	BLQ

Figure 5

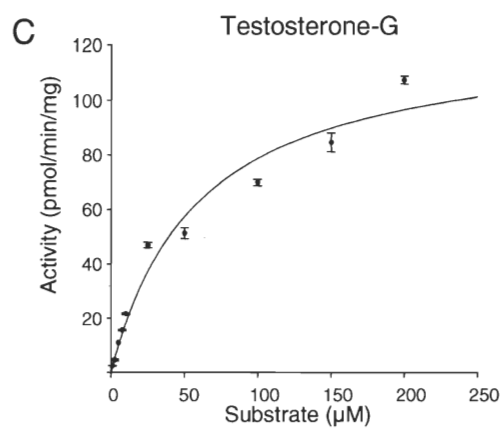
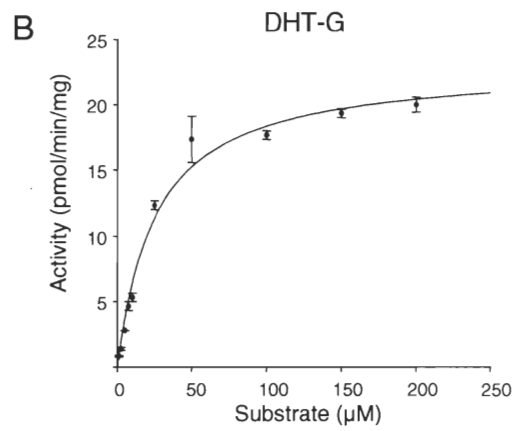
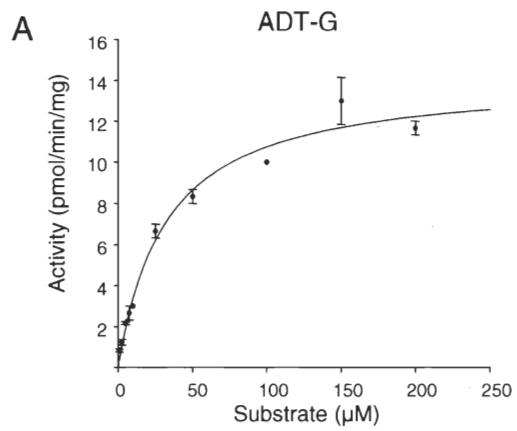
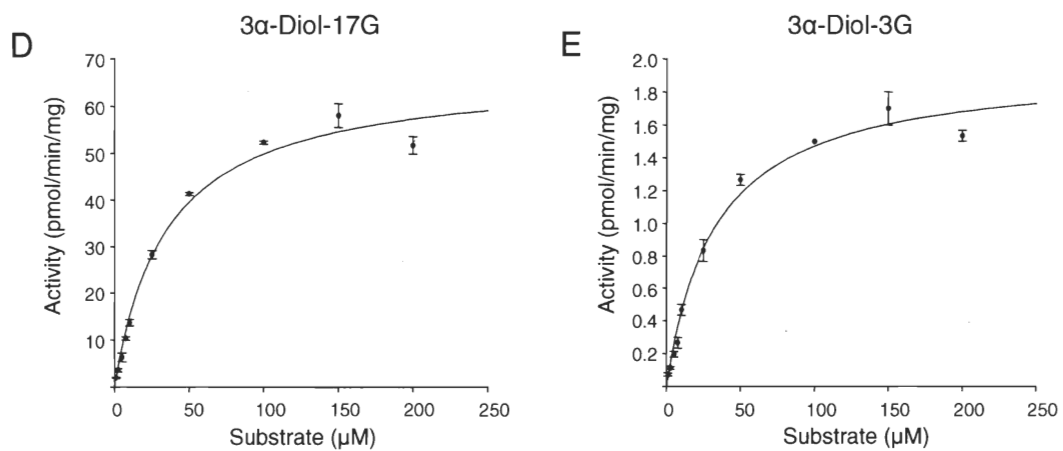




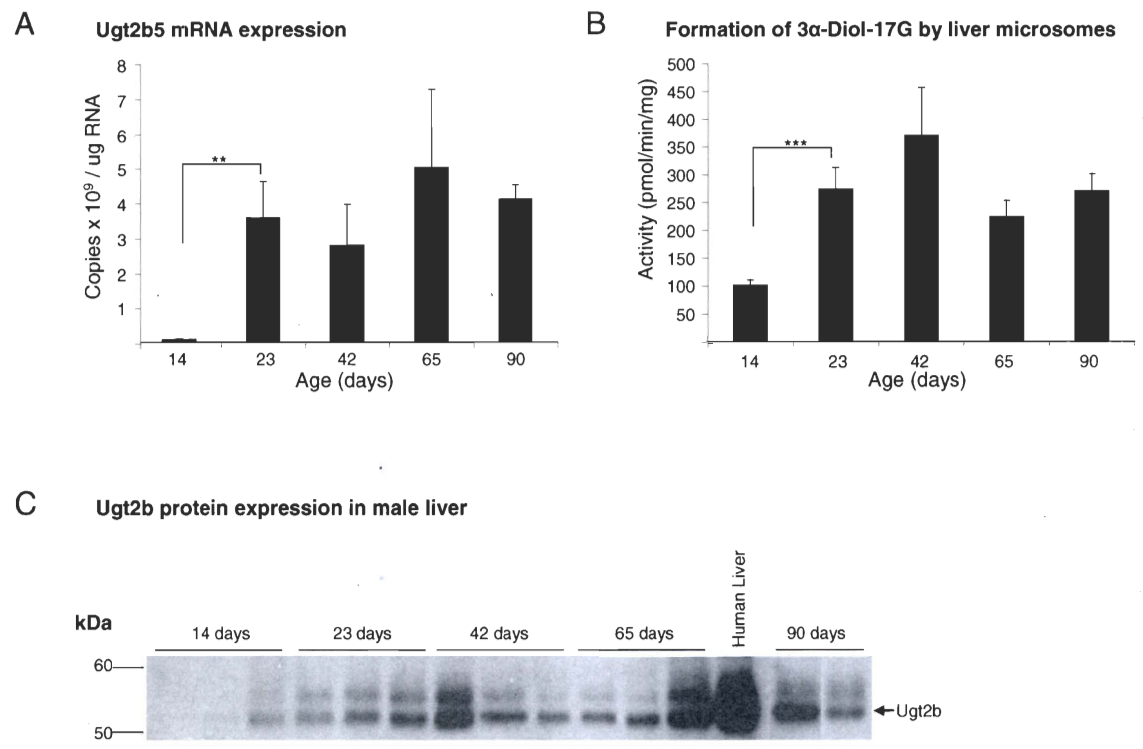
Figure 5



**F**

	Relative Vmax (pmol/min/mg)	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax/Km (nl/min/mg)
<b>ADT</b>	19 $\pm$ 8	39 $\pm$ 10	490
<b>DHT</b>	24 $\pm$ 5	35 $\pm$ 14	690
<b>3α-DIOL-3G</b>	2.0 $\pm$ 0.4	30 $\pm$ 5	70
<b>3α-DIOL-17G</b>	77 $\pm$ 27	37 $\pm$ 3	2100
<b>Testosterone</b>	141 $\pm$ 47	77 $\pm$ 26	1800

Figure 6



## **CHAPITRE IV**

### **Discussion et conclusion**

## 4.1 Discussion

La stéroïdogénèse est le pivot central des grands changements hormonaux chez l'homme. Impliquée dans le développement du fœtus, dans la puberté et dans la ménopause, elle joue aussi un rôle dans le cancer, notamment celui de la prostate. La testostérone et particulièrement l'un de ses dérivés, la DHT, sont des acteurs de premier plan dans le développement et la croissance des cellules cancéreuses prostatiques [49]. Le récepteur des androgènes ainsi que certaines enzymes comme la 5 $\alpha$ -réductase sont aussi impliqués dans le cancer de la prostate [95]. Plus de 300 gènes dont l'expression est contrôlée en partie par le récepteur des androgènes ont jusqu'à maintenant été étudiés dans le cadre du cancer de la prostate [29]. Les traitements existants sont généralement composés d'un agoniste de la LH-RH et d'un antiandrogène pur. Cette stratégie appelée blocage androgénique combiné a pour objectif d'éliminer la production de testostérone tout en éliminant l'activation du récepteur des androgènes par la DHT [49]. Or, au niveau intraprostatique l'UGT2B15 par son activité enzymatique de glucuronidation est capable d'éliminer la DHT, donc de jouer sur la concentration intraprostatique de la DHT et de modifier l'activation du récepteur des androgènes [21]. Le rôle *in vitro* de l'UGT2B15 et son implication dans la régulation des androgènes, notamment dans les LNCaP, cellules cancéreuses de la prostate est clairement établi [83]. Ces observations ainsi que des études épidémiologiques reliant le cancer de la prostate et l'UGT2B15 [82, 87], suggèrent fortement que cet enzyme est un joueur clé dans le cancer de la prostate et pourrait éventuellement être utilisé comme outil de diagnostic et/ou comme cible thérapeutique. La prochaine étape pour augmenter notre compréhension et éventuellement confirmer le rôle de l'UGT2B15 dans le cancer de la prostate est l'étude de cet enzyme dans un modèle animal. Développer un modèle animal représente actuellement l'objectif de recherche de notre laboratoire.

Dans le cadre de ce programme de recherche, mes travaux de maîtrise avaient comme objectifs :

- 1) D'identifier l'orthologue murin du gène humain UGT2B15.
- 2) D'exécuter le clonage des sept Ugt2b de souris.
- 3) De déterminer les caractéristiques enzymatiques de ces protéines.

#### 4) De déterminer la distribution tissulaire de ces protéines.

Lors de ce projet nous avons pu cloner cinq Ugt2b de souris, Ugt2b1, Ugt2b5, Ugt2b34, Ugt2b35, Ugt2b36. Nous avons aussi pu faire leur caractérisation, ce qui nous a permis de démontrer avec succès que les Ugt2b de souris possèdent une spécificité enzymatique propre pour les androgènes et les estrogènes. Spécificité qui varie entre les différentes enzymes Ugt2b murins dépendamment de la nature du substrat. Nos observations sur l'activité enzymatique des Ugt2b de souris nous permettent d'établir comme hypothèse que l'Ugt2b5, de par sa grande spécificité de glucuronidation en position 17-hydroxy, notamment concernant le 3 $\alpha$ -DIOL, serait l'orthologue murin du gène humain UGT2B15.

Actuellement, il n'existe qu'une seule étude sur les Ugt2b, celle de Buckley et Klaassen [89]. À l'aide d'une méthode appelée «QuantiGene bDNA signal amplification assay» et d'une douzaine de tissus murins, ils ont obtenu une distribution tissulaire des sept Ugt2b de souris. Cette distribution tissulaire diffère en certains points de celle que nous avons obtenue, notamment concernant l'expression de l'Ugt2b34 et de l'Ugt2b35. Nous avons trouvé une expression partielle de l'Ugt2b34 dans les testicules, le petit intestin mâle, le rein mâle et femelle, alors que leurs résultats démontrent une forte expression dans le petit intestin, une absence dans les testicules et un très faible niveau pour le rein mâle et femelle. Concernant l'Ugt2b35, l'expression que nous avons trouvée est restreinte au foie pour les deux sexes, alors que leurs résultats démontrent une expression, bien que faible, dans pratiquement tous leurs tissus. Les résultats de l'Ugt2b1 sont similaires dans les deux études, c'est-à-dire une expression limitée au foie. Dans l'étude de Buckley et Klaassen, l'Ugt2b36 présente une forte expression hépatique et une expression très faible dans neuf autres tissus, notamment le petit intestin. Pour notre part nous avons aussi une forte expression hépatique mais notons une absence dans le petit intestin. Nous avons pu démontrer une forte expression de l'Ugt2b5, Ugt2b37 et Ugt2b38 dans le foie mâle et femelle mais aussi dans le rein mâle. Bien que la méthode utilisée par Buckley et Klaassen ne puisse distinguer séparément les Ugt2b5, Ugt2b37 et Ugt2b38, ils ont obtenu des résultats qui corroborent nos données. Malgré les quelques différences, pouvant être expliquées par l'emploi de méthodes d'investigations différentes, et par la

difficulté de parfaitement séparer l'expression des Ugt2b à cause de leur très grande homologie entre elles, en moyenne plus de 63%, notre étude et celle de Buckley et Klaassen arrivent à la même conclusion finale, le foie est le site majeur de l'expression des Ugt2b de souris autant chez le mâle que chez la femelle.

Nous avons pu confirmer ce résultat à l'aide d'essais enzymatiques utilisant des homogénats de différents tissus murins. Les observations obtenues avec ces essais ont clairement démontré que le foie représente pour les deux sexes le site majeur de glucuronidation des androgènes comme l'ADT, le DHT, la testostérone et le 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G et 17G. Nous avons aussi démontré la capacité du rein mâle à faire la glucuronidation de l'ADT et du 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G. Cette dernière observation renforce les données de notre distribution tissulaire qui mettait en évidence une expression des Ugt2b dans le rein mâle mais une absence d'expression dans le rein femelle. Nos résultats obtenus à partir des essais semblent aussi indiquer que la stéréospécificité de glucuronidation du rein mâle serait la position 3G et qu'il serait incapable d'exécuter celle en 17G. En effet, chez l'humain, l'ADT est uniquement glucuronidé en position 3G [21], et bien que le 3 $\alpha$ -DIOL peut être glucuronidé en 3G et en 17G [21], seule la forme 3G se retrouve dans nos résultats d'essais.

Cette restriction de stéréospécificité de glucuronidation semble aussi être présente entre le foie mâle et femelle. D'après nos résultats, il semblerait que le foie mâle serait plus efficace pour glucuronider les substrats en position 17G qu'en position 3G, alors que le foie femelle aurait une activité de glucuronidation inversée de celle du foie mâle, c'est-à-dire plus efficace pour la glucuronidation en position 3G qu'en position 17G. Le foie mâle présente des valeurs de glucuronidation plus élevées pour la DHT (59 pmol/min/mg de protéines), la testostérone (58 pmol/min/mg de protéines) et le 3 $\alpha$ -DIOL en position 17G (19 pmol/min/mg de protéines), trois substrats glucuronidés en position 17 [21], que pour l'ADT (14 pmol/min/mg de protéines) et le 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G (6.9 pmol/min/mg de protéines). Or, les résultats de glucuronidation de la DHT (28 pmol/min/mg de protéines), de la testostérone (33 pmol/min/mg de protéines) et du 3 $\alpha$ -DIOL en position 17G (10 pmol/min/mg de protéines) sont plus faibles dans le foie

femelle, mais on peut noter une augmentation de ceux de l'ADT (32 pmol/min/mg de protéines) et du 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G (19 pmol/min/mg de protéines).

Cette différence de glucuronidation entre les tissus représente une différence dans l'expression des Ugt2b comme en témoignent les résultats de notre distribution tissulaire mais indique aussi une activité enzymatique spécifique pour chaque Ugt2b. Afin de pouvoir déterminer cette activité nous avons fait le clonage de cinq enzymes Ugt2b : Ugt2b1, Ugt2b5, Ugt2b34, Ugt2b35 et Ugt2b36 et avons procédé à des essais enzymatiques. Nos résultats enzymatiques, tant pour les essais de vélocité avec une concentration 50  $\mu$ M que ceux de clairance intrinsèque, indiquent clairement que les Ugt2b de souris possèdent une spécificité pour les androgènes et les estrogènes. De plus, notre étude démontre que cette spécificité est différente d'un Ugt2b à l'autre.

Les Ugt2b1 et 2b5 seraient responsables en très grande partie de la glucuronidation exercée sur les androgènes (ADT, DHT, testostérone et 3 $\alpha$ -DIOL). En effet, Ugt2b5 est le seul à démontrer une activité enzymatique sur l'ADT et présente une clairance intrinsèque quatre et six fois plus élevée que Ugt2b1 pour la testostérone et le 3 $\alpha$ -DIOL en position 17G, respectivement. Cependant, Ugt2b1 démontre une clairance intrinsèque trois fois plus élevée pour la DHT que Ugt2b5. Combinés, ces résultats exposent le rôle clé de ces deux enzymes dans la glucuronidation des androgènes. Quant à eux les Ugt2b34 et 2b36 seraient majoritairement responsables de la glucuronidation des estrogènes (E2 et 4-OHE<sub>1</sub>). Ugt2b34 est le seul à présenter une clairance intrinsèque pour l'E2 et le 4-OHE<sub>1</sub> en position 3G. L'E2 peut aussi être glucuronidé en position 17G par les Ugt2b1 et 2b5 mais cette activité reste très faible. La forme 4G du 4-OHE<sub>1</sub> est surtout réalisée par Ugt2b36 avec une clairance intrinsèque quatre fois supérieure à Ugt2b1 et 90 fois supérieure à Ugt2b34. Fait intéressant, l'Ugt2b5 semble n'exercer qu'une très faible activité enzymatique en position 3G, comme le démontrent nos résultats, mais présente une activité très forte en position 17G. De même, l'Ugt2b35 n'exerce aucune activité en position 17G mais seulement en position 3G, et son activité enzymatique ne présente aucune affinité. En conclusion, nos résultats démontrent que la spécificité de l'activité de glucuronidation de la protéine Ugt2b1 se fait principalement sur la DHT, alors que celle de Ugt2b5 est majoritairement exécutée en position 17-hydroxy et ce, sur l'ADT, la

testostérone et le 3 $\alpha$ -DIOL. Pour les protéines Ugt2b34 et Ugt2b36 la spécificité de leur activité de glucuronidation est quant à elle exécutée en position 3-hydroxy sur l'E2 et le 4-OHE<sub>1</sub>, et en position 4-hydroxy sur le 4-OHE<sub>1</sub>, respectivement.

Bien que notre étude ne présente pas de résultats sur l'activité enzymatique de l'Ugt2b37 et 2b38, nous pouvons néanmoins tirer certaines conclusions intéressantes, en particulier pour l'Ugt2b38. En effet, l'Ugt2b38 partage une homologie en acides aminés de 99% avec l'Ugt2b5 pour son domaine N-terminal, domaine qui est responsable de la liaison au substrat, et une homologie totale de 97%. De plus, selon nos résultats d'expression, l'Ugt2b38 serait l'Ugt2b murin le plus exprimé dans le rein mâle. Or, selon les résultats des essais enzymatiques du rein mâle, seul la glucuronidation de l'ADT et du 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G y serait effectuée. D'après nos résultats, l'Ugt2b5 est aussi exprimé dans le rein et serait responsable de la glucuronidation de l'ADT, cependant il ne démontre qu'une très faible activité enzymatique sur le 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G. Mises ensembles ces observations nous portent à croire que l'Ugt2b38 aurait des substrats semblables à ceux de l'Ugt2b5 et pourrait être responsable de la glucuronidation du 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G, particulièrement celle retrouvée dans le rein mâle.

Il est difficile de déterminer un parfait orthologue murin au gène humain UGT2B15. En effet, selon l'étude de Turgeon et al. [78], l'UGT2B15 est capable de glucuronider la testostérone, la DHT et le 3 $\alpha$ -DIOL, alors que la spécificité de substrat de l'UGT2B17 est l'ADT, la DHT, la testostérone et le 3 $\alpha$ -DIOL. La glucuronidation du 3 $\alpha$ -DIOL se fait uniquement en position 17G et ce, pour l'UGT2B15 et l'UGT2B17 [21]. Sur ces observations, nous pourrions émettre l'hypothèse que l'Ugt2b1 serait l'orthologue murin du gène humain UGT2B15, alors que l'Ugt2b5 serait l'orthologue murin du gène humain UGT2B17, puisque l'ADT est ce qui différencie au premier coup d'œil les deux activités enzymatiques. Cependant, une étude plus approfondie de l'activité enzymatique de ces deux protéines nous révèle que l'UGT2B15 est hautement spécifique pour la glucuronidation du 3 $\alpha$ -DIOL en position 17G, alors que celle de la protéine UGT2B17 est très spécifique pour le DHT [78]. Or, nos résultats ont démontré que chez la souris c'est l'Ugt2b1 qui présente la plus grande spécificité de glucuronidation de la DHT, alors que l'Ugt2b5 présente la meilleure activité pour le 3 $\alpha$ -DIOL en 17G. Il nous est impossible de



définir un orthologue murin qui aurait une activité enzymatique parfaitement semblable à la protéine humaine UGT2B15. Cependant, en nous basant sur le fait que le substrat préférentiel de l'UGT2B15 est le 3 $\alpha$ -DIOL en position 17G il nous est possible de dire que l'Ugt2b5 est l'enzyme murine ayant l'activité enzymatique la plus similaire.

## 4.2 Conclusion

En conclusion, nos résultats démontrent que chez la souris mâle et femelle, le foie représente le site majeur d'expression de tous les Ugt2b murins. La souris mâle possède aussi d'autres sites d'expression des Ugt2b comme le rein, le testicule et le petit intestin. Il semblerait aussi que le foie mâle serait plus efficace dans la glucuronidation des substrats androgéniques en position 17G, alors que le foie femelle aurait cette capacité pour la position 3G. De plus, notre étude démontre que les Ugt2b de souris possèdent une spécificité de glucuronidation pour les androgènes et les estrogènes. Cette spécificité est propre à chaque Ugt2b et nos résultats indiquent que l'Ugt2b1 et 2b5 seraient responsables de la glucuronidation des androgènes, alors que les Ugt2b34 et 2b36 seraient responsables de la glucuronidation des estrogènes. Aussi, la forte homologie du domaine N-terminal de l'Ugt2b5 et 2b38, l'expression de l'Ugt2b38 dans le rein et l'activité enzymatique retrouvée dans le rein mâle nous porte à croire que l'Ugt2b38 aurait une activité enzymatique semblable à celle de l'Ugt2b5 et serait sans doute responsable de la présence du 3 $\alpha$ -DIOL en position 3G dans le rein mâle. Bien qu'il soit impossible d'établir un orthologue parfait des gènes humains UGT2B15 et UGT2B17, notre étude permet d'établir un parallèle très intéressant entre l'activité enzymatique de la protéine murine Ugt2b1 et celle UGT2B17. En effet, tous deux ont comme substrat préférentiel la DHT. Il nous est aussi possible d'établir un pont intéressant entre l'activité de la protéine humaine UGT2B15 et Ugt2b5 murin, puisque tous deux ont le 3 $\alpha$ -DIOL en position 17G comme cible première de glucuronidation. Il reste cependant beaucoup de travail pour mieux comprendre l'activité enzymatique des Ugt2b murins. La création de souris déficiente est la prochaine étape. Bien que tous les modèles déficients Ugt2b soient importants, celui de Ugt2b5 peut être particulièrement intéressant puisqu'il pourrait nous apporter de l'information sur le rôle de l'UGT2B15.

1. Sanderson, J.T., *The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals*. Toxicological Sciences, 2006. **94**(1): p. 3-21.
2. Miller, W.L., *Molecular biology of steroid hormones synthesis*. Endocr Rev, 1988. **9**: p. 295-318.
3. Ghayee, H.K., and Auchus, R.J., *Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis*. Rev Endocr Metab Disord, 2007. **65**: p.289-300
4. Auchus, R.J., *Overview of Dehydroepiandrosterone Biosynthesis*. Seminars in Reproductive, 2004. **22**(4): p. 281-288.
5. Parker, K.L., and Schimmer, B.P., *Transcriptional regulation of the gene encoding the cytochrome p-450 steroid hydroxylases*. Vitam Horm, 1995 **51**: p. 339-370.
6. Rainey, W.E., *Adrenal zonation: Clues from 11(Beta)-hydroxylase and aldosterone synthase*. Mol. Cell. Endocrinol., 1999. **151**: p. 151.
7. Schimmer, B.P., and Parke, K. L., *Adrenocorticotrophic hormones; adrenocortical steroids and their synthetic analogs: Inhibitors of the synthesis and action of adrenocortical hormones*, in *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, E. J.G. Hardman and L.E. Limbird, Editor. 1996, McGraw-Hill: New York. p. 1459-1485.
8. Sasano, H., White, P.C., New, M.I., and Sasano, N., *Immunohistochemical localization of cytochrome P-450C21 in human adrenal cortex and its relation to endocrine function*. Hum. Pathol., 1988. **19**: p. 181-185.
9. Erdmann, B., Denner, K., Gerst, H., Lenz, D., and Bernhardt, R., *Human adrenal CYP11B1: Localization by in situ-hybridization and functional expression in cell cultures*. Endocr. Res., 1995. **21**: p. 425-435.
10. Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F., and Ishimura, Y., *Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: Histochemical basis for the functional zonation* Endocrinology, 1992. **130**: p. 2971.
11. Voutilainen, R., and Miller, W.L., *Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450ssc (20,22-desmolase), P450c17 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1986. **63**: p. 1145-1150.
12. Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., Lehmann, R., Karl, M., and Allolio, B., *Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex*. J. Endocrinol., 1998. **156**: p. 415-423.
13. Stouffer, R.L., *Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis*. Human Reproductive Update 2003. **9**: p. 99-177.
14. Woodruff, T.K.a.S., L.D., *The Role of the Extracellular Matrix in Ovarian Follicle Development* Reproductive Sciences 2007. **14**: p. 6-10.
15. Luu-The, V., *Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2001. **76**(143-151).
16. Greenwald, G., and Roy, S., *Follicular development and its control*, E.K.a.J. Neill, Editor. 1994, Raven Press: New York. p. 629-724.
17. Fitzpatrick, S.L., Carlone, D.L., Robker, R. L., and Richards, J., S., *Expression of aromatase in the ovary: Down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge* Steroids, 1997. **62**: p. 197-206.
18. Dharia, S., Slane, A., Jian, M., Conner, M., Conley, A.J., and Parker, C.R., Jr, *Colocalization of P450c17 and cytochrome b5 in androgen-synthesizing tissues of the human*. Biol. Reprod., 2004. **71**: p. 83-88.

19. Mindnich, R., Moller, G., and Adamski, J., *The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. Mol. Cell. Endocrinol., 2004. **218**: p. 7-20.
20. Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., and Bourguiba, S., *Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review*. Reprod. Biol. Endocrinol., 2003. **1**: p. 35.
21. Bélanger, A., Pelletier, G., Labrie, F., Barbier, O., and Chouinard, S., *Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans*. TRENDS in Endocrinology and Metabolism, 2003. **14**: p. 473-479.
22. Pelletier, G., et al., *Immunoelectron microscopic localization of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland*. J. Mol. Endocrinol., 2001. **26**: p. 11-19.
23. Pelletier, G., et al., *Localization in situ hybridization of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme gene expression in the human prostate and preputial skin*. J. Urol., 1998. **160**: p. 577-582.
24. Kumar, N., Crozat, A., Li, F., Catterall, J.F., Bardin, C.W., Sundaram, K., *7 $\alpha$ -methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen with high potency: structure-activity comparisons with other androgens*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **71**: p. 213-222.
25. Zhou, Z.X., Lane, M.V., Kempainen, J.A., French, F.S., and Wilson, E.M., *Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability*. Mol Endocrinol, 1995. **9**: p. 208-218.
26. Deslypere, J.P., Young, M., Wilson, J.D., and McPhaul, M.J., *Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene*. Mol Cell Endocrinol, 1992. **88**: p. 15-22.
27. Sakhri, S., and Gooren, L.J., *Safety aspects of androgen treatment with 5 alpha-dihydrotestosterone*. Andrologia, 2007. **39**: p. 216-222.
28. Bélanger, B., et al., *Comparison of residual c-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men*. J. Steroid Biochem., 1989. **32**: p. 695-698.
29. Swinnen, J.V., Heemers, H., Van de Sande, T., De Schrijver, E., Brusselmans, K., Heyns, W., and Verhoeven, G., *Androgens, lipogenesis and prostate cancer*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2004. **92**: p. 273-279.
30. Pienta, C.E., and Esper, P.S., *Risk factors for prostate cancer*. Ann. Intern. Med., 1993. **118**: p. 793-803.
31. Brawer, M.K., *Prostate Cancer*. J. Urol., 1995. **153**: p. 115-116.
32. Ahluwalia, B., Jackson, M.A., Jones, G.W., Williams, A.O., Rao, M.S., and Rajguru, S., *Blood hormone profiles in prostate cancer patients in high-risk and low-risk populations*. Cancer 1981. **48**: p. 2267-2273.
33. Ross, R., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M., and Henderson, B., *Serum testosterone levels in healthy young black and white men*. J. Natl. Cancer Inst., 1986. **1**(45-48).
34. Gann, P.H., Hennekens, C.H., Ma, J., Longcope, C., and Stampfer, M.J., *Prospective study of sex hormones levels and risk of prostate cancer*. J. Natl. Cancer Inst., 1996. **88**: p. 1118-1126.
35. Huggins, C.H., C.V., *Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate cancer*. Cancer Res., 1941. **1**: p. 293-297.
36. Kyprianou, N., English, H.F., and Isaacs, J.T., *Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation*. Cancer Res., 1990. **50**: p. 3748-3753.
37. Rosenberg, A.G., and Eschenbach, A.C., *Hormonal therapy for prostate cancer*. Semin. Surg. Oncol., 1990. **6**: p. 71-76.



38. Huang, H., and Tindall, D.J., *The role of the androgen receptor in prostate cancer*. Crit. Rev. Eukar. Gene Expr., 2002. **12**: p. 193-207.
39. Culig, Z., Klocker, H., Bartsch, G., Steiner, H., and Hobisch, A., *Androgen receptors in prostate cancer*. J. Urol., 2003. **170**: p. 1363-1369.
40. Bonkhoff, H., and Remberger, K., *Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate*. Virchows Arch, 1998. **433**: p. 195-202.
41. Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K., *The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate*. Prostate, 1994. **24**: p. 224-118.
42. Ware, J.L., *Prostate cancer progression. Implications of histopathology*. Am. J. Pathol., 1994. **145**: p. 983-993.
43. Bonkhoff, H., Fixemer, T., and Remberger, K., *Relation between Bcl-2, cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer*. Prostate, 1998. **34**: p. 251-258.
44. Colombel, M., Symmans, F., Gie, S., O'toole, K., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C., Korsmeyer, S., and Buttgan, R., *Detection of the oncoprotein Bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancer*. Am. J. Pathol., 1993. **143**: p. 390-400.
45. Di Sant'Agnes, P.A., and Cockett A.T., *Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy*. Cancer, 1996. **78**: p. 357-361.
46. Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K., *Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. Simultaneous demonstration of cell specific epithelial markers*. Hum. Pathol., 1994. **25**: p. 42-46.
47. Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K., *Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells*. Hum. Pathol., 1995. **26**: p. 167-170.
48. Krijnen, J.L., Janssen, P.J., Ruizeveld de Winter, J.A., Van Krimpen, H., Schröder F.H., and Van der Kwast T.H., *Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor?* Histochemistry, 1993. **100**: p. 393-398.
49. Labrie, F., Cusan, L., Gomez, J.L., Candas, B., Bélanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., and Simard, J., *De la biologie à la clinique: le décès dû au cancer de la prostate peut-il maintenant être une exception*. Médecine/Sciences, 2003. **19**: p. 910-919.
50. Bolla, M., Gonzalez, D., Warde, P., et al., *Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated radiotherapy and goserelin*. N. Eng. J. Med., 1997. **337**: p. 295-300.
51. Labrie, F., Dupont, A., Suburu, R., et al., *Serum prostate specific antigen (PSA) as prescreening test for prostate cancer*. J. Urol., 1992. **147**: p. 846-852.
52. Labrie, F., Candas, B., Cusan, L., et al., *Diagnosis of advanced or noncurable prostate cancer can be practically eliminated by prostate-specific antigen*. Urology, 1996. **47**: p. 212-217.
53. Hugosson, J., Aus, G., Lilja, H., Lodding, P., Pihl, C.G., and Pileblad, E., *Prostate specific antigen based biennial screening is sufficient to detect cancers while still curable*. J. Urol., 2003. **169**: p. 1720-1723.
54. Nebert, D.W. a.R., D.W., *Clinical importance of the cytochromes P450*. Lancet, 2002. **360**: p. 1155-62.
55. Zamek-Gliszczyński, M.J., et al., *Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites*. Eur. J. Pharm. Sci., 2006. **27**: p. 447-86.
56. Evans, W.E., and Relling, M.V., *Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics*. Science, 1999. **286**: p. 487-491.

57. MacKenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., et al., *The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence*. Pharmacogenetics, 1997. **7**: p. 255-269.
58. Tephly, T., Green, M., Puig, J., Irshaid, Y., *Endogenous substrates for UDP-glucuronosyltransferases*. Xenobiotica, 1988. **18**: p. 1201-1210.
59. Dutton, G.J., *Glucuronidation of drugs and other compounds*. 1980: Boca Raton, FL: CRC Press
60. Lévesque, É., Hum, D.W., Bélanger, A., *Rôles des UDP-glucuronosyltransferases (UGT) dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes*. Médecine/Sciences, 2001. **17**: p. 33-43.
61. Beaulieu, M., Lévesque, É., Hum, D.W., Bélanger, A., *Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids*. J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 22855-22862.
62. King, C.D., et al., *UDP-glucuronosyltransferases*. Curr Drug Metab, 2000. **1**: p. 143-161.
63. Fujisawa, T., and Mori, M., *Influence of various bile salts on beta-glucuronidase activity of intestinal bacteria*. Lett Appl Microbiol, 1997. **25**: p. 95-107.
64. Radomska-Pandya, A., et al., *Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes*. Methods Enzymol, 2005. **400**: p. 116-147.
65. Tukey, R.H., and Strassburg, C.P., *Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 581-616.
66. Strassburg, C.P., et al., *Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(2): p. 212-220.
67. Meech, R., and Mackenzie, P.I., *Determinants of UDP glucuronosyltransferase membrane association and residency in the endoplasmic reticulum*. Arch Biochem Biophys, 1998. **356**(1): p. 77-85.
68. Strassburg, C.P., et al., *Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36164-36171.
69. Hum, D.W., et al., *Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones*. J steroid Biochem Mol Biol 1999. **69**: p. 413-423.
70. Brierley, C.H., Burchell, B., *Human UDP-glucuronosyltransferases : Chemical Defence, Jaundice and Gene Therapy*. Bioassays 1993. **15** p. 749-754.
71. MacKenzie, P.I., et al., *Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily*. Pharmacogenet genomics, 2005. **15**(10): p. 677-685.
72. Kiang, T.K., Ensom, H.H., Chang, T.K.H., *UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions*. Pharmacology and Therapeutics, 2004. **106**: p. 97-132.
73. Gong, Q.H., et al., *Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(4): p. 357-368.
74. Lévesque, É., Girard, H., Journeault, K., Lépine, J., and Guillemette, C., *regulation of the UGT1A1 Bilirubin-Conjugating pathway: Role of a New Splicing Event at the UGT1A Locus*. Hepatology, 2007. **45**(1): p. 128-138.
75. Girard, H., Lévesque, É., Bellemare, J., Journeault, K., Caillier, B., and Guillemette, C., *Genetic diversity at the UGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity*. Pharmacogenetics and Genomics, 2007. **17**(12): p. 1077-1089.

- 76.Kiang, T., Ensom, MH., and Chang, TK., *UDP-glucuronosyltransferase and clinical drug-drug interactions*. Pharmacol. Ther., 2005. **106**(1): p. 97-123.
- 77.Desai, A.A., Innocenti, F., and Ratain, M.J., *UGT pharmacogenomics: implications for cancer risk and cancer therapeutics*. Pharmacogenetics, 2003. **13**: p. 517-523.
- 78.Turgeon, D., et al., *Relative enzymatic activity, protein stability and tissue distribution of human steroid metabolizing UGT2B subfamily members*. Endocrinology, 2001. **142**: p. 778-787.
- 79.Lévesque, É., et al., *Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene*. Pharmacogenetics, 1997. **7**: p. 317-325.
- 80.Chung, L.W.a.C., D.S., *Androgen glucuronide. II. Differences in its formation by human normal and benign hyperplastic prostates*. Invest. Urol., 1978. **15**: p. 385-388.
- 81.Bélanger, A., et al., *Determination of non-conjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990. **595**: p. 251-259.
- 82.Barbier O., et al., *Cellular Localization of Uridine Diphosphoglucuronosyltransferase 2B Enzymes in the Human Prostate by in Situ Hybridization and Immunohistochemistry*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2000. **85**(12): p. 4819-4826.
- 83.Chouinard, S., Barbier, O., and Bélanger, A., *UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 Enzymes Are Major Determinants of the Androgen Response in Prostate Cancer LNCaP cells*. The journal of Biological Chemistry, 2007. **282**: p. 33466-33474.
- 84.McLeod, S.L., et al., *An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer*. Ann. Surg. Oncol., 2000. **7**: p. 777-782.
- 85.Hajdinjak, T., and Zagradisnik, B., *Prostate Cancer and Polymorphism D85Y in Gene for Dihydrotestosterone Degrading Enzyme UGT2B15: Frequency of DD Homozygotes Increases With Gleason Score*. The Prostate, 2004. **59**: p. 436-439.
- 86.Okugi, H., et al., *Association of the polymorphisms of genes involved in androgen metabolism and signaling pathways with familial prostate cancer risk in a Japanese population*. Cancer Detection and Prevention, 2006. **302**: p. 1-7.
- 87.Gsur, A., et al., *A polymorphism in the UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene (D85Y) is not associated with prostate cancer risk*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2002. **11**: p. 497-498.
- 88.Park, J., and al., *Asp85tyr polymorphism in the UDP-glucuronosyltransferase (UGT)2B15 gene and the risk of prostate cancer*. J.Urol., 2004. **171**: p. 2484-2488.
- 89.Buckley, D.B., and Klaassen, C., *Tissue-and Gender-Specific mRNA Expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) in Mice*. Drug Metabolism and Disposition 2006. **35**: p. 121-127.
- 90.Guillemette, C., Hum, D., and Bélanger, A., *Levels of plasma C19 steroids and Salpha-reduced C19 steroid glucuronides in primates, rodents, and domestic animals*. American Physiological Society, 1996. **271**: p. E348-E353.
- 91.Shappell, S.B., et al., *Prostate Pathology of genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Concensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human cancer Consortium Prostate Pathology Committee.* . Cancer Research, 2004. **64**: p. 2270-2305.
- 92.Abate-Shen, C.a.S., M., *Mouse models of prostate carcinogenesis*. Genetics, 2002. **18**: p. S1-5.

93. Matsumoto, T., Takeyama, K.I., Sato, T., and Kato, S., *Androgen receptor functions from reverse genetic models*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003. **85**: p. 95-99.
94. Hudak, S.J., Hernandez, J., Thompson, I.M., *Role of 5alpha-Reductase Inhibitors in the management of prostate cancer*. Clin Interv Aging., 2006. **1**: p. 425-431.
95. Platz, A.E., and Giovannucci, E., *The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer*. Journal of Clinical Biochemistry and Molecular Biology, 2004. **92**: p. 237-253.