

Rôle des UDP-glucuronosyltransférases (UGT) dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes

Éric Lévesque
Dean W. Hum
Alain Bélanger

Ces dernières années, le clonage et la caractérisation de plusieurs UDP-glucuronosyltransférases (UGT) a permis d'élucider la fonction de ces enzymes dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. En effet, ces enzymes sont exprimées dans la vaste majorité des tissus humains où elles conjuguent l'acide glucuronique (UDPGA) à plusieurs substrats endogènes dont les stéroïdes. L'ajout d'un groupement hydrophile à un stéroïde favorise l'élimination du conjugué hors du tissu et, de ce fait, hors de l'organisme terminant de la sorte le signal hormonal. Les UGT agiraient donc de concert avec les enzymes de la stéroïdogénèse afin de maintenir des concentrations hormonales physiologiques nécessaires au bon fonctionnement cellulaire.

Le glucuronidation est la forme la plus répandue de « conjugaison » dans le métabolisme des mammifères. Cette réaction de glucuronon-conjugaison est catalysée par la famille multigénique des UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Ces enzymes membranaires sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique des cellules de la grande majorité des tissus de l'organisme, et catalysent le transfert d'un groupement glucuronide provenant du cofacteur acide UDP-glucuronique sur différentes molécules endogènes ou exogènes possédant un groupement hydroxyle, carboxyle, amine ou thiol. La molécule issue de cette réaction est généralement inactive,

hydrosoluble, moins toxique et plus facilement excrétée dans la bile ou dans l'urine. Les composés endogènes et exogènes conjugués par les UGT incluent la bilirubine, les sels biliaires, les stéroïdes ainsi que divers médicaments et polluants environnementaux. Dans des conditions physiologiques normales, la réaction de conjugaison relayée par les UGT est irréversible. De ce fait, cette famille d'isoenzymes aurait un rôle-clé dans le catabolisme de différentes molécules, parmi lesquelles figurent les hormones stéroïdiennes. Les UGT seraient impliquées dans la régulation de l'action intracrine des hormones stéroïdiennes et, par conséquent, joueraient un rôle important dans le contrôle du signal hormonal.

ADRESSE

É. Lévesque, D.W. Hum, A. Bélanger : Groupe du CRM en endocrinologie moléculaire, Centre de recherche du CHUQ, Pavillon CHUL, Université Laval, Québec, G1V 4G2, Canada.

Réactions de fonctionnalisation et de conjugaison

Le processus général de détoxification est divisé en trois phases, la fonctionnalisation (phase I), la conjugaison (phase II), et l'élimination (phase III) [1]. Le métabolisme de la phase I est principalement effectué par la grande famille des cytochromes P450 (CYP450). La molécule résultante possède un groupement polaire de type hydroxyle, amino, thiol ou carboxyle. Les produits de la réaction de phase I sont en général partiellement liposolubles, et possèdent parfois une activité biologique toxique ou thérapeutique [1]. Cette «activation», qui résulte de l'addition d'un ou plusieurs groupements polaires, rend la molécule accessible pour les enzymes de la phase II.

Dans cette deuxième phase, la conjugaison s'effectue sur différents groupements (-OH, -NH₂, -SH, -COOH), dont ceux ajoutés lors de la phase I, en présence de co-facteurs polaires tels que l'acide glucuronique ou UDPGA, cofacteur des UGT, et le phosphoadénosine-5'-phosphosulfate ou PAPS, cofacteur des sulfotransférases. Généralement, l'addition d'un groupement polaire, tel que l'UDPGA, sur une molécule stéroïdienne, provoque un encombrement stérique et diminue l'affinité de l'hormone pour son récepteur. Enfin, la phase III est caractérisée par l'excrétion du produit conjugué hors de la cellule, du tissu et éventuellement de l'organisme. Ce produit conjugué se retrouve dans le plasma (dans le cas d'un tissu périphérique), et il peut alors être éliminé dans la bile ou dans l'urine.

Uridine diphosphoglucuronosyltransférase (UGT)

Chez l'homme, plusieurs composés exogènes et endogènes sont conjugués par les UGT, parmi lesquels la bilirubine, les hormones stéroïdiennes (corticostéroïdes, minéralocorticoïdes, progestatifs, androgènes et œstrogènes) et thyroïdiennes, les acides biliaires, les vitamines liposolubles, les toxines environnementales ainsi que plusieurs drogues [2]. La

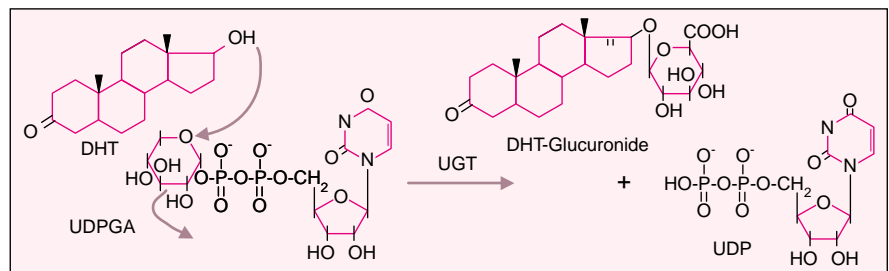


Figure 1. Réaction de glucuronidation catalysée par les UGT. La réaction enzymatique implique deux molécules : un co-facteur, l'acide glucuronique (UDPGA), et une hormone stéroïdienne (dihydrotestostérone : DHT) représentée ici comme substrat.

glucuronidation est généralement considérée comme un mécanisme de détoxification qui modifie l'activité biologique et pharmacologique de différents composés en augmentant l'hydrophilicité de la molécule, et en favorisant ainsi leur excrétion de l'organisme [3]. Chez l'homme, les connaissances actuelles indiquent que le processus général de glucuronidation est catalysé par au moins 15 isoformes différentes. Les caractéristiques des membres de cette famille qui s'accroît sans cesse sont décrites dans les sections suivantes.

Structures chimiques conjuguées par les UGT

Les structures chimiques pouvant être conjuguées par les UGT, possèdent une fonction R-OH, R-SH, R-NH₂, R-CO ou R-COOH [1]. Le groupement accepteur du substrat attaque le carbone C1 situé dans le groupement pyranose de l'UDPGA, formant ainsi un acide β-D-glucopyranosidurique (glucuronide) (figure 1). 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) [4]. L'orientation α ou β 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. Cependant, il est reconnu que les UGT peuvent présenter des réactions croisées avec leurs substrats, tout particulièrement avec les hormones stéroïdiennes [4, 5].

Stéroïdes conjugués

Il existe trois grandes classes de stéroïdes conjugués, les stéroïdes-sulfates [6], les stéroïdes-glucuronides [6] et les stéroïdes-esters d'acides gras [7]. Les processus de sulfatation et de glucuronidation augmentent l'hydrophilicité des stéroïdes, à l'inverse de la formation d'esters d'acides gras de stéroïdes, qui accentue la lipophilicité de ces hormones. Le plasma humain contient de grande quantité de stéroïdes-sulfates et de stéroïdes-glucuronides, tels que le dehydroépiandrostérone-sulfate (DHEA-S), l'estrone-sulfate (E₁-S), l'androstérone-sulfate (ADT-S), l'androstérone-glucuronide (ADT-G) et l'androstane-3α, 17β-diol-glucuronide (3α-diol-G). Les concentrations de ces conjugués sont supérieures à celles de leurs homologues non-conjugués [8]. En général, la glucuronidation et la sulfatation sont associées au catabolisme des hormones stéroïdiennes. La présence de sulfatases dans les tissus périphériques soulève cependant la possibilité que les stéroïdes sulfatés puissent agir comme des précurseurs hormonaux, suite à leur reconversion en stéroïdes libres dans les cellules cibles.

Stéroïdes C19 5α-réduits glucuronides : marqueurs de l'activité androgénique périphérique

En 1968, Mauvais-Jarvis *et al.* observent qu'à la suite d'injections intraveineuses de testostérone chez des sujets masculins, des dérivés glucuro-

nidés d'androstane-3 α , 17 β -diol (3 α -diol) et d'androstérone (ADT) sont identifiables dans l'urine, à des taux plus élevés que ceux des stéroïdes libres correspondants. Des études ultérieures concernant la voie d'administration de la testostérone suggèrent qu'il existe une formation plus importante de produits conjugués lorsque le stéroïde est absorbé par la voie transdermique plutôt que par voie orale ou intraveineuse [9]. Ces premiers résultats ont mené à l'hypothèse que la majorité du 3 α -diol-G plasmatique provenait du métabolisme de la testostérone dans les tissus extra-splanchniques, et plus particulièrement du tissu cutané [9]. Il a donc été proposé que le 3 α -diol-G serve de marqueur de l'activité cutanée du métabolisme des androgènes. Par la suite, des études menées par Morimoto *et al.* (1981) ont suggéré que la dihydrotestostérone (DHT) et la testostérone étaient transformées en 3 α -diol-G directement dans les tissus extra-splanchniques, puisque l'injection de ces deux stéroïdes chez des hommes normaux ne conduisait à aucun gradient de 3 α -diol-G à travers le tissu hépatique. L'ensemble de ces résultats indique clairement que le 3 α -diol-G était un excellent marqueur de l'activité androgénique périphérique et que les UGT sont exprimées dans certains tissus périphériques et pas seulement dans le foie.

En 1986, nous avons démontré que les taux d'ADT-G plasmatiques sont cinq à dix fois plus élevés que ceux du 3 α -diol-G. Une corrélation entre les taux de DHEA, d'ADT-G et de 3 α -diol-G a pu être établie chez des patients castrés. En effet, une réduction de 90 % de la testostérone plasmatique est observée chez ces patients, alors que les taux sériques de 3 α -diol et d'ADT sont inférieurs de 25 % et 40 % respectivement. Cependant, la baisse d'androgènes testiculaires a des conséquences plus dramatiques sur les dérivés conjugués, le 3 α -diol-G et l'ADT-G, dont les taux sont abaissés de 72 % et 63 % respectivement. Ces résultats ont démontré que les taux de stéroïdes conjugués étaient plus affectés par la castration que les stéroïdes libres. Cette étude a confirmé que, chez l'homme, l'ADT-G et le 3 α -diol-G proviennent du métabolisme des

stéroïdes testiculaires (70 %) et surrenaliens (30 %) et qu'ils constituent d'excellents marqueurs de l'activité androgénique périphérique [10]. A l'appui de ces observations, Horton *et al.* ont montré la présence d'une activité glucuronosyltransférase dans la peau et la prostate humaine et ont conclu que cette activité pouvait être responsable des taux de glucuronides trouvés dans la circulation [11].

Taux de stéroïdes C19 5 α -réduits glucuronides circulants

L'évaluation de la concentration plasmatique des stéroïdes 5 α -réduits-glucuronides, effectuée chez plusieurs espèces parmi lesquelles les animaux domestiques (chien, etc.), les rongeurs, le singe et l'homme a révélé que seuls les primates possédaient des taux circulants de stéroïdes-glucuronides (figure 2) [12]. En outre, cette étude a démontré l'absence d'ADT-G et de 3 α -diol-G dans les tissus périphériques de rat alors qu'ils sont présents dans la bile. La présence d'UGT responsables de la conjugaison en position 3 α et 17 β des stéroïdes dans ce tissu suggère que le foie est l'organe majeur de glucuronidation chez le rat. Chez les rongeurs, il semble que les stéroïdes 5 α -réduits périphériques soient relargués dans la circulation pour être finalement conjugués par les hépatocytes. Les stéroïdes glucuronidés à ce site seraient ensuite acheminés vers la bile pour y être excrétés.

Le singe représente le meilleur modèle pour étudier la formation et le catabolisme des stéroïdes dans les tissus périphériques puisqu'il possède de hauts niveaux de stéroïdes-glucuronides en circulation, comme cela est le cas pour l'homme [12]. La présence d'UGT dans la prostate humaine et la prostate de singe a été récemment démontrée par le clonage de plusieurs ADNc codant pour des UGT à partir de ce tissu [2, 13, 14]. La présence d'UGT dans les tissus extra-hépatiques chez l'homme et le singe, combinée à la présence de stéroïdes-glucuronides intraprostatiques et plasmatiques, suggèrent une contribution des tissus périphériques au pool circulant d'androgènes conjugués (figure 3).

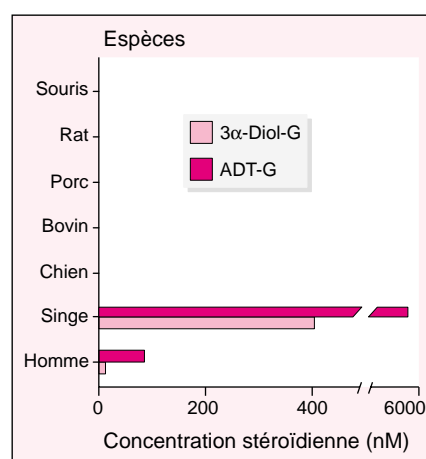


Figure 2. Taux circulants des stéroïdes C19-glucuronides chez l'homme et chez différentes espèces animales. Mesure des stéroïdes conjugués dans le plasma de vingt sujets chez l'homme et quatre mâles chez les autres espèces par RIA (radioimmunoassay).

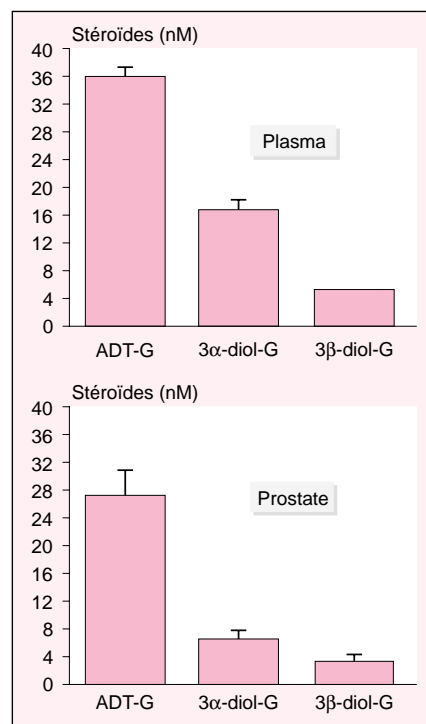


Figure 3. Taux plasmatiques et prostatiques des stéroïdes C19-glucuronides chez l'homme. Les stéroïdes conjugués du plasma (n = 10) et de la prostate (n = 21) sont séparés par chromatographie, et mesurés par RIA.

Variations plasmatiques des stéroïdes C19 5 α -réduits glucuronides chez l'homme

Chez l'homme, en situation normale, la hausse des taux plasmatiques des stéroïdes-glucuronides est liée à l'adrénarche* et à la puberté [15, 16]. En effet, l'augmentation de la sécrétion de DHEA et de DHEA-S observée entre l'âge de 6 et 10 ans provoque une élévation de 3 α -diol-G et d'ADT-G plasmatiques [15, 16]. En outre, l'augmentation de testostérone observée à la puberté induit une hausse de 3 α -diol-G et d'ADT-G, suggérant que les glandes surrénales et les testicules contribuent au taux circulant de stéroïdes-G retrouvé chez l'homme [15].

* Adrénarche : libération pré-pubertaire des hormones cortico-surrénales.

Ces variations de stéroïdes-G en fonction de l'âge ont été analysées chez plus de 2 000 hommes normaux âgés de 40 à 80 ans. Les résultats indiquent que, lors du vieillissement, une baisse de précurseurs surrénaux et d'androgènes testiculaires s'accompagne d'une diminution concomitante de stéroïdes-G sériques [6]. Ces résultats suggèrent donc que les stéroïdes-G plasmatiques reflètent les fluctuations de la sécrétion surrénale et testiculaire de stéroïdes observées avec l'âge.

La superfamille multigénique des UGT

Une nomenclature classant les UGT selon leur divergence évolutive a été proposée pour la première fois en 1991, et sa mise à jour a été effectuée en 1997 [3]. La comparaison des

séquences protéiques a mené à la définition de deux familles (UGT1 et UGT2) et trois sous-familles (UGT2A, UGT2B et UGT2C) identifiées par une lettre suivie d'un chiffre, permettant de distinguer chacune des enzymes. Les membres de la famille 1 sont de 35 à 50 % identiques aux membres de la famille 2, tandis que les membres de la même famille démontrent une homologie supérieure à 50 %. L'homologie entre les enzymes de la même sous-famille est supérieure à 60 %, et celle entre les sous-familles se situe entre 50 % et 60 %. L'utilisation du symbole UGT désignant les UDP-glycosyltransférases a été suggérée, plutôt que de restreindre son utilisation aux UDP-glucuronosyltransférases. Plus de 110 ADNc/gènes répartis en 33 familles ont été identifiés comme faisant partie de cette superfamille d'UGT [3].

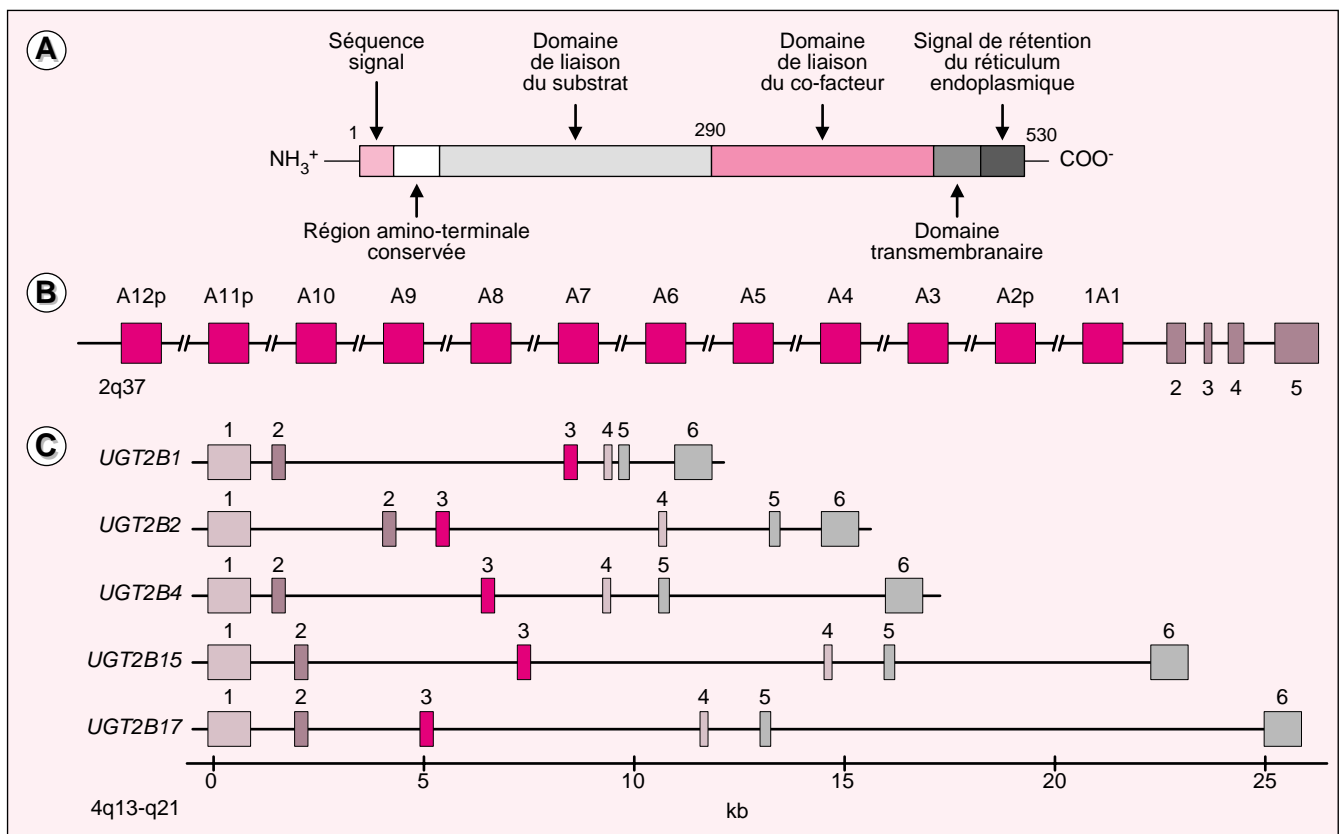


Figure 4. Représentations schématiques de la structure des protéines et des gènes des UGT. **A**. La structure primaire des UGT est constituée de deux domaines structuraux : une région amino-terminale responsable de la liaison au substrat, et une région carboxy-terminale qui se fixe au cofacteur UDPGA. **B**. Un seul gène existe pour les enzymes de la famille UGT1 alors que **C** des gènes indépendants codent pour les enzymes UGT2B. Les gènes humains de la famille UGT1 et UGT2 sont regroupés respectivement dans les régions chromosomiques 2q37 et 4q13-q21.1.

Aspects structuraux des UGT

Les UGT sont des enzymes membranaires de 528-531 acides aminés, qui peuvent être divisées en deux régions, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal (figure 4) [2]. La partie amino-terminale est moins conservée d'une isoenzyme à l'autre, et cette portion variable semble conférer leur spécificité enzymatique aux UGT. Cette région de la protéine contient une séquence signal qui dirige la protéine dans le réticulum endoplasmique [17]. Le séquençage de la portion amino-terminale de protéines purifiées démontrent que la séquence signal est clivée à la suite de la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique [18]. La très grande homologie de séquence dans la région carboxy-terminale des UDP-glucuro-nosyltransférases a conduit à l'hypothèse selon laquelle ce domaine pourrait être responsable de la liaison avec le cofacteur UDPGA. Chez les membres de la famille des UDP-glycosyltransférases, une région consensus, située entre les résidus 350 et 400, responsable de la liaison des sucres (exemple: acide UDP-glucuronique, UDP-glucose,

UDP-galactose, etc.) a été identifiée [3]. Des analyses de profils hydropathiques suggèrent que ce domaine contient également une séquence hydrophobe (17 acides aminés) formant une hélice- α transmembranaire. L'analyse de la structure primaire de l'enzyme révèle un signal d'ancrage au RE composé d'acides aminés chargés positivement (KKXX ou KXKXX) dans la région carboxy-terminal. Ces résidus constituent donc le signal de rétention à l'intérieur du réticulum endoplasmique puisque en l'absence de ce signal, la protéine est distribuée au niveau de la membrane plasmique [17].

La famille UGT1

Chez l'homme, le gène de la famille UGT1 est localisé dans la région 2q37 [2]. Les membres de la famille 1 sont codés par un gène complexe contenant au moins 16 exons (figure 4). Les données génomiques les plus récentes indiquent que le locus UGT1 possède au moins douze premiers exons différents, et que grâce à un mécanisme d'épissage alternatif, 12 transcrits sont issus de ce gène [19]. Les exons 2 à 5 sont communs à l'ARNm de ces différentes UGT, alors que l'exon 1 est spécifique de

chacune des formes. Les différents exons 1 codant pour la partie amino-terminale sont numérotés de 1 à 12 de 3' en 5'. Les exons 2, 11 et 12 correspondent à des pseudogènes contenant des mutations non-sens (codons stop) à l'intérieur de la séquence déduite en acides aminés. Jusqu'à présent, huit protéines ont été caractérisées chez l'homme: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 et UGT1A10. La fonction d'UGT1A5 n'est pas encore connue à ce jour. La spécificité des UGT de la famille 1 envers les stéroïdes est indiquée dans le *Tableau I*. UGT1A1, l'isoforme majeure responsable de la glucuronidation de la bilirubine, catalyse également la conjugaison de l'éthinylestradiol, des catécholœstrogènes et de plusieurs œstrogènes [20]. Cette enzyme conjugue l'anneau A de l'œstradiol pour former l'œstradiol-3-glucuronide, conjugué majeur de l'œstradiol mesuré dans l'urine chez l'homme [20]. La caractérisation de la spécificité enzymatique d'UGT1A9 a récemment révélé que cette enzyme était aussi capable de conjuguer spécifiquement les œstrogènes et les catécholœstrogènes avec une très grande affinité [21].

Dans des conditions hépatiques normales, les enzymes de la famille 1 (UGT1A1 surtout) sont responsables de l'inactivation de la bilirubine et de son excrétion dans la bile. L'excrétion de la bilirubine de l'organisme est d'une grande importance puisque à forte concentration, celle-ci cause des dommages neurologiques irréversibles. Un grand nombre de mutations génétiques sont à l'origine de deux troubles métaboliques liés à la conjugaison de la bilirubine par les UGT, les syndromes de Crigler-Najjar (CN) et de Gilbert. Le syndrome de Crigler-Najjar se manifeste par une hyperbilirubinémie non conjuguée rare mais fréquemment fatale, menant irréversiblement vers une encéphalopathie chez le nouveau-né [22]. Les personnes atteintes de cette maladie peuvent être classées en type 1 (CN1) et en type 2 (CN2) selon les niveaux sériques de bilirubine non-conjuguée [23, 24]. Généralement, le CN1 se produit lorsque les deux allèles présents sur le chromosome 2 contiennent des mutations non-sens ou des changements de cadre de lec-

Tableau I. Spécificité enzymatique des UGT1 envers les hormones stéroïdiennes.

UGT1	Substrats stéroïdiens
UGT1A1	E ₂ , E ₃ , 2-OH-E ₁ , 2-OH-E ₂ , 2-OH-E ₃
UGT1A3	2-OH-E ₂ , 2-OH-E ₁ , E ₂ , E ₁ , 4-OH-E ₂ , 4-OH-E ₁
UGT1A4	ADT, Testostérone, DHT, Etio, 3 α -diol, 3 β -diol, DHEA, E ₂ , E ₃
UGT1A6	Aucun
UGT1A7	E ₃ , 2-OH-E ₂
UGT1A8	4-OH-E ₁ , 4-OH-E ₂ , 2-OH-E ₁ , 2-OH-E ₂ , E ₁ , DHT, 3 α -diol
UGT1A9	E ₁ , E ₂ , E ₃ , 4-OH-E ₁ , 4-OH-E ₂ , 2-OH-E ₁ , 2-OH-E ₂
UGT1A10	E ₂ , E ₃ , 4-OH-E ₁ , 2-OH-E ₂ , E ₁ , ADT

ture, donnant naissance à une protéine UGT1A1 tronquée [3]. Des mutations ponctuelles ont également été rapportées comme étant responsables du CN1 [3]. Les patients atteints du type 2 présentent des symptômes plus modérés, causés par une réduction importante de l'activité UGT1 hépatique.

Le syndrome de Gilbert est une forme d'hyperbilirubinémie trouvée chez 5 à 10 % de la population [25]. Ce syndrome bénin n'est relié à aucune symptomatologie à l'exception de la jaunisse. Dans ce syndrome, l'élimination de la bilirubine est diminuée en raison de la présence d'une mutation rare dans la région codante et promotrice du gène UGT1A1 [3]. Le promoteur du gène UGT1A1 est caractérisé par la présence d'une boîte TATA de la forme (TA)₆TAA (située à 22 nucléotides en amont de la coiffe du message). Chez les patients atteints du syndrome de Gilbert, une répétition supplémentaire du dinucléotide TA produit une boîte TATA de type (TA)₇TAA qui réduit l'expression basale du gène UGT1A1 [26].

La famille UGT2

La famille 2 comprend jusqu'à à ce jour 29 membres subdivisés en trois sous-familles, UGT2A (UGT2A1 olfactif), UGT2B (UGT2B1-UGT2B29P; le P indiquant un pseudogène) et UGT2C (UGT2C1). Les membres de la sous-famille UGT2A, d'abord caractérisés chez le rat et le boeuf, se retrouvent dans l'épithélium olfactif et sont impliqués dans la terminaison du signal odorant [27]. Pour sa part, la sous-famille UGT2B est composée de 24 ADNc isolés chez cinq espèces différentes: l'homme, le rat, la souris, le lapin et le singe [3]. Vingt et une de ces différentes isoformes possèdent une réactivité dirigée vers les stéroïdes. La troisième sous-famille est représentée par une forme exprimée dans le foie de lapin. Cette UGT diffère des autres isoformes identifiées chez cette espèce, et le nom provisoire UGT2C1 lui a été attribuée, afin d'indiquer les divergences de séquences avec les membres de la sous-famille UGT2B.

La comparaison des séquences de cette sous-famille démontre que les différences de séquence sont réparties sur l'ensemble de l'ADNc, contrairement à la famille 1 qui présente des différences uniquement dans la région correspondant à l'extrémité amino-terminale de la protéine. La structure génomique des gènes *UGT2B1*, *UGT2B2*, *UGT2B4*, *UGT2B15* et *UGT2B17* a été élucidée [28]. Les isoformes de cette sous-famille sont codées par des gènes différents contenant chacun 6 exons (figure 4). Chez l'homme, les gènes UGT2B sont regroupés en *cluster* sur le chromosome 4 [28]. Les gènes *UGT2B4*, *UGT2B10*, *UGT2B11*, *UGT2B15* et *UGT2B17*, ainsi que 5 nouveaux pseudogènes (*UGT2B24P*, *2B25P*, *2B26P*, *2B27P* et *2B29P*) [28],

ont été localisés dans la région 4q13-q21.1 [28, 29]. Jusqu'en 1994, tous les ADNc codant pour les enzymes humaines avaient été isolés du foie humain. Ces enzymes ont été nommées dans l'ordre, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10 et UGT2B15. Par la suite, deux autres isoformes nommées UGT2B11 [30] et UGT2B17 [4] ont été isolées de la prostate humaine et de la lignée cellulaire LNCaP [2]. Ces deux nouvelles isoformes, comme l'ensemble des UGT2B, ont pu être identifiées dans la vaste majorité des tissus humains [2]. Mise à part la mise en évidence récente de la spécificité d'UGT2B7 pour l'ADT, aucune enzyme n'avait été identifiée comme potentiellement responsable des taux élevés d'ADT-G plasmatiques et prostatiques retrouvés chez l'homme (figures 2 et 3). Le clonage d'UGT2B17 et la détermination de son expression dans la prostate humaine, expliquerait, du moins en partie, les taux sériques d'ADT-G et de 3 α -diol-G, puisque cette enzyme glucuronide ces métabolites de la DHT, qui seraient ensuite relargués dans la circulation. La spécificité stéroïdienne des enzymes UGT2B chez l'homme est indiquée dans le *Tableau II*.

ont été localisés dans la région 4q13-q21.1 [28, 29].

Jusqu'en 1994, tous les ADNc codant pour les enzymes humaines avaient été isolés du foie humain. Ces enzymes ont été nommées dans l'ordre, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10 et UGT2B15. Par la suite, deux autres isoformes nommées UGT2B11 [30] et UGT2B17 [4] ont été isolées de la prostate humaine et de la lignée cellulaire LNCaP [2]. Ces deux nouvelles isoformes, comme l'ensemble des UGT2B, ont pu être identifiées dans la vaste majorité des tissus humains [2]. Mise à part la mise en évidence récente de la spécificité d'UGT2B7 pour l'ADT, aucune enzyme n'avait été identifiée comme potentiellement responsable des taux élevés d'ADT-G plasmatiques et prostatiques retrouvés chez l'homme (figures 2 et 3). Le clonage d'UGT2B17 et la détermination de son expression dans la prostate humaine, expliquerait, du moins en partie, les taux sériques d'ADT-G et de 3 α -diol-G, puisque cette enzyme glucuronide ces métabolites de la DHT, qui seraient ensuite relargués dans la circulation. La spécificité stéroïdienne des enzymes UGT2B chez l'homme est indiquée dans le *Tableau II*.

Polymorphisme génétique des UGT2B

La première évidence d'un polymorphisme affectant les propriétés cinétiques d'une enzyme de la sous-famille 2B a été obtenue grâce à l'identification de l'allèle UGT2B15(Y⁸⁵) [5]. Celui-ci possède sur les androgènes une activité supérieure à celle de la forme UGT2B15(D⁸⁵) isolée précédemment, alors que sa spécificité enzymatique demeure inchangée. Toutefois, le clonage d'un variant d'UGT2B7 ne possédant qu'un acide aminé différent en position 268 (H268Y) a révélé une spécificité enzymatique différente, suggérant qu'un seul résidu peut modifier l'activité transférase des enzymes appartenant à cette sous-famille. La récente caractérisation d'UGT2B4(E⁴⁵⁸) indique que le gène *UGT2B4* est également polymorphique et que trois allèles différents sont issus de ce gène. Des différences significatives au niveau du métabolisme d'un sel biliaire (acide hyodéoxycholique) ont été rapportées

Tableau I. Spécificité enzymatique des UGT2B envers les hormones stéroïdiennes.

UGT2	Substrats stéroïdiens
UGT2B4	HDCA, 4-OH-E ₁ , E ₃ , 3 α -diol
UGT2B7	HDCA, 4-OH-E ₁ , E ₃ , 3 α -diol, DHT, ADT, testostérone
UGT2B10	Inconnu
UGT2B11	Inconnu
UGT2B15	3 α -diol, DHT, testostérone
UGT2B17	DHT, ADT, 3 α -diol, testostérone

in vitro puisqu'un des allèles possède une activité nulle sur ce composé [31]. Jusqu'à présent, aucune maladie n'est attribuable aux UGT appartenant à la famille 2.

Métabolisme des médicaments par les UGT

Plusieurs médicaments d'utilisation courante, tels que l'aspirine, sont conjugués par les UGT pour être ensuite éliminés. Cependant, alors que la majorité des produits sont inactivés par ces enzymes, il arrive parfois que certaines drogues soient plus actives que leurs homologues non-conjugués. Ainsi, la morphine-6-glucuronide est un analgésique plus puissant que la morphine non conjuguée ou la morphine-3-glucuronide [32]. De plus, des différences individuelles significatives ont été observées dans l'efficacité de glucuronidation de certains médicaments (par exemple les benzodiazépines), laissant présager que la présence de mutations ou de polymorphismes dans les UGT serait responsable de ces altérations métaboliques.

Régulation des UGT

L'effet des hormones sexuelles sur la glucuronidation hépatique des stéroïdes a tout d'abord été étudié chez le rat. Une diminution de l'activité œstrone-UGT hépatique est observable à la suite d'une ovariectomie [33]. L'administration d'œstradiol aux femelles ovariectomisées induit un retour de l'activité UGT à des taux normaux. Cependant, la castration et l'injection de testostérone ne provoquent aucun changement dans l'activité testostérone-UGT chez les rats mâles [33]. Ces résultats suggèrent qu'il existe une régulation différentielle de l'activité stéroïde-UGT selon le sexe. Par la suite, l'influence des hormones mâles et femelles sur l'activité bilirubine-UGT a été démontrée [34]. En effet, l'œstradiol et la progestérone stimulent l'activité UGT sur la bilirubine alors que la testostérone exerce une action opposée sur cette dernière [34]. Ces expériences démontrent donc à l'évidence que, chez le rat, les hormones sont impliquées dans la régulation des UGT.

Une étude plus récente utilisant des isoformes spécifiques révèle des différences marquées au niveau de l'expression des ARN messagers entre les rats mâles et femelles. En outre, après gonadectomie, des altérations significatives sont mises en évidence par *Western blot*. Malgré cette régulation apparente des UGT par les stéroïdes *in vivo*, aucun des gènes caractérisés jusqu'à ce jour ne possède un élément de réponse aux hormones (*hormone responsive element* ou HRE) à l'intérieur de sa région promotrice. De plus, des études récentes démontrent que les hormones thyroïdiennes modulent l'expression du gène *UGT1A1* chez le rat, et que cette régulation nécessite une synthèse protéique *de novo* puisque aucun élément TRE n'est présent dans la région 5' de ce gène. Jusqu'à présent, quelques substances exogènes comme le phénobarbital, le 3-méthylcholanthrène et le clofibrate ont pu être identifiées comme molécules régulatrices de l'expression des gènes *UGT*.

Modèle d'étude in vitro : la lignée cellulaire LNCaP

La lignée cellulaire LNCaP dérive de métastases d'un cancer de la prostate, isolées à partir des ganglions lymphatiques [35]. Cette lignée représente un excellent modèle pour l'étude du métabolisme des stéroïdes dans la prostate humaine, puisqu'elle possède le récepteur des androgènes (bien que présent sous forme mutée) et les enzymes 5 α -réductase, 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase/ Δ 5- Δ 4 isomérase (3 β -HSD) et 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases (17 β -HSD) [36]. De plus, la prolifération des cellules LNCaP dépend des androgènes et de la sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) [37, 38]. Grâce à la spectrométrie de masse, il a pu être démontré que les cellules LNCaP étaient capables de former des dérivés polaires glucuronides avec la testostérone et ses métabolites tels la DHT, le 3 α -diol, le 3 β -diol et l'ADT [36]. La glucuronidation en position 17 β -hydroxy de la DHT et en position 3 α -hydroxy de l'ADT s'accomplit grâce à deux enzymes distinctes, UGT2B15 et UGT2B17 [36, 39, 40]. Les cellules LNCaP expriment fortement

l'ensemble des UGT2B humaines connues à ce jour et représente le meilleur modèle disponible pour isoler, caractériser et étudier la régulation de ces transférases. De telles études ont permis d'étudier spécifiquement la régulation transcriptionnelle des isoformes UGT2B15 et UGT2B17. Ces expériences ont démontré une corrélation entre l'effet des stéroïdes sur la croissance des cellules LNCaP, la sécrétion de l'antigène prostatique spécifique (PSA) et l'inhibition de l'activité stéroïde-UGT. En effet, en présence d'androgènes (DHT) et d'EGF, on observe une baisse d'activité stéroïde-UGT associée à une hausse de la prolifération cellulaire et de la sécrétion de PSA. En outre, des analyses plus spécifiques (protection à la ribonucléase et *Western blots*) ont révélé une régulation différentielle entre UGT2B15 et UGT2B17 lorsque les cellules LNCaP sont traitées avec des androgènes, des facteurs de croissance et des cytokines [40, 41]. Ces résultats indiquent que la baisse d'activité transférase est attribuable à une diminution spécifique de la protéine UGT2B17, une enzyme majeure du catabolisme des stéroïdes.

Les UGT étant des enzymes impliquées dans le catabolisme des androgènes dans la prostate et les cellules LNCaP, la baisse d'activité UGT sur les stéroïdes favorise donc l'accumulation d'androgènes à l'intérieur de ces cellules sensibles à l'hormone et influence la réponse androgénique. Cependant, des études *in vitro* démontrent une augmentation de l'activité testostérone-UGT lorsque les cellules LNCaP sont traitées durant 6 jours avec différents flavonoïdes. Il est donc fort probable que ces composés provoquent une augmentation des taux d'UGT2B15 et UGT2B17, puisque ces enzymes métabolisent les androgènes dans ces cellules. Tout facteur modifiant l'expression des UGT à l'intérieur d'une cellule cible peut donc potentiellement mener à un déséquilibre hormonal et altérer la réponse stéroïdienne.

UGT et concept d'« intracrinologie »

Les testicules chez l'homme et les ovaires chez la femme constituent les

sites primaires de synthèse des hormones androgéniques et œstrogéniques. Cependant, une grande proportion des androgènes chez l'homme (40%) et la majorité des œstrogènes chez la femme (75% avant la ménopause et 100% après la ménopause) sont synthétisées dans les tissus périphériques à partir des précurseurs surrénaliens tels le DHEA, le DHEA-S et l'androstènedione [42]. Selon ce principe, qui réfère à l'«intracrinologie», la formation d'hormones actives a lieu à l'intérieur même de la cellule sans libération extracellulaire [42]. Les gènes qui codent pour les enzymes responsables de la formation et du métabolisme des androgènes et des œstrogènes sont présents dans la vaste majorité des tissus périphériques [42].

Les enzymes impliquées dans la conversion des précurseurs surrénaliens comme le DHEA-S et le DHEA en androgènes (DHT) ou en œstrogènes (œstradiol (E_2)) actifs sont la 3β -HSD, la P450C17, la 17β -HSD, la 5α -réductase et/ou l'aromatase. La présence de ces enzymes dans les tissus tels que la prostate et le sein démontre l'importance de la synthèse locale d'hormones actives dans ces tissus hormono-dépendants. Les stéroïdes sexuels sont synthétisés localement par les cellules cibles qui ajustent la quantité d'hormones actives selon leurs besoins immédiats [42]. La molécule stéroïdienne active ainsi formée interagit alors avec un récepteur cytoplasmique/nucléaire spécifique. Ce complexe hormone/récepteur peut lier des séquences nucléotidiques (HRE) particulières et agir comme facteur de transcription modulant de la sorte l'expression des gènes sous ce contrôle hormonal. Une fois l'action hormonale terminée, la molécule stéroïdienne est conjuguée à l'acide glucuronique (UDPGA) *via* l'action d'une UGT périphérique spécifique présente dans cette cellule cible (figure 5). La nouvelle molécule glucuronconjuguée inactive est ensuite éliminée du tissu et relarguée dans la circulation pour finalement être excrétée dans la bile ou l'urine. Le rôle des UGT responsables du catabolisme stéroïdien est donc de première importance puisqu'un déséquilibre entre les processus de formation et de dégrada-

tion sont susceptibles d'affecter la réponse biologique finale.

Conclusions et perspectives

Chez l'homme, l'expression de différentes isoformes d'UGT joue un rôle primordial dans le maintien des concentrations hormonales des tissus cibles tels que la prostate, en inactivant les hormones au sein de cet organe. Toutes les substances capables de moduler les taux d'UGT dans un tissu sont susceptibles de faire varier les concentrations d'hormones actives, de modifier la réponse stéroïdienne et de moduler ainsi la prolifération des cellules en réponse à cette hormone. Le clonage et la caractérisation récente des gènes codant pour les UGT spécifiques des hormones stéroïdiennes sont en faveur d'un mécanisme intracrine, selon lequel la formation et le catabolisme d'hormones actives se produisent au niveau de la cellule cible (figure 6). Chez l'homme, des expériences récentes montrent que des isoformes très homologues agissant sur les stéroïdes ne sont exprimées que dans certains types cellu-

laire de la prostate et suggèrent l'existence d'une fonction physiologique particulière pour chacune de ces enzymes. Le clonage des ADNc codant pour de nouvelles isoformes d'UGT, l'étude des polymorphismes affectant les propriétés enzymatiques de ces isoformes dans diverses maladies, ainsi que l'analyse des mécanismes de régulation *in vitro* et *in vivo* devraient permettre de mieux comprendre le rôle et l'implication des UGT dans l'hyperplasie bénigne de la prostate, le cancer de la prostate ainsi que dans différentes maladies hormono-dépendantes ■

Remerciements

Merci à Caroline Albert et Michel Vallée pour les données concernant les substrats stéroïdiens conjugués par les UGT1. Merci à David Turgeon pour la lecture critique de ce manuscrit. Merci à Olivier Barbier pour les données d'immunohistochimie. Éric Lévesque bénéficie d'une bourse du Conseil de recherche médicale du Canada.

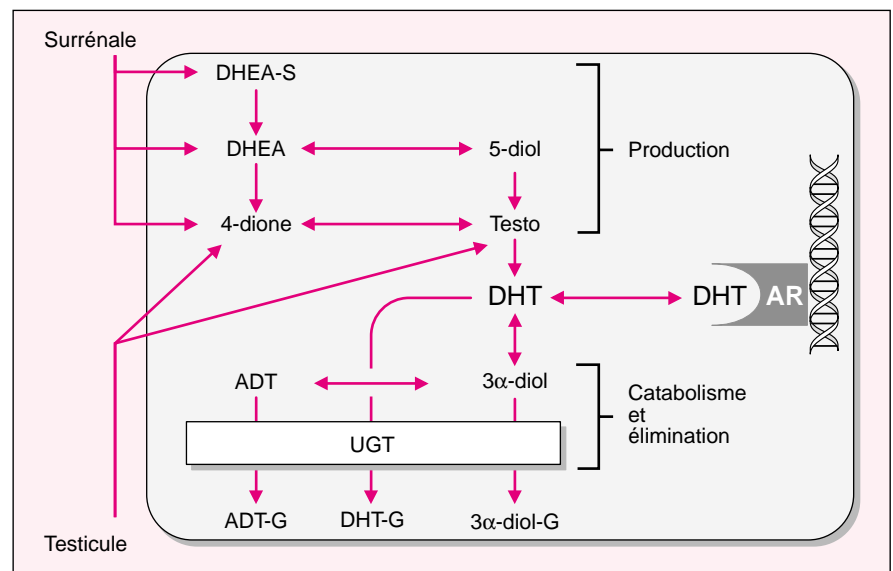


Figure 5. **Production et élimination de la DHT et de ses métabolites dans une cellule cible.** Il existe un équilibre précis entre la formation et la dégradation de la DHT, l'hormone active permettant une régulation de la concentration hormonale.

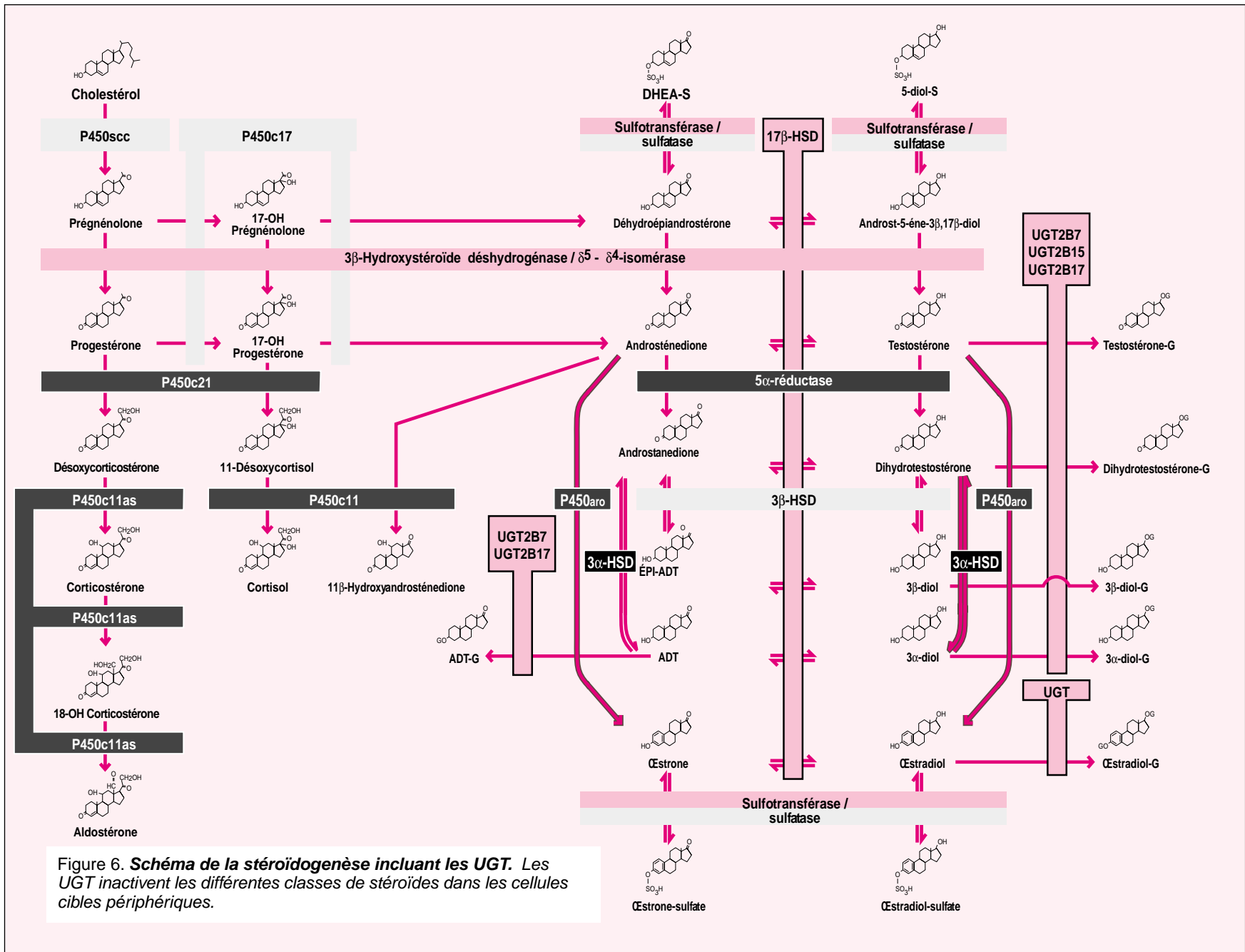


Figure 6. **Schéma de la stéroïdogénèse incluant les UGT.** Les UGT inactivent les différentes classes de stéroïdes dans les cellules cibles périphériques.

RÉFÉRENCES

1. Dutton GJ. *Glucuronidation of drugs and other compounds*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980.
2. Hum DW, Bélanger A, Lévesque E, et al. Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69 (suppl) : 413-23.
3. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997; 7 : 255-69.
4. Beaulieu M, Lévesque E, Hum DW, Bélanger A. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids. *J Biol Chem* 1996; 271 : 22855-62.
5. Lévesque E, Beaulieu M, Green MD, Tephly TR, Bélanger A, Hum DW. Isolation and characterization of UGT2B15 (Y85) : a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* 1997; 7 : 317-25.
6. Bélanger A, Candas B, Dupont A, et al. Changes in serum concentration of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year old men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79 : 1086-90.
7. Hochberg RB. Biological esterification of steroids. *Endocrine Rev* 1998; 19 : 331-48.
8. Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez J, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 : 2396-402.
9. Mauvais-Jarvis P, Bercivici J, Crepy O, Gauthier F. Studies on testosterone metabolism in subjects with testicular feminization syndrome. *J Clin Invest* 1970; 49 : 31.
10. Bélanger A, Brochu M, Cliche J. Levels of plasma steroid glucuronides in intact and castrated men with prostatic cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62 : 812-5.
11. Horton R, Lobo R. Peripheral androgens and the role of androstenediol glucuronide. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 15 : 293-306.
12. Guillemette C, Hum DW, Bélanger A. Levels of plasma C19 steroids and 5 α -reduced C19 steroid glucuronides in primates, rodents, and domestic animals. *Am J Physiol* 1996; 271 : E348-53.
13. Beaulieu M, Lévesque E, Barbier O, et al. Isolation and characterization of a simian UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B18) active on 3-hydroxyandrogens. *J Mol Biol* 1998; 275 : 785-94.
14. Bélanger G, Beaulieu M, Lévesque E, Hum DW, Bélanger A. Expression and characterization of a novel UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B9, from cynomolgus monkey. *DNA Cell Biol* 1997; 16 : 1195-205.
15. Brochu M, Bélanger A. Increase in plasma steroid glucuronide levels in men from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64 : 1283-7.
16. Bélanger A, Brochu M, Lacoste D, et al. Steroid glucuronides: human circulatory levels and formation by LNCaP cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40 : 593-8.
17. Kinoshita M, Masuko T, Sogawa K, et al. Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells. *Cell Struct Funct* 1993; 18 : 41-51.
18. Iyanagi T, Haniu M, Sogawa K, et al. Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for UDP-glucuronosyltransferase. *J Biol Chem* 1986; 261 : 15607-14.
19. Cho J, Gholami N, Owens IS. Diversity and independent regulation at the novel human UGT1 locus encoding 12 UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes through duplication of both exon 1 and the upstream regulatory region. *FASEB J* 1995; A1268.
20. Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase : UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J* 1994; 303 : 33-40.
21. Albert C, Vallée M, Beaudry G, Bélanger A, Hum DW. The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes. *Endocrinology* 1999; 140 : 3292-302.
22. Crigler JF, Najjar VA. Congenital familial non-haemolytic jaundice with kernicterus. *Paediatrics* 1952; 10 : 169-80.
23. Daly AK. Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med* 1995; 73 : 539-53.
24. Meech R, Mackenzie PI. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24 : 907-15.
25. Black M, Billing BH. Hepatic Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity in liver disease and Gilbert's disease. *N Engl J Med* 1969; 280 : 1266-71.
26. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 : 8170-4.
27. Lazard D, Zupko K, Poria Y, et al. Odorant signal termination by olfactory UDP-glucuronosyl transferase. *Nature* 1991; 349 : 790-3.
28. Turgeon D, Carrier JS, Lévesque E, Beatty BG, Bélanger A, Hum DW. Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *J Mol Biol* 2000; 295 : 489-504.
29. Beaulieu M, Lévesque E, Tchernof A, Beatty B, Bélanger A, Hum DW. Chromosomal localization, structure and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a steroid metabolizing enzyme. *DNA Cell Biol* 1997; 16 : 1143-55.
30. Beaulieu M, Lévesque E, Hum DW, Bélanger A. Isolation and characterization of a human orphan UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B11. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248 : 44-50.
31. Lévesque E, Beaulieu M, Hum DW, Bélanger A. Characterization and substrate specificity of UGT2B4 (E458) : a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* 1999; 9 : 206-17.
32. Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR. Human UGT2B7 catalyzes morphine. *Drug Metab Dispos* 1997; 25 : 1-4.
33. Rao GS, Haueter G, Rao ML, Breuer H. Steroid glucuronosyltransferases of rat liver. Properties of oestrone and testosterone glucuronosyltransferases and the effect of ovariectomy, castration and administration of steroids on the enzymes. *Biochem J* 1977; 162 : 545-56.
34. Muraca M, Fevery J. Influence of sex and steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. *Gastroenterology* 1984; 87 : 308-13.
35. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al. LNCaP a model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983; 43 : 1809-18.
36. Guillemette C, Bélanger A. Glucuronosyltransferase activity in human cancer cell line LNCaP. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 107 : 131-9.
37. Bélanger A, Couture J, Caron S, Roy R. Determination of non-conjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Ann NY Acad Sci* 1990; 595 : 251-9.
38. Guillemette C, Hum DW, Bélanger A. Regulation of steroid glucuronosyltransferase activities and transcripts by androgen in the human prostatic cancer LNCaP cell line. *Endocrinology* 1996; 137 : 2872-9.
39. Guillemette C, Hum DW, Bélanger A. Specificity of glucuronosyltransferase activity in the human cancer cell line LNCaP, evidence for the presence of at least two UGT enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 55 : 355-62.
40. Guillemette C, Lévesque E, Beaulieu M, Turgeon D, Hum DW, Bélanger A. Differential regulation of two UDP-glucuronosyltransferases, UGT2B15 and UGT2B17, in human prostate LNCaP cells. *Endocrinology* 1997; 138 : 2998-3005.
41. Lévesque E, Beaulieu M, Guillemette C, Hum DW, Bélanger A. Effect of interleukins on UGT2B15 and UGT2B17 steroid uridine diphosphate-glucuronosyltransferase expression and activity in the LNCaP cell line. *Endocrinology* 1998; 139 : 2375-81.
42. Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 78 : C113-8.

Summary

Role of UDP-glucuronosyltransferases (UGT) in steroid metabolism

The mechanism of conjugation of various compounds by glucuronidation has been described in all vertebrates studied to date. Uridine diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) are membrane-bound enzymes localized in the endoplasmic reticulum of most of human cells, where they catalyze the transfer of the glucuronyl group from uridine 5'-diphosphoglucuronic to active endogenous and exogenous molecules bearing functional groups of oxygen, nitrogen, sulfur and carbon. The resulting glucuronide products are generally hydrosoluble, more polar, less toxic and more easily excreted than the substrate molecule. Examples of such substrates include bilirubin, bile acids and steroids, although xenobiotics such as drugs and pollutants are also detoxified by UGT enzymes. Under normal physiological conditions, the glucuronidation reaction is irreversible, thereby leading to the inactivation and catabolism of several molecules, including steroid hormones. UGTs are important enzymes involved in the regulation of intracellular steroid concentrations and, therefore, in the control of the hormonal response.



TIRÉS À PART

A. Bélanger.

m/s n°1, vol. 17, janvier 2001