



**HAL**  
open science

# Fonctions physiologiques des aldoses réductases dans la glande surrénale

Sarah Lambert-Langlais

► **To cite this version:**

Sarah Lambert-Langlais. Fonctions physiologiques des aldoses réductases dans la glande surrénale. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2007. Français. NNT : 2007CLF21804 . tel-00718601

**HAL Id: tel-00718601**

**<https://theses.hal.science/tel-00718601>**

Submitted on 17 Jul 2012

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

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

*Ecole Doctorale*  
*Des Sciences de la Vie et de la Santé*  
N° d'ordre : 473

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires)

Soutenue le 14 Décembre 2007

**Sarah LAMBERT-LANGLAIS**

---

**Fonctions physiologiques des aldose réductases dans la glande surrénale :  
rôle de l'activité prostaglandine F synthase et création de modèles transgéniques**

---

Président : M. Joël DREVET

Rapporteurs : Mme Martine BEGEOT  
M. Hervé LEFEBVRE  
M. Eric PAILHOUX

Membres : M. Alain FAVIER  
M. Antoine MARTINEZ

Directrice de thèse : Mme Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ



*A Matias et Julien, les deux amours de ma vie*



*Je tiens tout d'abord à remercier Matias et Julien pour leur soutien, leur patience et les sacrifices qu'ils ont consentis ces derniers mois. Mes remerciements vont ensuite à ma famille et à ma belle-famille pour leur aide et leur soutien.*

*Un grand merci à Antoine et Marie Martinez pour m'avoir accueilli dans leur équipe et permis de travailler sur un sujet aussi passionnant comportant des approches moléculaires, cellulaires et in vivo. Je vous souhaite de mettre en évidence de nombreux phénotypes chez les souris  $akr1b7^{-/}$  attendues depuis si longtemps.*

*Je remercie le Professeur Georges Veyssière pour son accueil au sein du laboratoire et sa gentillesse. Merci à tous les membres de l'équipe PCEM passés et actuels pour leur aide, leur soutien et leur amitié. Malgré les périodes de tension et les incertitudes face à l'avenir, ce laboratoire reste un lieu où il fait bon travailler dans la bonne humeur et les plaisanteries subtiles. (La succession est assurée !)*

*Merci aux Drs M. Bégeot, H. Lefebvre, E. Pailhoux, A. Favier et J. Drevet qui me font l'honneur de juger ce travail.*



# **RESUME**





La protéine murine AKR1B7 appartient à la famille des aldose réductases (AKR1B). Par son expression limitée à un petit nombre de tissus et son contrôle hormonal, elle constitue un modèle de choix pour l'étude des fonctions physiologiques de cette famille enzymatique. Mon travail de thèse a eu pour objet *i)* l'étude *ex vivo* du rôle de l'activité prostaglandine F synthase (PGFS) des aldose réductases murines et humaines dans les fonctions endocrines surrénaliennes et *ii)* le développement de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre dans la cortico-surrénale pour réaliser l'invalidation conditionnelle du gène *akr1b7* dans ce tissu.

Suite à la mise en évidence *in vitro* de l'activité PGFS portée par certains membres des AKR1B, nous avons étudié l'implication de cette activité dans la physiologie surrénalienne. L'étude des sites d'expression des AKR1B et des enzymes limitantes de la synthèse des prostaglandines, les cyclooxygénases (COX1 et COX2) a permis de démontrer que la cortico- et la médullo-surrénale expriment ces acteurs essentiels de la biosynthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . De plus, nous avons mis en évidence une régulation coordonnée par l'ACTH de l'expression de COX2 et de AKR1B7 dans le cortex surrénalien. Grâce à son couplage fonctionnel et sa co-localisation intracellulaire avec COX2, AKR1B7 est responsable d'une production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimulée par l'ACTH dans le cortex surrénalien. A l'inverse, une production constitutive de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a été mise en évidence dans les cellules chromaffines qui sont les seules à exprimer le récepteur de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (FP). Nous avons démontré grâce à des modèles cellulaires et des cultures organotypiques que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhibe les productions de corticostérone par le cortex surrénalien et de catécholamines par la *medulla*. Nos données révèlent l'existence d'une boucle de régulation négative entre le cortex et la *medulla*. Lors d'un stress, l'expression du couple COX2-AKR1B7 est stimulée ce qui permet l'augmentation de la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le cortex. En se liant au récepteur FP exprimé par les cellules chromaffines,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  réprime la libération de catécholamines et de ce fait limite leur effet positif sur la stéroïdogénèse.

L'étude *in vivo* des fonctions physiologiques de AKR1B7 nécessite la réalisation de l'invalidation conditionnelle de son gène de manière restreinte au cortex surrénalien. Dans ce but, différentes régions promotrices du gène *akr1b7* ont été utilisées pour créer des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans cet organe. Nous avons obtenu la première lignée de souris dans laquelle la recombinaise Cre est exprimée spécifiquement dans le cortex surrénalien. La variabilité de l'expression de Cre limitera son utilisation pour l'invalidation complète de gènes dans cet organe. Toutefois, cette lignée constitue un outil très puissant pour la création de modèles murins de pathologies tumorales surrénaliennes.

Mots clés : glandes surrénales,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , aldose réductases, système Cre/LoxP



## **ABBREVIATIONS**



---

4E-BP1	eIF4E binding protein 1
4-HNE	4-hydroxynonéal
ACTH	adrenocorticotropin hormone
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AP-1	activator protein 1
AP2	adipose protein 2
APAF-1	apoptotic protease activating factor
AKR	aldo-keto reductase
ALLN	N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucinal
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APC	adenomatous polyposis coli
AR	aldose reductase
ARE	antioxydant responsive element
ARE	androgen responsive element
ARLP	aldose reductase-like protein
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATM	ataxia-telangiectasia mutated kinase
ATP	adénosine triphosphate
Bcl-2	B cell/lymphoma 2 family
Caspase	cysteiny aspartate cleaving protease
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CHO	chinese hamster ovary
CNC	complexe de Carney
COX	cyclooxygénase
Cre	causes recombination
CRE	cyclic AMP response element
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CreER <sup>T2</sup>	recombinase Cre inducible par le tamoxifen
CRF	corticotropin-releasing factor
DAG	diacylglycérol
DAX-1	dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome gene 1
DBH	dopamine- $\beta$ -hydroxylase
DHEA	déhydroépiandrostérone
E	embryonic day
EGF	epidermal growth factor
EGFR	récepteur de l'EGF
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
EOR	espèce oxygénée réactive
EP	récepteur de PGE <sub>2</sub>
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FadE	fetal adrenal enhancer
Fas-L	ligand du récepteur de mort Fas
FGF-1	fibroblast growth factor 1
FP	récepteur de PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>
FR-1	fibroblast growth factor-1 regulated protein
FSH	follicle stimulating hormone
GH	growth hormone
GPC	glycérophosphorylcholine
GS-DHN	glutathionyl-1,4-dihydroxynonène
GSH	glutathion réduit
GS-HNE	hydroxynonéal conjugué au glutathion



---

GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HDAC	histone déacétylase
HEK	human embryonic kidney
HHS	axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
HSD	hydroxystéroïde déshydrogénase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAD	inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
IFN	interféron
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukine
IP	récepteur de PGI <sub>2</sub>
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-triphosphate
JAK	janus kinase 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kb	kilobase
$k_{cat}$	constante catalytique
kDa	kiloDalton
$K_m$	constante de Michaelis
LBD	ligand binding domain
LH	luteinising hormone
LH-R	récepteur de la LH
LPS	lipopolysaccharide
LXR	liver X receptor
LXRE	LXR responsive element
MAO	monoamine oxydase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MC2R	melanocortin 2 receptor
MEK	MAPK/ERK kinase
MMP	métalloprotéinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVDP	mouse vas deferens protein
NAD(P)H	nicotinamide adénine (phosphate) dinucléotide
NF1	nuclear factor 1
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NO	oxyde nitrique
Nrf2	NF-E2-related factor 2
Nur 77	nuclear orphan receptor 77
ORE	osmotic responsive element
OTR	récepteur de l'ocytocine
P450 <sub>17<math>\alpha</math></sub>	cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase
P450 <sub>scc</sub>	cytochrome P450 cholestrol side chain cleavage, desmolase
p70 <sup>S6K</sup>	70-kDa ribosomal protein S6 kinase
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PDGF	platelet derived growth factor
PGD <sub>2</sub>	prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGFS	prostaglandine F synthase
PGH <sub>2</sub>	prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
PGJ <sub>2</sub>	prostaglandine J <sub>2</sub>





---

PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIO	pression intra-oculaire
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
PMA	phorbol myristate acetate
PNMT	phényléthanolamine- <i>N</i> -méthyltransférase
POMC	proopiomélanocortine
POVPC	1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidylcholine
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PPNAD	primary pigmented nodular adrenocortical disease
PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
PRL	prolactine
PRL-R	récepteur de la prolactine
PTG	produit terminal de la glycation
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCP-2	sterol carrier protein 2
SDH	sorbitol déshydrogénase
SDR	small chain dehydrogenase/reductase
SF-1	steroidogenic factor 1
siARN	small interfering ARN
SOCS3	supressor of cytokine signaling 3
Sp1	selective promoter factor 1
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF	transforming growth factor
TH	tyrosine hydroxylase
TIM	triose phosphate isomerase
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	récepteur du TNF
TonEBP/OREBP	tonicity responsive element binding protein/osmotic responsive element binding protein
TP	récepteur du thromboxane A <sub>2</sub>
TxA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>
VCNM	vitesse de conduction des nerfs moteurs
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
Wnt	Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family
YY1	yin yang 1



# **TABLE DES ILLUSTRATIONS**



<b>Figure 1</b> : La glande surrénale.....	1
<b>Figure 2</b> : L'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien .....	3
<b>Tableau 1</b> : Numéros d'accension pour le site Entrez des différents membres des aldose réductases AKR1B .....	7
<b>Figure 3</b> : Structure des gènes codant pour les membres humains et murins de la sous-famille des AKR1B .....	7
<b>Tableau 2</b> : Pourcentages d'identité entre les différents membres de la sous-famille AKR1B.....	9
<b>Figure 4</b> : Structure tridimensionnelle de l'aldose réductase de porc .....	9
<b>Figure 5</b> : Fixation du NADPH sur l'aldose réductase humaine .....	10
<b>Figure 6</b> : Mécanisme réactionnel de la réduction d'un aldéhyde par l'aldose réductase en présence de NADPH ...	10
<b>Figure 7</b> : Alignement des séquences en acides aminés des différents membres de la sous-famille AKR1B.....	11
<b>Figure 8</b> : La voie des polyols.....	12
<b>Figure 9</b> : Mécanisme simplifié de la peroxydation lipidique.....	13
<b>Figure 10</b> : Métabolisme des rétinoïdes .....	15
<b>Figure 11</b> : Réaction de réduction de PGH <sub>2</sub> en PGF <sub>2α</sub> catalysée par les AKR1B en présence de NADPH .....	16
<b>Figure 12</b> : Eléments <i>cis</i> et facteurs <i>trans</i> participant à l'expression de <i>akr1b7</i> dans le canal déférent.....	20
<b>Figure 13</b> : Eléments <i>cis</i> et facteurs <i>trans</i> participant à l'expression de <i>akr1b7</i> dans le cortex surrénalien .....	20
<b>Figure 14</b> : Implication de la voie des polyols dans le développement des complications diabétiques .....	30
<b>Figure 15</b> : Contribution de la voie des polyols dans l'apparition des cataractes diabétiques : apport des souris transgéniques surexprimant l'aldose réductase humaine dans le cristallin.....	30
<b>Tableau 3</b> : Phénotypes des modèles murins utilisés pour démontrer l'implication de la voie des polyols dans l'apparition des neuropathies diabétiques.....	31
<b>Tableau 4</b> : Phénotypes des modèles murins utilisés pour démontrer l'implication de la voie des polyols dans l'apparition des rétinopathies diabétiques.....	32
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de l'implication de l'aldose réductase dans la signalisation cellulaire.....	33
<b>Figure 17</b> : Les trois voies de biosynthèse de PGF <sub>2α</sub> .....	40
<b>Figure 18</b> : Structure des gènes codant pour les cyclooxygénases humaines COX1 et COX2 .....	41
<b>Figure 19</b> : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression du gène <i>cox2</i> .....	42
<b>Figure 20</b> : Structure tridimensionnelle de COX1 ovine.....	43
<b>Figure 21</b> : Réactions catalysées par les COX .....	43
<b>Figure 22</b> : Principales voies de signalisation cellulaire induites par la liaison de PGF <sub>2α</sub> au récepteur FP .....	54
<b>Figure 23</b> : Anatomie générale de l'œil et circulation de l'humeur aqueuse.....	56
<b>Figure 24</b> : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation adipocytaire terminale.....	61
<b>Figure 25</b> : Mécanismes moléculaires de l'effet anti-différenciateur de PGF <sub>2α</sub> sur les préadipocytes.....	63
<b>Figure 26</b> : Modèle hypothétique des facteurs impliqués dans la génération des contractions phasiques spontanées de l'épididyme de boeuf.....	66
<b>Figure 27</b> : Mécanismes moléculaires de l'induction de l'expression de la 20α-HSD par PGF <sub>2α</sub> dans les cellules lutéales.....	69
<b>Figure 28</b> : Modèle simplifié des voies de signalisation apoptotiques .....	73
<b>Figure 29</b> : Constructions utilisées en transgénèse pour l'expression de la recombinaise Cre ou CreER <sup>T2</sup> dans les glandes surrénales et/ou le canal déférent .....	91
<b>Tableau 5</b> : Tableau récapitulatif des différentes lignées transgéniques Cre obtenues .....	92
<b>Figure 30</b> : Analyse de l'expression de la recombinaise CreER <sup>T2</sup> dans les glandes surrénales des souris 1.8 <sup>(-82m)</sup> <i>akr1b7</i> -CreER <sup>T2</sup> /R26R révélée par un marquage β-galactosidase .....	95
<b>Tableau 6</b> : Paramètres cinétiques de l'activité PGFS catalysée par différents membres de la superfamille AKR... ..	96



# **TABLE DES MATIERES**





<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>1</b>
<b>I. La glande surrénale .....</b>	<b>1</b>
<b>A. Une glande endocrine multifonctionnelle.....</b>	<b>1</b>
<b>B. Mécanismes de régulation des fonctions endocrines surrénaliennes.....</b>	<b>2</b>
1. Le système sympatho-surrénalien .....	2
2. Mécanismes de régulation de la production de minéralocorticoïdes.....	3
3. Mécanismes de régulation de la production de glucocorticoïdes.....	3
4. Mécanismes de régulation intra-surrénaliens .....	4
5. Implication des prostaglandines dans la physiologie surrénalienne.....	5
<b>II. Les aldose réductases AKR1B .....</b>	<b>6</b>
<b>A. Les différents membres de la famille AKR1B .....</b>	<b>6</b>
1. Nomenclature .....	6
2. Complexité génétique .....	6
a) Gènes humains .....	7
b) Gène du lapin .....	7
c) Gènes murins.....	7
d) Gènes du rat .....	8
e) Gène du boeuf.....	8
f) Autres gènes .....	8
<b>B. Propriétés structurales des aldose réductases .....</b>	<b>8</b>
1. Structure primaire.....	8
2. Structure tertiaire.....	9
a) Généralités .....	9
b) Fixation du cofacteur .....	10
c) Réduction du substrat.....	10
<b>C. Propriétés cinétiques des aldose réductases.....</b>	<b>12</b>
1. La réduction du glucose .....	12
2. La réduction des aldéhydes.....	13
3. La réduction de dérivés stéroïdiens.....	14
4. La réduction des rétinoïdes.....	15
5. La réduction de xénobiotiques.....	15
6. La réduction des prostaglandines.....	15
<b>D. Localisation tissulaire et régulation de l'expression des aldose réductases .....</b>	<b>16</b>
1. L'aldose réductase .....	16
a) Répartition tissulaire.....	16
b) Régulation transcriptionnelle des gènes codant l'AR.....	17
2. Les protéines apparentées aux aldose réductases ou ARLP .....	19
a) AKR1B7.....	19



b) AKR1B8.....	21
c) AKR1B9.....	22
d) AKR1B10.....	22
e) AKR1B12.....	23
f) AKR1B13.....	23
<b>E. Fonctions physiologiques des aldose réductases.....</b>	<b>24</b>
1. Rôle osmorégulateur.....	24
2. Rôle dans le tractus génital mâle.....	25
a) L'aldose réductase.....	25
b) Les protéines apparentées aux aldose réductases.....	27
3. Détoxification de composés aldéhydiques.....	28
a) L'aldose réductase.....	28
b) Les protéines apparentées aux aldose réductases.....	28
<b>F. Implication des aldose réductases en physiopathologie.....</b>	<b>29</b>
1. Complications diabétiques.....	29
a) Contribution de la voie des polyols dans le développement des complications diabétiques.....	30
b) Autres rôles de l'AR dans le développement des complications diabétiques.....	33
2. Aldose réductase et inflammation.....	35
3. Emergence du rôle des AKR1B dans les cancers.....	37
<b>III. Les prostaglandine F synthases (PGFS).....</b>	<b>40</b>
<b>A. Les voies de biosynthèse de la prostaglandine F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>).....</b>	<b>40</b>
1. Les cyclooxygénases.....	40
a) Structure des gènes et expression.....	40
b) Propriétés structurales et enzymatiques.....	42
2. La synthèse de PGF par la PGE 9-cétoréductase.....	44
3. La synthèse de PGF par la PGD 11-cétoréductase.....	44
4. La synthèse de PGF par la PGH 9-, 11-endopéroxyde réductase.....	45
<b>B. Propriétés structurales et cinétiques des prostaglandine F synthases de la</b>	
<b>superfamille des AKR.....</b>	<b>47</b>
1. AKR1C5.....	47
2. AKR1C7.....	47
3. AKR1C11.....	48
4. AKR1C3.....	48
5. AKR1A1.....	50
6. AKR5A1 et AKR5A2.....	51
7. AKR1B5.....	52
8. AKR1B humaines et murines.....	53
<b>IV. Fonctions physiologiques de PGF<sub>2α</sub>.....</b>	<b>54</b>



A. Le récepteur de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FP) .....	54
B. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la régulation de la pression oculaire .....	56
C. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la fonction rénale .....	58
D. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le système cardio-vasculaire .....	59
E. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans l'inhibition de la différenciation adipocytaire .....	61
F. Rôles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la fonction de reproduction .....	63
1. Rôles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le tractus génital mâle.....	64
2. Rôles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la régression du corps jaune .....	67
a) <i>La lutéolyse</i> .....	67
b) <i>Mécanismes d'action de <math>\text{PGF}_{2\alpha}</math> lors de la lutéolyse fonctionnelle</i> .....	68
c) <i>Effet de <math>\text{PGF}_{2\alpha}</math> sur le stress oxydant associé à la lutéolyse</i> .....	72
d) <i>Implication de <math>\text{PGF}_{2\alpha}</math> dans la lutéolyse structurale</i> .....	73
3. Implication de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la parturition.....	75
<b>V. Projet.....</b>	<b>77</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>Première partie : Mise en évidence et étude du rôle de l'activité PGFS des aldose réductases murines et humaines dans les glandes surrénales .....</b>	<b>81</b>
Article 1 .....	82
Premier bilan.....	83
<b>Deuxième partie : Création d'outils génétiques nécessaires à l'inactivation conditionnelle de gènes spécifiquement dans le cortex surrénalien ou le canal déférent de souris .....</b>	<b>89</b>
Article 2 .....	90
Deuxième bilan.....	91
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>96</b>
<b>I. Activité <math>\text{PGF}_{2\alpha}</math> synthase des AKR1B : détermination du mécanisme catalytique .....</b>	<b>96</b>
<b>II. Fonctions physiologiques des AKR1B : nouveaux apports de l'activité PGFS.....</b>	<b>97</b>
A. Rôles des AKR1B dans la fonction surrénalienne et la réponse au stress .....	97
B. Rôle des AKR1B dans l'adipogenèse.....	101
C. Rôle des AKR1B dans la fonction de reproduction .....	102



**III. Applications des lignées de souris transgéniques Cre..... 103**

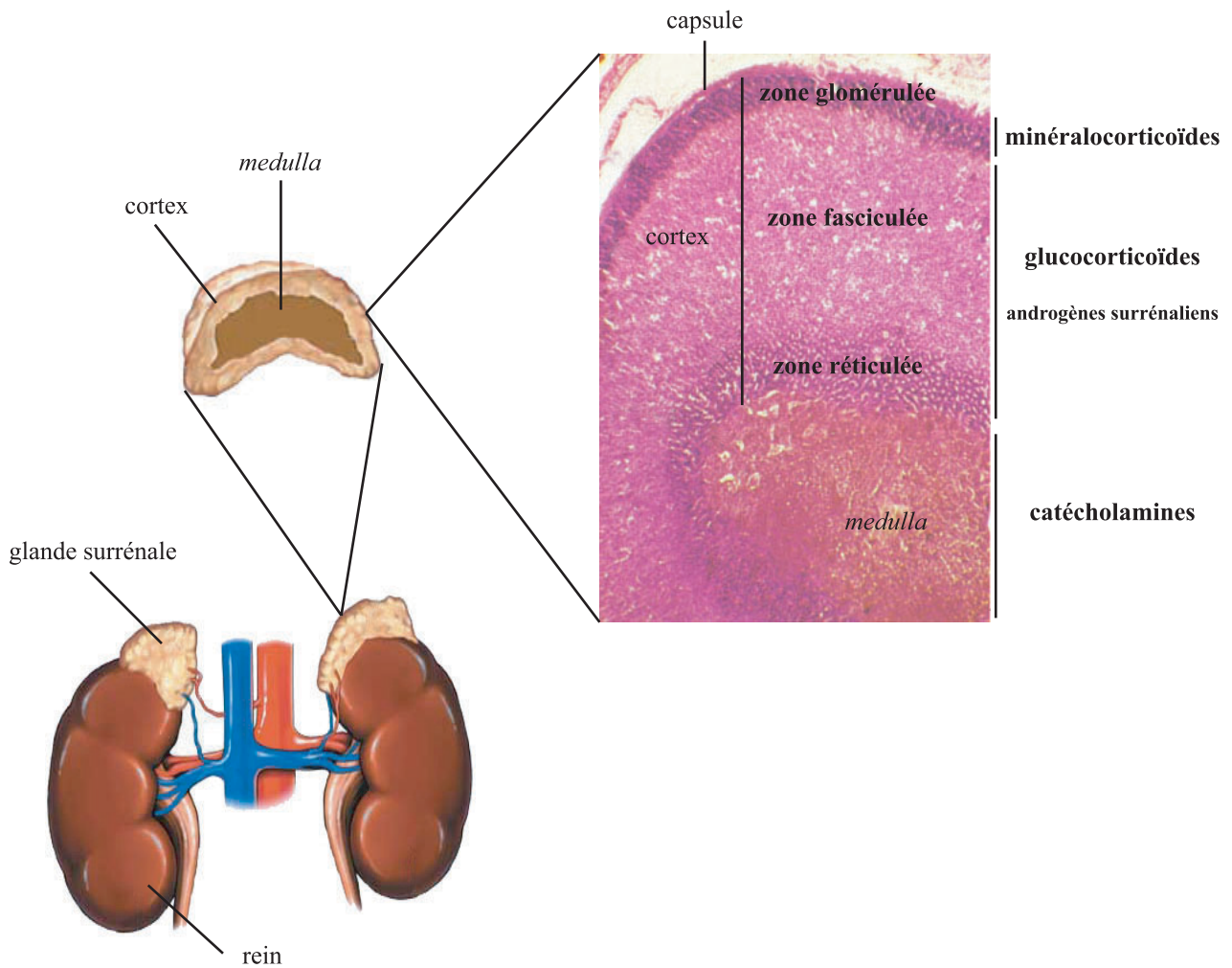
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 106**

**ANNEXE ..... 128**





# **BIBLIOGRAPHIE**



**Figure 1 : La glande surrénale.** Représentation schématique de sa structure macroscopique et coupe transversale d'une surrénale humaine montrant l'organisation du cortex en trois zones concentriques qui entourent la *medulla*. Les principales hormones produites par ces zones sont indiquées sur la droite de la coupe.

## I. La glande surrénale

### A. Une glande endocrine multifonctionnelle

Chez les mammifères, les surrénales sont des glandes endocrines en forme de pyramide surplombant les reins, enveloppées d'une capsule fibreuse et d'une couche de tissu adipeux. Elles sont formées de deux tissus d'origine embryonnaire et de fonctions différentes (figure 1).

- La médullo-surrénale ou *medulla* qui constitue le centre de la glande est d'origine neuro-ectodermique (Landsberg et Young, 1992). Des cellules nommées sympathogonies migrent des crêtes neurales jusqu'à l'ébauche corticale où elles se regroupent progressivement sous forme d'une masse cellulaire centrale. Après différenciation, ces cellules, dénommées cellules chromaffines, produisent des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) mais aussi de nombreux neurotransmetteurs, neuropeptides et protéines. Les catécholamines jouent un rôle intégratif lors d'un stress et ajustent de nombreux métabolismes aux besoins de l'organisme. Notamment, elles augmentent la pression sanguine en agissant sur le cœur, les vaisseaux et le rein. Elles diminuent les fonctions végétatives dans les organes autres que le système cardiovasculaire (relaxation des muscles lisses gastro-intestinaux et urinaires). Elles mobilisent les stocks d'énergie du foie, du tissu adipeux et des muscles squelettiques (augmentation de la glycolyse musculaire et hépatique, de la néoglucogenèse hépatique et de la lipolyse).

- La cortico-surrénale entoure la médullo-surrénale. Le cortex prend naissance à partir de l'épithélium coelomique dorsal de la crête urogénitale qui est également à l'origine des gonades et des reins. Chez les mammifères adultes, la cortico-surrénale est subdivisée en trois zones concentriques suivant des critères morphologiques et fonctionnels (Orth et al., 1992).

La zone glomérulée située immédiatement sous la capsule conjonctive produit les minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone. L'aldostérone est principalement impliquée dans le maintien de l'homéostasie hydro-minérale en favorisant la rétention de sodium et l'excrétion de



potassium au niveau du rein et du colon. Elle permet ainsi une augmentation du volume sanguin et de la pression artérielle en cas de déshydratation ou d'hémorragie.

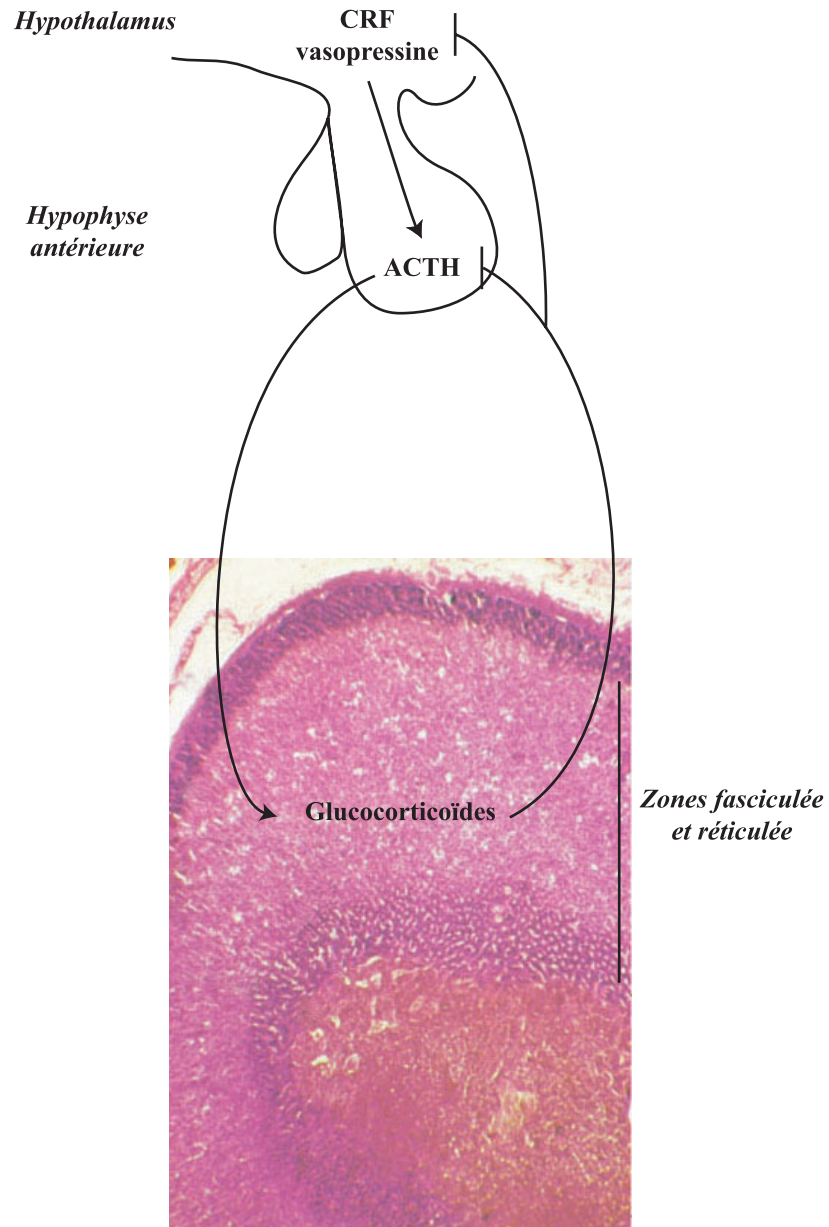
La zone fasciculée qui est la plus développée est composée de cellules stéroïdogènes disposées en colonnes dans l'axe medulla-capsule. Elle sécrète principalement des glucocorticoïdes, le cortisol chez les primates et la corticostérone chez les rongeurs. Les glucocorticoïdes jouent un rôle majeur dans le maintien du métabolisme cellulaire et la réponse de l'organisme au stress en contrôlant la glycémie. En conditions de stress, ils induisent une augmentation marquée des taux plasmatiques de glucose, d'acides gras et d'acides aminés en favorisant la néoglucogenèse, la glycogénogenèse et la lipolyse. Les glucocorticoïdes sont également des composés anti-inflammatoires majeurs et réduisent la réponse immunitaire. Ces propriétés sont utilisées en thérapeutique dans le cadre des maladies auto-immunes ou inflammatoires et pour la transplantation d'organes. Les glucocorticoïdes jouent aussi un rôle dans le développement. Ils stimulent la différenciation de différents types cellulaires dont les cellules chromaffines et induisent la production de surfactant par les pneumocytes de type II.

La zone réticulée contiguë à la médullo-surrénale élabore des quantités moindres de glucocorticoïdes. Les zones fasciculée et réticulée produisent de petites quantités d'androgènes surrénaliens (androsténone, déhydroépiandrostérone (DHEA) et sulfate de DHEA (zone réticulée uniquement)) dont le rôle précis reste obscur.

## **B. Mécanismes de régulation des fonctions endocrines surrénaliennes**

### **1. Le système sympatho-surrénalien**

La médullo-surrénale et le système nerveux sympathique forment une unité anatomique et fonctionnelle que l'on nomme système sympatho-surrénalien (Landsberg et Young, 1992). En effet, les cellules chromaffines sont directement stimulées par les fibres sympathiques pré-ganglionnaires du nerf splanchnique. Ces neurones reçoivent directement des afférences de



**Figure 2 : L'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien.** Le CRF et la vasopressine libérés par l'hypothalamus au niveau de l'hypophyse antérieure induisent la synthèse et la libération d'ACTH dans le sang par les cellules corticotropes. L'ACTH stimule la production de glucocorticoïdes par les zones fasciculée et réticulée du cortex surrénalien. En retour, ces hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la sécrétion de CRF, de vasopressine et d'ACTH.

différentes régions du système nerveux central (*medulla*, pons, hypothalamus). Lorsqu'un facteur de stress amorce la réaction de défense de l'organisme, les centres nerveux sympathiques envoient des influx qui entraînent la libération d'acétylcholine par les neurones préganglionnaires. Cette stimulation nerveuse induit la libération d'adrénaline et de noradrénaline par les cellules chromaffines. De plus, la stimulation du système sympatho-surrénalien augmente à court terme l'activité de la tyrosine hydroxylase (TH) (enzyme catalysant l'étape limitante de la biosynthèse des catécholamines) et à plus long terme sa synthèse.

## **2. Mécanismes de régulation de la production de minéralocorticoïdes**

Deux systèmes majeurs régulent la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée : le système rénine-angiotensine et les concentrations sériques en ions potassium. Toutefois, de nombreux autres facteurs constituent des modulateurs de la sécrétion d'aldostérone comme l'ACTH (adrenocorticotropin hormone) et les autres peptides issus de la proopiomélanocortine (POMC) qui stimulent la libération d'aldostérone ou le facteur natriurétique auriculaire qui la diminue (Orth et al., 1992).

Le système rénine-angiotensine débute dans le rein au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire. Dans chaque néphron, les cellules juxta-glomérulaires sont stimulées lorsque la pression artérielle ou les concentrations en solutés sont diminuées. Elles réagissent en libérant dans le sang une enzyme appelée rénine qui clive la protéine plasmatique nommée angiotensinogène pour former l'angiotensine I. Celle-ci est ensuite convertie en angiotensine II puis angiotensine III qui sont toutes deux de puissants stimulateurs de la production de minéralocorticoïdes. D'autre part, l'augmentation des concentrations sériques en potassium stimule directement la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée.

## **3. Mécanismes de régulation de la production de glucocorticoïdes**

La sécrétion des glucocorticoïdes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HHS) (Orth et al., 1992) (figure 2). Les stimuli nerveux induisent notamment la





libération de CRF (corticotropin-releasing factor) et de vasopressine par l'hypothalamus au niveau du sang portal de l'éminence médiane hypophysaire. Dans l'hypophyse antérieure, au niveau des cellules corticotropes, ces neuropeptides stimulent la synthèse et la sécrétion d'ACTH dans le sang. Au niveau du cortex surrénalien, l'ACTH agit *via* son récepteur MC2R (melanocortin 2 receptor) pour induire la production et la libération des glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes inhibent leur propre production en agissant sur la synthèse et la sécrétion de CRF, de vasopressine et d'ACTH.

#### 4. Mécanismes de régulation intra-surréaliens

Depuis une vingtaine d'années, il est devenu indiscutable qu'en plus des régulations centrales, systémiques et sympathiques, les fonctions surréaliennes sont également régulées par des mécanismes se déroulant au sein de la surrénale.

Au niveau de la *medulla*, les glucocorticoïdes corticaux sont indispensables pour la différenciation et le maintien des cellules chromaffines. Ils stimulent l'expression de neuropeptides et d'enzymes de biosynthèse des catécholamines notamment TH (Fossom et al., 1992), la dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) (McMahon et Sabban, 1992) et la phényléthanolamine-*N*-méthyltransférase (PNMT) (Wurtman et Axelrod, 1966).

Au niveau cortical, de nombreux neuropeptides, neurotransmetteurs, hormones et cytokines sécrétés par les cellules chromaffines, les terminaisons nerveuses ou des cellules du système immunitaire ont été impliqués dans la régulation de la stéroïdogénèse (Ehrhart-Bornstein et al., 1998 ; Delarue et al., 2001). Les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) stimulent de manière aigue la sécrétion de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes. A plus long terme, elles stimulent au niveau transcriptionnel l'expression de protéines impliqués dans la stéroïdogénèse (Ehrhart-Bornstein et al., 1991 ; Haidan et al., 1998 ; Haidan et al., 2000). D'autres neurotransmetteurs comme la sérotonine et l'acétylcholine stimulent également la production de corticostéroïdes chez de nombreuses espèces. Un grand panel de neuropeptides a été testé sur des cellules dispersées ou des cultures organotypiques. La majorité d'entre eux



exerce un effet positif sur la libération des corticoïdes. Différents modes d'action ont été décrits : une action directe sur les cellules stéroïdogènes (vasopressine) ou un effet indirect grâce à la stimulation de la libération de catécholamines (VIP (vasoactive intestinal polypeptide), PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)). Quelques peptides ont démontré une action inhibitrice notamment sur la zone glomérulée comme le facteur natriurétique auriculaire ou la somatostatine. En plus des facteurs neuroendocriniens libérés par les terminaisons nerveuses ou les cellules chromaffines, différentes substances produites par les cellules endothéliales ou des éléments du système immunitaire semblent également participer à la régulation paracrine de l'activité surrénalienne (Turnbull et Rivier, 1999 ; Bornstein et al., 2004). Notamment, de nombreuses études ont impliqué différentes cytokines dans la modulation de la production des corticoïdes dont les plus importantes sont les interleukines IL-1, IL-3 et IL-6 qui exercent un effet positif et le facteur TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) qui inhibent la libération d'aldostérone.

### **5. Implication des prostaglandines dans la physiologie surrénalienne**

Depuis le début des années 1970, différentes études ont montré *in vitro* et *in vivo* une action de certaines prostaglandines sur la stéroïdogénèse surrénalienne. La plupart des études ont montré une action positive de la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sur les quantités d'aldostérone et de corticostérone (Flack et al., 1969 ; Flack et Ramwell, 1972 ; Saruta et Kaplan, 1972). PGE<sub>2</sub> semble être l'agent responsable de l'action positive des interleukines sur la stéroïdogénèse surrénalienne observée chez le bœuf (Winter et al., 1990 ; Michl et al., 2000), le rat (Tominaga et al., 1991) et l'homme (Weber et al., 1997). Récemment, des travaux réalisés sur des surrénales de rat en culture dont l'architecture a été préservée ont montré que l'oxyde nitrique (NO) par l'intermédiaire de PGE<sub>2</sub> entraînait la libération précoce de corticostérone induite par l'ACTH (Mohn et al., 2005). Jusqu'à maintenant, aucune autre prostaglandine n'a été impliquée dans la fonction surrénalienne. Enfin, un point fondamental reste à souligner : aucune étude n'a identifié à ce jour l'ensemble des acteurs enzymatiques impliqués dans la genèse et la régulation du signal prostaglandine dans la glande surrénale.



## **II. Les aldose réductases AKR1B**

### **A. Les différents membres de la famille AKR1B**

#### **1. Nomenclature**

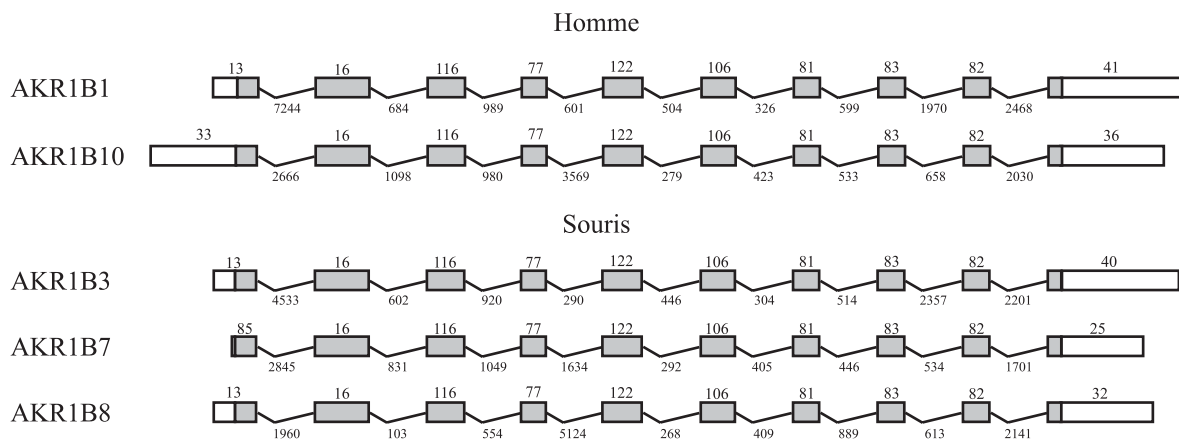
Les aldose réductases (AR) appartiennent à la superfamille des aldo-céto réductases (AKR) qui comptent plus de 114 protéines distribuées en 14 familles. Les membres de cette superfamille sont retrouvés parmi tous les règnes biologiques : mammifères, plantes, levures, protozoaires et bactéries (Hyndman et al., 2003). Ces protéines catalysent toutes des réactions d'oxydo-réduction en se liant aux cofacteurs nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). A l'origine, les membres de cette superfamille étaient nommés en fonction de leurs spécificités de substrats. Au cours des années, une même protéine pouvait porter plusieurs noms suite à l'élargissement de son spectre de substrats. Pour éviter les confusions, une nomenclature systématique basée sur les alignements des séquences protéiques a été adoptée en 1997 (Jez et al., 1997) et est remise à jour régulièrement ([www.med.upenn.edu/akr](http://www.med.upenn.edu/akr)). La superfamille est organisée en familles qui possèdent moins de 40% d'identité en acides aminés entre elles et en sous-familles au sein desquelles les différents membres ont au moins 60 % d'identité. Chaque protéine porte le symbole AKR pour Aldo-Keto Reductase, un nombre désignant la famille, une lettre représentant la sous-famille et un nombre indiquant la séquence protéique. Ainsi, les AR se notent AKR1B, le 1 représentant la famille n°1 et le B désignant la sous-famille des AR.

#### **2. Complexité génétique**

Depuis une vingtaine d'années, la détermination des séquences primaires des AR et les efforts de clonage à partir de différents tissus ont permis d'isoler chez les vertébrés douze protéines AKR1B présentant plus de 60 % d'identité en acides aminés entre elles. D'après leurs phylogénies, elles peuvent être classées en deux sous-groupes : les AR (AKR1B1, AKR1B2,

AKR	nom commun	espèces	protéine	ARN	gène
1B1	aldose réductase	homme	NP_001619	NM_001628	231
1B2	aldose réductase	lapin	NP_001075756	NM_001082287	100009122
1B3	aldose réductase	souris	NP_033788	NM_009658	11677
1B4	aldose réductase	rat	NP_036630	NM_012498	24192
1B5	aldose réductase	bœuf	NP_001012537	NM_001012519	317748
1B6	aldose réductase	porc	NP_001001539	NM_001001539	396816
1B7	mouse vas deferens protein (MVDP)	souris	NP_033861	NM_009731	11997
1B8	fibroblast growth factor regulated protein 1 (FR-1)	souris	NP_032038	NM_008012	14187
1B9	chinese hamster ovary reductase	hamster	AAC53199	U81045	/
1B10	small intestine reductase/aldose reductase-like protein 1 (HSI/ARL1)	homme	NP_064695	NM_020299	57016
1B12	aldose reductase-like protein	poulet	NP_989960	NM_204629	395338
1B13	aldose reductase-like protein	rat	NP_775159	NM_173136	286921

**Tableau 1 : numéros d'accèsion pour le site Entrez des différents membres des aldose réductases AKR1B**



**Figure 3 : Structure des gènes codant pour les membres humains et murins de la sous-famille des AKR1B.** Les rectangles représentent les exons. Le nombre de nucléotides les composant est donné au-dessus. Les séquences codantes sont grisées. Les introns sont visualisés par les lignes et le nombre de nucléotides qui les compose est indiqué au-dessous. (D'après Petrash, 2004).

AKR1B3, AKR1B4, AKR1B5 et AKR1B6) et les protéines apparentées aux aldose réductases ou aldose reductase-like proteins (ARLP) (AKR1B7, AKR1B8, AKR1B9, AKR1B10, AKR1B12 et AKR1B13). Une liste des gènes correspondants et leurs numéros d'accèsion pour le site Entrez ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery)) sont récapitulés dans le tableau 1.

*a) Gènes humains*

Chez l'homme, deux gènes ont été identifiés. Le gène codant l'AR humaine (*AKR1B1*) a été cloné à partir de banques d'ADN complémentaires (ADNc) de placenta (Bohren et al., 1989), de rétine et de muscle squelettique (Nishimura et al., 1990). Le gène codant la small intestine reductase/aldose reductase like protein 1 (*AKR1B10*) a été isolé à partir de banques d'ADNc construites à partir d'intestin grêle (Hyndman et Flynn, 1998) et de tumeurs du foie (Cao et al., 1998 ; Scuric et al., 1998). Ils sont localisés à 68 kb l'un de l'autre en orientation inverse sur le chromosome 7 au locus q35 pour *AKR1B1* (Graham et al., 1991b) et au locus q33 pour *AKR1B10*. Chaque gène est organisé en 10 exons et 9 introns (figure 3) (Graham et al., 1991a).

*b) Gène du lapin*

A ce jour, chez le lapin, seul le gène codant l'AR (*akr1b2*) a été isolé à partir d'ADNc de cellules dérivées de la *medulla* rénale placées en conditions de stress osmotiques (Garcia-Perez et al., 1989). Ce gène divisé en dix exons couvre environ 14,7 kb (Ferraris et al., 1994).

*c) Gènes murins*

Le génome murin possède trois gènes *akr1b* transcrits, *akr1b3* isolé d'une librairie d'ADNc rénaux qui code l'AR murine (Gui et al., 1995), *akr1b7* cloné à partir du canal déférent qui code la protéine MVDP (Mouse Vas Deferens Protein) (Pailhoux et al., 1990) et *akr1b8* isolé à partir de la lignée fibroblastique embryonnaire NIH-3T3 qui code la protéine FR-1 (Fibroblast growth factor-1 regulated protein) (Donohue et al., 1994). Ces trois gènes sont disposés en tandem sur le chromosome 6 et semblent issus d'un événement de duplication d'un gène unique





(Ho et al., 1999). Comme tous les gènes de cette sous-famille, ils sont composés de 10 exons et 9 introns qui ont la même localisation que ceux de l'AR humaine (figure 3).

#### d) Gènes du rat

Chez le rat, quatre transcrits ont été retrouvés : *akr1b4* (aldose réductase) isolé à partir du cristallin (Nishimura et al., 1988), *akr1b13* (aldose réductase like protein) isolé dans des hépatomes (Zeindl-Eberhart et al., 2001), *rakr1b10* (orthologue du gène *AKR1B10* humain) isolé lors de l'annotation du génome murin et *rakr1b7* (orthologue du gène *akr1b7* murin) cloné à partir d'une banque d'ADNc de glandes surrénales (Val et al., 2002b). Ces quatre gènes se situent sur le chromosome 4 au locus q22 et présentent la même organisation génique (Graham et al., 1991c). De plus, *akr1b13* semble être le gène orthologue de *akr1b8* retrouvé chez la souris car ils présentent un fort pourcentage d'identité.

#### e) Gène du boeuf

Le gène codant l'AR bovine (*akr1b5*) a été cloné à partir du cristallin (Petrash et Favello, 1989 ; Schade et al., 1990). Il couvre environ 16,7 kb sur le chromosome 1 et présente la même organisation que les gènes des autres espèces.

#### f) Autres gènes

Le gène de l'AR du porc (*akr1b6*) (Jaquinod et al., 1993) et les gènes codant pour les protéines apparentées aux aldose réductases du hamster chinois (*akr1b9*) (Hyndman et al., 1997) et du poulet (*akr1b12*) (Crosas et al., 2001) ont également été clonés.

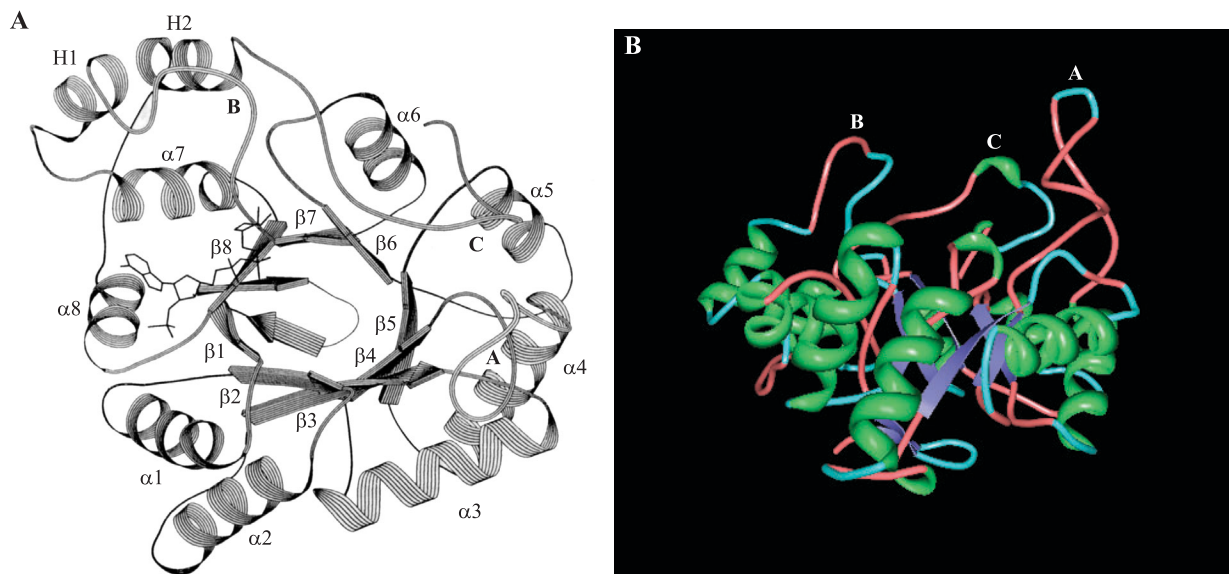
## B. Propriétés structurales des aldose réductases

### 1. Structure primaire

Les douze protéines de la sous-famille se présentent sous forme de monomères composés initialement de 317 acides aminés pour AKR1B12 ou de 316 acides aminés pour les onze autres

		AR						ARLP					
AKR	espèce	1B1 homme	1B2 lapin	1B3 souris	1B4 rat	1B5 boeuf	1B6 porc	1B7 souris	1B8 souris	1B9 hamster	1B10 homme	1B12 poulet	1B13 rat
AR	1B1 homme	100	88,9	85,4	85,4	86,4	86,7	71,2	70,3	70,9	70,6	65,9	71,2
	1B2 lapin	88,9	100	85,4	88,0	87,0	86,4	71,2	71,5	71,8	72,2	67,5	72,5
	1B3 souris	85,4	88,3	100	96,8	84,2	84,5	69,3	69,0	69,6	70,3	67,2	69,0
	1B4 rat	85,4	88,0	96,8	100	84,2	84,5	69,0	69,0	70,6	70,9	67,8	69,3
	1B5 boeuf	86,4	87,0	84,2	84,2	100	90,2	69,0	69,0	69,3	72,2	65,0	69,3
	1B6 porc	86,7	86,4	84,5	84,5	90,2	100	69,3	69,0	69,3	71,5	64,7	69,0
ARLP	1B7 souris	71,2	71,2	69,3	69,0	69,0	69,3	100	82,3	79,4	79,7	66,9	82,0
	1B8 souris	70,3	71,5	69,0	69,0	69,0	69,0	82,3	100	92,1	82,6	67,2	94,6
	1B9 hamster	70,9	71,8	69,6	70,6	69,3	69,3	79,4	92,1	100	83,5	67,5	91,1
	1B10 homme	70,6	72,2	70,3	70,9	72,2	71,5	79,7	82,6	83,5	100	68,5	82,0
	1B12 poulet	65,9	67,5	67,2	67,8	65,0	64,7	66,9	67,2	67,5	68,5	100	66,6
	1B13 rat	71,2	72,5	69,0	69,3	69,3	69,0	82,0	94,6	91,1	82,0	66,6	100

**Tableau 2 : Pourcentages d'identité protéique entre les différents membres de la sousfamille AKR1B.** Les séquences protéiques utilisées sont celles disponibles sur le site Entrez ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery)) à partir des numéros d'accension récapitulés dans le tableau 1. Les pourcentages d'identité protéique ont été obtenus grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor disponible en ligne ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)).



**Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l'aldose réductase de porc (A) vue de dessus (B) vue de côté.** La structure comprend un core cylindrique de 8 feuillets  $\beta$  entourés de 8 hélices  $\alpha$ . A l'extrémité N-terminale, le tonneau est fermé par deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles formant une épingle à cheveux. Deux hélices auxiliaires notées H1 et H2 sont localisées entre le feuillet  $\beta 7$  et l'hélice  $\alpha 7$  et après l'hélice  $\alpha 8$ , respectivement. Trois boucles notées A, B et C émergent au-dessus du tonneau. (D'après Rondeau et al., 1992)

AKR1B ce qui représente une masse moléculaire d'environ 36 kDa. Les protéines matures comptent en fait 315 ou 316 acides aminés après l'élimination de la méthionine amino-terminale. Les identités de séquence protéique des différentes AKR1B sont récapitulées dans le tableau 2.

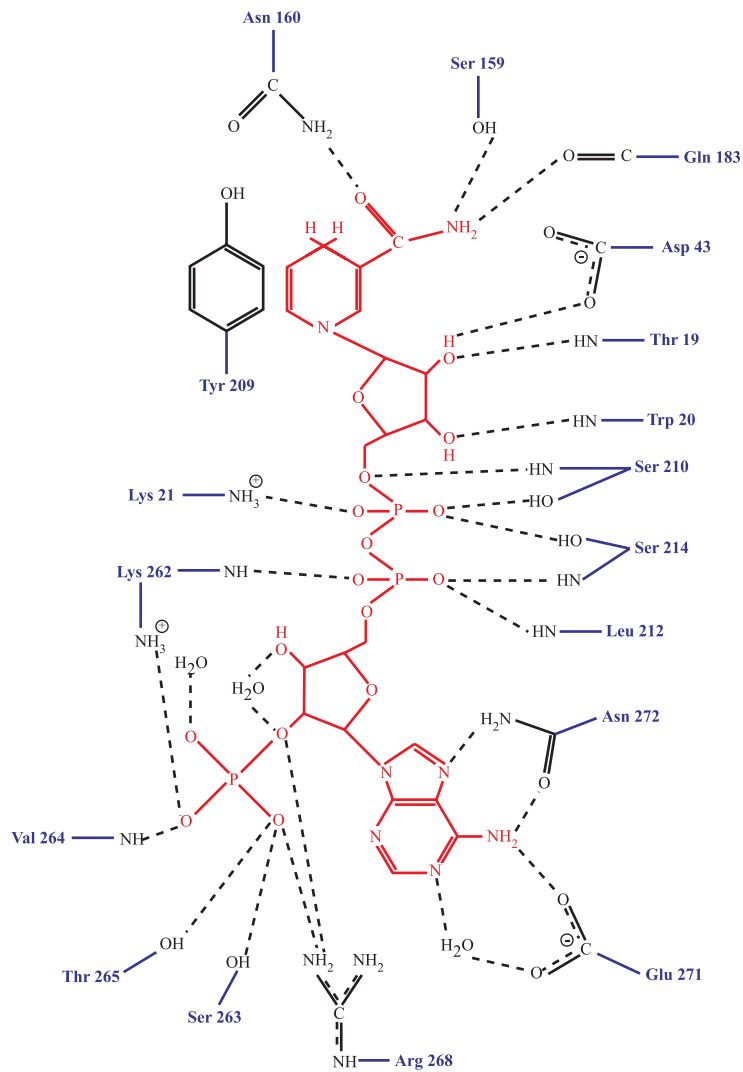
## 2. Structure tertiaire

### a) Généralités

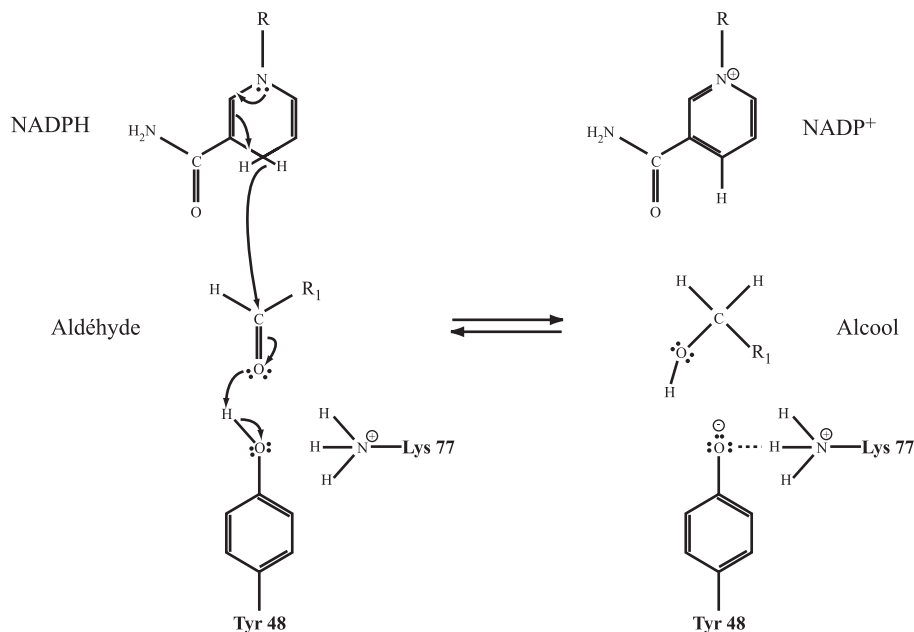
Les études de cristallographie réalisées pour l'AR humaine (Borhani et al., 1992 ; Wilson et al., 1992 ; Wilson et al., 1993) et l'AR de porc (Rondeau et al., 1992) ont permis de déterminer avec précision la structure tridimensionnelle de ces enzymes (figure 4). Les aldose réductases sont des protéines globulaires qui présentent un seul domaine structural constitué d'un noyau central de 8 feuillets  $\beta$  parallèles agencés en forme de tonneau entouré de 8 hélices  $\alpha$ . Ce motif est appelé « barrique  $\alpha/\beta$  » ou « TIM barrel » pour Triose phosphate IsoMerase. Plusieurs structures secondaires rompent la régularité de ce motif :

- A l'extrémité amino-terminale, 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles forment une boucle en épingle à cheveux.
- Deux hélices auxiliaires H1 et H2 sont localisées respectivement entre le feuillet  $\beta 7$  et l'hélice  $\alpha 7$  et après l'hélice  $\alpha 8$ .
- 3 boucles A, B et C émergent au-dessus du motif  $\alpha_8/\beta_8$  à l'extrémité carboxy-terminale.

Le site actif est constitué par une poche large (7 x 13 Å chez l'homme, 4 x 15 Å chez le porc) et profonde (12 Å chez l'homme et 15 Å chez le porc) localisée du côté C-terminal. L'intérieur de cette poche de nature très hydrophobe est tapissé par 7 résidus aromatiques (Trp<sup>20</sup>, Tyr<sup>48</sup>, Trp<sup>79</sup>, Trp<sup>111</sup>, Phe<sup>121</sup>, Phe<sup>122</sup> et Trp<sup>219</sup>) et par 4 résidus apolaires (Val<sup>47</sup>, Pro<sup>218</sup>, Leu<sup>300</sup> et Leu<sup>301</sup>). Les Gln<sup>49</sup>, Cys<sup>298</sup> et His<sup>110</sup> sont les seuls résidus à chaîne latérale polaire dans le site actif.



**Figure 5 : Fixation du NADPH sur l'aldose réductase humaine.** Représentation schématique des interactions (liaisons hydrogène et ponts salins) entre le NADPH (en rouge) et les résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme. (D'après Wilson et al., 1992).



**Figure 6 : Mécanisme réactionnel de la réduction d'un aldéhyde par l'aldose réductase en présence de NADPH.** Un hydrogène est transféré du carbone C4 du noyau nicotinamide du NADPH sur le carbone de la fonction carbonyle du substrat tandis que l'oxygène récupère le proton du groupement hydroxyle de la Tyrosine 48. L'anion alors formé sur cette dernière est stabilisé par une liaison hydrogène avec la fonction amine de la Lysine 77.

*b) Fixation du cofacteur*

Le NADPH se fixe dans une conformation inhabituelle, étiré au travers de la barrière  $\alpha/\beta$  avec son noyau nicotinamide centré dans la partie la plus profonde de la cavité et sa partie adénosine monophosphate callée dans une légère dépression à l'extérieur du tonneau formée par les feuillets  $\beta$ . Le NADPH est maintenu en place par 19 liaisons hydrogènes et trois ponts salins (figure 5). La Tyr<sup>209</sup> située au fond de la poche est en grande partie responsable de l'orientation du noyau nicotinamide dont la face B est dirigée vers l'ouverture de la cavité ce qui permet la réduction du substrat. Les résidus Gln<sup>183</sup>, Asn<sup>160</sup> et Ser<sup>159</sup> participent également à l'orientation correcte du noyau en établissant des liaisons hydrogènes avec son groupement amide. La liaison du NADPH à l'enzyme demande des changements de conformation. Le plus important est la rotation de la boucle B qui recouvre une partie du NADPH à la manière d'une ceinture de sécurité (Borhani et al., 1992 ; Rondeau et al., 1992 ; Wilson et al., 1992).

*c) Réduction du substrat*

La réduction d'un substrat carbonyle par l'AR correspond à un mécanisme « bi-bi » ordonné dans lequel le NADPH est fixé en premier et le NADP<sup>+</sup> libéré en dernier une fois l'alcool formé (Grimshaw et al., 1990 ; Kubiseski et al., 1992). La réaction se décompose selon les étapes suivantes :

- liaison du NADPH dans la poche catalytique
- changement de conformation qui maintient le NADPH dans la cavité
- fixation du substrat sur le complexe enzyme/NADPH
- transfert stéréospécifique de l'hydrogène de l'atome de carbone 4 du cycle nicotinamide du NADPH sur le groupement carbonyle du substrat (figure 6)
- protonation de l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle par le groupement hydroxyl du résidu Tyr<sup>48</sup> (figure 6)
- libération de l'alcool formé



- échange du NADP<sup>+</sup> contre une nouvelle molécule de NADPH

Le changement de conformation nécessaire à la libération du NADP<sup>+</sup> constitue l'étape limitante de cette réaction (Kubiseski et al., 1992 ; Grimshaw et al., 1995).

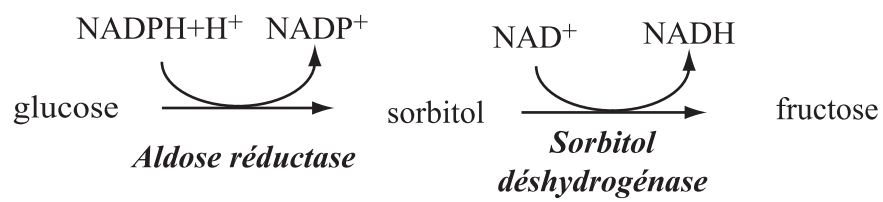
L'analyse structurale de l'AR humaine ou de porc complexée avec différents substrats et inhibiteurs a révélé que toutes ces molécules se fixaient dans le site actif en reconnaissant un site anionique spécifique délimité par l'atome d'azote du carbone 4 du NADPH, l'atome d'oxygène du résidu Tyr<sup>48</sup> et par l'atome d'azote du résidu His<sup>110</sup> (Wilson et al., 1993 ; Harrison et al., 1994 ; Urzhumtsev et al., 1997 ; Steuber et al., 2007). Le site actif est longé de résidus que l'on peut classer en deux groupes :

- le premier groupe compte principalement les résidus hydrophiles (Asp<sup>43</sup>, Tyr<sup>48</sup>, Lys<sup>77</sup>, His<sup>110</sup>, Ser<sup>159</sup>, Asn<sup>160</sup>, Gln<sup>183</sup>, Tyr<sup>209</sup>) qui forment un réseau serré de liaisons hydrogènes avec le cofacteur.

- le deuxième groupe se trouve au-dessus du cofacteur et forme la paroi de la cavité hydrophobe (Trp<sup>20</sup>, Trp<sup>79</sup>, Trp<sup>111</sup>, Phe<sup>122</sup>, Pro<sup>218</sup>, Trp<sup>219</sup>, Cys<sup>298</sup>, Leu<sup>300</sup> et Val<sup>47</sup>). Ce site actif est surtout la cible de groupements hydrophiles négativement chargés. Mais des ligands portant des groupements hydrophobes appropriés comme certains inhibiteurs (tolrestat ou zopolrestat) peuvent induire des changements de conformation qui ouvrent une nouvelle poche appelée la poche de « spécificité ». Celle-ci contient les résidus Thr<sup>113</sup>, Phe<sup>115</sup>, Val<sup>130</sup>, Ser<sup>302</sup> et Cys<sup>303</sup> et partagent avec le site actif les résidus Trp<sup>111</sup>, Phe<sup>122</sup> et Leu<sup>300</sup>.

Ces propriétés structurales sont bien conservées parmi la famille des AKR1B (Wilson et al., 1995 ; Ye et al., 2000 ; Crosas et al., 2001). Les différents résidus importants pour la liaison du cofacteur ou la catalyse sont conservés chez les différents membres (figure 7). Seules de subtiles différences dans le domaine C-terminal (boucle C) de ces enzymes peuvent expliquer les différences de spécificités de substrats que nous allons détailler ci-dessous.





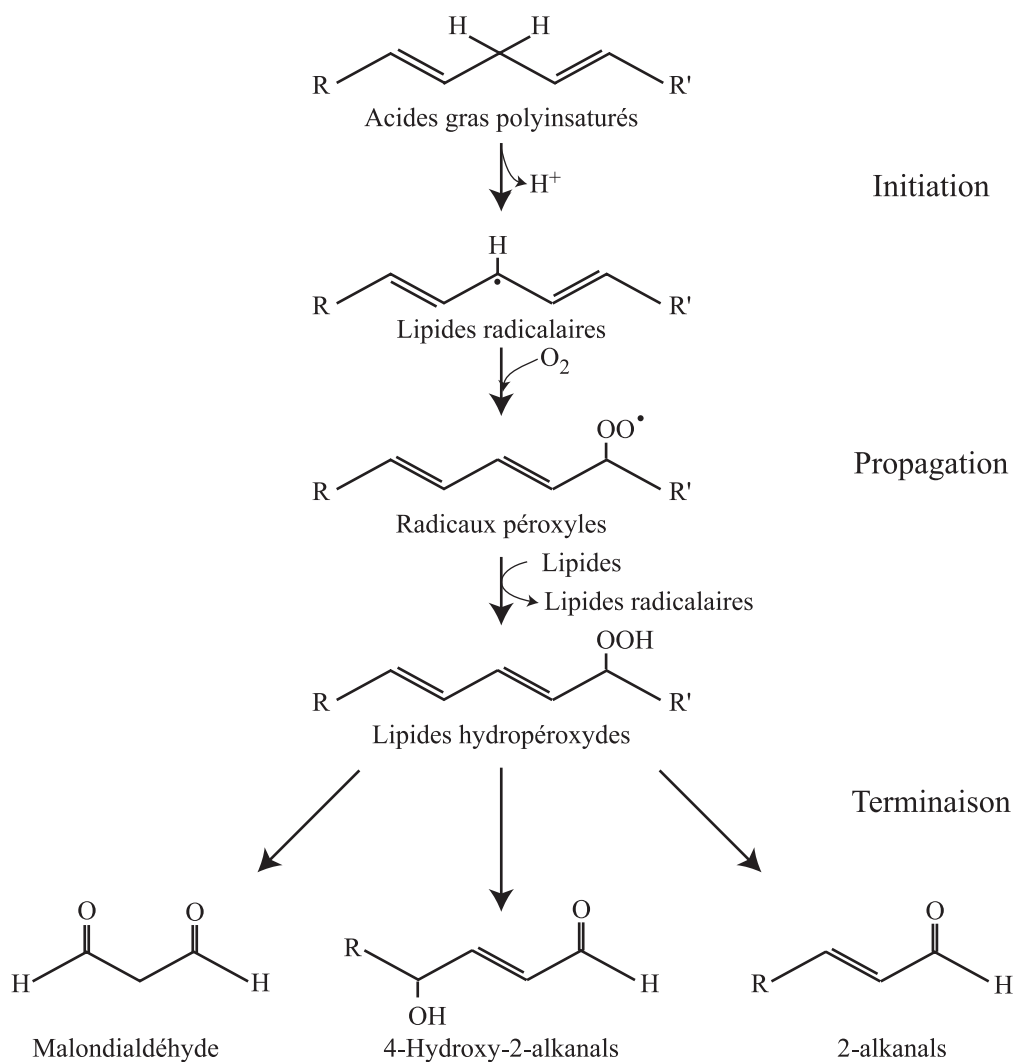
**Figure 8 : La voie des polyols.** Elle se divise en 2 étapes : la réduction du glucose en sorbitol catalysée par l'aldose réductase en présence de NADPH et l'oxydation du sorbitol en fructose par l'action de la sorbitol déshydrogénase en présence de  $\text{NAD}^+$ .

## C. Propriétés cinétiques des aldose réductases

L'AR a été isolée et étudiée à partir d'une grande variété de tissus et d'espèces. Les données biochimiques obtenues ensuite à partir de protéines recombinantes produites en système bactérien d'expression sont en grande partie identiques aux premières données obtenues. AR présente un très large spectre de substrats en réduisant les groupements aldéhydes des aldoses et des aldéhydes aliphatiques et aromatiques ainsi que les groupements cétones des cétones aliphatiques et aromatiques.

### 1. La réduction du glucose

AR a tout d'abord été décrite pour son implication dans la première étape de la voie des polyols où elle catalyse la conversion du glucose en sorbitol en présence de NADPH (figure 8). Cette voie est complétée par la sorbitol déshydrogénase (SDH) qui catalyse l'oxydation du sorbitol en fructose. Le galactose est également un substrat de cette voie bien que le galactitol ne puisse pas être pris en charge par la SDH. D'un point de vue biochimique, le glucose est un substrat médiocre pour AR qui présente une constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 70 000  $\mu\text{M}$  et une constante catalytique  $k_{\text{cat}}$  de 64  $\text{min}^{-1}$ , ce qui représente une efficacité catalytique assez faible (Vander Jagt et al., 1990). De plus, comme nous l'avons décrit précédemment, le site actif de l'enzyme possède peu de résidus polaires qui confèrent aux protéines de bonnes spécificité et affinité pour les sucres grâce aux liaisons hydrogènes qu'ils forment avec le substrat. Ces caractéristiques suggèrent qu'en cas de glycémie normale, le métabolisme du glucose ne soit pas la fonction première de AR. Par contre, l'enzyme doit être très active lorsque les concentrations intracellulaires en sucres augmentent de manière anormale. Cette activité semble portée par les aldose réductases proprement dites (AKR1B1, B2, B3, B4, B5, B6) et par AKR1B10 chez l'homme (Cao et al., 1998). Par contre, toutes les autres protéines apparentées aux aldose réductases qui ont été étudiées biochimiquement (AKR1B7, B8, B9, B12) ne sont pas capables



**Figure 9 : Mécanisme simplifié de la peroxydation lipidique.** La peroxydation lipidique s'effectue principalement en 3 étapes. L'étape d'initiation est induite par des radicaux libres qui peuvent arracher un hydrogène sur les carbones situés entre 2 doubles liaisons. Elle est suivie d'une étape de propagation due aux radicaux peroxydes qui se transforment en peroxydes au contact d'autres acides gras qui forment de nouveaux lipides radicalaires. L'étape de terminaison conduit par des réactions de clivage à la formation d'aldéhydes toxiques. (D'après Burcham, 1998).

de catalyser la réduction du glucose (Hyndman et al., 1997 ; Srivastava et al., 1998b ; Lefrancois-Martinez et al., 1999 ; Crosas et al., 2001).

## 2. La réduction des aldéhydes

D'autres substrats d'un grand intérêt physiologique ont été décrits notamment une large gamme d'aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. Les attaques radicalaires sur les chaînes d'acide gras insaturées des phospholipides entraînent la formation de lipides hydroperoxydes qui vont subir un clivage carbone-carbone. Après des réactions successives, ce processus génère des aldéhydes libres non estérifiés à chaînes moyennes ou courtes (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>) comme le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ou l'acroléine (2-propénal) et des chaînes d'acide gras raccourcies qui restent estérifiées appelées aldéhydes phospholipidiques (figure 9).

*In vitro*, AKR1B1 catalyse la réduction d'une grande gamme d'aldéhydes saturés et insaturés avec une efficacité 1000 à 10 000 fois supérieure à celle qu'elle présente pour le glucose ( $K_m \approx 10$  à  $250 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} \approx 10$  à  $30 \text{ min}^{-1}$ ). Elle montre la meilleure efficacité pour les aldéhydes à chaînes moyennes (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) notamment ceux générés lors de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE (Vander Jagt et al., 1995 ; Srivastava et al., 1999), les alcanes et les alcènes de 4 à 9 carbones (Srivastava et al., 1999). Ces bonnes propriétés catalytiques pour le 4-hydroxynonéal ont été retrouvées pour l'AR de bœuf (AKR1B5) (Srivastava et al., 1995), l'AR de rat (AKR1B4) (Srivastava et al., 1998a) et la protéine apparentée aux aldose réductases FR-1 (AKR1B8) (Srivastava et al., 1998b). Récemment, AKR1B10 a démontré une forte affinité et une bonne activité enzymatique pour l'acroléine ( $K_m = 110 \mu\text{M}$  et  $V_{\text{max}} = 3122 \text{ nmol/min/mg}$  de protéine) qui est un aldéhyde insaturé produit lors de la peroxydation lipidique mais que l'on retrouve également dans l'environnement (Zu et al., 2007).

*In vivo*, les aldéhydes insaturés du fait de leur forte électrophilicité forment des adduits avec le glutathion qui est un agent antioxydant intracellulaire. Ainsi, les études biochimiques ont montré que l'efficacité catalytique de l'AR humaine était significativement plus grande avec les



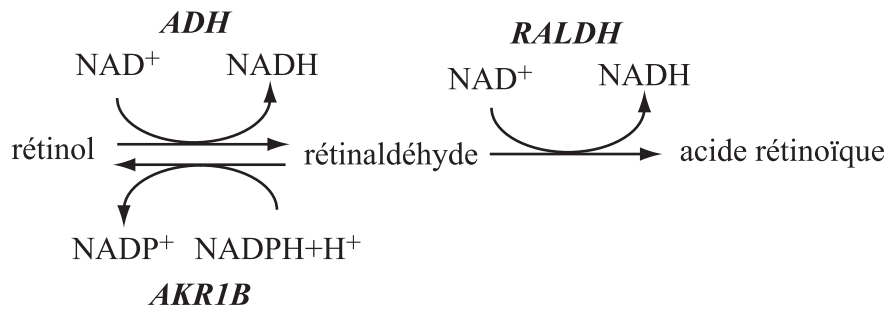
aldéhydes conjugués au glutathion qu'avec les aldéhydes libres correspondants (4 à 1000 fois supérieure) (Srivastava et al., 1999 ; Dixit et al., 2000).

AR catalyse également la réduction de groupements aldéhydes qui restent estérifiés aux phospholipides produits lors de la peroxydation lipidique. Par exemple, le POVPC (1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine), l'aldéhyde phospholipidique modèle est réduit efficacement par AKR1B1 ( $K_m = 8,8 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 25,9 \text{ min}^{-1}$ ) (Srivastava et al., 2004 ; Spite et al., 2007). Ces travaux démontrent également que AR peut prendre en charge beaucoup d'autres aldéhydes phospholipidiques et que cette capacité biochimique semble être bien partagée. En effet, elle a été démontrée pour les trois protéines murines (AKR1B3, B7, B8) et les deux protéines humaines (AKR1B1, B10) qui présentent tout de même des spécificités de substrats différentes parmi ces molécules phospholipidiques (Srivastava et al., 2004 ; Spite et al., 2007).

En 1999, l'AR de lapin a été impliquée dans le métabolisme de la noradrénaline dans les neurones du système nerveux sympathique où elle participerait avec la monoamine oxydase (MAO) à la déamination oxydative des catécholamines (Kawamura et al., 1999). Elle catalyse la réduction du 3,4-dihydroxymandelaldéhyde issu de la déamination de la noradrénaline en 3,4-dihydroxyphénylglycol. Cette propriété a également été démontrée pour l'AR humaine (Kawamura et al., 2002).

### 3. La réduction de dérivés stéroïdiens

Les stéroïdes et leurs dérivés peuvent également être des substrats pour ces enzymes. L'isocaproaldéhyde issu du clivage de la chaîne latérale du cholestérol lors de la première étape de la stéroïdogénèse constitue un bon substrat endogène pour AKR1B1 ( $K_m = 1 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 36 \text{ min}^{-1}$ ) (Matsuura et al., 1996), AKR1B3 ( $K_m = 53 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 78 \text{ min}^{-1}$ ) et AKR1B7 ( $K_m = 320 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 23 \text{ min}^{-1}$ ) (Lefrancois-Martinez et al., 1999). D'autre part, AKR1B5 est également la 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase du bœuf. Elle catalyse *in vitro* la réduction de la 17-hydroxyprogestérone ( $K_m = 71,7 \mu\text{M}$ ) et de la 17-hydroxypregnénolone (Warren et al., 1993 ;



**Figure 10 : Métabolisme des rétinoïdes.** L'acide rétinoïque est formé par l'oxydation successive du rétinol en rétinaldéhyde par les alcool déshydrogénases (*ADH*) et du rétinaldéhyde en acide rétinoïque par la rétinaldéhyde déshydrogénase (*RALDH*). *In vitro*, certains membres des *AKR1B* sont capables de catalyser la réduction du rétinaldéhyde en rétinol qui constitue une étape clé du métabolisme des rétinoïdes.

Madore et al., 2003). Parmi les autres membres de la famille, seule AKR1B9 est capable de réduire certains dérivés aldéhydiques stéroïdiens (Hyndman et al., 1997).

#### **4. La réduction des rétinoïdes**

Chez l'homme, AKR1B1 et AKR1B10 et chez le poulet, AKR1B12 présentent de très bonnes caractéristiques biochimiques vis-à-vis du rétinaldéhyde (AKR1B1,  $K_m = 1,1 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 0,35 \text{ min}^{-1}$ ; AKR1B10,  $K_m = 0,6 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 27 \text{ min}^{-1}$ , AKR1B12,  $K_m = 32 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 170 \text{ min}^{-1}$ ) (Crosas et al., 2001 ; Crosas et al., 2003 ; Gallego et al., 2006). L'acide rétinoïque est formé par l'oxydation successive du rétinol (vitamine A) en rétinaldéhyde par des alcool déshydrogénases et du rétinaldéhyde en acide rétinoïque par la rétinaldéhyde déshydrogénase (figure 10). Seule la première étape est réversible, ce qui fait du rétinaldéhyde une molécule clé dont les taux sont fortement contrôlés. AR pourrait être impliquée dans ce métabolisme.

#### **5. La réduction de xénobiotiques**

D'autre part, du fait de leurs larges spectres de substrats, les AKR1B sont maintenant étudiées pour leur capacité à prendre en charge différents xénobiotiques notamment des agents anti-tumoraux ou des molécules carcinogènes. Une étude récente a montré qu'AKR1B10 pouvait être une réductase efficace du dolasetron qui est un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>3</sub> utilisé comme antiémétique (Martin et al., 2006). Elle peut également réduire deux molécules antitumorales, la daunorubicine et l'oracine ainsi que l'agent cancérigène du tabac NNK (4-méthylnitrosamino-1(3-pyridyl)-1-butanone).

#### **6. La réduction des prostaglandines**

La dernière activité décrite concerne la synthèse des prostaglandines qui jusqu'ici était plutôt attribuée aux enzymes de la sous-famille AKR1C, les hydroxystéroïde déshydrogénases. En effet, l'AR bovine AKR1B5 a été démontrée comme étant la prostaglandine F<sub>2alpha</sub> synthase (PGFS) dans l'endomètre bovin. Elle catalyse la réduction du groupement 9,11 endopéroxyde de



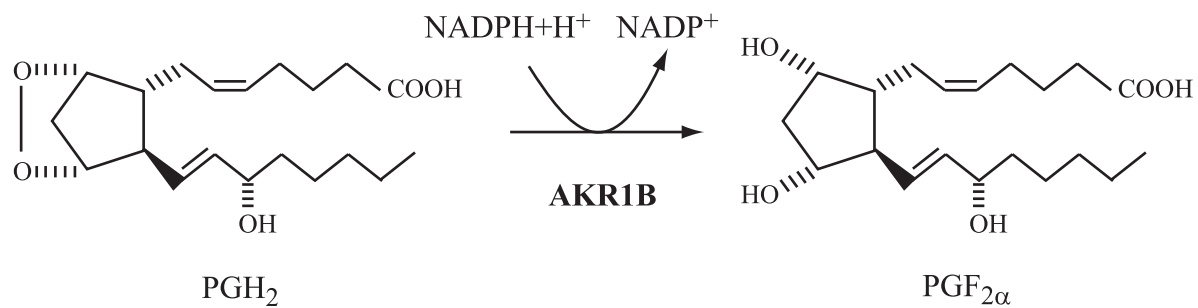


Figure 11: Réaction de réduction de la prostaglandine H<sub>2</sub> en prostaglandine F<sub>2α</sub> catalysée par les AKR1B en présence de NADPH.

la prostaglandine H<sub>2</sub> pour produire la PGF<sub>2α</sub> avec de très bonnes propriétés enzymatiques :  $K_m = 7,1 \mu\text{M}$  et  $k_{\text{cat}} = 0,86 \text{ min}^{-1}$  (Madore et al., 2003) (figure 11).

Des travaux récents réalisés en collaboration avec l'équipe du professeur URADE d'Osaka démontrent qu'AKR1B1, B3 et B7 catalysent la réduction de PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub> en présence du NADPH (annexe). AKR1B8 et AKR1B10 ne possèdent pas cette activité PGFS. Les propriétés cinétiques de AKR1B1, B3 et B7 sont équivalentes ( $K_m$  pour PGH<sub>2</sub> de 2 à 9  $\mu\text{M}$  et  $V_{\text{max}}$  de 26 à 44 nmol/min/mg de protéines) et sont supérieures à celles de la PGFS humaine AKR1C3 ( $K_m = 18 \mu\text{M}$  et  $V_{\text{max}} = 4 \text{ nmol/min/mg}$  de protéines).

## **D. Localisation tissulaire et régulation de l'expression des aldose réductases**

### **1. L'aldose réductase**

#### *a) Répartition tissulaire*

L'AR a été décrite dans de nombreuses espèces (homme, rat, lapin, souris, chien, bœuf, mouton, porc, différents rongeurs) et a été purifiée à partir d'un grand nombre de tissus (cerveau, rein, cristallin, rétine, ovaires, testicules, placenta, vésicules séminales). Son gène n'a été cloné que chez l'homme (*AKR1B1*), le lapin (*akr1b2*), la souris (*akr1b3*), le rat (*akr1b4*), le bœuf (*akr1b5*) et le porc (*akr1b6*) comme nous l'avons développé précédemment (paragraphe I-A-2). L'analyse par northern-blot et/ou western-blot de l'expression de l'AR chez ces différentes espèces montre qu'elle est détectée à des niveaux plus au moins importants dans la plupart des tissus analysés ce qui fait d'elle une enzyme ubiquiste. De manière générale, elle présente une forte expression dans les glandes surrénales, la *medulla* rénale, le coeur et le muscle squelettique. Elle est également retrouvée dans les gonades, le placenta, le cerveau, le cristallin, la rétine et les



nerfs périphériques. Son expression est plus faible dans le foie (Nishimura et al., 1988 ; Grimshaw et Mathur, 1989 ; Gui et al., 1995 ; Cao et al., 1998).

*b) Régulation transcriptionnelle des gènes codant l'AR*

Dans la lignée de cellules épithéliales dérivées de la *medulla* rénale de lapin PAP-HT25, l'augmentation de l'osmolarité extracellulaire par addition de NaCl entraîne une augmentation de l'activité de l'AR dont découle une accumulation de sorbitol intracellulaire (Bagnasco et al., 1987). Cette stimulation de l'activité de l'AR est corrélée à l'augmentation du taux de la protéine dans les cellules (Bedford et al., 1987). Lors du passage en conditions hypertoniques, les auteurs observent une augmentation de la synthèse de la protéine (15 fois en 24h) tandis que sa dégradation reste lente (25 % en 3 jours) (Moriyama et al., 1989). L'accumulation de l'ARN messenger (ARNm) de l'AR suit le même profil d'induction (18 fois en 18h) que la protéine (Garcia-Perez et al., 1989). Suite à ces travaux, les auteurs ont cloné et caractérisé la région 5'-flanquante du gène de l'AR de lapin. Ils ont mis en évidence la présence d'éléments de réponse à l'osmolarité (ORE) dans la région -3429/-192 (Ferraris et al., 1994). L'élément minimum essentiel est en fait composé de 11 pb (C/TGGAAAATCAC) situées en positions -1105/-1094 chez le lapin (Ferraris et al., 1996). Cet élément a depuis été identifié dans le promoteur du gène de l'AR de souris (Daoudal et al., 1997), de l'homme (Ko et al., 1997) et de rat (Aida et al., 1999). Cet élément lie le facteur de transcription TonEBP/OREBP (tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein) (Miyakawa et al., 1999) qui appartient à un important complexe protéique identifié récemment. Celui-ci comprend des kinases, des hélicases, des protéines de chocs thermiques, la poly (ADP-ribose) polymérase 1, et des ribonucléoprotéines nucléaires (Chen et al., 2007). Différentes kinases contribuent à l'activation de TonEBP par l'hyperosmolarité mais aucune n'est suffisante : la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) p38 (Ko et al., 2002), la tyrosine kinase Fyn (Ko et al., 2002), la protéine kinase A (PKA) (Ferraris et al., 2002) et la kinase mutée dans l'ataxie-télangiectasie (ATM) (Irarrazabal



et al., 2004). Les mécanismes moléculaires permettant la régulation transcriptionnelle de l'AR lors du stress osmotique ne sont donc pas encore totalement identifiés.

Plus récemment, de nouvelles régulations de l'expression de l'AR ont été démontrées notamment lors du stress oxydant dans des cellules musculaires lisses aortiques de rat. En effet, l'expression de l'AR est stimulée par le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Spycher et al., 1997), l'oxyde nitrique NO et l'ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  (Seo et al., 2000). L'activation du gène de l'AR par l' $H_2O_2$  est principalement médiée par la voie de signalisation du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) et de la MAPK ERK (Extracellular signal-Regulated protein Kinase) mais elle implique également la voie de la MAPK p38 (Nishinaka et Yabe-Nishimura, 2001). Dans des cellules endothéliales microvasculaires humaines en culture, l'expression de l'AR est induite par les produits terminaux de la glycation (PTG) (Nakamura et al., 2000) mais les mécanismes moléculaires impliqués restent à identifier. Différentes études ont également montré que l'expression de l'AR était régulée par certains de ses substrats supposés comme le méthylglyoxal (Chang et al., 2002 ; Yabe-Nishimura et al., 2003) et le 4-hydroxynonéal (Spycher et al., 1996 ; Spycher et al., 1997). En fait, ces deux composés hautement réactifs entraînent dans la cellule l'apparition d'espèces oxygénées réactives (EOR) et de PTG qui pourraient stimuler l'expression du gène de l'AR. De manière inattendue, l'étude portant sur le méthylglyoxal a montré une implication importante de la voie de la MAPK p38 mais aucun rôle de la voie ERK dans la stimulation par ce substrat (Chang et al., 2002 ; Yabe-Nishimura et al., 2003). Des éléments de réponse antioxydants (ARE : antioxidant responsive element) et un site de liaison du facteur de transcription AP1 ont été identifiés près de l'ORE dans la région 5'-flanquante du gène de l'AR de souris. L'un des ARE et le site AP1 sont nécessaires à la transactivation du promoteur par le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2-related factor 2) qui est impliqué dans la régulation de diverses enzymes de détoxication (Nishinaka et Yabe-Nishimura, 2005). Pour l'instant, les autres facteurs de transcription participant à la régulation de l'AR par le stress oxydant ne sont pas connus.



De plus, dans la lignée cellulaire issue d'une tumeur de cortex surrénalien humain NCI-H295, l'expression du gène *AKR1B1* est significativement augmentée par un traitement par la forskoline, un activateur de la synthèse d'AMP cyclique (AMPC). Cette étude laisse supposer que l'expression de *AKR1B1* pourrait être régulée par la voie AMPC/PKA (Lefrancois-Martinez et al., 2004).

## 2. Les protéines apparentées aux aldose réductases ou ARLP

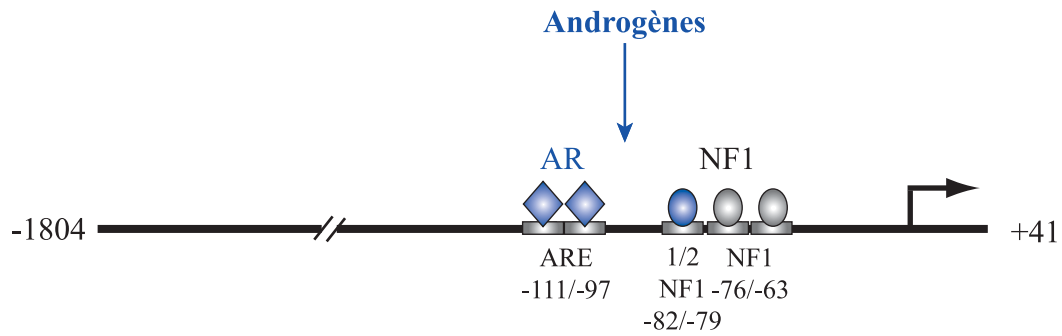
Les ARLP (AKR1B7, B8, B9, B10, B12 et B13) présentent une répartition tissulaire plus restreinte que celle de l'aldose réductase et pour certaines d'entre elles des modes de régulation inédits.

### a) *AKR1B7*

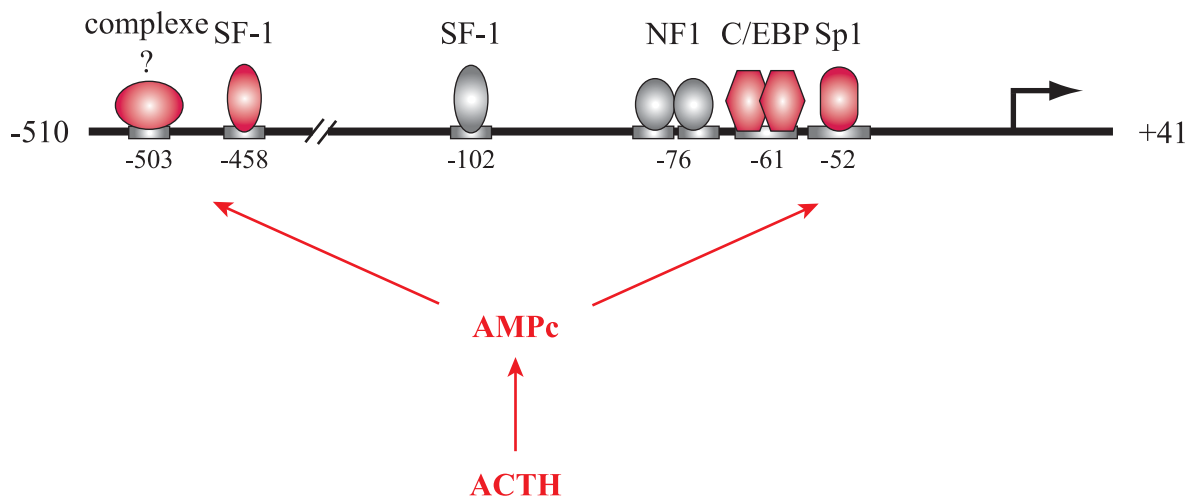
L'expression du gène *akr1b7* a été étudiée en détail grâce à l'utilisation de la stratégie d'analyse par protection à la RNase (Lau et al., 1995). AKR1B7 est exprimée en grande quantité dans le canal déférent où elle a été décrite pour la première fois. Elle présente également une expression importante dans les glandes surrénales et des taux d'ARNm conséquents sont présents dans l'intestin, les vésicules séminales et l'œil. Les transcrits sont également détectés en faible quantité dans le rein, le foie, les poumons et le testicule. L'analyse protéomique d'ovaires de souris traitées par la LH (Luteinising Hormone) a révélé la présence de AKR1B7 dans les cellules de la thèque et les cellules interstitielles (Brockstedt et al., 2000). Une étude menée par microarray sur des souris rendues obèses par un régime a mis en évidence la présence du transcrit *akr1b7* dans le tissu adipeux blanc péri-épididymaire (Moraes et al., 2003).

Dans le canal déférent, l'expression de AKR1B7 est dépendante des androgènes (Taragnat et al., 1988). La testostérone stimule la transcription du gène après activation du récepteur des androgènes (Martinez et al., 1990). Un élément de réponse aux androgènes (ARE) fonctionnel situé en -111 a été identifié (Fabre et al., 1994). Celui-ci ainsi qu'un demi-site de liaison du





**Figure 12 : Eléments *cis* et facteurs *trans* participant à l'expression de *akr1b7* dans le canal déférent.** Les facteurs *trans* impliqués dans l'activité basale du promoteur sont indiqués en gris, ceux participant à la réponse aux androgènes sont indiqués en bleu.



**Figure 13 : Eléments *cis* et facteurs *trans* participant à l'expression de *akr1b7* dans le cortex surrénalien.** Les facteurs *trans* impliqués dans l'activité basale du promoteur sont indiqués en gris, ceux participant à la réponse à l'AMPc sont indiqués en rouge.

facteur NF1 (Nuclear Factor 1) situé en -82 sont indispensables *in vivo* à la régulation par les androgènes (Martinez, données non publiées) (figure 12).

AKR1B7 est exprimée dans le cortex surrénalien sous le contrôle transcriptionnel de l'ACTH. Cette induction est médiée par la voie de signalisation intracellulaire impliquant l'AMPc et la PKA (Aigueperse et al., 1999 ; Aigueperse et al., 2001). Des expériences de transgénèse additive ont permis de définir les séquences régulatrices du gène *akr1b7* permettant son expression et sa régulation dans le cortex surrénalien (figure 13). Ces séquences sont constituées d'un fragment de 0,5 kilobase (kb) de la région 5' flanquante du gène *akr1b7* (-510/+41) (Martinez et al., 1999 ; Martinez et al., 2003). De plus, des régions intragéniques (introns 1 et 2) coopèrent avec les séquences en amont pour augmenter la probabilité d'expression du transgène. Des expériences de transfections transitoires réalisées en lignées cellulaires cortico-surréaliennes Y1 ont permis d'identifier les éléments *cis* et les facteurs *trans* participant au contrôle du gène dans la glande surrénale. Les premiers travaux (Aigueperse et al., 2001) ont montré que la région proximale -121/+41 était suffisante pour obtenir *ex vivo* une activité transcriptionnelle basale et une réponse à l'AMPc. L'expression basale nécessite la liaison du facteur SF-1 (Steroidogenic Factor 1) sur un site atypique en -102 et la liaison du facteur NF1 sur un site situé en -76. La réponse à l'AMPc est médiée par l'interaction fonctionnelle des facteurs Sp1 (Selective Promoter factor 1) et C/EBP $\beta$  (CCAAT Enhancer Binding Protein  $\beta$ ) au niveau des sites situés en -52 et -61. Suite à ces travaux, l'analyse de la séquence nucléotidique et des expériences de retard sur gel ont permis de mettre en évidence dans la région -510/-121 deux éléments de réponse potentiels du facteur SF-1 en position -503 et -458 (Val et al., 2002a). La fonction de ces deux sites a été analysée grâce à des constructions mutantes transfectées dans des cellules cortico-surréaliennes Y1 et par retardement sur gel. Ces expériences ont révélé que la réponse à l'AMPc était conditionnée par la liaison d'un complexe protéique inconnu spécifique de la surrénale sur le site -503 et du facteur SF-1 sur le site -458 (Val et al., 2004).



Dans les gonades, AKR1B7 est exprimée dans les cellules interstitielles et de la thèque chez la femelle et dans les cellules de Leydig chez le mâle. Dans les deux cas, son expression est régulée par la LH (Brockstedt et al., 2000 ; Martinez et al., 2001 ; Baron et al., 2003). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation restent à identifier.

Dans l'intestin, l'expression du gène *akr1b7* est une cible du récepteur nucléaire orphelin LXR $_{\alpha}$  (Liver X Receptor) *via* trois éléments de réponse aux LXR (LXRE) situés dans la région régulatrice -510/+41 (Volle et al., 2004). Toutefois, les éléments *cis* responsables de son ciblage dans l'intestin restent inconnus.

Chez le rat, dans le foie, l'expression du gène *akr1b7* est régulée par l'hormone de croissance GH (Growth Hormone). L'ARNm de *akr1b7* est exprimé de manière différentielle entre le mâle où il est indétectable et la femelle où il est présent. Cette expression présentant un dimorphisme sexuel est due au profil de sécrétion de la GH qui présente un pic important toute les 3 à 4 heures chez le mâle et des pics plus faibles mais plus fréquents chez la femelle (Kotokorpi et al., 2004).

Une régulation par le stress oxydant a également été mise en évidence chez un modèle de rats qui accumulent du cuivre dans le foie (Long-Evans Cinnamon) suite à la mutation du gène *Atp7b* (transporteur du cuivre). Dans le foie de ces animaux, l'expression de *akr1b7* est significativement augmentée au moment où survient une hépatite aigue (environ 20 semaines). Les auteurs ont montré que cette régulation impliquait la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) mais pas directement le cuivre (Jia et al., 2006).

#### b) *AKR1B8*

Les plus grandes quantités d'ARNm *akr1b8* ont été détectées dans les glandes surrénales au niveau du cortex, dans le testicule, l'ovaire et le cœur. Des quantités relativement importantes se trouvent dans les poumons. Une expression plus faible est détectable dans l'œil, l'intestin, le foie et les vésicules séminales (Lau et al., 1995).



Le gène *akr1b8* a été identifié suite au traitement de la lignée de fibroblastes murins NIH 3T3 par le FGF-1 (Fibroblast Growth Factor 1). L'expression de *akr1b8* est fortement stimulée dès 4 h de traitement. *Akr1b8* est également inductible par le PMA (Phorbol Myristate Acetate), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et l'EGF (Donohue et al., 1994). Par contre, ce gène montre une très faible induction de son expression par le stress osmotique par rapport au gène de l'AR murine *akr1b3* (Hsu et al., 1997).

c) *AKR1B9*

Seules deux publications portent sur AKR1B9, dont celle présentant son clonage. Dans cet article, les auteurs ont détecté par northern-blot l'ARNm de *akr1b9* dans la vessie, le testicule, le jéjunum et de manière plus faible dans l'ovaire du hamster chinois (Hyndman et al., 1997). L'expression de *akr1b9* dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) est inductible par un tripeptide aldéhydique nommé ALLN (N-acétyl-leucyl-leucyl-norleucinal).

d) *AKR1B10*

Trois études ont décrit au même moment l'identification de AKR1B10 et sa répartition dans les tissus humains (Cao et al., 1998 ; Hyndman et Flynn, 1998 ; Scuric et al., 1998). Pour les trois auteurs, le transcrite est présent en quantité importante dans l'intestin grêle et pour deux d'entre eux dans le colon. Une très forte expression dans les glandes surrénales a été décrite par Hyndman et Flynn qui sont les seuls à avoir étudié cet organe. Bien que ces trois équipes aient utilisé des membranes de northern-blot du même fournisseur, leurs sondes dirigées contre des zones différentes du transcrite n'ont pas présenté le même profil d'hybridation. En 2005, l'analyse des transcrits par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel indique une forte expression de AKR1B10 dans l'estomac et l'intestin grêle et une expression relativement importante dans le colon et la vessie (Fukumoto et al., 2005). Des taux faibles de transcrits sont retrouvés dans la prostate, le foie, la trachée, le thymus, la peau et le muscle squelettique. Par contre, les auteurs ne retrouvent pas l'expression importante dans les



glandes surrénales indiquée par Hyndman et Flynn (Hyndman et Flynn, 1998). AKR1B10 présente un profil d'expression assez restreint dans des tissus normaux par contre la protéine a été identifiée en premier lieu dans des carcinomes hépato-cellulaires où elle est fortement surexprimée (Cao et al., 1998 ; Scuric et al., 1998). Depuis, une surexpression de AKR1B10 a été décrite dans les cancers du poumon non à petites cellules (Fukumoto et al., 2005). La protéine a également été détectée dans des carcinomes utérins et dans les cellules HCT-8 dérivées d'un carcinome colorectal (Yan et al., 2007 ; Yoshitake et al., 2007).

Aucune régulation transcriptionnelle de AKR1B10 n'a encore été décrite. Toutefois, il est important de noter que la protéine est surexprimée dans des cancers du foie, du poumon, de l'utérus et du colon alors qu'elle est peu ou pas exprimée dans ces tissus en temps normal. Ceci suggère l'existence de régulations de son expression. Un article paru en 2006 démontre que son expression est induite par du condensat de fumée de cigarette appliqué sur différentes lignées de cellules de l'appareil respiratoire cancéreuses ou non (Nagaraj et al., 2006).

*e) AKR1B12*

Par northern-blot, l'ARNm de *akr1b12* a été détecté dans la langue, l'œsophage et les yeux de poulet. Aucun transcrit n'a été révélé dans l'intestin, le cerveau, le muscle squelettique, le foie et le cœur (Crosas et al., 2001). Dans cette étude, la régulation de l'expression de cette enzyme n'était pas étudiée et aucun autre travail portant sur cette protéine n'a été réalisé jusqu'ici.

*f) AKR1B13*

L'ARLP de rat est une protéine associée aux tumeurs du foie induites par les composés nitrosés où elle a été identifiée par une approche protéomique. Dans les tissus normaux, la protéine est retrouvée en quantité relativement importante dans l'intestin et en quantité faible dans le rein, les poumons, la rate et le cœur. Elle n'est pas détectable sur les gels en 2 dimensions dans le placenta, le foie, le muscle squelettique, le cerveau et le cristallin (Zeindl-Eberhart et al.,





2001). Comme AKR1B8 chez la souris, l'expression de AKR1B13 est stimulée par le FGF-1 (Zeindl-Eberhart et al., 1997).

## **E. Fonctions physiologiques des aldose réductases**

### **1. Rôle osmorégulateur**

Les cellules de la *medulla* rénale sont exposées à des concentrations variables en urée et en sels qui peuvent atteindre des valeurs de l'ordre de la mole. Pour combattre le stress osmotique, les cellules accumulent des osmolytes organiques tels que le myo-inositol, la bétaïne, la taurine, le sorbitol et la glycérophosphorylcholine (GPC). L'accumulation de ces composés, contrairement aux fortes concentrations d'ions sodium ou potassium, permet aux cellules de maintenir leur volume et leur milieu intracellulaire sans perturber la fonction des protéines et des acides nucléiques. L'inositol, la taurine et la bétaïne sont transportés de manière active du milieu extracellulaire au cytosol grâce à des transporteurs membranaires spécifiques (transport couplé avec celui des ions sodium ou chlorure). La GPC est synthétisée à partir de la phosphatidylcholine par l'action d'une phospholipase. Le sorbitol est produit par la réduction du glucose par l'AR (Jeon et al., 2006). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I-D-1-b, l'exposition de cellules rénales en culture à un milieu hypertonique induit l'accumulation de sorbitol suite à l'augmentation de la synthèse et de l'activité de l'AR (Bagnasco et al., 1987 ; Garcia-Perez et al., 1989 ; Moriyama et al., 1989). Afin de confirmer le rôle de l'AR dans la protection contre l'hypertonie, deux équipes ont réalisé l'inactivation du gène *akr1b3* chez la souris (Aida et al., 2000 ; Ho et al., 2000). Ces souris ne présentent pas de problèmes majeurs de développement ou de reproduction. Dans les deux cas, ils n'observent qu'un défaut de concentration des urines qui entraîne une polyurie et une polydipsie. Ces travaux n'ont pas permis de déterminer pourquoi l'absence de l'AR entraînait un défaut de réabsorption de l'eau dans le rein. Ho et al. ne détectent plus de sorbitol dans les reins des souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> mais cet osmolyte ne représente que 2 % de l'osmolarité totale dans le rein des souris sauvages (Ho et al.,



2000). Il est donc difficile d'attribuer à cette diminution d'osmolarité l'altération de la réabsorption rénale. D'autre part, ces souris synthétisent et sécrètent la vasopressine mais la réponse du rein à l'hormone est altérée. Les taux d'ARNm du récepteur de la vasopressine V2R et des aquaporines 2 et 3 sont normaux ainsi que les quantités protéiques d'aquaporine 2 et du transporteur d'urée UTA-1. Seule la quantité d'aquaporine 1 est augmentée chez les souris *akr1b3<sup>-/-</sup>* ce qui devrait faciliter la réabsorption d'eau et non l'altérer. Pour déterminer la cause du défaut de réabsorption, la même équipe a ensuite réalisé la restauration de l'expression de l'AR dans les cellules épithéliales des tubules collecteurs grâce à l'utilisation d'un transgène dont l'expression est conduite par le promoteur de la cadhérine (Yang et al., 2006). Dès les stades précoces de maturation rénale (2 et 3 semaines post-natales), les souris *akr1b3<sup>-/-</sup>* présentent un défaut du mécanisme de concentration de l'urine. Celui-ci est associé à des désorganisations de la structure des tubules et des vaisseaux. Au niveau cellulaire, la taille des cellules, des noyaux et des mitochondries est diminuée. Le nombre de cellules en apoptose est également plus important chez les souris invalidées. La restauration de l'expression de l'AR dans les tubules collecteurs sauve partiellement le phénotype. Les souris retrouvent en partie leur capacité de réabsorption de l'eau et les défauts structuraux sont atténués par rapport aux souris *akr1b3<sup>-/-</sup>*. Ces études démontrent donc que l'AR fournit bien le sorbitol nécessaire à la protection osmotique du rein mais qu'elle est également nécessaire à la maturation post-natale du mécanisme de concentration urinaire et au développement néonatal du rein.

## 2. Rôle dans le tractus génital mâle

### a) *L'aldose réductase*

Le fructose, principal sucre contenu dans le fluide séminal des mammifères, est produit par les glandes annexes du tractus génital mâle. Il est admis depuis longtemps qu'il constitue une source d'énergie pour les spermatozoïdes par son clivage glycolytique en acide lactique (Mann, 1946). Hers a démontré que le fructose était formé dans les vésicules séminales de bélier à partir



du glucose sanguin grâce à la voie des polyols qui met en jeu l'AR et la SDH (Hers, 1960). Cette capacité a ensuite été démontrée pour les glandes séminales de taureau et d'étalon (Samuels et al., 1962).

Chez le rat, le fructose est principalement synthétisé dans les glandes coagulantes et la prostate dorso-latérale où l'activité de l'AR est la plus forte (Samuels et al., 1962). L'AR a également été détectée dans les cellules de sertoli et les spermatozoïdes du testicule de rat (Ludvigson et al., 1982). Des travaux plus récents réalisés chez le rat ont démontré la présence de l'AR et de la SDH dans les *epithelia* de l'épididyme, des vésicules séminales, du canal déférent et de la prostate (Kobayashi et al., 2002). Par contre, dans le testicule, les deux enzymes ne présentent pas le même profil d'expression : l'AR est retrouvée dans les cellules de sertoli et les spermatozoïdes tandis que la SDH est exprimée dans les cellules germinales à tous les stades de la spermatogenèse et dans le spermatozoïde. Cette expression différentielle laisse supposer que ces enzymes participent à d'autres fonctions que la voie des polyols dans le testicule. AR pourrait, par ses propriétés enzymatiques, participer à la détoxification de produits de la peroxydation lipidique ou de réactions de glycation qui se déroulent lors de la spermatogenèse. Les fluides séminaux et utérins contenant du sorbitol, la SDH pourrait fournir du fructose aux spermatozoïdes comme source d'énergie.

En 2003, l'AR bovine AKR1B5 a été isolée de vésicules membranaires issues de l'épithélium épидидymaire appelées épидидyosomes (Frenette et al., 2003). Ces travaux ont montré la présence de l'AR dans le cytoplasme des cellules principales qui bordent la lumière de l'épididyme. Son expression est forte au niveau de la tête et du corps de l'épididyme et décroît dans la queue. La SDH est également exprimée dans l'épididyme majoritairement dans la tête et la queue (Frenette et al., 2004). Les auteurs proposent que le sorbitol s'accumulerait tout au long de l'épididyme et serait oxydé dans la partie distale et le canal déférent pour produire le fructose nécessaire à la motilité flagellaire des spermatozoïdes.



Chez l'homme, l'AR et la SDH sont associées aux spermatozoïdes de l'éjaculat, aux prostasomes et aux épидидymosomes. Elles présentent une expression uniforme tout au long de l'épithélium épидидymaire (Frenette et al., 2006). Cette caractéristique semble indiquer qu'il n'existe pas de modulation de l'apport en fructose le long de l'épидидyme humain. Il reste donc à déterminer quel pourrait être le rôle de l'AR dans le tractus génital mâle humain et son implication dans la maturation des spermatozoïdes.

Les deux modèles de souris invalidées pour le gène *akr1b3* ne présentent pas de problèmes majeurs de reproduction (Aida et al., 2000 ; Ho et al., 2000). Il est donc difficile d'affirmer que la voie des polyols est indispensable à la reproduction. Toutefois aucune étude poussée n'a été réalisée pour explorer la fonction de reproduction de ces modèles. De plus, une compensation de la perte de l'AR par d'autres protéines n'est pas à exclure.

#### *b) Les protéines apparentées aux aldose réductases*

Etant données les mauvaises propriétés catalytiques des ARLP pour le glucose, il est difficile de les impliquer dans la voie des polyols dans le tractus génital mâle. Pourtant, AKR1B7, AKR1B8 et AKR1B9 y sont exprimées. Dans le testicule, la stéroïdogénèse et la spermatogénèse génèrent une grande quantité de produits secondaires potentiellement toxiques. Les propriétés enzymatiques des ARLP vis-à-vis des aldéhydes leur permettraient de jouer le rôle d'enzymes de détoxification. AKR1B7 est exprimée dans les cellules de Leydig où a lieu la synthèse des stéroïdes. La stéroïdogénèse débute par la conversion du cholestérol en pregnénolone et en isocaproaldéhyde. AKR1B7 qui démontre de très bonnes propriétés catalytiques vis-à-vis de l'isocaproaldéhyde pourrait participer dans ces cellules à l'élimination de ce produit toxique de la stéroïdogénèse. Le rôle de AKR1B7 dans l'épithélium du canal déférent chez la souris reste encore à déterminer. Toutefois, l'implication de AKR1B7 dans la fonction de reproduction vient d'être remise en cause par la publication de l'invalidation de *akr1b7 in vivo* (Baumann et al., 2007). L'étude des paramètres de fertilité et l'analyse du sperme n'ont pas mis en évidence d'altérations de la fonction de reproduction mâle.





### 3. Détoxification de composés aldéhydiques

#### a) *L'aldose réductase*

L'AR est exprimée dans un très grand nombre de tissus. Parmi eux beaucoup ne subissent pas de stress osmotique extracellulaire nécessitant la production de sorbitol. L'AR pourrait donc jouer un autre rôle métabolique dans l'organisme. Comme nous l'avons vu dans les paragraphes I-A et I-B, ses propriétés catalytiques et structurales lui permettent de prendre en charge les aldéhydes et leurs conjugués au glutathion. De plus, son expression est régulée par différentes molécules du stress oxydant. Ces études suggèrent un rôle de l'AR dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant. Nous aborderons cette fonction dans le prochain paragraphe dédié à l'implication des AKR1B dans des pathologies.

#### b) *Les protéines apparentées aux aldose réductases*

Les ARLP de par leurs spectres de substrats semblent également impliquées dans des phénomènes de détoxification cellulaire.

Chez la souris, AKR1B7 réduit de manière efficace l'isocaproaldéhyde qui est un produit secondaire de la stéroïdogénèse toxique pour la cellule (Lefrancois-Martinez et al., 1999). Dans des cellules corticosurréaliennes en culture, AKR1B7 est la principale réductase de ce produit. De plus, son expression est régulée par l'ACTH de manière coordonnée aux protéines impliquées dans la synthèse des stéroïdes surréaliens (Ragazzon et al., 2006). AKR1B8 présente de très bonnes constantes catalytiques vis-à-vis des aldéhydes dérivés des lipides comme le 4-HNE (Srivastava et al., 1998b) et une forte expression dans des organes endocriniens tels que les glandes surrénales, le testicule et l'ovaire (Lau et al., 1995). Ces propriétés suggèrent que cette protéine pourrait également être une enzyme de détoxification.

D'après les résultats obtenus à partir de protéines recombinantes, l'ARLP humaine, AKR1B10 pourrait catalyser la réduction du groupement cétone de différents xénobiotiques tels que des agents anti-tumoraux (daunorubicine et oracine), un anti-émétique (dolasetron) ou un



produit carcinogène (NNK) (Martin et al., 2006). Elle peut également réduire un aldéhyde libre issu de l'environnement ou de la peroxydation lipidique, l'acroléine. Lorsque la protéine est surexprimée en modèle cellulaire, elle protège ces cellules de la toxicité de l'acroléine (Zu et al., 2007). AKR1B10 semble donc également participer à des mécanismes de détoxification.

## **F. Implication des aldose réductases en physiopathologie**

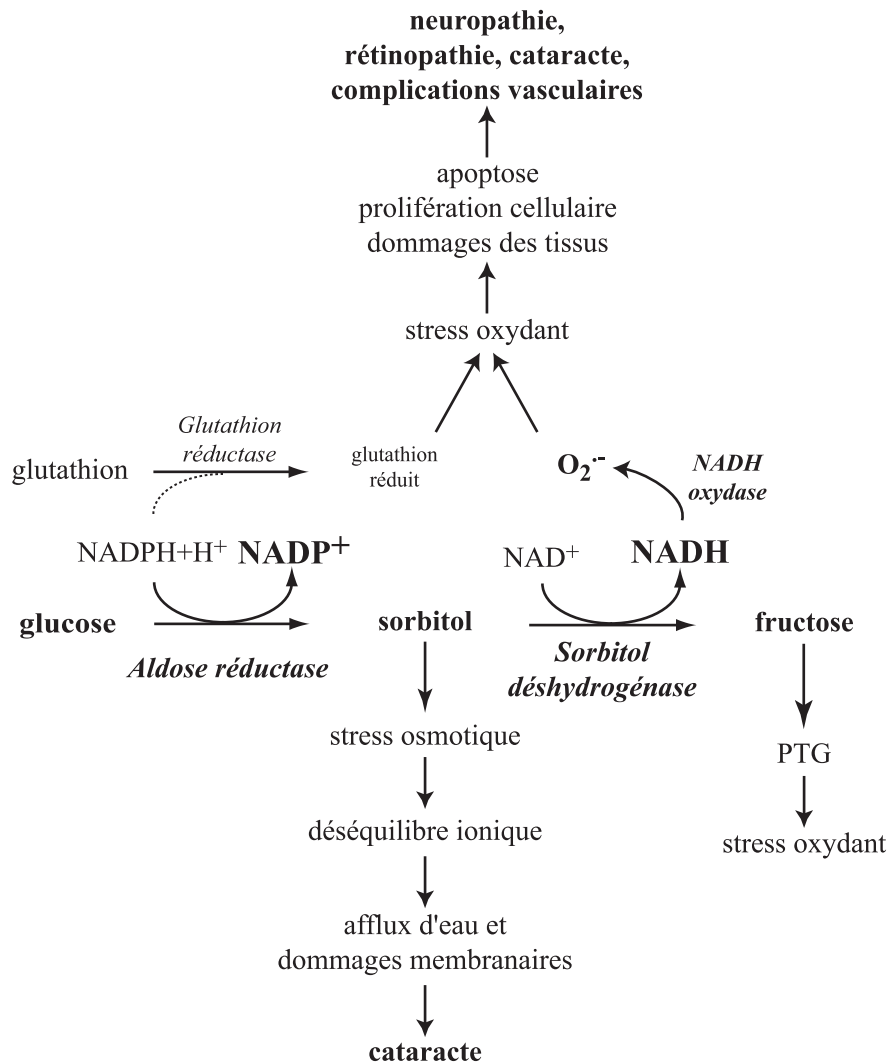
### **1. Complications diabétiques**

Les différentes formes de diabète *mellitus* sont toutes caractérisées par une hyperglycémie chronique et le développement de cataractes et de pathologies microvasculaires au niveau de la rétine, des glomérules rénaux et des nerfs périphériques. Le diabète est également associé à une athérosclérose accélérée dans les artères du cœur, du cerveau et des membres inférieurs et prédispose à de nombreuses maladies cardio-vasculaires (Brownlee, 2001).

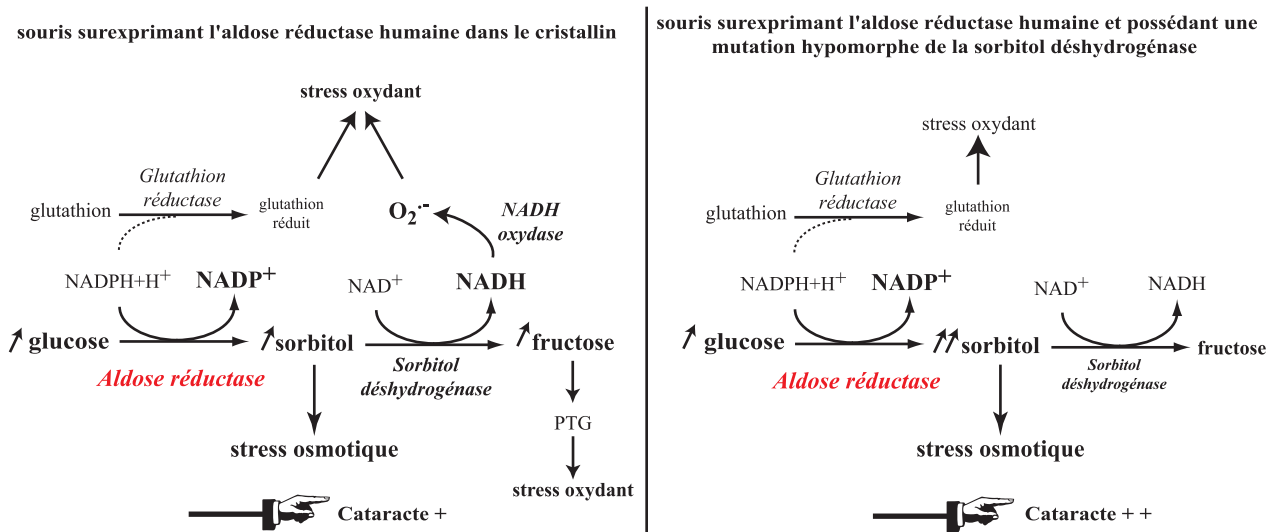
L'hypothèse osmotique a été proposée il y a une trentaine d'années pour expliquer l'apparition des cataractes (Srivastava et al., 2005). Dans le cristallin, suite à l'activation de la voie des polyols, l'accumulation de sorbitol à de fortes concentrations entraînerait une augmentation de l'osmolarité intracellulaire causant un déséquilibre ionique, une entrée d'eau et une insolubilité des protéines. Ce processus semble effectivement jouer un rôle dans la pathogenèse de la cataracte mais ne semble pas applicable aux autres complications diabétiques. Suite à différentes études qui ont montré un effet bénéfique des antioxydants sur l'apparition des cataractes chez le rat, l'hypothèse du stress oxydant est actuellement privilégiée pour expliquer le développement des différentes complications diabétiques.

Quatre mécanismes principaux semblent impliqués dans l'augmentation du stress oxydant par l'hyperglycémie (Brownlee, 2001) :

- L'augmentation du flux de glucose pris en charge par la voie des polyols
- L'augmentation de la formation des produits terminaux de la glycation (PTG)



**Figure 14 : Implication de la voie des polyols dans le développement des complications diabétiques.** Lors de l'hyperglycémie chronique, le stress osmotique causé par l'accumulation de sorbitol et le stress oxydant dû aux déséquilibres des rapports NADPH/NADP<sup>+</sup> et NADH/NAD<sup>+</sup> et à la formation de produits terminaux de la glycation (PTG) sont les causes majeures des complications diabétiques. (D'après Srivastava et al., 2005)



**Figure 15 : Contribution de la voie des polyols dans l'apparition des cataractes diabétiques : apport des souris transgéniques surexprimant l'aldose réductase humaine (hAR) dans le cristallin.** (D'après Lee et al., 1995 et Lee et Chung, 1999)

- L'activation de différentes isoformes de la protéine kinase C (PKC)
- L'augmentation du flux de glucose pris en charge par la voie de l'héxosamine

Ces quatre éléments semblent liés à la production accrue d'ion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale lors de l'hyperglycémie (Nishikawa et al., 2000).

*a) Contribution de la voie des polyols dans le développement des complications diabétiques*

Lors de l'hyperglycémie chronique, l'activation de la voie des polyols entraîne une surconsommation du NADPH par l'AR. Or, le NADPH est également utilisé par la glutathion réductase pour former du glutathion réduit (GSH) qui est l'antioxydant principal de la cellule. Ainsi, la diminution du NADPH disponible induit une diminution du GSH dans les cellules ce qui compromet leurs défenses antioxydantes (Chung et Chung, 2005 ; Srivastava et al., 2005). De plus, la conversion du sorbitol en fructose par la SDH utilise une grande quantité de  $\text{NAD}^+$  ce qui entraîne une augmentation du ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Or, le NADH est le substrat de la NADH oxydase pour former l'ion superoxyde  $\text{O}_2^-$ . Par conséquent, la production d'EOR est augmentée (Chung et Chung, 2005). En dernier lieu, le fructose et ses métabolites (fructose-3-phosphate et 3-déoxyglucosone) sont de meilleurs agents de glycation que le glucose. La glycation consiste en la liaison de sucres sur des protéines ou des lipides sans l'action d'une enzyme. Elle altère le fonctionnement des molécules biologiques comme les enzymes. L'activation de la voie des polyols pourrait donc entraîner une augmentation de la formation des PTG qui sont connus pour induire le stress oxydant (Chung et Chung, 2005) (figure 14).

L'implication du stress osmotique et du stress oxydant dans l'apparition des cataractes a été confirmée par l'étude de souris surexprimant l'AR humaine dans le cristallin (Lee et al., 1995 ; Lee et Chung, 1999) (figure 15). Lorsque ces souris sont rendues diabétiques par injection de streptozotocine, elles développent des cataractes de manière proportionnelle à l'expression de l'AR dans leurs cristallins. Les auteurs observent chez ces souris une diminution des taux de GSH et une augmentation du malondialdéhyde issu de la peroxydation lipidique indiquant que

neuropathies

	souris sauvages + streptozotocine	souris hAR + streptozotocine	souris <i>akr1b3</i> <sup>-/-</sup> + streptozotocine
VCNM	↘	↘ ↘	normale
atrophie nerveuse	+	++	0
stress oxydant	+	++	0

**Tableau 3 : Phénotypes des modèles murins utilisés pour démontrer l'implication de la voie des polyols dans l'apparition des neuropathies diabétiques.** Des souris sauvages, des souris surexprimant l'aldose réductase humaine (hAR) et des souris invalidées pour le gène de l'aldose réductase murine *akr1b3* (*akr1b3*<sup>-/-</sup>) ont été rendues diabétiques par l'injection de streptozotocine. L'analyse de la vitesse de conduction des nerfs moteurs, de l'atrophie nerveuse et du stress oxydant dans le nerf sciatique indique que AR est impliquée dans la génération du stress oxydant et que ce dernier est primordial dans l'apparition des neuropathies. (D'après Yagihashi et al., 2001 ; Song et al., 2003 et Ho et al., 2006)

l'AR est bien impliquée dans le stress oxydant induit par le diabète. Toutefois, lorsque ce modèle est traité avec des antioxydants, les taux de GSH et de malonaldéhyde sont normalisés mais l'apparition des cataractes est simplement ralentie. De plus, lorsqu'une mutation hypomorphe du gène de la SDH est introduite dans le génome de ces souris surexprimant l'AR (figure 15), une forte augmentation des taux de sorbitol et une diminution du stress oxydant sont observées. Pourtant, malgré la limitation du stress oxydant, les cataractes se développent plus rapidement chez ces souris ce qui met en évidence la forte implication du stress osmotique dans la pathogenèse des cataractes dans ce modèle génétique.

Dans le cas des neuropathies diabétiques, l'hypothèse du stress osmotique n'est pas privilégiée car les taux de sorbitol accumulés dans les nerfs lors de l'hyperglycémie sont trop faibles pour engendrer ce type de stress. De plus, lorsque les souris portent la mutation inactivatrice de la SDH, l'accumulation de sorbitol observée ne modifie pas le développement des neuropathies diabétiques (Ng et al., 1998). L'implication de l'AR dans le développement de cette complication a été démontrée par l'étude de différents modèles de souris transgéniques (tableau 3). Lorsque les souris sont rendues diabétiques par la streptozotocine, la surexpression de l'AR humaine dans tout l'organisme conduit à l'apparition de neuropathies plus sévères que chez les animaux sauvages caractérisées par une plus forte diminution de la vitesse de conduction des nerfs moteurs (VCNM) et une atrophie plus sévère des fibres nerveuses (Yagihashi et al., 2001). Chez des souris surexprimant l'AR uniquement dans les cellules de Schwann, une plus forte diminution de la VCNM chez les animaux transgéniques est également observée en corrélation avec une diminution des taux de GSH dans le nerf sciatique (Song et al., 2003). Il semble donc que les désordres métaboliques dans les cellules de Schwann soient suffisants pour causer une neuropathie et que l'AR soit bien une source majeure du stress oxydant lié au diabète dans les nerfs. Toutefois, dans ce modèle aucune atrophie des fibres nerveuses n'a été observée, il est donc probable que des désordres du tissu vasculaire environnant (ischémie) soient également impliqués dans l'apparition de cette pathologie. Les



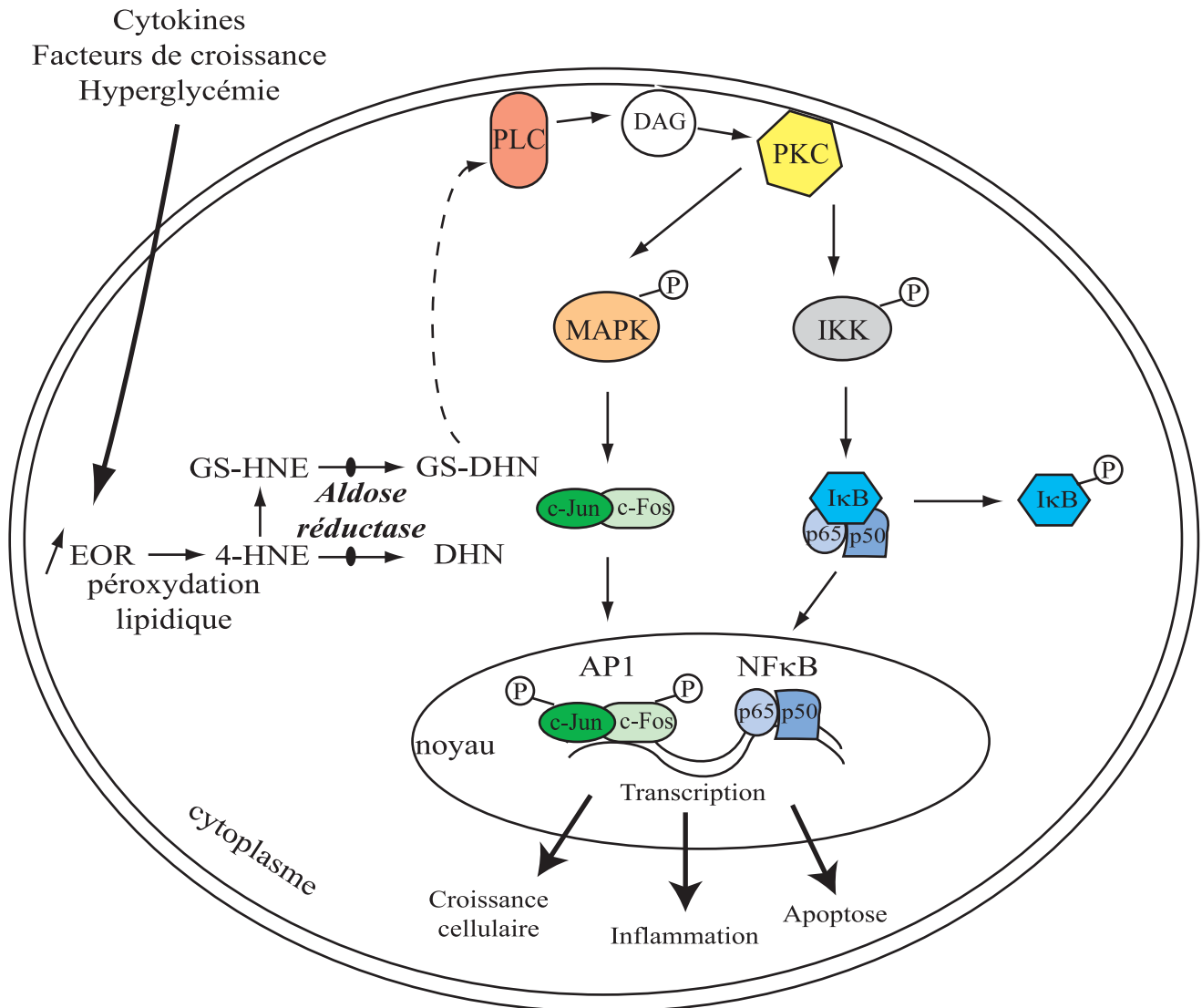
### rétinopathies

	souris <i>db/db</i>	souris <i>db/db akr1b3<sup>-/-</sup></i>
perte des péricytes	+	0
rupture barrière sang/rétine	+	0
apoptose neurones	++	+
néovascularisation	++	+

**Tableau 4 : Phénotypes des modèles murins utilisés pour démontrer l'implication de la voie des polyols dans l'apparition des rétinopathies diabétiques.** La souche de souris *db/db* génétiquement prédisposées au diabète de type 2 développe à 15 mois des rétinopathies. Lorsqu'on invalide le gène de l'aldose réductase murine chez cette souche (*akr1b3<sup>-/-</sup>*), les animaux sont protégés des dommages observés dans les rétines des souris *db/db*. L'AR joue donc un rôle important dans le développement des rétinopathies. (D'après Cheung et al., 2005)

souris invalidées pour le gène *akr1b3* ont également été utilisées pour étudier l'implication de l'AR dans le développement des neuropathies diabétiques (Ho et al., 2006). Dans des conditions diabétiques à court terme, les souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> sont protégées de la diminution de la vitesse de conduction des nerfs moteurs et sensitifs contrairement aux souris sauvages. Tous les signes de stress oxydant observés chez les souris sauvages sont absents chez les souris invalidées (diminution du taux de GSH, augmentation des quantités d'ion superoxyde, activation de la protéine kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et dommages de l'ADN). Les souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> sont donc protégées du stress oxydant lié au diabète dans le nerf sciatique. L'ensemble des données obtenues à partir de modèles génétiques murins confirme bien l'implication de l'AR dans le stress oxydant et son rôle primordial dans le développement des neuropathies diabétiques.

L'implication de l'AR dans le développement des rétinopathies diabétiques a été suggérée par sa surexpression dans la rétine des animaux diabétiques (Kinoshita et al., 1979) et par l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'AR sur le développement de cette pathologie (Kato et al., 2003). Les souris *db/db* qui portent une mutation du gène du récepteur de la leptine sont génétiquement prédisposées au diabète de type 2 (Hummel et al., 1966). Elles présentent tous les signes précoces des rétinopathies diabétiques ce qui font d'elles un bon modèle d'étude du développement de cette pathologie. Afin d'identifier le rôle de l'AR, les souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> ont été croisées avec les souris *db/db* jusqu'à obtenir des souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> *db/db* (Cheung et al., 2005) (tableau 4). A 15 mois, les souris *db/db* présentent une perte des péricytes des vaisseaux sanguins rétiniens, une rupture de la barrière sang-rétine, une apoptose des cellules neuronales, une réactivation des cellules gliales et une néovascularisation (signe d'une rétinopathie avancée). Toutes ces modifications induites par l'hyperglycémie sont atténuées chez les souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> *db/db*. Cette étude démontre que l'AR joue également un rôle important dans le développement des rétinopathies diabétiques.



**Figure 16 : Représentation schématique de l'implication de l'aldose réductase dans la signalisation cellulaire.** Les cytokines, les facteurs de croissance et l'hyperglycémie génèrent des espèces oxygénées réactives (EOR) qui causent la peroxydation des lipides. Ceci produit des lipides aldéhydiques toxiques comme le 4-hydroxynonéal (4-HNE). L'aldose réductase réduit de manière efficace le 4-HNE et son conjugué au glutathion (GS-HNE) en 1-4-dihydroxy-2-nonène (DHN) et GS-DHN. Ces produits peuvent activer la voie PLC/PKC d'une manière qui reste à déterminer. Cette activation en fonction des types cellulaires et des inducteurs induit la croissance, la mort des cellules ou la production de médiateurs de l'inflammation (TNF, IL, prostaglandines). (D'après Srivastava et al., 2005)

Les mécanismes impliqués dans l'apparition des néphropathies diabétiques restent encore très obscurs. Les études réalisées avec les inhibiteurs de l'AR et les différents modèles génétiques n'ont pas permis d'élucider le rôle de l'AR dans cette pathologie.

*b) Autres rôles de l'AR dans le développement des complications diabétiques*

La mise en évidence des bonnes capacités catalytiques de l'AR pour les composés aldéhydiques et leurs conjugués au glutathion a permis d'impliquer l'AR dans le développement des complications cardio-vasculaires par une autre voie que celle des polyols. Le diabète est un facteur de risque très important dans le développement de maladies cardio-vasculaires. Il accélère la progression et augmente la sévérité de l'athérosclérose. Il prédispose également au phénomène de resténose. Ces pathologies sont caractérisées par une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires dans l'intima où elles sont normalement absentes et une augmentation de l'inflammation qui entraîne des dysfonctionnements du tissu endothélial vasculaire.

L'inhibition de l'AR par le sorbinil ou le tolrestat dans des cellules musculaires lisses aortiques en culture diminue leur prolifération induite par différents agents mitogènes (sérum, FGF, thrombine) (Ruef et al., 2000). En parallèle, la conversion du 4-HNE conjugué au glutathion (GS-HNE) en son alcène, le glutathionyl-1,4-dihydroxynonène (GS-DHN) est également réduite par l'utilisation du sorbinil. *In vivo*, chez des rats, la formation du néointima de carotides préalablement endommagées est fortement ralentie par un traitement par le sorbinil (Ruef et al., 2000). Cette première étude suggère donc que l'AR par son activité de détoxification des composés aldéhydiques serait impliquée dans la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans les travaux suivants, les auteurs se sont employés à disséquer le rôle de l'AR dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire (figure 16). Lorsque les cellules musculaires lisses aortiques sont stimulées par le FGF, le PDGF, l'angiotensine II, le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) ou de fortes concentrations en glucose,



l'inhibition de l'AR atténue l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (Ramana et al., 2002 ; Ramana et al., 2004c). L'inhibition de l'AR empêche la phosphorylation de I $\kappa$ B ce qui prévient la dissociation du complexe I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B et la translocation du facteur dans le noyau. Lorsque les cellules sont stimulées par le PMA, un activateur de la PKC, l'inhibition de l'AR n'empêche plus l'activation de NF- $\kappa$ B ce qui indique que l'AR n'influence pas directement la voie de signalisation NF- $\kappa$ B mais agit en amont de la PKC. Dans les cellules musculaires lisses aortiques exposées à de fortes concentrations de glucose, les auteurs mettent en évidence une forte augmentation de l'activité PKC associée aux membranes (Ramana et al., 2005). L'utilisation d'inhibiteurs de l'AR (Sorbiniil ou Tolrestat) ou de petits ARN interférants (siARN) dirigés contre *akr1b4* (AR du rat) prévient la translocation membranaire et la phosphorylation de différentes isoformes de la PKC en inhibant la production de diacylglycérol (DAG) et l'activation de la phospholipase C $\gamma$ . Dernièrement, la même équipe a démontré que l'effet mitogène du 4-HNE était médié par ses conjugués au glutathion (GS-HNE) et qu'il nécessitait sa réduction par l'AR en GS-1-,4-dihydroxynonène (GS-DHN) pour stimuler la croissance cellulaire (Ramana et al., 2006a). En effet, le GS-DHN est capable d'activer la croissance cellulaire et les facteurs AP1 et NF- $\kappa$ B malgré l'inhibition de l'AR. Ces études menées en culture cellulaire ont été confirmées sur un modèle de rats rendus diabétiques par la streptozotocine et dont les artères carotides ont été endommagées (Srivastava et al., 2006). Chez ce modèle, le diabète induit une augmentation de la formation du néointima notamment en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses. Le traitement des rats par le tolrestat diminue la formation du néointima en prévenant la prolifération des cellules musculaires lisses au niveau de la lésion.

L'AR semble également jouer un rôle important dans les cellules endothéliales des vaisseaux. Le dysfonctionnement du tissu endothélial est un phénomène précoce dans l'athérosclérose et la resténose. L'inflammation y joue un rôle important. Dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC), l'inhibition de l'AR prévient des étapes



clé du processus inflammatoire comme l'activation de NF- $\kappa$ B, l'augmentation des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 et l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (Ramana et al., 2004b). De plus, l'inhibition de l'AR prévient l'effet cytotoxique du TNF $\alpha$  sur les cellules endothéliales (Ramana et al., 2004a) et sur la lignée humaine de cellules épithéliales du cristallin B-3 (Ramana et al., 2003). Pour cela, elle empêche l'augmentation des taux des protéines pro-apoptotiques Bad et Bax et la répression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Elle prévient l'activation d'AP-1, de la caspase 3, de la MAPK JNK et de la MAPK p38. L'AR semble donc être un régulateur important des signaux apoptotiques induits par le TNF $\alpha$  dans les cellules endothéliales vasculaires et les cellules épithéliales du cristallin.

L'ensemble de ces travaux implique l'AR dans le développement des complications diabétiques par sa capacité à réguler différentes voies de signalisation associées au stress oxydant et à l'inflammation.

## 2. Aldose réductase et inflammation

Suite à ces travaux en relation avec les complications cardio-vasculaires diabétiques, l'implication de l'AR dans d'autres phénomènes d'inflammation a été étudiée. Dans les macrophages, l'AR régule les voies de signalisation des facteurs inflammatoires induits par l'endotoxine des bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharide (Ramana et al., 2006b ; Ramana et Srivastava, 2006 ; Ramana et al., 2006c ; Ramana et al., 2007). L'injection intrapéritonéale de lipo-polysaccharides (LPS) chez des souris induit dès le premier jour la production de cytokines et de chémokines dans le sérum, la rate, le coeur et le foie (Ramana et al., 2006b ; Ramana et al., 2006c). Le traitement préalable des souris par le sorbinil diminue cette production de molécules inflammatoires. Dans la lignée de macrophages murins RAW264.7 activée par le LPS (1  $\mu$ g/mL) et des macrophages péritonéaux en culture primaire, l'inhibition pharmacologique ou l'inactivation de *akr1b3* par des petits ARN interférants évitent la synthèse de plusieurs cytokines (TNF $\alpha$ , Interleukine (IL)-1 $\beta$ , IL-6), de la chémokine MCP-1 et de la prostaglandine E2





(Ramana et al., 2006b ; Ramana et Srivastava, 2006). Lorsque les macrophages sont activés avec de plus fortes quantités de LPS (10 µg/mL), l'inhibition de l'AR diminue la production de NO et évite leur apoptose (Ramana et al., 2007). Comme pour les autres types cellulaires, l'inhibition de l'AR atténue l'activation de la PLC, de la PKC, et du facteur NF-κB (Ramana et al., 2006b ; Ramana et Srivastava, 2006 ; Ramana et al., 2006c). Dans le cas de la cytotoxicité du LPS, l'inhibition de l'AR limite l'activation de la caspase-3, de la MAPK p38, de JNK, de NF-κB et de AP-1. Elle évite la régulation négative du facteur anti-apoptotique Bcl-xl et la régulation positive des facteurs apoptotiques Bax et Bak (Ramana et al., 2007). De plus, le traitement des macrophages par le 4-HNE, le GS-HNE et son produit de conversion GS-DHN active NF-κB et la voie PLC/PKC. L'inhibition de l'AR ou son extinction élimine l'activation de ces différentes voies par le 4-HNE et le GS-HNE mais pas l'activation causée par le produit de conversion de l'AR (GS-DHN). Ceci suggère que les produits de conversion des aldéhydes fournis par l'AR sont impliqués dans la signalisation induisant la production des marqueurs inflammatoires (Ramana et al., 2006b). Pour finir, l'inhibition de l'AR augmente la survie de souris injectées avec des doses létales de LPS et protège les animaux des cardiomyopathies associées aux chocs septiques (Ramana et al., 2006c).

L'inflammation est également un facteur très important dans le développement du cancer du colon. Il est notamment caractérisé par une très forte expression de la cyclooxygénase 2 qui est régulée par de nombreuses cytokines et facteurs de croissance. L'exposition des cellules à ces stimuli aboutit à la synthèse anarchique de prostaglandines suivie d'une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales du colon. Comme l'inhibition de l'AR évite la cytotoxicité des cytokines dans d'autres types cellulaires, les auteurs ont réalisé le même type d'étude sur des cellules humaines issues d'un cancer du colon nommées Caco-2 (Tammali et al., 2006 ; Tammali et al., 2007). L'inactivation de l'AR évite l'augmentation de la synthèse de PGE<sub>2</sub> stimulée par le TNF<sub>α</sub> (Tammali et al., 2007), le PDGF et le FGF et ralentit la prolifération cellulaire (Tammali et al., 2006). Dans tous les cas, l'inhibition de l'AR empêche l'activation de la PKC et de NF-κB



ce qui limite l'expression de COX-2. Le 4-HNE et ses dérivés conjugués induisent l'expression de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> dans ces cellules. Et comme dans les modèles précédents, seule la stimulation par le GS-DHN persiste malgré l'inhibition de l'AR. Les formes réduites des aldéhydes conjugués au glutathion pourraient donc participer à la signalisation induite par les facteurs de croissance dans les cellules cancéreuses du colon (Tammali et al., 2006 ; Tammali et al., 2007). *In vivo*, l'administration de petits ARN interférants dirigés contre *akr1b3* à des souris nude portant des cellules d'adénocarcinome humain SW480 stoppe complètement la progression tumorale (Tammali et al., 2006). Ces deux études montrent que l'AR est un médiateur obligatoire de l'inflammation causée par des cytokines ou des facteurs de croissance dans le cancer du colon.

### 3. Emergence du rôle des AKR1B dans les cancers

De plus en plus d'études associent les AKR1B aux tumeurs. Chez le rat, la comparaison des protéines extraites de carcinomes hépatocellulaires ou de tissus normaux par gel en 2-dimensions a permis d'identifier AKR1B13. Son expression est significativement élevée dans des carcinomes induits par différents composés nitrosés alors que la protéine est indétectable dans les foies normaux (Zeindl-Eberhart et al., 2001). Le criblage de tumeurs du foie humaines a mis en évidence une surexpression de l'AR dans 29 % des cas mais surtout a permis d'isoler l'ARLP humaine AKR1B10 qui présente une surexpression dans 54% des échantillons (Cao et al., 1998). Scuric et ses collaborateurs ont également identifié ce gène dans une étude différentielle de gènes surexprimés dans les carcinomes hépatocellulaires humains (Scuric et al., 1998). Dernièrement, une étude préliminaire a été menée sur des tumeurs du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus et du rectum pour analyser l'expression de l'AR dans les tissus cancéreux (Saraswat et al., 2006). Les auteurs mettent en évidence une surexpression de l'AR dans les différentes tumeurs étudiées. Toutefois, cette étude a été menée sur un petit nombre d'échantillons (5 à 6) et la spécificité de l'anticorps généré contre l'AR recombinante n'a pas été vérifiée. Or, AKR1B10 est maintenant fortement associée à différents cancers. Elle est



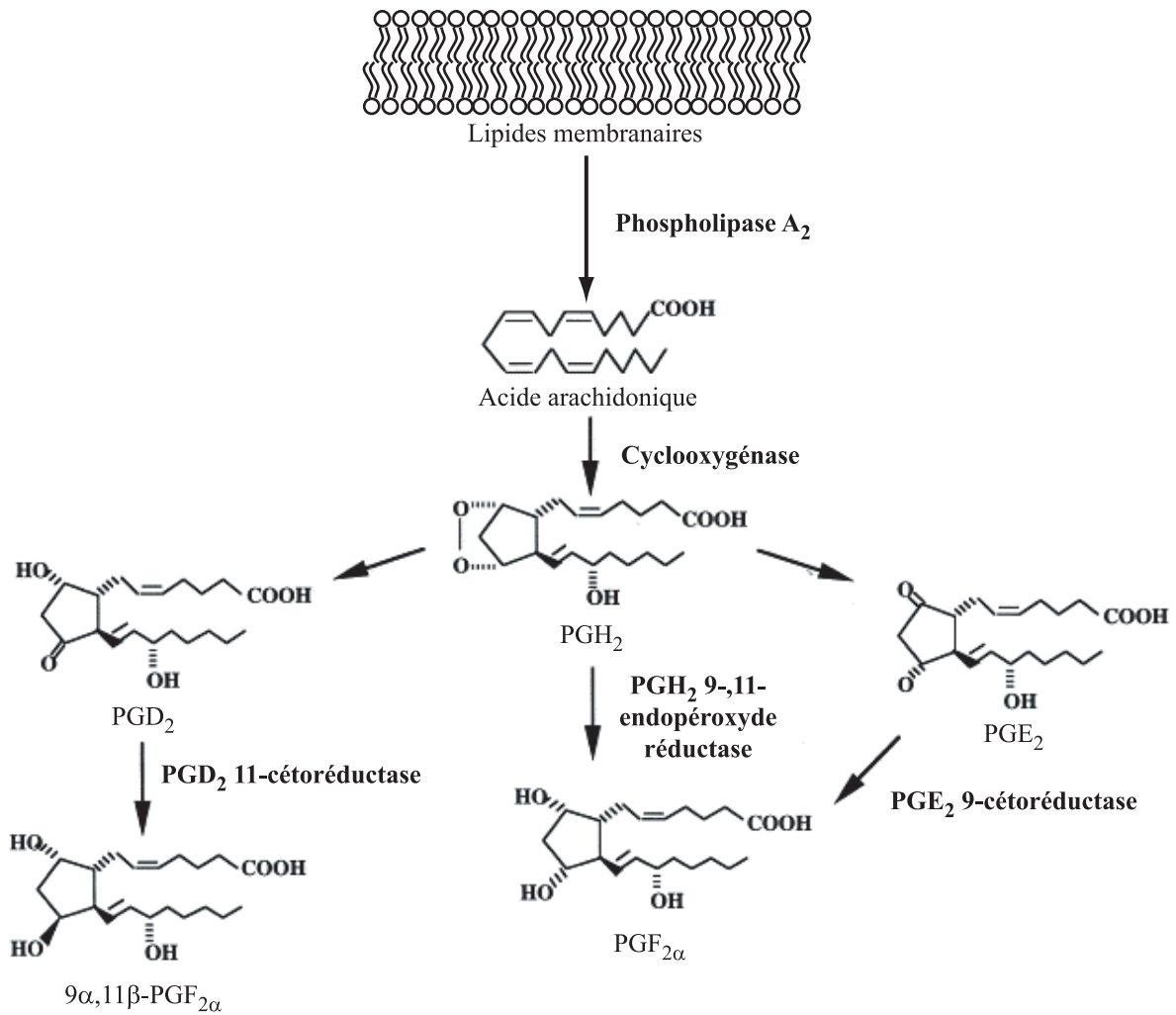
surexprimée dans 50 à 95 % des carcinomes hépatocellulaires en fonction des auteurs (Cao et al., 1998 ; Scuric et al., 1998) et pourrait constituer un marqueur diagnostique spécifique des cancers du poumon non à petites cellules du fumeur (Fukumoto et al., 2005 ; Penning, 2005 ; Woenckhaus et al., 2006). En effet, l'utilisation de puces à oligonucléotides a montré qu'AKR1B10 est surexprimée dans 85 % des carcinomes des cellules squameuses du poumon et 29 % des adénocarcinomes du poumon. A l'inverse, la quantité d'ARNm de *AKR1B1* est diminuée dans les carcinomes cortico-surréaliens par rapport aux quantités détectées dans les adénomes. Ce qui pourrait permettre d'utiliser l'expression du gène *AKR1B1* comme marqueur de malignité dans le diagnostic des tumeurs surréaliennes (Lefrancois-Martinez et al., 2004).

Le rôle des AKR1B dans la carcinogenèse ou dans les traitements anticancéreux reste encore très mystérieux. Toutefois, différentes études suggèrent que les AKR1B pourraient rendre les cellules cancéreuses résistantes à des composés carbonés toxiques produits par le métabolisme cellulaire ou administrés comme thérapeutiques. Le traitement de cellules HeLa issues de carcinomes du col utérin par un inhibiteur de l'AR augmente les effets cytotoxiques de 2 agents anti-cancéreux (doxorubicine et cisplatine) (Lee et al., 2002). Une première étude menée en 1995 avait montré que la viabilité de cellules d'hépatome de rat cultivées en présence de 3-déoxyglucosone ou de glycéraldéhyde était diminuée lors de l'inhibition de l'AR (Takahashi et al., 1995). Les cellules HepG2 cultivées dans un milieu hypertonique pour stimuler l'expression de l'AR deviennent plus résistantes à la daunorubicine que les cellules témoin ou traitées simultanément avec un inhibiteur de l'AR (Lee et al., 2001). Toutefois, ces études utilisent des inhibiteurs de l'AR dont la spécificité n'a pas été démontrée, le rôle de AKR1B10 ou d'autres enzymes dans ces phénomènes n'est donc pas exclu. De plus, à la lumière de travaux très récents et de son profil d'expression, AKR1B10 semble être un candidat plus intéressant qu'AKR1B1. Premièrement, une étude biochimique a montré qu'AKR1B10 catalysait efficacement la réduction de deux anticancéreux, la daunorubicine et l'oracine entraînant leur inactivation (Martin et al., 2006). Deuxièmement, l'expression ectopique de AKR1B10 stimule



la prolifération de la lignée de cellules rénales 293T et la protège de la cytotoxicité de l'acroléine, un aldéhyde extrêmement réactif (Zu et al., 2007). Troisièmement, l'extinction de l'expression de AKR1B10 dans les cellules HCT-8 dérivés d'un carcinome colorectal diminue la prolifération cellulaire et augmente leur susceptibilité à l'acroléine et au crotonaldéhyde entraînant leur mort cellulaire oncotique (Yan et al., 2007). Il semble donc que les AKR1B et notamment AKR1B10 pourrait être une nouvelle cible d'intervention dans la lutte contre le cancer mais leur rôle dans la carcinogenèse et/ou la résistance aux médicaments reste à étudier dans le détail.





**Figure 17 : Les trois voies de biosynthèse de la prostaglandine F<sub>2α</sub>.** La PGF<sub>2α</sub> peut être synthétisée par 3 activités enzymatiques différentes à partir de PGD<sub>2</sub> par la PGD 11-cétoréductase, à partir de PGE<sub>2</sub> par la PGE 9-cétoréductase ou à partir de PGH<sub>2</sub> par la PGH 9-, 11-endopéroxyde réductase. La production de PGH<sub>2</sub> à partir d'acide arachidonique est catalysée par les cyclooxygénases. L'acide arachidonique est issu des phospholipides membranaires grâce à l'action d'une phospholipase A<sub>2</sub>.

### III. Les prostaglandine F synthases (PGFS)

#### A. Les voies de biosynthèse de la prostaglandine F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)

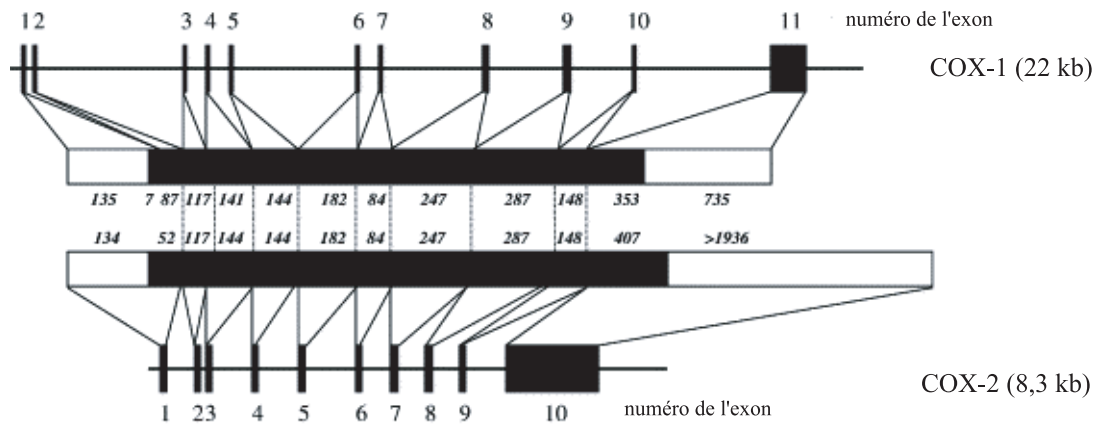
La biosynthèse des différents prostanoides (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, prostacycline et thromboxane) se déroule en trois étapes : i) la production d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par l'action d'une phospholipase A<sub>2</sub>, ii) la formation de prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) à partir d'acide arachidonique grâce à l'activité catalytique des prostaglandine H synthases également appelées cyclooxygénases (COX) et iii) la conversion de PGH<sub>2</sub> en l'un des prostanoides produits *in vivo* par différentes synthases terminales (Smith et Song, 2002). PGF<sub>2α</sub> est synthétisée *via* 3 activités enzymatiques différentes : la PGE 9-cétoréductase, la PGD 11-cétoréductase et la PGH 9-, 11-endopéroxyde réductase qui utilisent respectivement comme substrat PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> ou PGH<sub>2</sub> (figure 17) (Watanabe, 2002).

#### 1. Les cyclooxygénases

Chez les mammifères, il existe deux isoformes de la cyclooxygénase notées COX-1 et COX-2. COX-1 est considérée comme l'isoforme « constitutive » de part son expression dans de très nombreux tissus et COX-2 est nommée isoforme « inductible » car elle a tout d'abord été mise en évidence dans des fibroblastes traités par des esters de phorbol (Smith et al., 1996) et s'est depuis révélée inductible par de nombreux signaux.

##### a) Structure des gènes et expression

Chez l'homme, le gène *COX-1* composé de 11 exons s'étend sur 22 kb au locus 9q32-q33.3. Il est transcrit en un ARNm de 2,8 kb. Sa région promotrice (-1010/+69) comprend différents éléments de régulation potentiels : deux site de fixation du facteur Sp1, deux sites AP-2 (Activator Protein 2), un motif NF-IL6 de fixation des facteurs C/EBP, et un motif GATA. Par contre, la région 5'-flanquante, riche en GC, est dépourvue de boîtes TATA ou CAAT et



**Figure 18 : Structure des gènes codant pour les cyclooxygénases humaines COX-1 et COX-2.** Les nombres en italique indiquent le nombre de nucléotides compris dans les exons. (D'après Tanabe et Tohnai, 2002)

contient de nombreux sites d'initiation de la transcription. Ces caractéristiques correspondent à celles d'un gène d'entretien (Tanabe et Tohnai, 2002).

COX-1 est exprimée de manière constitutive dans beaucoup de tissus et de cellules. Elle est toutefois régulée dans différents types cellulaires par des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones ou les esters de phorbol (Tanabe et Tohnai, 2002). Ces exemples restent toutefois beaucoup plus limités que les études réalisées sur l'expression de COX-2.

Le gène codant COX-2 ne comprend que 10 exons sur 8,3 kb au locus 1q25.2-q25.3. Trois transcrits sont détectables de 4,6, 4,0 et 2,8 kb. La structure des deux gènes est très proche au niveau des jonctions exons-introns (figure 18). Seules deux différences sont à noter : i) le premier intron du gène *COX-1* est perdu dans le gène *COX-2* et ii) les introns sont plus courts dans le gène *COX-2*. La région promotrice (-327/+59) du gène *COX-2* possède une boîte TATA, un motif NF-IL6, deux sites AP-2, trois sites Sp1, deux sites NF- $\kappa$ B, un motif CRE (Cyclic-AMP Response Element), deux sites de liaison du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et une boîte E de liaison des facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice. La caractérisation des gènes de différentes espèces de mammifères (souris, rat, bœuf, mouton) a démontré qu'ils présentent les mêmes caractéristiques (Tanabe et Tohnai, 2002).

L'expression du gène *COX-2* a été rapportée dans de très nombreux tissus et cellules bien qu'elle reste souvent indétectable en conditions basales. COX-2 est toutefois exprimée de manière constitutive dans certains tissus comme le système nerveux central, le rein et les gonades. L'expression du gène *COX-2* est régulée au niveau transcriptionnel mais également post-transcriptionnel et au niveau de l'activité enzymatique de la protéine. Les glucocorticoïdes sont de très puissants supprimeurs de la synthèse de COX-2 (Masferrer et al., 1992). Ils réalisent cet effet notamment en inhibant la voie NF- $\kappa$ B. De très nombreux signaux sont connus pour stimuler l'expression de COX-2 (Tanabe et Tohnai, 2002 ; Tsatsanis et al., 2006). On trouve parmi eux des facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF, TGF Transforming Growth Factor), des cytokines (IL-1, IL-6, TNF $_{\alpha}$ ), des hormones (FSH Follicle Stimulating hormone, LH,

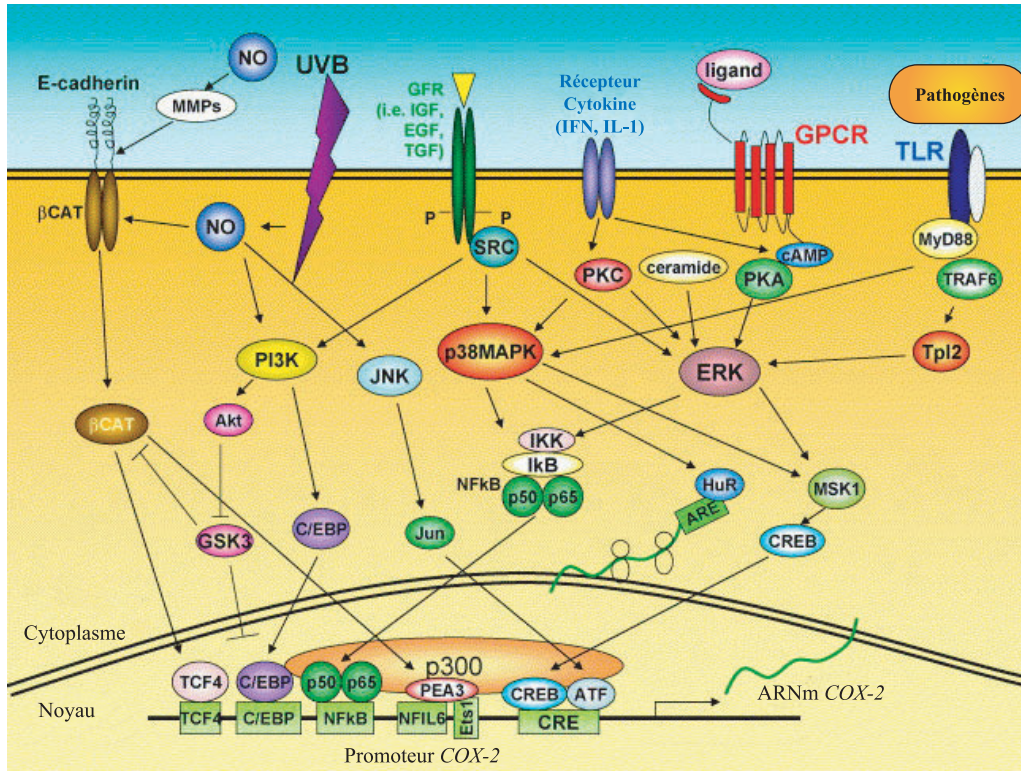


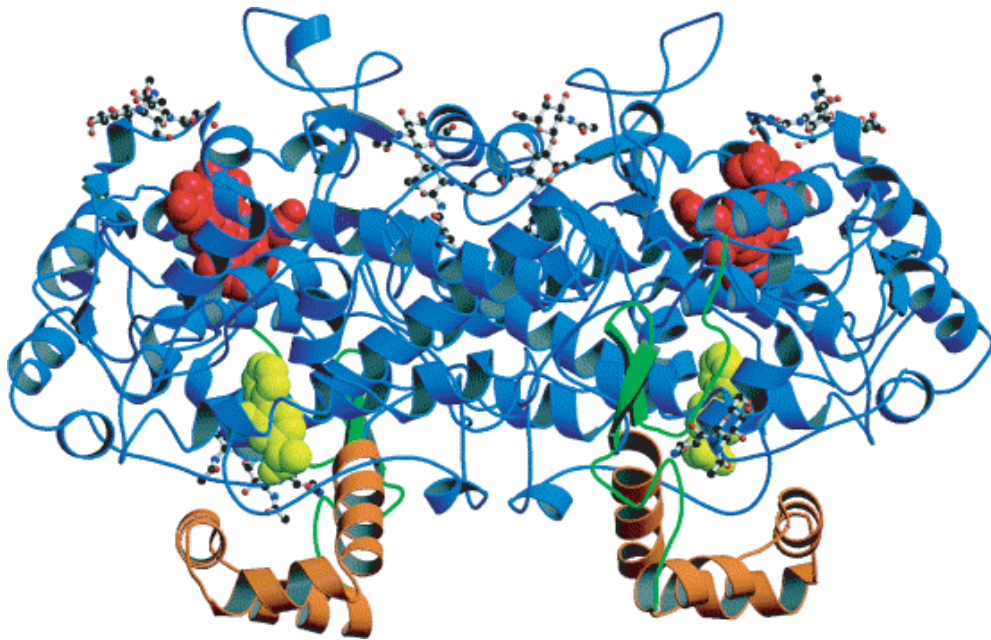
Figure 19 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression du gène *COX-2*. (D'après Tsatsanis et al., 2006)

oestrogènes), des facteurs pro-inflammatoires (LPS, PMA) ou des molécules du stress oxydant (NO, 4-HNE). Toutes ces molécules exercent leurs effets par un réseau très vaste de voies de signalisation intracellulaires qui convergent vers l'activation des MAPK (p38, ERK, JNK) (figure 19). L'expression de COX-2 est ensuite régulée par différents facteurs de transcription dont CREB (Cyclic-AMP Response Element Binding Protein), NF- $\kappa$ B et C/EBP. Les taux protéiques de COX-2 sont également contrôlés au niveau post-transcriptionnel par l'augmentation de la stabilité de son ARNm. L'activité même de la protéine est directement stimulée par le NO qui possède une forte affinité pour les protéines contenant du fer comme les cyclooxygénases (Tsatsanis et al., 2006).

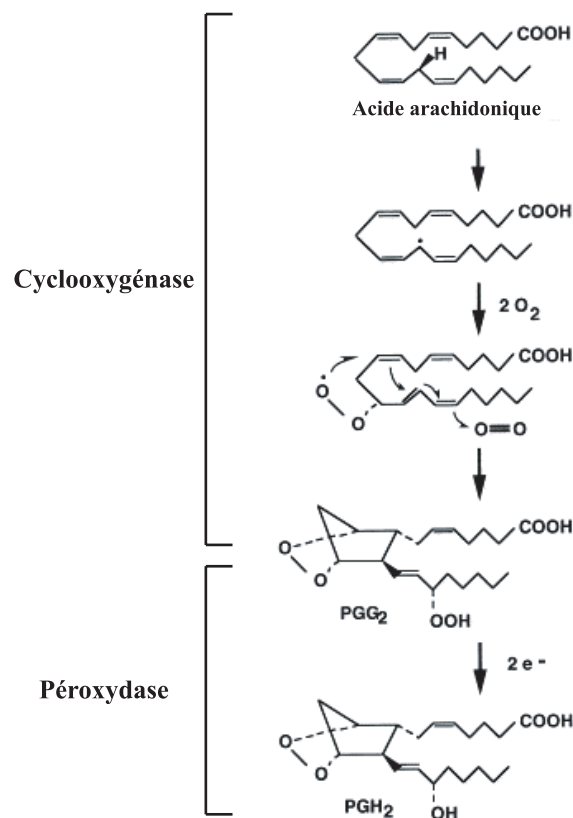
*b) Propriétés structurales et enzymatiques*

La structure primaire de COX-1 et COX-2 de différentes espèces de mammifères et du poulet indique que les formes maturées des enzymes sont respectivement composées de 576 acides aminés et 587 acides aminés après l'élimination de la méthionine N-terminale et le clivage de la séquence signal (Garavito et al., 2002). Au sein d'une même espèce, les deux enzymes présentent 60 à 65 % d'identité en acides aminés tandis que le pourcentage d'identité peut atteindre 85 à 90 % entre les protéines orthologues. Les deux enzymes sont composées de 3 domaines principaux : un domaine EGF à l'extrémité N-terminale, un domaine de liaison à la membrane et un domaine catalytique. Quatre grandes différences dans la structure primaire sont à noter : i) le peptide signal de chaque isoforme est de taille différente, ii) une insertion de 18 acides aminés est située à 6 résidus de l'extrémité C-terminale de COX-2, iii) il existe des différences importantes dans la séquence primaire du domaine de liaison à la membrane et iv) COX-1 est glycosylée au niveau de 3 résidus tandis que COX-2 est glycosylée de manière variable sur 2 à 4 sites (Otto et al., 1993).

Les cyclooxygénases fonctionnent uniquement sous forme d'homodimère. Chaque monomère contient un noyau hème. Leur structure tridimensionnelle a été déterminée chez différentes espèces (Picot et al., 1994 ; Kurumbail et al., 1996 ; Luong et al., 1996 ; Malkowski



**Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la cyclooxygénase-1 ovine.** L'homodimère est lié au flurbiprofène (jaune). Les domaines EGF sont colorés en vert. Les domaines de liaison à la membrane sont colorés en brun et les domaines catalytiques sont en bleu. Les noyaux hèmes sont indiqués en rouge. Les glycosylations sont représentées par un modèle "boule et bâton". (D'après Garavito et al., 2002)



**Figure 21 : Réactions catalysées par les cyclooxygénases.** Les cyclooxygénases possèdent 2 activités enzymatiques complémentaires : une activité cyclooxygénase et une activité peroxydase qui permettent la conversion de l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub>. (D'après Smith et Song, 2002)

et al., 2000) (figure 20). Les deux isoformes présentent une structure très proche et superposable. L'interface entre les deux monomères est créée par les domaines EGF et les domaines catalytiques globulaires ce qui place les domaines de liaison à la membrane à part. La fonction du domaine EGF reste floue. Les domaines de liaison à la membrane contiennent 4 petites hélices  $\alpha$  consécutives amphipatiques (motif peptidique qui présente une ségrégation spatiale de ses acides aminés polaires et apolaires). Trois des 4 hélices sont sur le même plan tandis que la dernière se situe au-dessus dans le domaine catalytique. Les résidus aromatiques et hydrophobes dépassent des hélices pour créer une surface hydrophobe qui interagit avec la bicouche lipidique membranaire (Picot et al., 1994). Le domaine catalytique est principalement composé d'hélices  $\alpha$  qui forment un domaine globulaire. Le site actif de l'activité peroxydase est situé dans un large sillon du côté opposé du domaine de liaison à la membrane tandis que l'entrée du site actif de l'activité cyclooxygénase se trouve entre les hélices du domaine de liaison à la membrane. Cette entrée mène à un tunnel hydrophobe de 25 Å de long qui contient plusieurs poches et cul-de-sacs (Picot et al., 1994 ; Kurumbail et al., 1996 ; Luong et al., 1996). Seule la structure du segment C-terminal n'a pas été résolue (17 résidus pour COX-1 et 35 résidus pour COX-2). Malheureusement, cette région de l'enzyme est d'un grand intérêt car elle semble impliquée dans la localisation intracellulaire des protéines. En effet, COX-1 et COX-2 sont localisées sur la surface luminale du réticulum endoplasmique et sur les membranes nucléaires interne et externe (Spencer et al., 1998). COX-2 a également été localisée dans les cavéoles de fibroblastes et dans les mitochondries chez différentes lignées cellulaires cancéreuses (Liou et al., 2001 ; Liou et al., 2005). Les quatre derniers résidus (Ser/Pro-Thr-Glu-Leu) semblent impliqués dans le ciblage des enzymes vers le réticulum endoplasmique (Song et Smith, 1996).

Les cyclooxygénases possèdent deux activités enzymatiques complémentaires : une activité cyclooxygénase qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique et de 2 molécules d'O<sub>2</sub> en PGG<sub>2</sub> et une activité peroxydase qui catalyse la réduction du groupement 15-hydroxypéroxyde de PGG<sub>2</sub> pour former PGH<sub>2</sub> (Smith et Song, 2002) (figure 21). COX-1 et





COX-2 présentent la même valeur de  $K_m$  pour l'acide arachidonique (environ 5  $\mu$ M) et pour l' $O_2$  (environ 5  $\mu$ M) ainsi que la même activité moléculaire (environ 3500 mol/min/mol de dimères) (Smith et al., 1996).

## 2. La synthèse de PGF par la PGE 9-cétoréductase

La PGE 9-cétoréductase catalyse la conversion de  $PGE_2$  en  $PGF_{2\alpha}$  en présence du NADPH. Cette activité a été tout d'abord identifiée dans des cœurs de poulet (Lee et Levine, 1975) et depuis de nombreux auteurs ont rapporté sa purification à partir d'organes variés tels que les reins humains et de porc (Schieber et al., 1992), le cerveau et le foie humain (Wermuth, 1981) ou la *decidua* utérine humaine (Kruger et Schlegel, 1986). En 1981, Wermuth a montré que la carbonyl réductase du cerveau humain qui appartient à la superfamille des déshydrogénases/réductases à courtes chaînes (SDR Small chain Dehydrogenase/Reductase) possédait l'activité PGE 9-cétoréductase (Wermuth, 1981). Puis une étude a établi que la PGE 9-cétoréductase du rein de porc possédait les mêmes propriétés catalytiques, structurales et immunologiques que la carbonyl réductase humaine (Schieber et al., 1992). Plus récemment, la PGE 9-cétoréductase purifiée à partir du corps jaune de lapin s'est révélée posséder une activité 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (20 $\alpha$ -HSD) et présenter des homologies de séquences avec les enzymes de la superfamille des AKR (Wintergalen et al., 1995). Cette protéine appartient à la famille des hydroxystéroïde déshydrogénases (HSD) ou AKR1C où elle porte le symbole AKR1C5. Les protéines exerçant *in vivo* l'activité PGE 9-cétoréductase restent donc encore peu étudiée et aucune n'a été formellement identifiée et clonée. Les différents candidats appartiennent pour l'instant à deux superfamilles d'oxydoréductases distinctes les AKR et les SDR.

## 3. La synthèse de PGF par la PGD 11-cétoréductase

La PGD 11-cétoréductase catalyse la conversion de  $PGD_2$  en 9 $\alpha$ -, 11 $\beta$ - $PGF_2$  en présence de NADPH. Cette activité a été tout d'abord purifiée dans le foie de lapin (Reingold et al., 1981 ;



Wong, 1981) et les poumons bovins (Watanabe et al., 1985). La protéine purifiée chez le bœuf catalyse la réduction du groupement cétone 11 de PGD<sub>2</sub> mais également la réduction du groupement 9-, 11- endopéroxyde de PGH<sub>2</sub>. L'analyse de sa séquence nucléotidique a montré qu'elle présentait une homologie de séquence avec les protéines de la superfamille AKR (Watanabe et al., 1988). Depuis, cette protéine a été classée parmi la famille des HSD (AKR1C) sous le sigle AKR1C7. Il existe en fait chez le bœuf deux isoenzymes possédant l'activité PGD 11-cétoréductase. La deuxième, isolée du foie, présente des différences biochimiques avec l'enzyme purifiée du poumon (Km pour PGD<sub>2</sub> plus faible, sensibilité accrue au ions chlorures, résistance à l'inhibition par le CuSO<sub>4</sub> et le HgCl<sub>2</sub>) (Chen et al., 1992). Le clonage de l'ADNc a montré que la protéine présentait 87 % d'identité en acides aminées et 90 % d'identité au niveau nucléotidique avec l'isoenzyme du poumon (Suzuki et al., 1999). Cette protéine appartient également à la famille des AKR1C où elle est classée sous le sigle AKR1C11. En 1998, Matsuura et ses collaborateurs ont recherché les propriétés biochimiques de AKR1C3 qui était désignée comme étant une 3 $\alpha$ -HSD de type 2 chez l'homme (Matsuura et al., 1998). Ils ont montré que la protéine recombinante possédait une activité PGD 11-cétoréductase. L'année suivante, l'utilisation de l'ADNc de *AKR1C7* comme sonde sur une banque d'ADNc pulmonaires humains a permis de cloner et caractériser la PGFS humaine AKR1C3 (Suzuki-Yamamoto et al., 1999). Comme les deux enzymes bovines, elle catalyse la réduction de PGD<sub>2</sub> en 9 $\alpha$ -, 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> mais également celle de PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

#### 4. La synthèse de PGF par la PGH 9-, 11-endopéroxyde réductase

La PGH 9-, 11-endopéroxyde réductase catalyse la conversion de PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  en présence de NADH ou de NADPH. En 1967, Hamberg et Samuelsson montrent pour la première fois que PGH<sub>2</sub> peut être un précurseur direct de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Hamberg et Samuelsson, 1967). En 1987, des isozymes de la glutathion-S-transférase purifiées de foie de rat ont été impliquées dans la réduction du groupement endopéroxyde de PGH<sub>2</sub> (Burgess et al., 1987 ; Chang et al., 1987 ;



Hong et al., 1989 ; Chang et al., 1990). Une protéine qui catalyse cette réaction a ensuite été isolée des vésicules séminales du mouton (Burgess et Reddy, 1997). L'activité de cette protéine de 16,5 kDa appelée PG endopéroxyde réductase est dépendante du glutathion réduit et augmentée par un choc thermique. Cette enzyme par ses capacités catalytiques est différente de la GST. A ce jour, l'implication de cette protéine dans la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  n'a pas été confirmée. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les deux PGFS du bœuf AKR1C7 et AKR1C11 et la PGFS humaine AKR1C3 possèdent *in vitro* l'activité 9-, 11-endopéroxyde réductase (Watanabe et al., 1985 ; Chen et al., 1992). Dans une étude biochimique, cette activité a également été attribuée à l'aldéhyde réductase isolée du foie humain qui appartient à la première famille des AKR, AKR1A1 (Hayashi et al., 1989).

En 2000, Kubata et ses collaborateurs ont isolé de la fraction cytosolique du parasite *Trypanosoma brucei* une protéine possédant l'activité PGH 9-, 11- endopéroxyde réductase (Kubata et al., 2000). L'enzyme de 33 kDa appartient à la sous-famille 5A des AKR et ne présente pas d'activité catalytique pour  $\text{PGE}_2$  ou  $\text{PGD}_2$ . En 2003, une protéine possédant les mêmes caractéristiques et présentant 61 % d'identité avec cette première a été isolée chez les espèces de *Leishmania* de l'ancien monde (*L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*) (Kabututu et al., 2003).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I-C-6, il faut ajouter à ces protéines les AKR1B. En effet, AKR1B5 chez le bœuf, AKR1B1 chez l'homme, ainsi qu'AKR1B7 et AKR1B3 chez la souris peuvent catalyser efficacement la réduction de  $\text{PGH}_2$  en  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en présence de NADPH (Madore et al., 2003) (Kabututu et al., soumis, article en annexe).



## B. Propriétés structurales et cinétiques des prostaglandine F synthases de la superfamille des AKR

### 1. AKR1C5

AKR1C5 ou 20 $\alpha$ -HSD du lapin est une protéine monomérique de 323 acides aminés qui présente la structure tridimensionnelle caractéristique des enzymes de la superfamille (Couture et al., 2004). Elle est composée de 8 motifs  $\alpha/\beta$  arrangés en forme de tonneau, d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle à l'extrémité N-terminale, de 2 hélices  $\alpha$  auxiliaires et de 3 boucles à l'extrémité C-terminale qui confèrent la spécificité de substrat à l'enzyme. La cristallographie de cette enzyme n'a été réalisée qu'avec des stéroïdes, on ne connaît donc pas les résidus importants pour son activité PGE 9-cétoréductase.

Peu de travaux relatent l'activité PGE 9-cétoréductase de AKR1C5 puisqu'elle est surtout étudiée pour ses activités de réduction d'une large gamme de stéroïdes : 3 $\alpha$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD et 20 $\alpha$ -HSD. Seule l'équipe qui a purifiée l'enzyme à partir de corps jaune de lapin en pseudogestation a étudié ses capacités catalytiques (Wintergalen et al., 1995). Elle présente pour PGE<sub>2</sub> un  $K_m$  de 122  $\mu$ M et un  $k_{cat}$  de 0,08 s<sup>-1</sup> correspondant à une efficacité catalytique de 39,3 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>. Son efficacité catalytique est bien meilleure pour la 20 $\alpha$ -hydroxypregn-4-en-3-one (262,5 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>). Aucune étude n'a vérifié depuis si la 20 $\alpha$ -HSD de lapin était effectivement impliquée dans la synthèse de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

### 2. AKR1C7

AKR1C7 est également appelée PGFS bovine de type pulmonaire. Elle est constituée d'un monomère de 323 acides aminés correspondant à une masse moléculaire de 36,7 kDa (Watanabe et al., 1988). L'étude de sa structure tridimensionnelle n'a jamais été réalisée. Elle catalyse en présence de NADPH la réduction du groupement cétone 11 de PGD<sub>2</sub>, la réduction du groupement 9-, 11- endopéroxyde de PGH<sub>2</sub> mais aussi la réduction de nombreux autres





composés carbonylés comme le 9-, 10-phénanthrène quinone (Watanabe et al., 1985). Elle présente une plus forte affinité pour PGH<sub>2</sub> que pour PGD<sub>2</sub> comme l'indique son  $K_m$  plus faible (10  $\mu$ M pour PGH<sub>2</sub> contre 120  $\mu$ M pour PGD<sub>2</sub>). La caractérisation des produits formés à partir de PGD<sub>2</sub> et de PGH<sub>2</sub> par spectrométrie de masse a révélé que l'enzyme réduit PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  mais qu'elle réduit PGD<sub>2</sub> en 9 $\alpha$ -, 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> (Watanabe et al., 1986).

### 3. AKR1C11

AKR1C11 ou PGFS bovine de type hépatique est également constituée de 323 acides aminés et présente 87 % d'identité avec l'isoenzyme du poumon AKR1C7 (Suzuki et al., 1999). Comme cette dernière, elle catalyse en présence du NADPH la réduction de PGD<sub>2</sub> en 9 $\alpha$ -, 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> et de PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Elle possède une bonne affinité pour les deux substrats avec un  $K_m$  de 25  $\mu$ M pour PGH<sub>2</sub> et de 10  $\mu$ M pour PGD<sub>2</sub>. Son efficacité catalytique est plus faible pour l'activité PGH 9-, 11- endopéroxyde réductase ( $k_{cat}/K_m = 14 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) que pour l'activité PGD 11-cétoréductase ( $k_{cat}/K_m = 57 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ). Pour déterminer les résidus impliqués dans l'activité PGF synthase et notamment l'activité PGD 11-cétoréductase, une étude par mutagenèse dirigée a été réalisée (Suzuki et al., 1999). Les résidus Arg<sup>27</sup>, Arg<sup>91</sup>, His<sup>170</sup>, Arg<sup>223</sup> et Asn<sup>306</sup> sont impliqués dans la liaison de PGD<sub>2</sub>, le résidu His<sup>170</sup> est impliqué dans la liaison de PGH<sub>2</sub> et le résidu Asn<sup>306</sup> semble également jouer un rôle dans l'efficacité catalytique avec PGH<sub>2</sub>. Aucune étude de la structure tridimensionnelle de cette protéine n'a été réalisée.

### 4. AKR1C3

Dans le foie humain, les 3 $\alpha$ -HSD possédant une activité dihydrodiol déshydrogénase (DDD) existent sous différentes isoformes et 4 ADNc différents ont été clonés et nommés AKR1C1 à AKR1C4. AKR1C3 a été désignée comme étant la 3 $\alpha$ -HSD de type 2. En fait, AKR1C3 est une protéine démontrant de très nombreuses activités *in vitro* : 3-céto, 17-céto et 20-cétostéroïde réductase ainsi que 3 $\alpha$ -, 17 $\beta$ -, et 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde oxydase (Penning et al., 2000). Elle est beaucoup étudiée pour son rôle dans la formation et/ou l'inactivation des



androgènes dans les tissus périphériques grâce à son activité 17 $\beta$ -HSD. Matsuura et ses collaborateurs ont été les premiers à indiquer que les stéroïdes n'étaient pas les seuls substrats pour AKR1C3 et qu'en fait elle présentait une bonne affinité pour PGD<sub>2</sub> ( $K_m = 0,6 \mu\text{M}$ ) dont elle catalyse la réduction en 9 $\alpha$ -, 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> avec une bonne efficacité catalytique ( $k_{\text{cat}}/K_m = 1000 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) (Matsuura et al., 1998). Ces données ont été confirmées l'année suivante lors du clonage de la PGFS humaine en utilisant l'ADNc de *AKR1C7* comme sonde (Suzuki-Yamamoto et al., 1999). AKR1C3 est composée de 323 acides aminés pour une masse moléculaire de 36,8 kDa. Elle présente 76 % d'identité en acides aminés avec la séquence de AKR1C7 et 78 % avec celle de AKR1C11. L'équipe de Suzuki-Yamamoto a également réalisé la caractérisation de la protéine recombinante. Elle présente un  $K_m$  de 3,4  $\mu\text{M}$  pour PGD<sub>2</sub> et un rapport  $k_{\text{cat}}/K_m$  de 21200  $\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Ses constantes catalytiques pour PGH<sub>2</sub> ne sont pas détaillées dans cette étude car son activité enzymatique avec ce substrat est plus faible (8 % de l'activité démontrée avec PGD<sub>2</sub>). AKR1C3 démontre une efficacité catalytique plus faible avec les stéroïdes ( $k_{\text{cat}}/K_m = 640 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  avec le 5 $\beta$ -androstane-3,17-dione).

AKR1C3 étant considérée comme la PGFS humaine et la 17 $\beta$ -HSD de type 5, plusieurs études structurales ont été réalisées avec différents substrats (PGD<sub>2</sub>, testostérone, 4-androstène-3,17-dione) ou inhibiteurs (bimatoprost, indométhacine, acide flufénamique) (Komoto et al., 2004 ; Lovering et al., 2004 ; Qiu et al., 2004 ; Komoto et al., 2006). Dans tous les cas, la structure générale de AKR1C3 est conservée et correspond à la structure caractéristique des enzymes de la superfamille AKR. AKR1C3 est composée de la barrique ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> ou « TIM barrel » associée à 3 boucles qui couvrent la partie C-terminale du tonneau. 2 brins  $\beta$  bouchent l'extrémité N-terminale du tonneau tandis que 2 hélices  $\alpha$  dépassent sur son flanc. Le cofacteur et la plupart des substrats se lient à une cavité située à l'extrémité C-terminale du tonneau. Le NADPH s'étend le long du tonneau très proche du core cylindrique. Il est fortement impliqué dans des liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés localisés dans les boucles qui connectent les feuilletts  $\beta$  et les hélices  $\alpha$ . Le noyau nicotinamide est localisé près du centre du



tonneau tandis que la partie adénine est exposée à la surface de la protéine. Dans le complexe PGFS-NADP-PGD<sub>2</sub> (Komoto et al., 2004), PGD<sub>2</sub> est localisée au-dessus du NADPH et est elle-même surmontée des boucles 1, 2, 4, 7 et 9. Son noyau cyclopentane est enfoncé dans la cavité du site actif tandis que ses deux queues sont éloignées du site et interagissent peu avec la protéine. Les auteurs ont proposé un mécanisme catalytique similaire au mécanisme retrouvé chez la plupart des AKR. Quand PGD<sub>2</sub> entre dans le site actif, le groupement carboné n°11 essentiel pour la réaction se lie fermement à l'enzyme par 2 liaisons hydrogènes avec la Tyr<sup>55</sup> et l'His<sup>117</sup>. Puis PGD<sub>2</sub> est réduit par le transfert direct de l'hydrogène 4 pro-R du carbone 4 du noyau nicotinamide du NADPH sur son carbone 11 tandis que l'oxygène 11 récupère le proton du groupement hydroxyle de la Tyr<sup>55</sup>. Les deux liaisons hydrogènes sont alors rompues et 9 $\alpha$ -,11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub> est libéré. La cristallographie du complexe ternaire PGFS-NADPH-PGH<sub>2</sub> n'a pas été réalisée. Toutefois, un mécanisme catalytique potentiel a été proposé suite à la cristallographie de la PGFS contenant un analogue structural de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , le Bimatoprost (Komoto et al., 2006). Quand PGH<sub>2</sub> entre dans le site actif, les groupes polaires des chaînes  $\alpha$  et  $\omega$  forment de liaisons hydrogènes avec l'enzyme et le noyau cyclopentane portant le groupement endopéroxyde bascule vers le NADPH sans rompre les liaisons H. Dans cette géométrie, l'oxygène 9 de PGH<sub>2</sub> se trouve suffisamment proche de l'hydrogène 4 pro-R du NADPH pour permettre le transfert direct de ce dernier. La liaison O<sub>9</sub>-O<sub>11</sub> est ensuite rompue de manière concertée. L'O<sub>11</sub> chargée négativement reçoit un proton de la solution permettant la formation de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Les différentes études cristallographiques indiquent qu'AKR1C3 possède un site actif assez spacieux et flexible ce qui lui confère une multiplicité d'activité.

## 5. AKR1A1

L'aldéhyde réductase humaine AKR1A1 a été impliquée une fois dans la synthèse de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  à partir de PGH<sub>2</sub> (Hayashi et al., 1989). L'enzyme a été purifiée à partir de foies humains puis caractérisée au niveau biochimique. Elle présente un  $K_m$  de 100  $\mu$ M pour PGH<sub>2</sub> et un  $k_{cat}$  de



3,1 min<sup>-1</sup> ce qui correspond à une efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m$ ) de 31 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>. Ces caractéristiques biochimiques ne sont pas très différentes de celles présentées par les PGFS bovines et pourraient peut-être permettre à cette enzyme de participer *in vivo* à la production de PGF<sub>2α</sub> mais ces travaux sur AKR1A1 n'ont jamais été confirmés ou exploités.

## 6. AKR5A1 et AKR5A2

De nombreuses études ont démontré que les parasites produisaient également des prostaglandines. En 2000, Kubata et ses collaborateurs ont identifié et cloné une nouvelle PGFS chez *Trypanosoma brucei* (Kubata et al., 2000). Cette protéine est composée de 276 résidus d'acides aminés donnant une masse moléculaire calculée de 31 kDa. Elle présente peu d'identité en acides aminés avec les autres AKR des mammifères ou des plantes (39-40 %). Elle a depuis été enregistrée dans la nomenclature sous le symbole AKR5A2. La protéine recombinante ne catalyse que la formation de PGF<sub>2α</sub> à partir de PGH<sub>2</sub>, elle est complètement dépourvue des activités PGE 9-cétoréductase ou PGD 11-cétoréductase. Par comparaison avec les PGFS de mammifères, elle possède une forte activité PGFS à partir de PGH<sub>2</sub> (2 μmol/min/mg de protéine), le  $K_m$  le plus bas (1,3 μM) indiquant sa bonne affinité et le  $k_{cat}$  le plus grand (63 min<sup>-1</sup>). La structure tridimensionnelle de AKR5A2 a été étudiée par cristallographie (Kilunga et al., 2005). AKR5A2 est composé du motif (α/β)<sub>8</sub> interrompu par 2 hélices α auxiliaires situées près de l'extrémité C-terminale de la molécule. Le fond du tonneau est fermé par 2 brins β antiparallèles formant une structure en épingle à cheveu. Toutefois, cette protéine présente une différence majeure avec les autres enzymes de la famille AKR, les boucles A, B et C sont beaucoup plus courtes. Par conséquent, les sites de liaison du substrat et du cofacteur sont beaucoup plus superficiels que chez les AKR1. La position de la tétrade catalytique retrouvée chez toutes les AKR est conservée chez AKR5A2 : Asp<sup>47</sup>, Tyr<sup>52</sup>, Lys<sup>77</sup>, His<sup>110</sup>. Toutefois, les expériences de mutagenèse dirigée indiquent que seuls les résidus Lys<sup>77</sup> et His<sup>110</sup> sont nécessaires pour la réduction de PGH<sub>2</sub>. Les auteurs ont proposé un nouveau mécanisme





catalytique pour la réduction de  $\text{PGH}_2$ . Lorsque  $\text{PGH}_2$  se lie au site actif, l'hydrogène 4 pro-R du NADPH est transféré sur l'oxygène 9 de  $\text{PGH}_2$  tandis qu'un proton du résidu His<sup>110</sup> est transféré sur l'oxygène 11 négativement chargé. Le résidu Lys<sup>77</sup> par sa charge positive semble maintenir la position du résidu His<sup>110</sup> en créant une répulsion électrostatique et stabiliser le résidu Asp<sup>47</sup> grâce à un pont salin.

En 2003, la même équipe a démontré que les leishmanies synthétisaient des prostaglandines et a cloné l'ADNc de la PGFS de *Leishmania major*. Sa séquence s'est révélée identique à celle de la protéine P100/11E appartenant à la famille AKR5 (AKR5A1). La protéine recombinante présente une valeur de  $K_m$  pour  $\text{PGH}_2$  supérieure à celle de AKR5A2 (15  $\mu\text{M}$ ) et une valeur de  $V_{\text{max}}$  10 fois inférieure (270  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine) indiquant que cette protéine possède une moins bonne activité PGH 9-, 11- endopéroxyde réductase bien qu'elle reste très bonne par rapport aux enzymes de mammifères.

## 7. AKR1B5

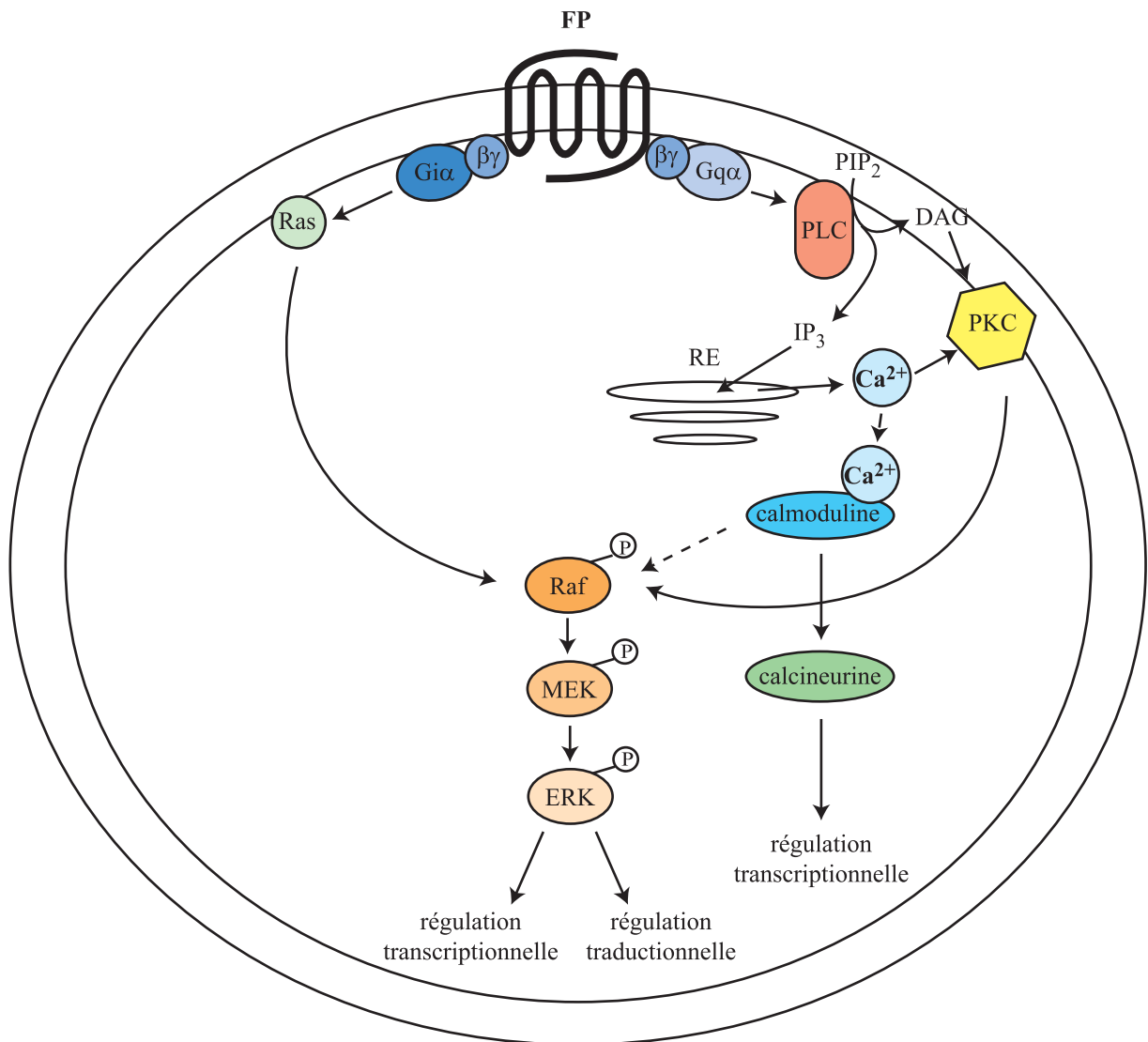
En 2003, Madore et ses collaborateurs en souhaitant identifier la PGFS de l'endomètre bovin se sont rendus compte qu'aucune des PGFS connues ou potentielles n'étaient exprimées dans l'endomètre et que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produite dérivée principalement de la réduction de  $\text{PGH}_2$  (Madore et al., 2003). Pour trouver un nouveau candidat, les auteurs ont recherché dans les banques une enzyme de la superfamille AKR ayant une activité  $20\alpha$ -HSD par homologie avec AKR1C5 chez le lapin qui présente 2 activités : PGE 9-cétoréductase et  $20\alpha$ -HSD (Wintergalen et al., 1995). Ils ont ainsi identifié AKR1B5 comme candidat potentiel. L'étude des transcrits par northern-blot, RT-PCR et protection à la RNase a révélé que le gène *AKR1B5* était exprimé dans l'endomètre au moment de la lutéolyse. L'expression de la protéine étudiée par western-blot suit le même profil. Les auteurs ont alors étudié l'activité enzymatique de la protéine recombinante. Elle présente un  $K_m$  de 7,1  $\mu\text{M}$  pour  $\text{PGH}_2$ , un  $k_{\text{cat}}$  de 0,86  $\text{min}^{-1}$  et une  $V_{\text{max}}$  de 22,7  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine. Dans la même étude, AKR1C7 et AKR1C11 présentent des  $V_{\text{max}}$



inférieures à celle de AKR1B5 (2 à 10 nmol/min/mg de protéine). AKR1B5 présente donc une meilleure affinité pour PGH<sub>2</sub> ( $K_m$  inférieur) et une meilleure activité que les PGFS bovines identifiées jusqu'à présent. AKR1B5 peut donc être considéré comme la PGFS fonctionnelle de l'endomètre bovin.

### 8. AKR1B humaines et murines

Récemment, par notre collaboration avec l'équipe du Pr URADE à Osaka (Japon), nous avons participé à la démonstration de l'activité PGFS possédée par d'autres membres de la famille AKR1B. Cette étude, en cours de publication, explore les propriétés enzymatiques des AKR1B humaines (AKR1B1, AKR1B10) et murines (AKR1B3, AKR1B7, AKR1B8) vis-à-vis de PGH<sub>2</sub>. Les protéines recombinantes ont été produites dans un système d'expression bactérien et purifiées. Lorsque ces protéines sont incubées avec 1-[<sup>14</sup>C] PGH<sub>2</sub> en présence de NADPH, la chromatographie sur couche mince des produits de réaction révèle qu'AKR1B1, AKR1B3 et AKR1B7 catalysent la réduction de PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (annexe). Par contre, AKR1B8 et AKR1B10 sont dépourvues de cette activité. AKR1B1, B3 et B7 montrent des valeurs de  $K_m$  pour PGH<sub>2</sub> de 2, 9 et 4  $\mu$ M bien inférieures à celle de AKR1C3 (18  $\mu$ M). Leurs valeurs de  $V_{max}$  (26, 53 et 44 nmol/min/mg de protéine) sont 7 à 11 fois plus fortes que celle de AKR1C3 (4 nmol/min/mg de protéine). Ces protéines démontrent donc une meilleure activité PGFS que la PGFS humaine AKR1C3. Une étude préliminaire par mutagenèse dirigée de AKR1B1 suggère que le résidu His<sup>110</sup> et non le résidu Tyr<sup>48</sup> serait le donneur de proton pour l'oxygène 11 de PGH<sub>2</sub> comme nous l'avons décrit pour AKR5A2.



**Figure 22 : Principales voies de signalisation cellulaire induites par la liaison de PGF<sub>2α</sub> au récepteur FP.** La liaison de PGF<sub>2α</sub> au récepteur FP active la voie Raf/MEK/ERK grâce à l'activation de la protéine G hétérotrimérique Gq qui induit l'activation de la voie PLC/PKC. PGF<sub>2α</sub> peut également exercer son action en activant la protéine Gi qui stimule la petite protéine G Ras. Une activation de la calcineurine par PGF<sub>2α</sub> via la voie PLC/PKC a également été montrée. L'activation d'autres MAPK (JNK, p38) a été décrite mais les voies de signalisation impliquées n'ont pas été explorées.

## IV. Fonctions physiologiques de $\text{PGF}_{2\alpha}$

### A. Le récepteur de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FP)

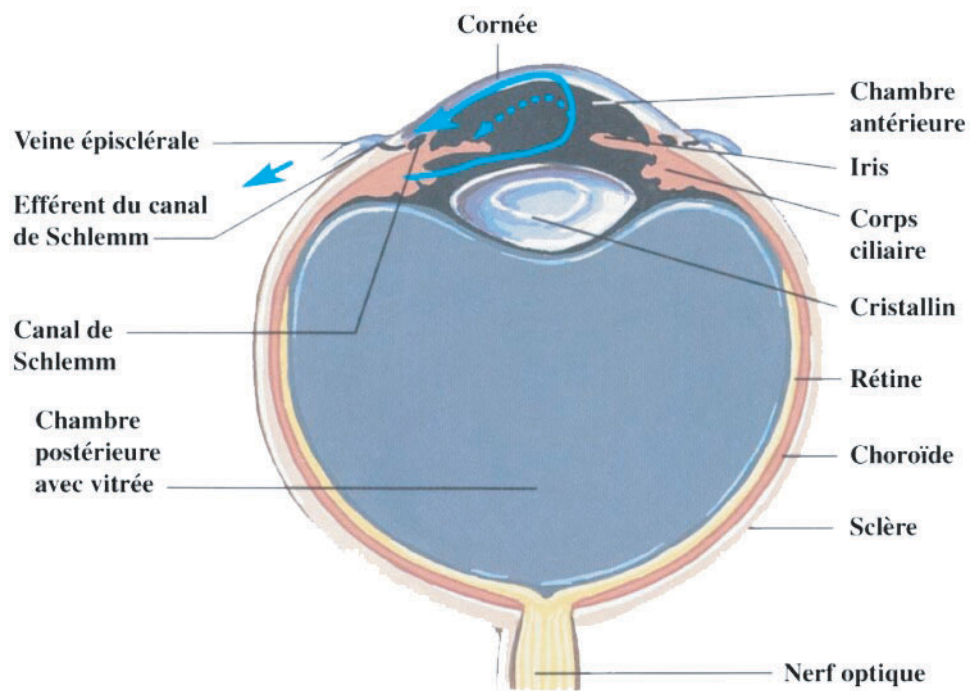
$\text{PGF}_{2\alpha}$  se lie à un récepteur appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à 7 traversées transmembranaires nommé FP. Elle se lie également avec une affinité significative à 2 des récepteurs de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{EP}_1$  et  $\text{EP}_3$  (Breyer et Breyer, 2001). FP est le récepteur le moins sélectif parmi les récepteurs de prostanoïdes car il lie  $\text{PGD}_2$  et  $\text{PGE}_2$  à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Abramovitz et al., 2000). Le gène codant FP a été cloné en 1994 chez la souris (Sugimoto et al., 1994), le rat (Lake et al., 1994), le bœuf (Sakamoto et al., 1994), la brebis (Graves et al., 1995) et l'homme (Abramovitz et al., 1994 ; Lake et al., 1994). Il est composé de 3 exons et 2 introns avec la région traduite localisée dans les exons 2 et 3. Chez la brebis, une deuxième isoforme issue d'un épissage alternatif a été clonée et nommée  $\text{FP}_B$  (Pierce et al., 1997). Elle est plus courte de 46 résidus d'acides aminés au niveau de son extrémité C-terminale. Aucune protéine équivalente n'a été retrouvée chez les autres espèces. La protéine est composée de 359 résidus d'acides aminés chez l'homme, de 362 résidus chez le bœuf et la brebis et de 366 résidus chez la souris et le rat. Elle contient 7 régions hydrophobes correspondant aux domaines transmembranaires (Anderson et al., 2001).

La liaison de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  à FP active différentes voies de signalisation (figure 22). La première à avoir été identifiée est la voie de la phospholipase C (PLC) (Davis et al., 1987 ; Duncan et Davis, 1991 ; Abramovitz et al., 1994 ; Sugimoto et al., 1994 ; Watanabe et al., 1994). Suite à sa liaison à FP,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  entraîne l'activation de la PLC liée à la membrane par l'intermédiaire d'une protéine G hétérotrimérique stimulatrice  $\text{Gq}_\alpha$ . PLC catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et en 1,2-diacylglycérol (DAG). L'augmentation des concentrations cytosoliques en  $\text{IP}_3$  entraîne la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  libre du réticulum endoplasmique lisse dans le compartiment cytoplasmique. L'élévation des taux de



$\text{Ca}^{2+}$  libre et de DAG stimule l'activité catalytique de la protéine kinase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) qui à son tour modifie l'activité de nombreuses protéines en les phosphorylant au niveau de résidus sérine ou thréonine. Notamment, suite à l'exposition des cellules à  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , PKC active la cascade de signalisation Raf (MAP kinase kinase kinase)/MEK (MAP kinase/ERK kinase)/ERK (Chen et al., 1998).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  active également cette voie par l'intermédiaire de la protéine G hétérotrimérique  $G_i$  qui active la petite protéine G Ras (GTPase) qui à son tour phosphoryle Raf (Ohmichi et al., 1997 ; Melien et al., 1998). La voie de signalisation exacte qui active la cascade raf/MEK/ERK reste obscure. L'élévation des taux de  $\text{Ca}^{2+}$  peut également entraîner l'activation de la sérine/thréonine phosphatase dépendante du complexe calmoduline/ $\text{Ca}^{2+}$  nommée calcineurine (Liu et Clipstone, 2007). La contribution relative de chacune des voies semble dépendre du type cellulaire et des conditions comme nous le verrons dans les paragraphes suivants. La stimulation de FP conduit à l'activation d'autres protéines de signalisation. L'activation des autres MAPK p38 (Adams et al., 1998 ; Husain et Abdel-Latif, 2001 ; Dekanty et al., 2006) et JNK (Adams et al., 1998 ; Kunapuli et al., 1998 ; Tokuda et al., 2004) bien que moins étudiée a tout de même été relatée dans différents types cellulaires . De plus, des liens entre le récepteur FP et la voie du récepteur de l'EGF ont été montrés dans des cellules d'adénocarcinomes de l'endomètre (Sales et al., 2004 ; Sales et al., 2005). Suite à la liaison de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , le récepteur FP par l'intermédiaire de la PLC transactive EGFR et déclenche la voie ERK, ce qui stimule la prolifération des cellules. D'autre part, l'activation du récepteur FP *via* la voie PLC/PKC contrôle également la synthèse protéique en stimulant la sérine/thréonine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Arvisais et al., 2006). De plus, chez la brebis, l'isoforme  $\text{FP}_B$  et non l'isoforme  $\text{FP}_A$  active la voie  $\beta$ -caténine par l'intermédiaire d'une petite protéine G de la famille Ras nommé Rho (Fujino et Regan, 2001 ; Fujino et al., 2002). Ce couplage n'a pas été décrit pour les autres espèces chez qui le variant n'a pas été identifié.





**Figure 23 : Anatomie générale de l'oeil et circulation de l'humeur aqueuse.** La flèche bleue indique l'origine de l'humeur aqueuse (corps ciliaires) et la voie d'écoulement trabéculaire par le canal de Schlemm. Une partie de l'humeur aqueuse est évacuée par la voie uvéo-sclérale (pointillés) à travers le muscle ciliaire.  
 (Source : [www.theses.ulaval.ca/2003/20880/ch01.html](http://www.theses.ulaval.ca/2003/20880/ch01.html).)

## **B. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la régulation de la pression oculaire**

Il est établi depuis longtemps que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et ses dérivés sont des agents hypotenseurs oculaires chez les animaux et l'homme. La contrôle de la pression intra-oculaire (PIO) résulte principalement de la dynamique locale de l'humeur aqueuse qui dépend du débit de sécrétion du corps ciliaire, du système vasculaire impliqué dans l'élimination de l'humeur aqueuse et de l'élimination trabéculaire et uvéo-sclérale de l'humeur aqueuse (Chiquet et Denis, 2004) (figure 23).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et ses analogues pharmacologiques ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  isopropyl ester, prostamides) tels que le bimatoprost, le latanoprost, le travoprost et l'unoprostone diminuent la pression intraoculaire en augmentant l'élimination de l'humeur aqueuse par la voie uvéo-sclérale (Crawford et Kaufman, 1987 ; Gabelt et Kaufman, 1989 ; Weinreb et al., 2002). Cette propriété est utilisée dans le traitement de l'hypertension oculaire et du glaucome (Alexander et al., 2002). La voie uvéo-sclérale permet l'écoulement de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure à travers les espaces interstitiels du muscle ciliaire vers l'espace suprachoroïdal. Le liquide transite ensuite derrière l'œil pour être éliminé à travers la sclère.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de l'écoulement uvéo-sclérale par les analogues de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  restent flous. Weinreb et ses collaborateurs (Weinreb et al., 2002) ont proposé que ces agents pourraient agir en augmentant la production de métalloprotéinases dans la matrice extracellulaire ce qui entraînerait une réduction de cette matrice au niveau du muscle ciliaire, de la base de l'iris et de la sclère facilitant l'écoulement. Différentes données étayent cette hypothèse. D'une part, ces différents tissus oculaires expriment le récepteur FP (Anthony et al., 2001 ; Mukhopadhyay et al., 2001 ; Schlotzer-Schrehardt et al., 2002). De plus, plusieurs études ont montré que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et ses analogues pouvaient augmenter la production de différentes métalloprotéinases dans des cultures de cellules musculaires lisses ciliaires (Lindsey et al., 1996 ; Weinreb et al., 1997 ; Ocklind, 1998 ; Sagara et al., 1999 ; Husain et al., 2005 ; Oh et al., 2006) ou de cellules de la sclère (Gaton et al., 2001 ; Weinreb et al., 2004). L'effet sur la métalloprotéinase 2 est médié par le récepteur FP grâce aux voies PKC et



ERK (Husain et al., 2005). Certaines études ont également montré un réarrangement de la matrice extracellulaire du muscle ciliaire ou de la sclère indiqué par la diminution de différents constituants de la matrice (collagènes, laminine, fibronectine) (Ocklind, 1998 ; Sagara et al., 1999). Ces différentes données appuient l'hypothèse d'un réarrangement de la matrice extracellulaire du muscle ciliaire qui diminuerait la résistance du tissu et augmenterait la diffusion de l'humeur aqueuse. Toutefois, une action des analogues de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sur d'autres mécanismes de régulation de la pression intra-oculaire n'est pas à exclure. Notamment, différents travaux semblent également impliquer la voie trabéculaire. La voie d'écoulement trabéculaire (figure 23) est un système de drainage de l'humeur aqueuse dépendant de la pression. Le liquide est drainé à travers le filtre trabéculaire qui se trouve au sommet de l'angle irido-cornéen puis dans le canal de Schlemm qui lui permet de rejoindre la circulation sanguine. La présence du récepteur FP dans les cellules du filtre trabéculaire a été démontrée ainsi que son activation par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et ses analogues (mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et augmentation de la rotation du stock de phosphoinositides) (Anthony et al., 1998 ; Sharif et al., 2003). Les dernières études suggèrent que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhiberait l'effet constricteur de l'endothéline-1 sur les cellules du filtre trabéculaire (cellules apparentées aux cellules musculaires lisses) ce qui permettrait un relâchement des mailles donc une diminution de la résistance à l'écoulement (Thieme et al., 2006). Toutefois, les études pharmacologiques et cliniques mettent essentiellement en avant un effet sur l'écoulement uvéo-scléral.

L'implication du récepteur FP dans l'effet hypotenseur de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a été démontrée par l'étude de la PIO chez les souris invalidées pour le gène *fp* (Sugimoto et al., 1997). L'application de différents analogues de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (latanoprost, travoprost, bimatoprost, unoprostone, tafluprost) sur les yeux de ces souris n'induit pas de diminution de la PIO indiquant que le récepteur FP est indispensable à leur action (Crowston et al., 2005 ; Ota et al., 2005 ; Ota et al., 2007). Par contre, en conditions basales, lorsque les variations naturelles de la PIO sont suivies pendant 24 h, aucune différence n'a été détectée entre les souris sauvages et les souris *fp*<sup>-/-</sup>. Ceci semble



indiquer que le récepteur FP et  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne sont pas impliqués dans la régulation physiologique de la PIO (Crowston et al., 2007). Pourtant, les différents acteurs enzymatiques nécessaires à la synthèse endogène de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sont présents dans la zone antérieure de l'œil. En effet, COX-1 et COX-2 sont exprimées dans l'iris et le corps ciliaire chez le lapin et le rat (Damm et al., 2001 ; Yadav et al., 2007). Une expression de l'AR (AKR1B4) dans ces mêmes tissus a également été décrite chez le rat (Ludvigson et Sorenson, 1980 ; Yadav et al., 2007). Une implication de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la physiologie de l'œil n'est donc pas à exclure.

### C. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la fonction rénale

$\text{PGF}_{2\alpha}$  est la principale prostaglandine excrétée dans les urines. L'ARNm du récepteur FP a été détecté par Northern-blot dans le rein chez différentes espèces (Abramovitz et al., 1994 ; Sugimoto et al., 1994). Chez la souris, il a été localisé uniquement dans une sous-population de cellules du cortex au niveau des tubules contournés distaux et des tubes collecteurs (Saito et al., 2003). Aucune expression de l'ARNm n'a été détectée dans les glomérules, les tubules proximaux ou la partie ascendante de l'anse. Pourtant, quelques travaux décrivent une activation de la voie PLC/PKC par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans les cellules mésangiales glomérulaires (Breshnahan et al., 1996) et les podocytes glomérulaires en culture (Bek et al., 1999). Dans les podocytes murins en culture, les auteurs ont montré l'expression de l'ARNm du récepteur FP mais n'ont pas étudié son rôle dans la fonction glomérulaire (Bek et al., 1999). Dans les cellules mésangiales, le traitement par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  entraîne une augmentation significative de la synthèse d'ADN signe d'une prolifération cellulaire (Mene et Dunn, 1990 ; Kelefiotis et al., 1995). Mais la démonstration de l'implication du récepteur FP dans cet effet n'a pas été réalisée. Depuis, aucune étude portant sur le rôle de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la filtration glomérulaire n'a été publiée. Toutefois, cette hypothèse a repris un grand intérêt très récemment car l'ARNm de *akr1b7* a été décrit comme marqueur des cellules mésangiales dans les phases tardives de développement du glomérule chez la souris



(Takemoto et al., 2006). COX-1 est également exprimée dans ce type cellulaire (Campean et al., 2003). L'expression de COX-2 a été localisée dans les cellules de la *macula densa* du tube contourné distal qui sont les osmorécepteurs de l'appareil juxta-glomérulaire (Ichitani et al., 2001 ; Campean et al., 2003). La localisation exacte des protéines dans les glomérules rénaux et l'appareil juxta-glomérulaire est difficile car il existe peu de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires. L'étude de l'expression des différents acteurs nécessaires à la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de son récepteur dans cette zone devrait permettre de suggérer de nouveaux rôles pour  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la régulation de la filtration glomérulaire ou le développement rénal.

La localisation du récepteur FP dans l'épithélium des segments distaux du néphron a relancé la recherche sur des effets potentiels de l'activation du récepteur FP dans ce segment. En effet, dans les années 1980, quelques travaux avaient montré que l'administration de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par infusion intraveineuse chez des chiens ou des rats avait un effet natriurétique et diurétique (Zook et Strandhoy, 1981 ; Stier et al., 1987). En 2005, une étude portant sur le clonage de l'ADNc du récepteur FP de lapin a montré qu'il était exprimé dans le conduit collecteur cortical (Hebert et al., 2005). Son activation par le latanoprost (agoniste FP) inhibe la perméabilité à l'eau stimulée par la vasopressine de tubes collecteurs microperfusés. Cette action passe par l'activation d'une protéine  $G_i$  et l'inhibition de la production d'AMPc. Il semble donc que l'activation du récepteur FP puisse inhiber l'absorption d'eau par l'épithélium rénal du tubule collecteur.

Aucun défaut majeur de l'homéostasie rénale n'a été décrit chez les souris  $fp^{-/-}$  par leurs créateurs (Sugimoto et al., 1997). Toutefois, aucune étude poussée de leur fonction rénale n'a été réalisée.

#### **D. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le système cardio-vasculaire**

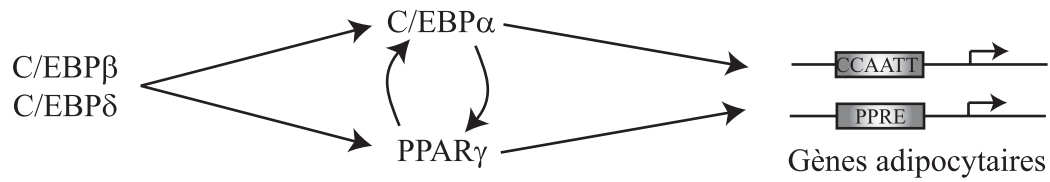
Il existe de plus en plus de données sur l'implication des prostanoïdes dans l'homéostasie vasculaire en conditions physiologiques ou physio-pathologiques. Parmi eux, ce sont le thromboxane A2 ( $\text{TxA}_2$ ) et la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) qui sont les plus étudiés (Norel, 2007). Mais





quelques travaux décrivent  $\text{PGF}_{2\alpha}$  comme un prostanoïde vasoconstricteur et hypertrophique. Les études pharmacologiques sur organes isolés indiquent que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  entraîne la contraction de vaisseaux sanguins de différentes espèces (Balwierczak, 1991 ; Wendling et Harakal, 1991 ; Hori et al., 1992). En 1992, Dorn et ses collaborateurs ont démontré que l'effet vasoconstricteur de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sur des anneaux aortiques de rat était dû à l'activation du récepteur TP du  $\text{TxA}_2$  par des concentrations micromolaires de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Dorn et al., 1992). L'utilisation de concentration de l'ordre du nanomolaire sur des cellules musculaires lisses vasculaires stimule la synthèse protéique et l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *c-myc* sans augmenter la synthèse d'ADN ou la prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent un rôle hypertrophique de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sur les cellules musculaires lisses vasculaires plutôt qu'un effet vasoconstricteur (Dorn et al., 1992). Pour augmenter la synthèse protéique dans ce modèle cellulaire,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induit l'activation des MAPK JNK et ERK2, de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et de la sérine/thréonine kinase  $\text{p70}^{\text{s6k}}$ . Elle entraîne également la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E et de son régulateur 4E-BP1 (Rao et al., 1999). Une autre étude indique que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induit l'hypertrophie de ces cellules en transactivant EGFR ce qui entraîne l'activation des différentes MAPK et la phosphorylation de CREB (Fukuyama et al., 2005).

$\text{PGF}_{2\alpha}$  a des effets complexes sur le cœur. Elle augmente la contractilité cardiaque, module le rythme cardiaque, augmente la production du facteur natriurétique auriculaire et entraîne une hypertrophie des ventricules (Yew et al., 1998). En effet,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule l'hypertrophie de cardio-myocytes ventriculaires en culture prélevés chez des rats nouveaux-nés et amplifie l'expression des gènes myofibrillaires (Adams et al., 1996). De plus, l'expression de l'ARNm du récepteur FP et les faibles concentrations de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nécessaires pour induire la synthèse protéique dans ce modèle suggèrent que cet effet passe par son récepteur spécifique. Surtout que seule  $\text{PGF}_{2\alpha}$  parmi les prostanoïdes démontre cette capacité (Lai et al., 1996). L'administration chronique de fluprostenol (agoniste du récepteur FP) à des rats augmente de



**Figure 24 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation adipocytaire terminale.** C/EBPβ et C/EBPδ exprimés plus précocément, entraînent l'expression de PPARγ et C/EBPα. Ces deux facteurs renforcent mutuellement leurs expressions et induisent l'expression d'un large panel de gènes adipocytaires. L'activité transcriptionnelle de PPARγ et C/EBPα est influencée par d'autres facteurs de transcription et divers co-activateurs et co-répresseurs qui ne sont pas représentés ici. (D'après MacDougald et Mandrup, 2002)

manière dépendante à la dose le rapport poids du cœur/poids du corps.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  semble donc bien jouer un rôle important dans la croissance et/ou l'hypertrophie cardiaque (Lai et al., 1996). L'effet de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans ce modèle passe par la voie PLC/PKC et active les MAPK p38, ERK et JNK (Adams et al., 1998). Pour définitivement démontrer l'action hypertrophique de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , il serait nécessaire de vérifier si les souris  $fp^{-/-}$  en conditions normales présentent des défauts de croissance du cœur ou si les analogues de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  administrés à ces animaux perdent leurs effets sur le poids du cœur.

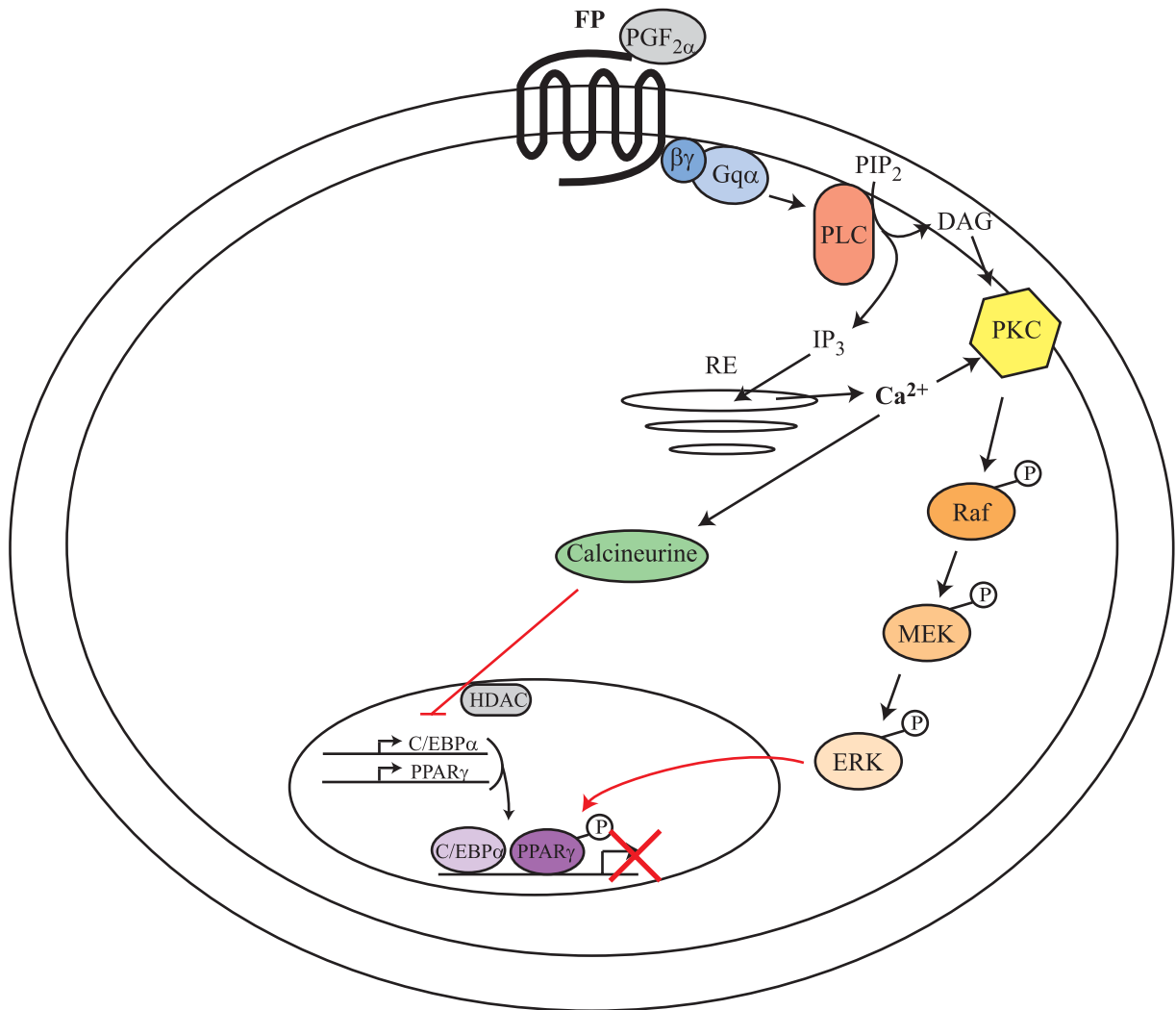
### **E. Rôle de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans l'inhibition de la différenciation adipocytaire**

Le premier rôle des adipocytes est le stockage de l'énergie sous forme de triacylglycérol et la production d'acides gras et de glycérol lorsque la demande d'énergie augmente. Toutefois, le tissu adipeux joue également un rôle majeur dans le contrôle du métabolisme en sécrétant des facteurs endocrines et paracrines. Lorsque les apports énergétiques dépassent les besoins de l'organisme, ils entraînent l'augmentation de la masse du tissu adipeux par l'hypertrophie et l'hyperplasie des adipocytes (MacDougald et Mandrup, 2002 ; Otto et Lane, 2005). La compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent la croissance et la différenciation des adipocytes est devenue un enjeu majeur pour la communauté scientifique et médicale. La plupart des données ont été obtenues dans le modèle de préadipocytes en culture 3T3-L1. Ces cellules fibroblastiques embryonnaires déjà engagées dans le lignage adipocytaire peuvent se différencier en adipocytes matures lorsqu'elles sont exposées à un cocktail hormonal qui comprend un analogue synthétique des glucocorticoïdes (dexaméthasone), un agent qui augmente les taux d'AMPc intracellulaires et de l'insuline. Il est maintenant établi que la différenciation adipocytaire terminale est un processus coordonné qui consiste en une induction séquentielle de facteurs de transcription dont les plus importants sont PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) et les protéines de la famille C/EBP (figure 24). Lorsque les préadipocytes sont



exposés aux inducteurs, ils entrent de nouveau dans le cycle cellulaire et se divisent une à deux fois. Cette première étape nommée expansion clonale mitotique est associée à l'augmentation de l'expression des facteurs C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ . Ces deux facteurs induisent l'expression de la deuxième vague de facteurs de transcription proadipogéniques C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Ces deux derniers renforcent mutuellement leurs expressions et induisent l'expression d'un large panel de gènes spécifiques des adipocytes. L'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  est influencée par d'autres facteurs de transcription et divers co-activateurs et co-répresseurs dont les rôles respectifs commencent seulement à être élucidés (MacDougald et Mandrup, 2002 ; Otto et Lane, 2005).

L'entrée des préadipocytes dans l'adipogenèse est sous le contrôle d'un ensemble de signaux qui s'opposent (MacDougald et Mandrup, 2002). L'insuline, l'IGF, les glucocorticoïdes et tous les agents qui élèvent les taux d'AMPc sont des facteurs qui stimulent la différenciation adipocytaire. A l'inverse, beaucoup de facteurs de croissance (EGF, TGF $\beta$ ), de cytokines (IL-1, IL-6, IL-11, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) et de produits paracrines (résistine, glycoprotéines Wnt) inhibent l'adipogenèse. Les prostanoïdes influencent également la différenciation adipocytaire. Les dérivés de PGJ<sub>2</sub> ont un effet adipogénique en activant PPAR $\gamma$  dont ils sont des ligands. PGI<sub>2</sub> stimule la différenciation en se liant à son récepteur spécifique IP (Aubert et al., 2000). L'activation de l'adénylate cyclase qui en résulte augmente les taux d'AMPc ce qui induit l'expression de la première vague de facteurs de transcription (C/EBP $\alpha$  et  $\delta$ ). A l'inverse, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et ses analogues pharmacologiques (fluprostenol, cloprostenol) inhibent l'adipogenèse dans la lignée de préadipocytes 3T3-L1 (Casimir et al., 1996), dans les cellules adipogéniques 1246 (Serrero et al., 1992b) mais également dans des cultures primaires de précurseurs adipocytaires de rat (Serrero et al., 1992a ; Serrero et Lepak, 1997). La présence du récepteur FP dans les préadipocytes a été démontrée grâce à des techniques d'étude de la liaison spécifique de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et à l'amplification de son ARNm (Miller et al., 1996 ; Borglum et al., 1999). De plus, la co-expression de COX2 et de AKR1B7 dans les préadipocytes des tissus adipeux péri-



**Figure 25 : Mécanismes moléculaires de l'effet anti-différenciateur de PGF<sub>2α</sub> sur les préadipocytes.** Deux modes d'action différents ont été décrits. PGF<sub>2α</sub> en se liant au récepteur FP active le voie PLC/PKC. L'augmentation des taux intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> active la calcineurine. L'activation de cette voie prévient l'expression des facteurs de transcription C/EBPα et PPARγ grâce à l'intervention des HDAC. D'autre part, PGF<sub>2α</sub> induit l'activation de la voie MAPK qui inactive PPARγ en le phosphyrlant.

épididymaires et péri-surréaliens de la souris a été récemment démontrée (Tirard et al., 2007). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet anti-différenciateur de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  semblent multiples (figure 25). Dans une première étude, l'activation du récepteur FP par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  déclenche une augmentation des concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui entraîne une augmentation de la synthèse d'ADN sans prolifération cellulaire (Miller et al., 1996). Les auteurs démontrent également que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne modifie pas l'expression des marqueurs précoces de différenciation comme C/EBP $\beta$ . Des travaux récents ont également mis en évidence une augmentation des taux intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  *via* la protéine  $\text{Gq}\alpha$  (Liu et Clipstone, 2007). Cette étude démontre que l'activation de la sérine/thréonine phosphatase dépendante de la calmoduline/ $\text{Ca}^{2+}$  ou calcineurine est nécessaire à l'inhibition de la différenciation par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Comme dans les premiers travaux, l'activation de cette voie n'interfère pas avec la phase d'expansion clonale et n'affecte pas l'expression ou l'activité de C/EBP $\beta$ . En fait,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  *via* ce mécanisme dépendant de la calcineurine prévient l'expression des facteurs de transcription majeurs C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Ce phénomène semble impliquer les histone déacétylases (HDAC). Indépendamment de cette voie,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  peut bloquer l'adipogenèse en activant la voie MAPK qui induit l'inactivation de PPAR $\gamma$  par phosphorylation (Reginato et al., 1998). L'implication relative des ces 2 voies restent à étudier ainsi que l'exploration du mécanisme permettant l'inhibition de l'expression de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ .

## F. Rôles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans la fonction de reproduction

$\text{PGF}_{2\alpha}$  est principalement connue pour son rôle dans la fonction de reproduction chez la femelle. Elle constitue le principal agent lutéolytique chez les mammifères et participe avec l'ocytocine aux contractions utérines lors de la parturition. Le rôle de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le tractus génital mâle est beaucoup moins connu. Les modèles de souris transgéniques invalidées pour les gènes *cox-1*, *cox-2* ou *fp* présentent des phénotypes très marqués pour la reproduction femelle





alors que la fertilité mâle ne semble pas affectée. Pourtant quelques travaux suggèrent un rôle pour  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le tractus génital mâle.

### 1. Rôles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le tractus génital mâle

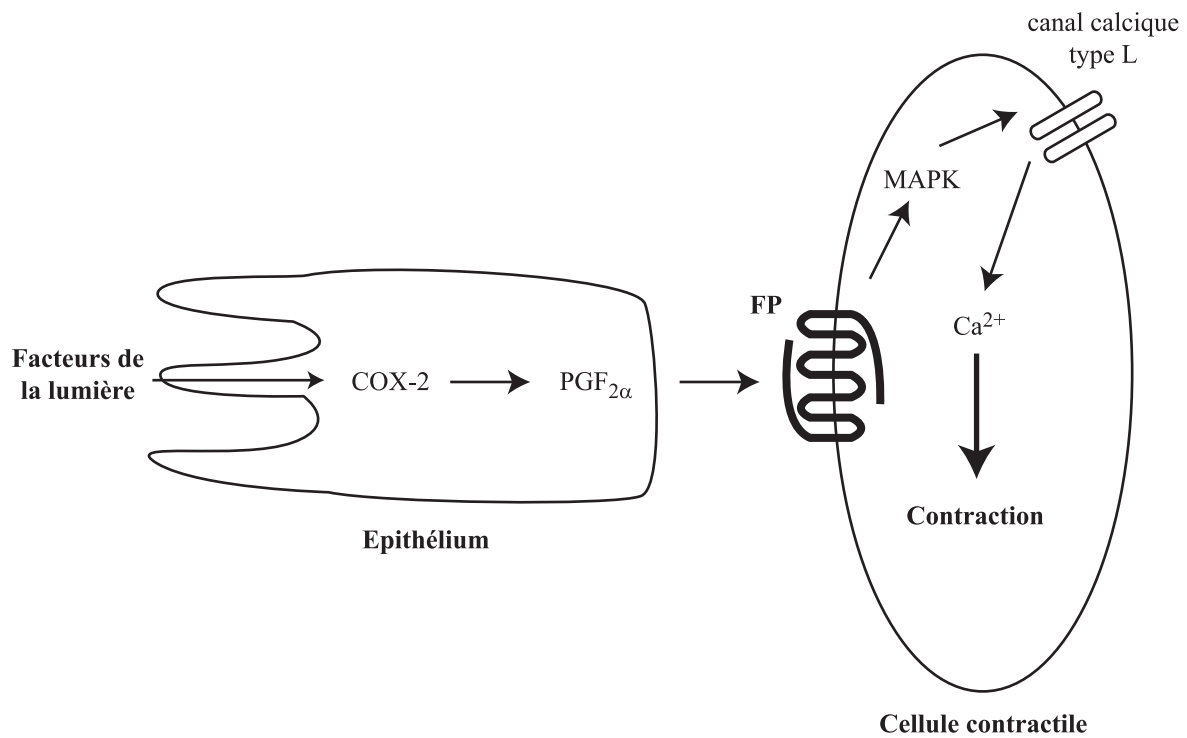
Deux rôles potentiels de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le tractus génital mâle ont été évoqués : une implication dans la régulation du transport des spermatozoïdes le long du tractus en augmentant la contractilité des différents tubules et un rôle dans des régulations paracrines au sein du testicule.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  est présente dans les testicules, l'épididyme et le canal déférent de différents modèles animaux (Badr et al., 1975 ; Badr, 1976 ; Gerozissis et Dray, 1983). Chez le mouton, les taux retrouvés dans la lumière augmentent tout au long du tractus (Cosentino et al., 1984). Chez le rat, les taux de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sont faibles dans les testicules, forts dans le canal déférent et intermédiaires dans l'épididyme (Cosentino et al., 1984). L'expression du récepteur FP dans les organes génitaux mâles a été peu étudiée. Pour l'instant, très peu d'études ont réussi à réaliser la localisation *in situ* de la protéine. L'une d'entre elles indiquent que dans le testicule de rat et de souris le récepteur FP n'est détectable que dans les cellules de Leydig (Orlicky et Williams-Skipp, 1992). Il est également exprimé dans les cellules de Leydig du hamster syrien et de biopsies humaines de patients atteints de désordres de la fertilité (Frungieri et al., 2006). Le reste des données a été obtenu par Northern-blot, par amplification des ARNm par RT-PCR ou grâce à une lignée de souris chez qui le gène « reporter »  $\beta$ -galactosidase a été inséré dans le locus du récepteur *fp* (Saito et al., 2003). Cette lignée permet de suivre la distribution de récepteur FP dans l'organisme. Une activité  $\beta$ -galactosidase importante a été détectée dans les *epithelia* de l'épididyme et du canal déférent (Saito et al., 2003). Toutefois, l'épididyme possédant une activité  $\beta$ -galactosidase endogène, la significativité du marquage dans ce segment reste douteuse. Dans ce modèle, aucune coloration n'a été détectée dans le testicule alors que différentes études ont évoquées son expression dans les précurseurs des cellules de Leydig (Walch et al., 2003), les



cellules de Leydig (Orlicky et Williams-Skipp, 1992) et les cellules de Sertoli (Ishikawa et Morris, 2006).

Des modifications de l'activité contractile des tubules séminifères suite à un traitement par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ont été rapportées. Dans des explants de rat, des doses de 10  $\mu\text{M}$  induisent une réduction de leur diamètre et une augmentation de leur fréquence de contraction (Farr et Ellis, 1980). De la même manière des tubules séminifères isolés humains se contractent après traitement par des doses croissantes de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-9}$  M à  $10^{-6}$  M) (Yamamoto et al., 1987). En 1998, une nouvelle étude a montré que le traitement de cultures primaires de cellules myoïdes périvitubulaires de rat par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induisait une production rapide d'inositol phosphate, une mobilisation des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires et une contraction des cellules (Tripiciano et al., 1998). Toutefois, les effets décrits sont observés pour des doses de l'ordre du micromolaire et l'implication du récepteur FP n'a pas été démontrée. L'épididyme permet de transporter les spermatozoïdes du testicule au canal déférent. Au cours de ce transit, les spermatozoïdes acquièrent une motilité progressive et leurs capacités de fécondation. Leur transport dans ce canal semble dépendre de contractions phasiques spontanées des couches musculaires. La contractilité d'explants de tête d'épididyme de rat est augmentée par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-6}$  M) (Cosentino et al., 1984). Les mécanismes permettant les contractions spontanées de l'épididyme ont été explorés récemment sur des segments épидидymaires de bœuf (Mewe et al., 2006). Cette étude démontre que l'épididyme présente une autorythmicité caractérisée par des contractions phasiques régulières dont la fréquence décroît de la tête à la partie proximale de la queue épидидymaire. Aucune activité n'a été enregistrée dans la partie la plus distale. Ces contractions sont essentiellement d'origine myogénique et non nerveuse. Lorsque les segments proximaux sont débarrassés de leurs *epithelia*, ils perdent totalement leur contractilité spontanée. Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de COX-2 (NS-398) et du récepteur FP (AL-8810), les auteurs ont démontré que l'autorythmicité épидидymaire était basée sur la sécrétion de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par l'épithélium *via* COX-2 et l'activation de canaux calciques de type L par la voie MAPK dans



**Figure 26 : Modèle hypothétique des facteurs impliqués dans la génération des contractions phasiques spontanées de l'épididyme de boeuf.** Des facteurs présents dans la lumière stimulent la production de PGF<sub>2α</sub> dans les cellules épithéliales par l'action de COX-2. PGF<sub>2α</sub> active la voie MAPK au sein des cellules contractiles par sa liaison au récepteur FP. Cette activation entraîne l'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaires par des canaux calciques de type L ce qui génère les contractions phasiques spontanées. (D'après Mewe et al., 2006)

les cellules contractiles (figure 26). Cette étude est à ce jour la plus convaincante quant à l'implication de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la contractilité de l'épididyme. Un rôle potentiel de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la contractilité du canal déférent a été plusieurs fois évoqué car de fortes concentrations de prostaglandines sont retrouvées dans cet organe (Badr et al., 1975 ; Badr, 1976). Toutefois, les acteurs potentiels de la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , COX1, COX2 (Lazarus et al., 2002) et AKR1B7 (Martinez et al., 1990) ont été localisés uniquement dans les cellules épithéliales ainsi que le récepteur FP (Saito et al., 2003). L'absence du récepteur FP dans les couches musculaires lisses ne semble pas compatible avec un effet contractile. Un rôle de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le canal déférent reste donc très hypothétique.

Les études portant sur l'effet des prostaglandines sur la production de testostérone sont assez rares et contradictoires. L'injection de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chez le singe ou le bœuf induit une augmentation rapide et transitoire des taux plasmatiques de testostérone précédée d'une augmentation des taux de LH (Kiser et al., 1976 ; Kimball et al., 1979). D'autre part, l'administration prolongée de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chez les rongeurs induit une diminution des taux de testostérone allant même jusqu'à un phénotype proche de celui de souris castrées (suppression de la spermatogenèse, réduction du poids des glandes annexes, de l'épididyme, du canal déférent) (Takatori et Yamaoka, 1978 ; Didolkar et al., 1981 ; Singh et Dominic, 1986 ; Sawada et al., 1994). En fait, il semble que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fonctionne comme un régulateur paracrine de l'action de la LH sur les cellules de Leydig. *In vitro* ou dans des préparations de testicules de rat décapsulés,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne modifie pas la production basale de testostérone mais réduit la sécrétion stimulée par la LH (Fuchs et Chantharaksri, 1981 ; Romanelli et al., 1995). La même action a été décrite dans les cellules de Leydig de Hamsters Syriens (Frungeri et al., 2006). Le mécanisme d'action implique une diminution de l'expression de deux protéines contribuant à la stéroïdogénèse la protéine de transport du cholestérol StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) et la  $17\beta$ -HSD (conversion de l'androstenedione en testostérone).



Une étude poussée des souris  $fp^{-/-}$  au niveau de la reproduction mâle n'a jamais été conduite puisque ces souris présentent essentiellement un défaut de mise-bas chez les femelles mais pas de défaut de la fertilité. L'analyse des spermogrammes et l'étude de la contractilité du tractus génital mâle pourraient permettre de conclure sur une implication de  $PGF_{2\alpha}$  dans la régulation du transport des spermatozoïdes et leur maturation.

## 2. Rôles de $PGF_{2\alpha}$ dans la régression du corps jaune

### a) La lutéolyse

$PGF_{2\alpha}$  est tout d'abord connue pour son rôle dans la reproduction femelle. En effet, chez de nombreux mammifères, la production de  $PGF_{2\alpha}$  par l'utérus et/ou le corps jaune est impliquée dans la régulation du cycle ovarien par son action lutéolytique. Le corps jaune est une glande endocrine transitoire qui se développe à partir des cellules folliculaires subsistant après l'ovulation. Il joue un rôle central dans la régulation du cycle oestrien et dans le maintien de la gestation grâce à la synthèse de progestérone. Si l'œuf n'est pas fécondé, le corps jaune régresse et un nouveau cycle débute. L'implantation de l'œuf et/ou l'accouplement selon les espèces initie un mécanisme complexe visant à maintenir la fonction du corps jaune jusqu'à la fin de la gestation pour certaines espèces comme le porc, la chèvre ou la souris, ou jusqu'à la synthèse de progestérone par le placenta comme chez les primates, la brebis ou le cheval. La lutéolyse est caractérisée par un déclin initial de la sécrétion de progestérone nommé lutéolyse fonctionnelle puis par la modification de la structure cellulaire de la glande et son involution nommée lutéolyse structurale. La structure qui en découle, le *corpus albicans* ou corps blanc est composée de tissus conjonctifs qui persistent pendant plusieurs semaines dans l'ovaire (McCracken et al., 1999).

Beaucoup de données prouvent que  $PGF_{2\alpha}$  est le principal agent lutéolytique chez la plupart des espèces de mammifères (McCracken et al., 1999). Par exemple, une simple injection de  $PGF_{2\alpha}$  entraîne la régression du corps jaune mature chez de nombreuses espèces,



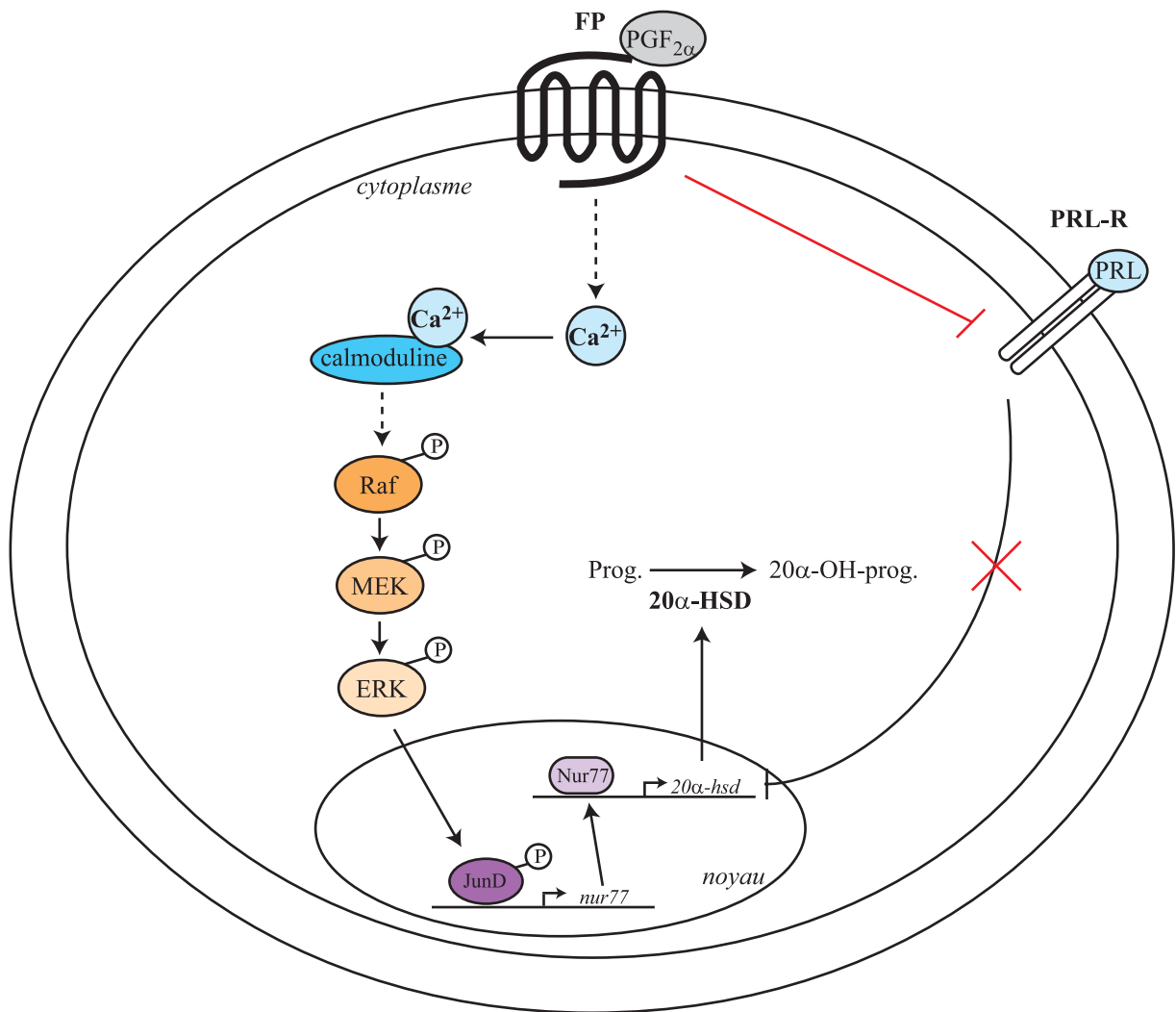


l'immunisation de vaches ou de brebis contre  $\text{PGF}_{2\alpha}$  rallonge leurs cycles oestriens (Scaramuzzi et Baird, 1976 ; Fairclough et al., 1981) ou encore l'invalidation du gène *fp* chez la souris empêche la régression du corps jaune en fin de gestation (Sugimoto et al., 1997). Les expériences d'ablation de l'utérus ont permis de démontrer que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  était d'origine utérine chez beaucoup d'espèces (ovins, bovins, caprins, rongeurs, lagomorphes) en dehors des primates. Chez les primates (singes, homme), l'hystérectomie n'a pas d'effet sur la longueur du cycle ovarien et sur la durée de vie du corps jaune. Différentes études ont montré que chez ces espèces,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est produite par le corps jaune mature. Il produit également  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chez beaucoup d'espèces où la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  utérine initie la lutéolyse (brebis, vache, truie, rongeurs) (McCracken et al., 1999).

*b) Mécanismes d'action de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  lors de la lutéolyse fonctionnelle*

L'action la plus évidente de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a lieu pendant la lutéolyse fonctionnelle où elle inhibe la synthèse de progestérone dans le corps jaune. L'étude de cet effet pose des problèmes récurrents car beaucoup de données ont été obtenues avec des doses pharmacologiques. De plus, il existe de grandes différences de mécanisme entre les espèces, il est donc difficile de concevoir le bon modèle. Il existe différents mécanismes par lesquels  $\text{PGF}_{2\alpha}$  peut diminuer la synthèse de progestérone : i) en ayant une action directe sur les protéines impliquées dans la stéroïdogénèse lutéale, ii) en s'opposant à l'effet des hormones lutéotrophiques prolactine (PRL) et LH ou iii) en ayant un effet anti-oestradiol.

Pour certains auteurs, chez les rongeurs,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ne semble pas modifier la synthèse de progestérone mais augmente son catabolisme en  $20\alpha$ -dihydroprogestérone. Ainsi, à la fin de la gestation, le corps jaune sécrète principalement ce catabolite inactif de la progestérone et la quantité totale de progestérone et de  $20\alpha$ -DH-progestérone reste constante (Stocco et al., 2000). Il était connu depuis longtemps que l'activité  $20\alpha$ -HSD augmentait suite à la stimulation par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . En utilisant les souris *fp*<sup>-/-</sup> et des rates en pseudogestation, Stocco et ses collaborateurs



**Figure 27 : Mécanismes moléculaires de l'induction de l'expression de la 20 $\alpha$ -Hydroxystéroïde Déshydrogénase (20 $\alpha$ -HSD) par PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dans les cellules lutéales.** PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induit l'expression de *nur77* grâce à un mécanisme dépendant du complexe calmoduline/Ca<sup>2+</sup>. Ce complexe induit l'activation de la voie Raf/MEK/ERK qui aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription JunD ce qui augmente son activité transcriptionnelle. Le récepteur nucléaire Nur 77 participe à la stimulation de l'expression du gène de la 20 $\alpha$ -*hsd*. D'autre part, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  inhibe l'expression de PRL-R ce qui lève la répression transcriptionnelle exercée par la PRL sur l'expression de la 20 $\alpha$ -HSD. (D'après Stocco et al., 2002)

ont démontré que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  était responsable d'une augmentation rapide et massive de l'expression du gène de la *20\alpha*-*hsd* en fin de gestation (Stocco et al., 2000).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induit l'expression du facteur de transcription Nur 77 (Nuclear Orphan Receptor) qui à son tour cause l'activation transcriptionnelle du gène de la *20\alpha*-*hsd*. L'induction du gène Nur77 par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  implique l'activation de ERK1/2 de manière dépendante de la calmoduline et la phosphorylation du facteur JunD, un membre de la famille des facteurs de transcription AP1 (Stocco et al., 2002). (figure 27). Bien que ces études démontrent que chez les rongeurs, la synthèse de progestérone est peu touchée par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , d'autres auteurs ont montré qu'elle inhibait l'expression de la protéine de transport intracellulaire du cholestérol (le précurseur des hormones stéroïdes) SCP-2 (Sterol Carrier Protein) dans les ovaires de rat (McLean et al., 1995) ainsi que l'expression de la protéine de transport du cholestérol à travers la membrane interne de la mitochondrie StAR (Fiedler et al., 1999 ; Shea-Eaton et al., 2002). Les facteurs moléculaires de régulation du gène *star* ont été étudiés en détail. L'inhibition de l'expression du gène *star* par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est associée *in vivo* à l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription DAX-1 (Sandhoff et McLean, 1999), c-Fos (Shea-Eaton et al., 2002) et Yin Yang 1 (YY1) (Nackley et al., 2002). Ces trois facteurs dans des cultures de cellules répriment l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *star*. De plus, le traitement par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  supprime l'expression de la protéine StAR *via* le recrutement de HDAC1 par YY1 dans les cellules lutéales de rat (Liu et al., 2007). La significativité physiologique de ces régulations n'est pas claire car l'étude par micro-array de l'expression des gènes de la stéroïdogenèse lors de la lutéolyse murine physiologique (jour 19 de la gestation) n'a pas révélée de modifications de l'expression des gènes impliqués dans le transport du cholestérol ou dans la synthèse de progestérone (Foyouzi et al., 2005). Par contre, dans cette étude l'expression de *akr1c18* (*20\alpha*-HSD) est stimulée en fin de gestation. En accord avec cette donnée, la durée du cycle oestrien, de la pseudogestation et de la gestation est prolongée chez les souris invalidées pour le gène *akr1c18* (Piekorz et al., 2005). Mais elles présentent tout de même une diminution significative des taux de progestérone en absence de la



20 $\alpha$ -HSD qui permet la délivrance des petits ce qui prouve que l'inhibition de la production de progestérone implique également d'autres processus. Ces études plaident pour un modèle chez les rongeurs où la synthèse de progestérone est affectée et où sa dégradation est augmentée permettant une diminution suffisante des taux de progestérone pour permettre la parturition.

Chez la génisse et la femme, au cours du cycle oestrien, l'expression de l'ARNm de *StAR* augmente pendant les deux premières parties du cycle puis diminue fortement pendant la phase tardive (Pescador et al., 1996 ; Devoto et al., 2002). Chez la génisse, la brebis, ou la femme, le traitement par PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  *in vivo* et/ou *in vitro* réduit les taux d'ARNm codant pour *StAR* et la production de la protéine (Juengel et al., 1995 ; Pescador et al., 1996 ; Chung et al., 1998 ; Devoto et al., 2002). Plus récemment, une étude a suivi l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de la progestérone dans le corps jaune de truies au cours de l'acquisition de la capacité lutéolytique (Diaz et Wiltbank, 2005). Suite au traitement des animaux par le cloprostenol, les auteurs ont mis en évidence une forte diminution de l'ARNm et de la protéine *StAR* ainsi qu'une augmentation des taux d'ARNm de *DAX-1* uniquement lorsque le corps jaune a acquis sa capacité lutéolytique (après le jour 13). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de *StAR* par PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  chez ces espèces n'ont pas été explorés. Pendant longtemps, l'étape de conversion du cholestérol en pregnénolone par la P450<sub>scc</sub> (Side Chain Clivage) était considérée comme l'étape régulée de la stéroïdogénèse. Toutefois, les doses de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  qui diminuent les concentrations de progestérone n'induisent pas de modification de l'expression ou de l'activité de cette enzyme. Une diminution de l'expression de l'ARNm de la 3 $\beta$ -HSD qui catalyse la dernière étape de la synthèse de progestérone a été relatée mais elle n'est pas corrélée à la diminution de la quantité de la protéine ou de son activité. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ne semble pas diminuer la production de progestérone par la régulation des enzymes impliquées dans sa synthèse (Niswender et al., 2000).

Quelques études suggèrent également que PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  pourrait s'opposer à l'action lutéotrophique de la LH et de la PRL. Chez de nombreux mammifères, la LH est importante



voire indispensable pour le développement normal et le fonctionnement du corps jaune toutefois l'hormone de croissance, la prolactine ou l'oestradiol peuvent aussi être impliquées chez certaines espèces (Niswender et al., 2000). Par exemple, chez les rongeurs, la synthèse de progestérone est contrôlée par la prolactine, les lactogènes placentaires, l'oestradiol et non par la LH (Stocco et al., 2007). Chez différentes espèces (rat, singe, porc, mouton), le traitement des animaux par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhibe l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur de la LH (LH-R) et diminue le taux de la protéine dans le corps jaune (Sotrel et al., 1981 ; Barb et al., 1984 ; Stocco et al., 2001 ; Diaz et Wiltbank, 2005). Toutefois, cette donnée n'est pas toujours corrélée à la diminution des taux de progestérone. Il est donc difficile d'affirmer que ce mécanisme soit impliqué dans l'inhibition de la production de progestérone par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . D'autre part,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pourrait interférer dans la voie de signalisation de la LH, la voie AMPc/PKA. En effet, la capacité de réponse à l'AMPc du promoteur du gène *star* du rat est diminuée par le facteur DAX-1 (Sandhoff et McLean, 1999). L'augmentation des taux de DAX-1 après la stimulation par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pourrait donc empêcher l'induction de l'expression de StAR par la LH. Toutefois, chez les rongeurs, la LH n'est plus sécrétée et n'a plus de rôle trophique après la mi-gestation. Il semble donc peu probable que ce mécanisme soit impliqué dans l'induction de la régression lutéale par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chez les rongeurs. Par contre, chez ces espèces, la PRL et les lactogènes placentaires sont indispensables pour le maintien de la synthèse de progestérone. Une étude récente a montré que chez le rat,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et la PRL agissaient de manière opposée dans la régulation de gènes clés pour la fonction lutéale (Stocco et al., 2001). Par exemple,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule l'expression du gène *akr1c18* (20 $\alpha$ -HSD) alors que la PRL l'inhibe et au contraire la PRL stimule l'expression du gène *scp-2* alors que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  l'inhibe. De plus,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhibe l'expression du récepteur de la PRL (PRL-R) et interfère dans sa signalisation au niveau de la voie JAK (Janus Kinase)/ STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). En effet, les souris *fp*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de diminution de l'expression du récepteur PRL-R en fin de gestation contrairement aux souris sauvages (Stocco et al., 2003). L'administration de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  à



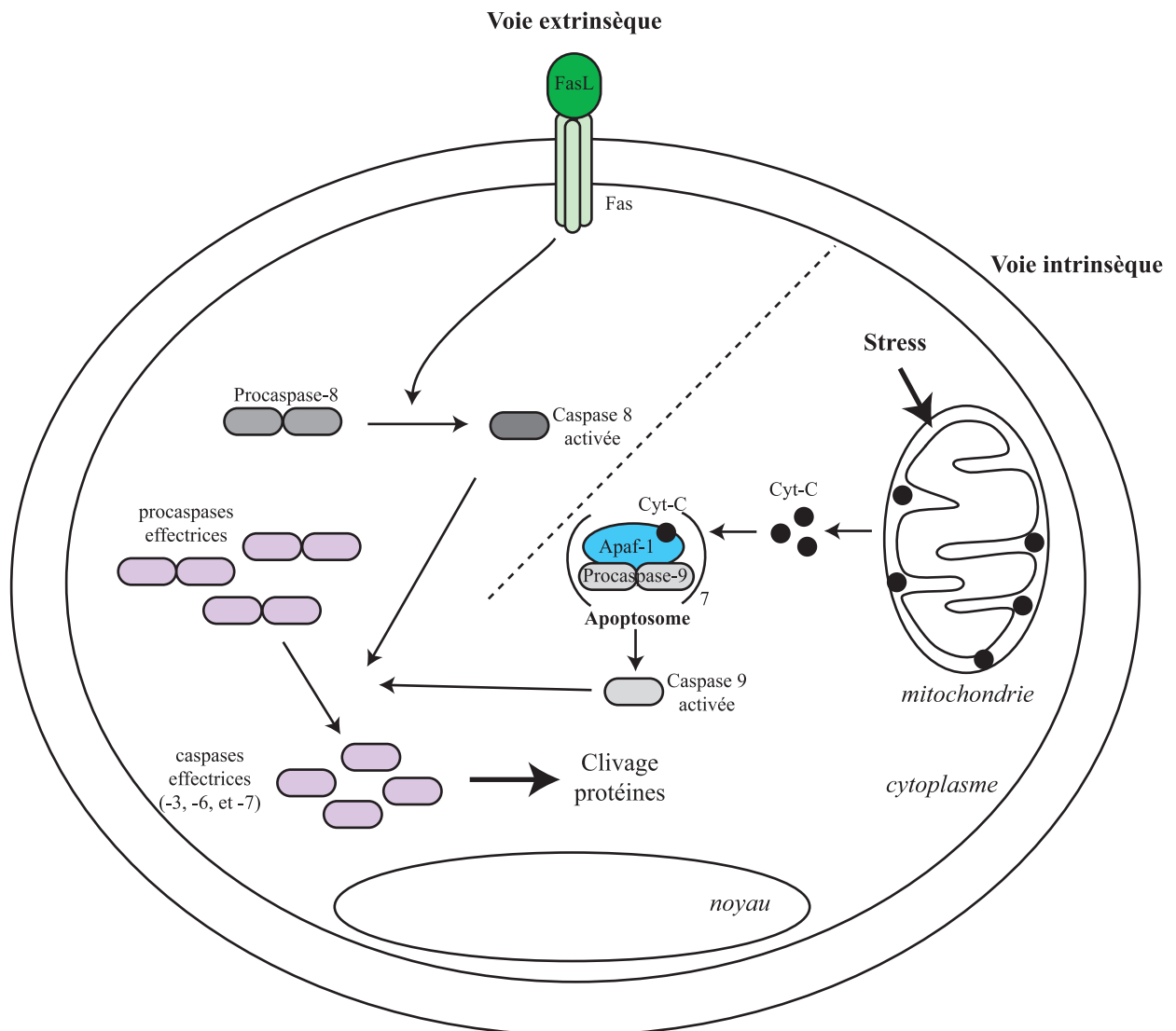


des rates en pseudogestation ou sur des cellules de la granulosa lutéinisées inhibe l'expression de PRL-R. Ces données indiquent que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est responsable du déclin physiologique des taux de PRL-R qui a lieu en fin de gestation. Les auteurs n'ont pas exploré les mécanismes moléculaires mis en jeu. Toutefois des travaux publiés peu avant montraient que le cloprostenol augmentait l'expression de SOCS3 (Supressor Of Cytokine Signaling) qui prévenait à son tour l'activation de STAT5 par la PRL (Curlewis et al., 2002). Comme l'expression de PRL-R est sous la dépendance de STAT5, ce mécanisme pourrait être impliqué dans la diminution de l'expression de PRL-R ou d'autres gènes dépendants de la voie Jak/STAT par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Un troisième mécanisme semble impliqué dans la régulation de la synthèse de progestérone par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chez les rongeurs. En effet, chez les rongeurs et le lapin, les oestrogènes sont directement impliqués dans la stimulation de la sécrétion de progestérone par le corps jaune.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pourrait supprimer la production d'oestradiol par le corps jaune car elle réprime l'expression de la cytochrome P450 aromatasase (conversion de l'androstènedione en oestrone) à la fin de la gestation chez le rat et la souris (Stocco et al., 2001 ; Stocco, 2004 ; Foyouzi et al., 2005). Cet effet a lieu au niveau transcriptionnel et semble impliquer le facteur de transcription GATA-4 (Stocco, 2004). De plus, l'expression du gène *Hsd17b7* qui code pour la  $17\beta$ -HSD (conversion de l'oestrone en  $17\beta$ -oestradiol) est également réprimée en fin de gestation (Foyouzi et al., 2005).

### *c) Effet de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur le stress oxydant associé à la lutéolyse*

Ces dernières années, un nouveau rôle de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la lutéolyse a été suggéré. Elle pourrait être impliquée dans la régulation du métabolisme des espèces oxygénées réactives. La régression du corps jaune naturelle ou induite par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est associée à l'accumulation d'EOR. Chez les rongeurs, le traitement par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  diminue les taux de composés antioxydants comme l'acide ascorbique et augmente la production de radicaux superoxydes (Stocco et al., 2007). En fin de gestation, 6 gènes impliqués dans l'élimination des radicaux libres sont moins exprimés



**Figure 28 : Modèle simplifié des voies de signalisation apoptotiques.** Il existe 2 voies majeures de signalisation apoptotiques, la voie extrinsèque impliquant les récepteurs de mort et la voie intrinsèque qui dépend de la mitochondrie. Les 2 voies impliquent l'activation en cascade de protéases, les caspases qui aboutit au clivage de protéines cellulaires clés (inhibiteurs de nucléases, protéines du cytosquelette...) entraînant la fragmentation de l'ADN et des modifications structurales.

chez les souris sauvages que chez les souris  $fp^{-/-}$  (Foyouzi et al., 2005). Les auteurs ont proposé que  $PGF_{2\alpha}$  en diminuant l'expression de protéines piègeuses de radicaux libres faciliterait l'accumulation des EOR qui à leur tour initieraient la mort des cellules lutéales. Toutefois, cette hypothèse est à confirmer en détail car une étude très récente a montré que chez la brebis, le traitement par  $PGF_{2\alpha}$  ne modifiait pas l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) dans le corps jaune (Garrel et al., 2007). Il est donc difficile aujourd'hui de dire si  $PGF_{2\alpha}$  induit l'accumulation de radicaux libres dans le corps jaune ou si les EOR sont impliqués dans la fonction de  $PGF_{2\alpha}$  ou encore si leur accumulation est simplement une conséquence de la régression lutéale.

#### *d) Implication de $PGF_{2\alpha}$ dans la lutéolyse structurale*

L'involution du corps jaune est due à la mort des cellules lutéales mais également au remplacement des tissus vasculaires et conjonctifs par des fibres de collagène, des fibroblastes et des macrophages. L'événement majeur est la mort programmée des cellules vasculaires et lutéales (Stocco et al., 2007). Il existe deux voies de signalisations apoptotiques : la voie impliquant les récepteurs de mort ou voie extrinsèque et la voie mitochondriale ou intrinsèque (figure 28). Dans la voie extrinsèque, le signal provient de l'interaction entre un ligand et les récepteurs de mort comme Fas et les récepteurs du TNF (TNF-R- 3, -4 et -5). Le ligand de Fas, FasL, initie l'activation de caspases (cysteinyl aspartate cleaving proteases) initiatrices (caspase-8). La voie intrinsèque est activée par des stimuli de stress qui modifient la perméabilité de la mitochondrie permettant la libération du cytochrome c. Celui-ci se lie à l'adaptateur Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor) et à la procaspase-9 pour former un complexe nommé apoptosome qui active la caspase 9. Chaque voie aboutit à l'activation des caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) qui clivent une grande variété de polypeptides intracellulaires nécessaires à la survie cellulaire comme des protéines de structure, des composants de la machinerie de réparation de l'ADN, des protéines kinases ou les inhibiteurs de DNase ICAD (inhibitor of



Caspase-Activated Deoxyribonuclease). L'apoptose est finement régulée par les protéines de la famille Bcl-2 qui peuvent bloquer (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) ou promouvoir (Bad, Bax, Bak, Bid, Puma) la mort cellulaire en régulant la perméabilité mitochondriale (Stocco et al., 2007).

L'injection de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chez la souris (Wang et al., 2003), la brebis (Sawyer et al., 1990 ; Rueda et al., 1995) ou la génisse (Juengel et al., 1993) induit l'apoptose du corps jaune. L'administration d'un anticorps activant Fas ou de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  après l'ovulation chez la souris induit l'activation des caspases-8 et -3 accompagnée de la fragmentation de l'ADN dans le corps jaune (Carambula et al., 2003). Ces modifications sont absentes chez les souris invalidées pour le gène codant la caspase-3. Cette étude démontre donc que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est impliquée dans la disparition du corps jaune *in vivo* via l'apoptose dépendante de la caspase-3. Par contre, les auteurs n'ont pas pu déterminer comment  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pouvait stimuler la voie extrinsèque car le récepteur FP ne peut pas être couplé directement au recrutement et à l'activation de la caspase-8. Ils supposent donc que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  doit augmenter l'activité ou la disponibilité des cytokines comme FasL qui ensuite activent la voie extrinsèque de l'apoptose. Une étude récente réalisée sur le buffle (Yadav et al., 2005) a montré que l'apoptose induite par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le corps jaune impliquait d'abord l'activation de la voie intrinsèque (4h à 12h après le traitement) caractérisée par l'augmentation du rapport Bax/Bcl-2 et l'activation des caspases-9 et -3 puis dans un deuxième temps, l'activation de la voie extrinsèque (18h) caractérisée par l'augmentation de l'expression de Fas et FasL et l'activation de la caspase-8. Pour explorer la contribution relative de ces deux voies dans l'apoptose lutéale induite par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , les auteurs ont également utilisé un modèle de rates en pseudogestation (Yadav et al., 2005). L'injection dans la cavité ovarienne d'un inhibiteur de la caspase-8 avant l'administration de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  abolit la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3. Par contre, l'injection d'un inhibiteur de la caspase-9 atténue l'apoptose mais ne l'abolit pas. Ce travail révèle que la voie de signalisation apoptotique extrinsèque est plus importante que la voie intrinsèque dans l'apoptose lutéale induite par  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .



PGF<sub>2α</sub> a également été associée à un autre processus important de la lutéolyse structurale : la dégradation de la matrice extracellulaire dans le corps jaune. En effet, chez la brebis, l'expression des ARNm codant pour un grand nombre de métalloprotéinases (MMP-1, -3, -7, -13 et -14) est augmentée dès 30 minutes après l'administration de PGF<sub>2α</sub> (Ricke et al., 2002b). L'activité métalloprotéinase est significativement augmentée dès 15 min de traitement et jusqu'à 48 h après l'injection de PGF<sub>2α</sub>. L'expression de l'inhibiteur de métalloprotéinases TIMP-1 est diminuée dans les cellules lutéales au même moment (Ricke et al., 2002a). Toutefois, ces études ne démontrent pas l'implication directe de PGF<sub>2α</sub> dans ce processus.

### **3. Implication de PGF<sub>2α</sub> dans la parturition**

Dans le myomètre utérin, le passage d'un état quiescent pendant la grossesse à un muscle spontanément actif et sensible aux agents utérotoniques au moment du travail est appelé activation utérine. Différentes protéines sont impliquées dans la capacité du myomètre à répondre à ces stimulateurs et à propager le signal de dépolarisation entre les cellules musculaires lisses. Ces protéines d'activation utérine incluent le récepteur de l'ocytocine (OTR), les récepteurs de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1-4</sub>), le récepteur FP, COX-2 et la protéine des jonctions communicantes la connexine 43. Le myomètre activé peut répondre aux agents utérotoniques comme les prostaglandines et l'ocytocine (Olson et al., 2003). La contractilité utérine est produite par l'interaction entre les filaments d'actine et la myosine des cellules musculaires lisses. Le calcium qui afflue dans la fibre musculaire lisse se lie à la calmoduline. Le complexe calcium-calmoduline qui s'est formé active la kinase des chaînes légères de la myosine. Cette kinase permet la phosphorylation d'une des deux chaînes légères de chaque tête de myosine par l'utilisation de l'ATP. Cette phosphorylation permet de démasquer le site de liaison de l'actine sur la tête de myosine lourde. La liaison de l'actine avec la myosine induit la contraction de la fibre musculaire lisse. De plus, la sensibilisation au calcium est facilitée par l'activation de la





kinase Rho qui inhibe la phosphatase de la myosine et probablement phosphoryle la myosine. La dépolarisation est transmise des cellules à cellules grâce aux jonctions communicantes. L'activité utérine est modulée par les récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs couplés à Gq $\alpha$  comme OTR et FP stimule la contractilité en activant la phospholipase C ce qui entraîne la libération de Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique (Lopez Bernal, 2003).

L'expression de récepteur FP augmente au moment du travail chez différentes espèces (rat, souris, brebis, homme) ainsi que les taux de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et l'expression de COX-2 (Olson et al., 2003). L'implication de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dans les contractions utérines lors du travail est communément admise et connue depuis longtemps. Pourtant, suite à l'étude de souris invalidées pour le gène *fp* (Sugimoto et al., 1997), elle ne semble pas indispensable. En effet, les souris *fp*<sup>-/-</sup> portent leurs petits après le terme normal car la lutéolyse est bloquée et la chute des taux de progestérone n'a pas lieu. Mais, lorsque la mise bas est induite par ovariectomie la naissance a lieu normalement et à terme (Tsuboi et al., 2000). Ce qui indique que le récepteur FP n'est pas essentiel pour le travail. De la même manière, les souris invalidées pour le gène de l'ocytocine mettent bas à terme (Nishimori et al., 1996). Il semble donc que l'action d'un seul des agents utérotoniques soit suffisante pour entraîner les contractions utérines. La création de souris invalidées pour les deux gènes permettrait de répondre à cette hypothèse. Toutefois, une nouvelle molécule (THG113.31) mise au point pour limiter les naissances avant terme est un antagoniste non compétitif du récepteur FP. Cette molécule est efficace pour diminuer *in vitro* les contractions utérines mais aussi pour repousser des naissances avant terme induite par le LPS ou le RU486 chez la souris et la brebis (Peri et al., 2002 ; Hirst et al., 2005). L'utilisation de ce nouveau produit semble impliquer le récepteur FP dans les contractions utérines mais son mécanisme d'action reste flou.

Au cours de la parturition, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  pourrait également être impliquée dans la maturation du col utérin et la rupture des membranes fœtales (amnios, chorion) et de la *decidua* adjacente (membrane d'origine endométriale). En effet, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  stimule l'expression de la métalloprotéinase



MMP-1 qui dégrade le collagène dans des cultures de fibroblastes cervicaux ce qui participe à la maturation du col utérin (Yoshida et al., 2002). D'autre part,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  augmente la production de MMP-2 et MMP-9 dans des explants de *decidua* humaine de fin de grossesse (Ulug et al., 2001). Ces protéines dégradent le collagène ce qui participe à la rupture des membranes. *In vivo*, l'expression du récepteur FP augmente dans la *decidua* en fin de grossesse de manière corrélée à l'augmentation de l'expression et de l'activité de MMP-2 et MMP-9 (Makino et al., 2007). Ces données laissent supposer que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pourrait participer à l'étape de rupture des membranes au cours de la naissance.

## V. Projet

L'aldose réductase, enzyme ubiquiste exprimée chez les mammifères, catalyse la première étape de la voie des polyols, la réduction du glucose en sorbitol. Grâce à cette activité, elle contribue à l'osmorégulation cellulaire et à la production de fructose utilisé comme source d'énergie par les spermatozoïdes. En plus de cette activité décrite depuis plusieurs dizaines d'années, elle semble impliquée dans des processus de signalisation intracellulaire et des mécanismes de défense oxydative. Ces nouveaux rôles de l'AR ont été mis en évidence suite à l'étude de son implication dans le développement des complications diabétiques. De multiples protéines apparentées aux aldose-réductases ont été clonées. Ainsi chez l'homme deux membres de la famille AKR1B sont exprimés (AKR1B1 et AKR1B10) et trois membres sont retrouvés chez la souris (AKR1B3, AKR1B7 et AKR1B8). Ces protéines présentent des structures tridimensionnelles très proches et certaines de leurs propriétés catalytiques sont redondantes. Toutefois, les ARLP présentent des profils d'expression tissulaire plus restreints que celui de l'AR et pour certaines une expression finement régulée par des hormones ou des facteurs paracrines. Les fonctions physiologiques des ces protéines restent encore peu explorées ainsi que



la signification physiologique de l'expression de différents membres de cette famille au sein d'une même espèce.

Notre équipe a identifié chez les rongeurs, l'enzyme AKR1B7, qui présente deux caractéristiques uniques dans cette famille : une expression restreinte à un petit nombre de tissus (le canal déférent, la cortico-surrénale, les gonades, le tissu adipeux, l'intestin) et un contrôle hormonal propre à chaque organe (androgènes dans le canal déférent, ACTH dans la cortico-surrénale et LH dans les gonades). Dans les cellules cortico-surréaliennes, le contrôle coordonné par l'ACTH des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse et de AKR1B7 permet l'élimination d'aldéhydes toxiques produits suite à l'activation des cytochromes P450. Toutefois, de récents résultats nous ont suggéré une nouvelle fonction de AKR1B7 dans le métabolisme des prostaglandines. En effet, des travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire du Pr Urade (Osaka Bioscience Institute, Japon), indiquent que la protéine recombinante possède une activité PGF synthase. Cette nouvelle activité de AKR1B7 souligne bien le caractère multifonctionnel de ces enzymes et constitue après celui de l'aldose réductase bovine (AKR1B5), le 2<sup>ème</sup> exemple attestant d'une activité PGFS chez un membre de la famille AKR1B. En effet, AKR1B5 qui cumule les activités 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase et PGFS dans l'endomètre utérin bovin, est vraisemblablement impliquée dans le contrôle de la lutéolyse ovarienne. Jusqu'à ces travaux, les enzymes décrites comme PGFS appartenaient aux sous-familles AKR1C chez les mammifères et AKR5A chez les protozoaires. Leur implication dans la synthèse de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ne repose que sur des études de leurs activités enzymatiques et de leurs structures. La fonction physiologique de ces protéines n'a jamais été démontrée *in vivo*. En effet, la ou les protéine(s) portant l'activité PGFS chez la souris n'est pas connue, il n'a donc pas été possible de réaliser l'inactivation de ce gène dans le modèle murin. Le rôle de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  chez les mammifères est essentiellement rattaché à son pouvoir lutéolytique et à son action inhibitrice sur la différenciation adipocytaire. Toutefois, elle semble également impliquée dans la physiologie rénale et cardio-vasculaire.



La découverte d'une activité PGFS pour une AKR1B d'expression tissulaire aussi restreinte que AKR1B7, suggère d'une part qu'elle pourrait participer à la fonction de reproduction et au contrôle de l'adipogenèse chez la souris et d'autre part qu'il existerait des cibles jusque là insoupçonnées de  $PGF_{2\alpha}$  comme la fonction surrénalienne. Compte tenu du large spectre de substrats des aldose réductases *in vitro* et de leur vaste distribution tissulaire *in vivo*, il est vraisemblable que dans un contexte physiologique, les fonctions de ces enzymes varient selon leur site d'expression et la biodisponibilité de leur substrat dans l'organe considéré. C'est pourquoi AKR1B7 constitue un modèle pertinent pour évaluer *in vivo* l'importance de ces enzymes en particulier dans le contrôle des fonctions endocrines et de reproduction.

L'objectif final de l'équipe étant d'explorer les fonctions physiologiques des aldose réductases en s'appuyant sur des modèles d'inactivation conditionnelle et tissu-spécifique du gène *akr1b7*, mon travail a consisté en deux volets distincts. Tout d'abord, la mise en évidence *in vitro* de l'activité PGFS de AKR1B1, AKR1B3 et AKR1B7 nous a incité à démontrer que cette activité PGFS des aldose réductases murines et humaines existait dans les cellules surrénaliennes en culture et à rechercher son implication physiologique. D'autre part, pour réaliser l'inactivation du gène *akr1b7* spécifiquement dans les deux organes où la protéine est le plus fortement exprimée, nous avons développé des lignées de souris transgéniques exprimant la recombinase Cre dans la cortico-surrénale ou le canal déférent grâce à l'utilisation du promoteur du gène *akr1b7* qui est maintenant bien caractérisé.

## Présentation des résultats

**1<sup>ère</sup> partie : Mise en évidence et étude du rôle de l'activité PGFS des aldose réductases murines et humaines dans les glandes surrénales.**

**Article 1 : *A novel paracrine circuit in the adrenal gland : aldo-keto reductases-mediated  $PGF_{2\alpha}$  synthesis inhibits glucocorticoid release.***





Nous avons précédemment démontré grâce aux travaux réalisés avec l'équipe du Pr URADE, que certaines AKR1B exprimées dans les glandes surrénales possédaient *in vitro* une forte activité PGFS (Kabututu et al., soumis, article en annexe). Dans ce travail, nous démontrons pour la première fois que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  agit comme un régulateur négatif des fonctions endocrines de la glande surrénale grâce à des interactions paracrines entre la cortico- et la medullo-surrénale. De plus, nous avons montré que l'expression différentielle des deux isoformes de COX (COX1 et COX2), des différentes AKR1B (AKR1B1, AKR1B7, AKR1B3, AKR1B8) et du récepteur de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (FP) dans les deux compartiments du tissu (cortex et *medulla*) ainsi que la régulation coordonnée de COX2 et AKR1B7 par l'ACTH jouaient un rôle essentiel dans la production de ce facteur paracrine/autocrine.

**2<sup>ème</sup> partie : Création d'outils génétiques nécessaires à l'inactivation conditionnelle de gènes spécifiquement dans le cortex surrénalien ou le canal déférent de souris.**

**Article 2 : *A Transgenic Mouse Line with Specific Cre Recombinase Expression in the Adrenal Cortex* et résultats complémentaires.**

Afin d'explorer les fonctions physiologiques de *akr1b7*, notamment dans la glande surrénale, mon deuxième objectif a été de créer différentes lignées de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre constitutive ou inductible par le Tamoxifen (Cre-ER<sup>T2</sup>) (Feil et al., 1997) sous le contrôle de différents fragments du promoteur du gène *akr1b7* préalablement validés dans l'équipe. L'utilisation du fragment de 0,5 kb (-510, +41) du promoteur de *akr1b7* nous a permis d'obtenir la première lignée de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans le cortex surrénalien (article 2). D'autre part, différentes autres lignées exprimant la recombinaise Cre soit dans le canal déférent et le cortex surrénalien soit uniquement dans le canal déférent sont en cours d'analyse ainsi que des lignées exprimant la recombinaise Cre-ER<sup>T2</sup> inductible spécifiquement dans le cortex surrénalien (résultats complémentaires).



## **RESULTATS ET DISCUSSION**



## **Première partie**

**Mise en évidence et étude du rôle de l'activité PGFS des aldose réductases murines et humaines dans les glandes surrénales.**



**ARTICLE 1 : A novel paracrine circuit in the adrenal gland : aldo-keto reductases mediated  $PGF_{2\alpha}$  synthesis inhibits glucocorticoid release.**

Sarah Lambert-Langlais, Jean-Christophe Pointud, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Michèle Manin, Bruno Ragazzon, Estelle Louiset, Catherine Delarue, Hervé Lefebvre, Yoshihiro Urade, Antoine Martinez

**Article en cours de préparation**





# A novel paracrine circuit in the adrenal gland : aldose reductase-mediated PGF<sub>2α</sub> synthesis inhibits glucocorticoid release

Abbreviated title : aldose reductases and PGF<sub>2α</sub> in adrenals

<sup>1</sup>Sarah Lambert-Langlais, <sup>1</sup>Jean-Christophe Pointud, <sup>1</sup>Anne-Marie Lefrançois-Martinez, <sup>1</sup>Michèle Manin, <sup>2</sup>Bruno Ragazzon, <sup>3</sup>Estelle Louiset, <sup>3</sup>Catherine Delarue, <sup>3</sup>Hervé Lefebvre, <sup>4</sup>Yoshihiro Urade, <sup>1</sup>Antoine Martinez

<sup>1</sup>CNRS, UMR 6547, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France ; <sup>2</sup>INSERM U567, Department of Endocrinology, Institut Cochin, 75014 Paris, France ; <sup>3</sup>INSERM U413, Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France ; <sup>4</sup>Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, Osaka, Japan.

Address all correspondence and requests for reprints to : Dr. A. Martinez, UMR 6547 CNRS-Université Blaise Pascal, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, Complexe universitaire des Cézeaux, 24 avenue des Landais 63177 Aubière Cedex, France. Tel. +33 4 73 40 74 09 ; Fax. +33 4 73 40 70 42 ; E-mail : [antoine.martinez@univ-bpclermont.fr](mailto:antoine.martinez@univ-bpclermont.fr).

Key words : aldose reductases, PGF<sub>2α</sub>, adrenal

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Blaise Pascal and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

## ABSTRACT

The most efficient prostaglandin F synthases (PGFS) characterized to date in mammals belong to aldose reductase 1B (AKR1B) family. Although AKR1Bs with PGFS activity are highly expressed in both human (AKR1B1) and murine (AKR1B3, AKR1B7) adrenal glands, the impact of PGF<sub>2α</sub> on adrenal physiology were unknown. We examined the PGF<sub>2α</sub> biosynthetic pathway by looking at the contributions of constitutive and inducible isoforms of cyclooxygenases (COX) and AKR1Bs in both cortex and *medulla* using hormonal manipulations of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis in mice, immunohistochemistry and cell and tissue cultures. COX1 and AKR1B3 were constitutively expressed in chromaffin cells and in whole adrenal. COX2 was undetectable under basal conditions or HPA axis blockade, but dramatically induced (peaking at 2-6h) by ACTH surge. In agreement with their ACTH-

responsiveness, COX2 and AKR1B7 expressions were limited to the steroidogenic compartment. In human adrenal sections, as expected, COX2 and the cAMP-regulated AKR1B1 were expressed in steroidogenic cells. Both medullary and adrenocortical murine cells secreted PGF<sub>2α</sub> in a constitutive and ACTH-regulated manner, respectively. The pivotal role of AKR1B7 in ACTH-induced PGF<sub>2α</sub> release was supported by functional coupling with COX2 and demonstrated by antisense approach in murine adrenocortical cells. PGF<sub>2α</sub> was shown to inhibit dose dependently corticosterone release from adrenal tissue cultures. This finding coupled with demonstration that FP receptor was restricted to chromaffin cells and that PGF<sub>2α</sub> repressed catecholamine release, strongly suggests that PGF<sub>2α</sub> repression of glucocorticoid secretion is an indirect mechanism involving at least abatement of catecholamine signal that in turn lessens adrenal steroidogenesis. Thus, AKR1B-



**mediated PGF<sub>2α</sub> synthesis is involved in a novel paracrine circuit that ensures both a constitutive and stress-induced corticostatic effect.**

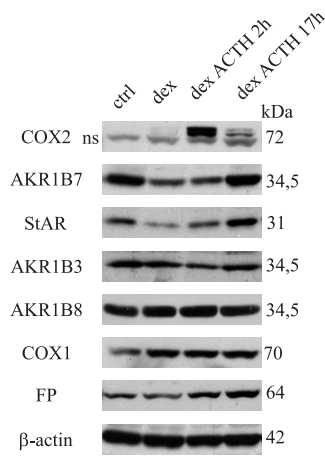
## INTRODUCTION

The aldose reductases (AKR1Bs) belong to the aldo-keto reductase (AKR) superfamily that contains more than 114 proteins expressed in prokaryotes and eukaryotes. This superfamily performs oxidoreduction of a wide variety of endogenous and exogenous substrates including aldoses, aliphatic and aromatic aldehydes and ketones, monosaccharides and prostaglandins (1). Among the 12 members of the AKR1B subfamily, aldose reductase (AKR1B1 in human and AKR1B3 in mouse) has been a focus of interest because of its role in the development of secondary diabetic complications. Indeed, aldose reductase catalyzes the reduction of glucose to sorbitol using NADPH as a cofactor. Under the hyperglycemic state, both sorbitol accumulation and increase of oxidative damages due to NADPH depletion are likely responsible for the induction of cataracts, retinopathies, neuropathies and nephropathies (2).

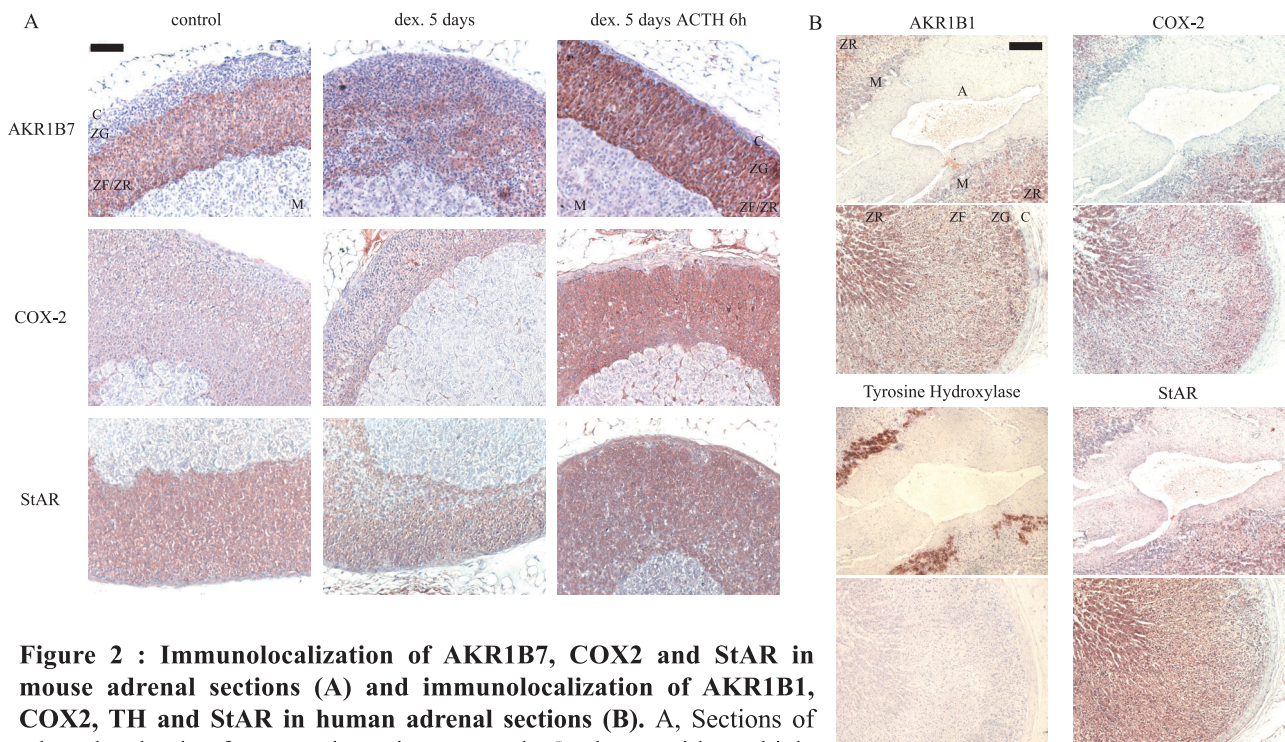
Although AKR1B1 was demonstrated to be involved in the aetiology of diabetic complications, its physiological roles are poorly understood. Sorbitol is a powerful osmolyte in normal conditions and, AKR1B1/B3 is thus thought to participate to osmotic homeostasis. Aldose reductase deficient mice (*akr1b3*<sup>-/-</sup>) exhibit a partially defective urine-concentrating ability (3, 4) and renal structural abnormalities (5). These defects are rescued by genetic restoration of aldose reductase to the collecting tubules (5). These results suggest that AKR1B3 plays an important role in renal osmoregulation and in full maturation of the urine concentrating mechanism. AKR1B1/B3 is also present in a broad range of tissues and other physiological functions based on its enzymatic activities *in vitro* have been proposed. Notably, AKR1B1/B3 is thought to be involved in detoxification of harmful cellular metabolites including 4-hydroxynonenal (6) and isocaproaldehyde (7). But this function

remains to be demonstrated *in vivo* since AKR1B3 deficient mice appeared to be healthy. It is likely that the detoxification function may be taken over by other AKR1B subfamily members. Indeed, we and others have identified AKR1B7 (8, 9) and AKR1B8 (10) as two other murine members of the family and AKR1B10 has been isolated in human small intestine (11, 12).

AKR1B7 presents two interesting characteristics : a tissue-restricted expression (*vas deferens*, steroidogenic tissues, small intestine and adipose tissue) and a tissue-specific hormonal regulation (13-19). In the adrenal cortex, the *akr1b7* gene is up-regulated at the transcriptional level by ACTH (20, 21) and acts as a major reductase for isocaproaldehyde formed during steroidogenesis (22). In human adrenocortical cells, AKR1B1 was proposed to undertake the same function as AKR1B7 in murine species, based on its hormonal sensitivity and isocaproaldehyde reductase activity (23). Interestingly, Madore and colleagues (24) showed that the bovine 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase also known as AKR1B5 had a prostaglandin F<sub>2α</sub> synthase (PGFS) activity in the endometrium. Furthermore, we have established by *in vitro* studies, that this property can be extended to other but not all AKR1B enzymes since AKR1B1, AKR1B3 and AKR1B7 are shown to catalyze the reduction of prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) into PGF<sub>2α</sub> whereas AKR1B8 and AKR1B10 recombinant proteins are devoid of PGFS activity (Kabutu *et al.*, unpublished). Prostaglandins are paracrine/autocrine cell mediators sharing a common precursor, PGH<sub>2</sub>, which is synthesized from free arachidonic acid by the cyclooxygenases type 1 (COX1) or type 2 (COX2). COX1 is regarded as a constitutively expressed enzyme. COX2 on the other hand is undetectable in most tissues in basal conditions but can be induced by various mitogenic agents and inflammatory stimuli (for review see (25)). These different regulations imply that COX1- and COX2-dependent PG productions will be primarily required for housekeeping functions and rapid adaptation to various stimuli, respectively. However, the identity and regulation of downstream enzymes involved in the selective



**Figure 1 : Differential expression of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins in response to ACTH in mouse adrenal glands.** Protein extracts (30  $\mu$ g/lane) from pooled adrenal glands (3 to 6 animals per condition) treated with vehicle alone (5 days, ctrl), dexamethasone (5 days, dex) or dexamethasone (5 days) plus ACTH for time ranging from 2 to 17h (dex ACTH) were subjected to western blot analysis. Molecular weight markers are shown on the right. COX2 multiple molecular species are a consequence of the heterogeneous glycosylation of the protein (ns, non specific signal).



**Figure 2 : Immunolocalization of AKR1B7, COX2 and StAR in mouse adrenal sections (A) and immunolocalization of AKR1B1, COX2, TH and StAR in human adrenal sections (B).** A, Sections of adrenal glands from male mice treated 5 days with vehicle (control), 5 days with dexamethasone (dex) or with dexamethasone plus ACTH for the last 6 h (dex + ACTH) were immunostained with anti-AKR1B7 (L3 antiserum), anti-COX2 and anti-StAR (steroidogenic cell marker) antibodies (A, bar, 100  $\mu$ m). B, Sections of normal human adrenal glands were incubated with anti-AKR1B1 (L3 antiserum), anti-COX2, anti-StAR (steroidogenic cell marker) and anti-tyrosine hydroxylase (TH) (chromaffin cell marker) antibodies (B, bar, 200  $\mu$ m). A, artery, M, medulla, ZG, zona glomerulosa, ZF, zona fasciculata, ZR, zona reticularis, C, capsule.

production of each isotype of prostaglandins remain largely unknown.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is the main initiator of labour and regression of corpus luteum (luteolysis) in most mammals (for review see (26)). Two of the hallmarks features of luteolysis are the decrease in progesterone synthesis and programmed luteal cell death.  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced inhibition of progesterone biosynthesis is mediated by the  $\text{PGF}_{2\alpha}$  receptor (FP receptor) present in luteal cells. Although it has a primary role in reproductive function, the cellular and molecular mechanisms by which  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is produced and its role in other steroidogenic tissues remain largely unknown. AKR1Bs with PGFS activity are highly expressed and for some of them specifically regulated in the adrenal cortex. We thus decided to explore the capacity of the adrenal to produce  $\text{PGF}_{2\alpha}$  and to investigate the effect that this production has on the endocrine functions of the gland.

## RESULTS

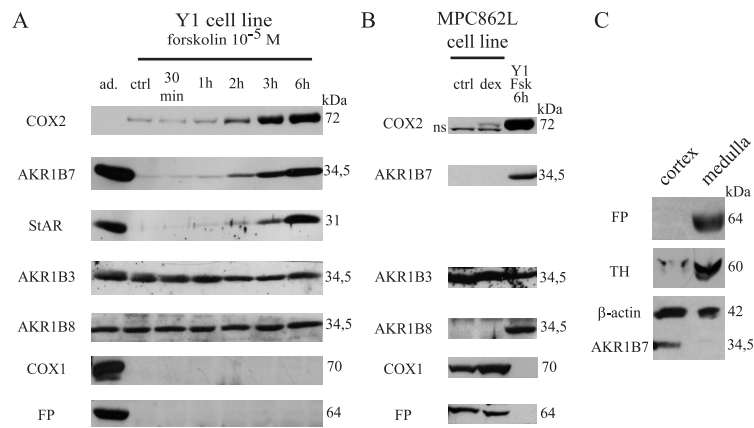
### Hormonal regulation and differential expression of AKR1Bs and COX enzymes in adrenal tissue

We have recently established that aldose reductases of the AKR1B subfamily exhibit PGF synthase activity *in vitro* (Kabutu et al.). Some of these PGF synthases are expressed in the murine adrenal gland (AKR1B7) and in human adrenocortical cells (AKR1B1) under the control of cAMP/ACTH (20, 23, 27). We first investigated the effect of modulations of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis on the capacity of mouse adrenal glands to synthesise prostaglandins. For this, whole adrenal protein extracts were submitted to western blot analysis (Fig.1). As expected, the level of StAR protein (an ACTH-regulated marker of steroidogenic activity) was decreased under dexamethasone-mediated HPA axis blockade (low plasma ACTH) and progressively restored 17h after the injection of exogenous ACTH. As previously described, the levels of the ACTH-responsive aldose reductase AKR1B7 followed the same pattern, confirming the efficiency of the hormonal treatments (28). By contrast, AKR1B3 and AKR1B8 proteins were unresponsive to any of the treatments and

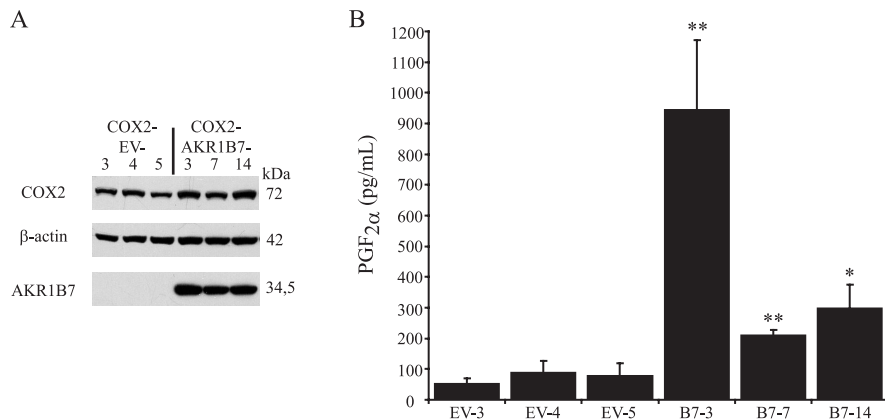
exhibited constitutive expressions. Interestingly, the rate-limiting enzymes of the prostaglandins synthesis pathway, COX1 and COX2, were both expressed in the adrenals but showed very different hormonal sensitivity. COX1 was constitutively expressed although its level appeared to be slightly induced by dexamethasone treatment. By contrast, COX2 was undetectable in basal condition. It was slightly induced by dexamethasone and was strongly stimulated, 2h after ACTH injection. This stimulation was transient, as shown by the low level of COX2 accumulation 17h after ACTH administration. In contrast, the  $\text{PGF}_{2\alpha}$  receptor FP was constitutively expressed in the adrenal. These data suggest that mouse adrenal glands have the capacity to synthesise  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in either a constitutive or an ACTH-dependent manner. The presence of FP indicates that they might be able to respond to this signal directly.

Expression of AKR1B7, AKR1B1 and COX2 in mouse and human adrenal glands was then analysed by immunohistochemistry (Fig.2). AKR1B7 was detected at high levels in the *zona fasciculata* of the cortex in basal conditions. This level was decreased upon dexamethasone treatment. AKR1B7 staining increased dramatically and expanded throughout the whole cortex in the presence of ACTH (Fig.2A). StAR protein had a similar expression pattern, although it spanned the entire cortex irrespective of the hormonal status. In contrast, COX2 positive cells were only found in the adrenal cortex of ACTH-stimulated mice. In human adrenal sections, expression of AKR1B1 and COX2 was restricted to the steroidogenic cells of the cortex (StAR-positive cells) and was absent from the chromaffin cells of the *medulla* (tyrosine hydroxylase positive cells) (Fig.2B).

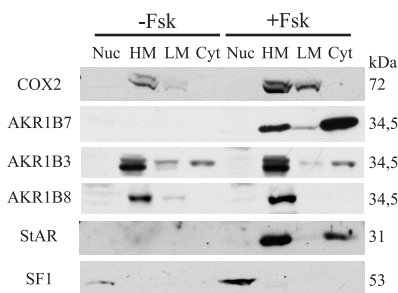
In order to define which of the adrenal cell types was responsible for  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production and which cell type could respond to this signal, we performed western blot experiments with both steroidogenic cortical and medullary chromaffin cell lines (Fig.3). In contrast with whole adrenal protein extracts (ad.), both FP receptor and COX1 were absent from the murine Y1 adrenocortical cell line (Fig.3A). In these cells, AKR1B3 and AKR1B8 were constitutively expressed. Remarkably, COX2 and AKR1B7 levels showed parallel time-



**Figure 3 : Differential expression of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins in cell cultures from adrenal cortex (steroidogenic Y1 cell line (A) and rat primary cultures (C)) and from adrenal medulla (chromaffin MPC862L cell line (B) and rat primary cultures (C)).** A, Time-dependent response to  $10^{-5}$  M forskolin treatment of StAR, AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins levels in Y1 cell line was analyzed by western blot. Whole adrenal protein extract was used as a positive control, (ad.) B, Expression levels of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins were analyzed by western-blot in the chromaffin MPC862L cell line either untreated (ctrl) or treated with  $10^{-6}$  M dexamethasone (dex) for 12h. These levels were compared to the levels observed in Y1 cells stimulated by  $10^{-5}$  M forskolin (Fsk) for 6h (ns, non specific signal). C, FP receptor expression in primary cell cultures of rat adrenal cortical and medullary cells. AKR1B7 and TH positive signals were used as markers of steroidogenic and chromaffin identity, respectively. Molecular weights are indicated on the right.



**Figure 4: Functional coupling between COX2 and AKR1B7.** A, Western blot analysis of six different HEK293 clones stably transfected with COX2 expression vector in combination with empty vector (COX2-EV, clones 3, 4, 5) or AKR1B7 expression vector (COX2-AKR1B7, clones 3, 7, 14). B, ELISA quantification of PGF<sub>2α</sub> in media from stably transfected HEK293 cell clones, expressing COX2 alone (EV-3, -4, -5) or in combination with AKR1B7 (B7-3, -7, -14). Cells were stimulated for 30 min with 10  $\mu$ M A23187 ionophore and culture media were used for PGF<sub>2α</sub> quantification. Values were expressed as the mean of 4 experiments  $\pm$  S.D. Asterisks point values significantly different from the release of PGF<sub>2α</sub> by the COX2-EV-4 cell clone. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .



**Figure 5: Subcellular localization of AKR1B7, AKR1B3, AKR1B8 and COX2 in Y1 adrenocortical cells.** Protein extracts (40  $\mu$ g/lane) from nuclear (Nuc), heavy membrane (HM), light membrane (LM) and cytosolic fractions (Cyt) of Y1 adrenocortical cells untreated or treated with  $10^{-5}$  M forskolin for 6h were subjected to western blot analysis. StAR and SF1 signals were used as markers of heavy membrane fraction and nuclear fraction respectively. Molecular weight markers are shown on the right.

dependent increases upon forskolin treatment, an activator of cAMP synthesis that stimulates steroidogenesis and StAR expression. The murine MPC862L chromaffin cell line was cultured in the absence or in the presence of dexamethasone in order to mimick the known stimulatory action of glucocorticoids on catecholamine production. In contrast with cortical cells, chromaffin MPC862L cells expressed constitutive high levels of FP receptor and COX1 whereas COX2 was either absent or expressed at very low levels (Fig.3B). Consistent with our *in vivo* observations in whole adrenal glands (Fig.1), COX1 and COX2 signals were slightly induced by dexamethasone treatment. The aldose reductase AKR1B3 was constitutively expressed in these cells whereas AKR1B7 and AKR1B8 were undetectable. We confirmed the mutually exclusive expression of AKR1B7 (cortical cells) and FP receptor (chromaffin cells) by western blots analyses performed on primary cell cultures from dispersed rat adrenals (Fig.3C).

Altogether our data demonstrated that there was a coordinated cell-specific expression of COX2 and AKR1B7/B1 in the steroidogenic cells of the adrenocortical cortex. This suggested that this part of the gland had the potential to produce  $\text{PGF}_{2\alpha}$  under cAMP/ACTH control.

### **Functional coupling between COX2 and AKR1B7**

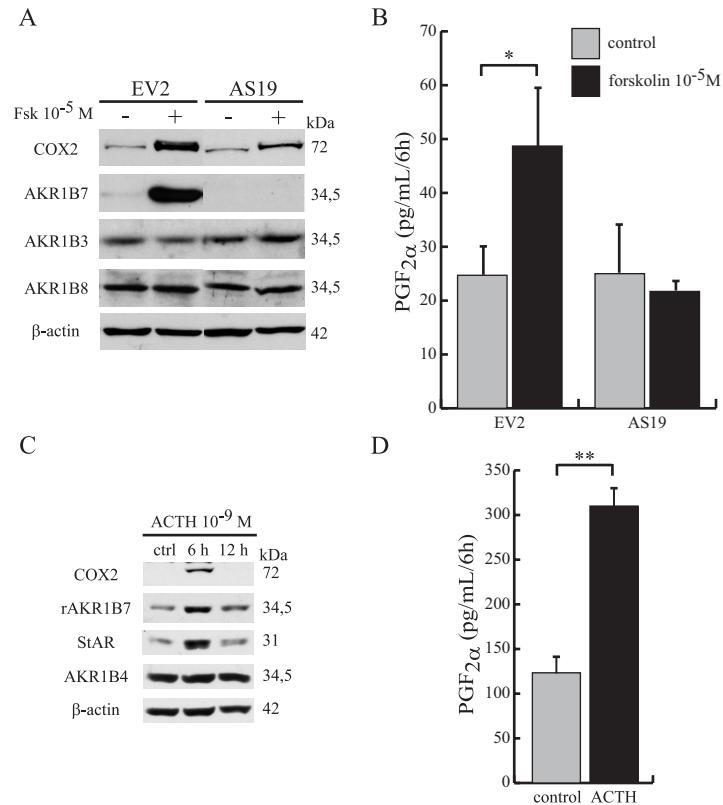
In order to assess a functional coupling between COX2 and AKR1B7, we stably transfected plasmids encoding these two enzymes into the HEK293 cell line that is known to be devoid of COX activity (29) (Fig.4). Expression of COX2 and AKR1B7 was confirmed by western blotting (Fig.4A). Amounts of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  released in the media by HEK293 clones expressing COX2 alone or both COX2 and AKR1B7 were measured by ELISA (Fig.4B). A low basal production of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  was detected in similar amounts in three independent COX2-expressing clones while a 2.5- to 18-fold increase of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  levels was observed in three independent clones upon stable introduction of AKR1B7 expression vector. Functional coupling for  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthesis is dependent on a membrane

association of both the COX and prostaglandin synthase enzymes (30, 31). We thus analysed subcellular localization of AKR1Bs and COX by cellular fractionation of Y1 adrenocortical cells in the absence or presence of forskolin (Fig.5). As expected, COX2 was only associated with heavy and low membranes fractions in both hormonal conditions and was absent from nuclear extracts or soluble cytosolic fractions. Importantly, the PGF synthases AKR1B7 and AKR1B3 which were previously considered as cytosolic enzymes, colocalized with COX2 in the heavy membranes fraction and to a lesser extent in the light membranes fractions. Whereas AKR1B3 was constitutively present in these two fractions, AKR1B7 was only observed in the presence of forskolin (Fig.5). Note that AKR1B8 which was shown to be devoid of PGF synthase activity was found associated with heavy membranes in all conditions. StAR, a mitochondrial protein that is responsive to cAMP was found mainly associated with heavy membrane fraction upon forskolin stimulation. On the other hand, the steroidogenic transcription factor SF-1, was found in the nuclear fraction. This validated the subcellular fractionation procedure. Altogether, we concluded that there was a functional cellular coupling between COX2 and AKR1B7 that resulted in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthesis.

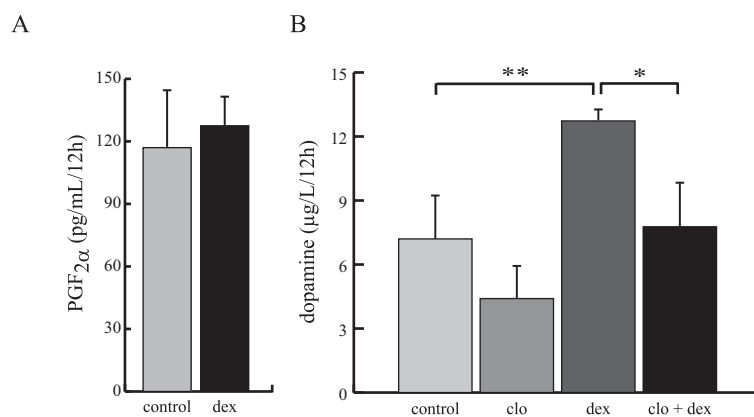
### **Hormonal sensitivity of $\text{PGF}_{2\alpha}$ production in adrenocortical cells and the role of AKR1B7**

We showed that in Y1 adrenocortical cells, COX2 and AKR1B7 were associated in the same membrane fractions under hormonal stimulation. We thus asked whether cAMP would stimulate  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production in a manner dependent on AKR1B7 presence. In order to answer this question we used Y1 cells clones stably transfected with AKR1B7 anti-sense cDNA (AS19) or harbouring an empty vector (EV2) (22). As expected, AKR1B7 was undetectable in the Y1 AS19 clone (antisense). The control EV2 and the antisense AS19 clones had similar levels of expression of AKR1B3, AKR1B8 and COX2 either in basal condition or under forskolin stimulation (Fig. 6A). Both Y1 clones produced similar amounts of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in basal conditions





**Figure 6 : Hormonal sensitivity of PGF<sub>2α</sub> production in rodent adrenocortical cells and involvement of AKR1B7 protein in PGF<sub>2α</sub> production.** A, Western-blot analysis of AKR1Bs and COX2 proteins accumulation in stably transfected Y1 cell clones expressing AKR1B7 (empty vector EV2) or devoid of AKR1B7 (antisense vector AS19) untreated or treated with 10<sup>-5</sup> M forskolin (Fsk) for 6h. Molecular weight markers are shown on the right. B, ELISA quantification of PGF<sub>2α</sub> in media from stably transfected Y1 cell clones expressing AKR1B7 (EV2) or devoid of AKR1B7 (AS19), untreated or treated with 10<sup>-5</sup> M forskolin for 6h. C, Differential expression of AKR1Bs and COX2 proteins in primary cultures of rat cortical cells treated with vehicle (ctrl) or with 10<sup>-9</sup> M ACTH for 6h or 12h. D, ELISA quantification of PGF<sub>2α</sub> release in media from rat adrenocortical primary cells, cultured in the absence or presence of 10<sup>-9</sup> M ACTH for 6h. Values are the mean of 3 experiments ± S.D. \*, *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01.



**Figure 7 : PGF<sub>2α</sub> production (A) and response to PGF<sub>2α</sub> (B) in the chromaffin MPC862L cell line.** A, ELISA quantification of PGF<sub>2α</sub> release by chromaffin MPC862L cells untreated (control) or treated with 10<sup>-6</sup> M dexamethasone for 12h (dex). B, HPLC quantification of dopamine secretion by MPC862L cells cultured in absence or presence of 10<sup>-6</sup> M cloprostenol (clo) used either alone or in combination with 10<sup>-6</sup> M dexamethasone for 12h (clo+dex). Values are the mean of 3 experiments ± S.D. \*, *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01.

(Fig.6B). Forskolin treatment induced a two-fold increase in PGF<sub>2α</sub> release by Y1 EV2 cells whereas PGF<sub>2α</sub> production remained at the basal level in the absence of AKR1B7 (Y1 AS19). To confirm that cAMP/ACTH induced an increase in PGF<sub>2α</sub> release in a non-immortalized cell culture model, we analyzed PGF<sub>2α</sub> production in primary cultures of rat adrenocortical cells. As shown in Fig.6C, rat adrenocortical cells showed a transient stimulation of COX2 expression upon ACTH treatment for 6h. ACTH responsiveness of rAKR1B7 and StAR was similar to that observed in Y1 cells, whereas AKR1B4 (the rat orthologue of mouse AKR1B3) was constitutively expressed. Rat adrenocortical cells produced PGF<sub>2α</sub> in basal condition and showed a 2.5-fold induction of PGF<sub>2α</sub> release upon ACTH stimulation (Fig. 6D). These experiments demonstrated that the AKR1B7 enzyme is responsible for the cAMP/ACTH-stimulated production of PGF<sub>2α</sub> by steroidogenic adrenocortical cells. In addition, our data suggest that the constitutive expression of AKR1B3 (AKR1B4 in rats) could be involved in basal PGF<sub>2α</sub> production.

### Role of PGF<sub>2α</sub> in adrenal functions

The experiments illustrated in Fig.3 provided evidence that the FP receptor was absent from steroidogenic adrenocortical cells (either immortalized cells or cells directly dispersed from adrenal cortex). It is thus likely that PGF<sub>2α</sub> secreted by these cells might act as a paracrine factor. We have shown that chromaffin cells constitutively expressed high levels of FP receptor, COX1 and AKR1B3. Consistent with this, the MPC862L chromaffin cell line secreted PGF<sub>2α</sub> into the culture media. This production was insensitive to glucocorticoids (dexamethasone) (Fig. 7A). Glucocorticoids are known stimulators of catecholamine biosynthesis. In order to investigate a possible role of PGF<sub>2α</sub> on glucocorticoid-induced catecholamine release, we looked at the effects of a PGF<sub>2α</sub> analog (cloprostenol) on the dopamine secretion of MPC862L cells in the absence or presence of dexamethasone (Fig.7B). As expected, dexamethasone induced a 2-fold increase in dopamine release. Interestingly, treatment with

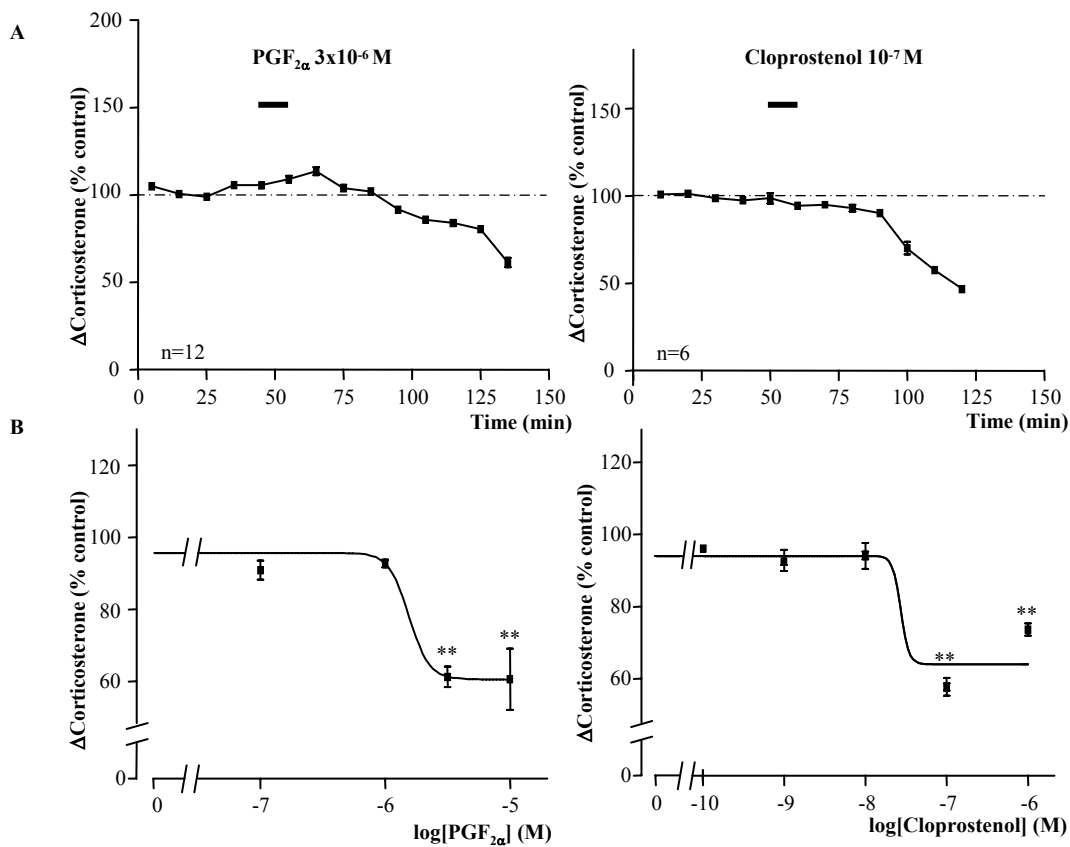
cloprostenol not only decreased basal dopamine release but also completely antagonized dexamethasone-induced dopamine secretion. These data strongly suggested that PGF<sub>2α</sub> was exerting an inhibitory effect on chromaffin cells dopamine release, through an autocrine/paracrine mechanism.

Cell-cell interactions play a crucial role for maintenance of the homeostasis of adrenal glands (reviewed in (32)). We showed that FP receptor was not expressed in the steroidogenic cells of the adrenal cortex. This suggested that PGF<sub>2α</sub> could not directly influence cortical cell activity. We thus investigated the effect of PGF<sub>2α</sub> on corticosterone release by setting-up perfusions of isolated rat adrenals, an experimental approach which preserves the architecture of the gland. Various concentrations of PGF<sub>2α</sub> and of its synthetic analogue, cloprostenol were applied during 20 min. Aliquots of the perfused media were collected every 10 min for determination of corticosterone concentrations (Fig.8A). PGF<sub>2α</sub> and cloprostenol induced a dose-dependent inhibition of corticosterone release (Fig 8B). The half-maximum effective doses (IC<sub>50</sub>) of PGF<sub>2α</sub> and cloprostenol were  $1.58 \pm 0.3 \times 10^{-6}$  M and  $2.51 \pm 0.2 \times 10^{-8}$  M respectively. Maximum responses for PGF<sub>2α</sub> ( $-39.4 \pm 6.6\%$ ) and cloprostenol ( $-36 \pm 9.3\%$ ) were obtained with concentrations of  $3 \times 10^{-6}$  M and  $10^{-7}$  M, respectively ( $P < 0.001$ ).

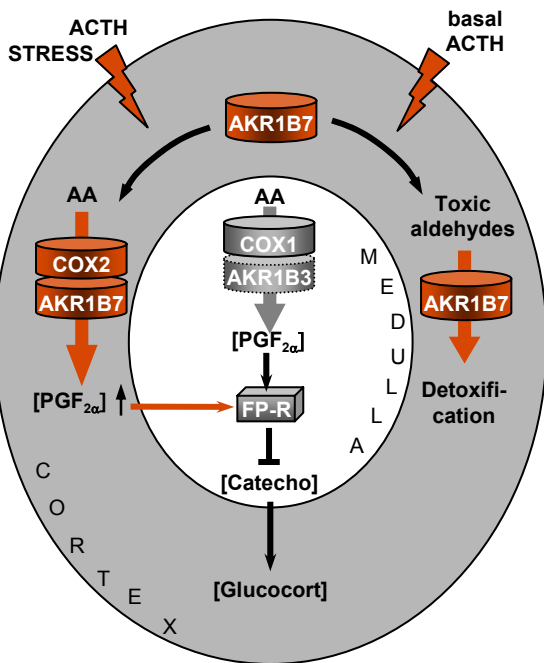
Altogether these data demonstrated that PGF<sub>2α</sub> exerted an inhibitory effect on the endocrine functions of adrenal glands by inhibiting both catecholamine and corticosterone release.

## DISCUSSION

PGF<sub>2α</sub> has been shown to be an essential autocrine/paracrine regulator of ovarian steroidogenesis that initiates luteolysis and parturition in mammals (reviewed in (26)). Although PGF<sub>2α</sub> has this prominent role in the reproductive function, nothing is known about its possible impact on other steroidogenic tissues. Furthermore, little is known about the biosynthetic enzymes involved in its selective production. In our previous work, we



**Figure 8 : Effect of increasing concentrations of PGF<sub>2α</sub> and cloprostenol on corticosterone secretion by perfused rat adrenocortical slices.** A, Typical perfusion profiles illustrating the effects of increasing concentrations of PGF<sub>2α</sub> (0.1 μM to 10 μM) and cloprostenol (0.1 nM to 1 μM) on corticosterone secretion. Horizontal bars indicate the start point and duration of PGF<sub>2α</sub> or cloprostenol infusions. B, Semi-logarithmic plot showing the effect of increasing concentrations of PGF<sub>2α</sub> and cloprostenol on the inhibition of corticosterone secretion. Results are expressed as a percentage of the basal secretory rate. Experimental values were calculated from data similar to those presented in Fig. 8A. Each curve represents the mean ± SEM of 6 to 12 independent experiments. After stabilization, the mean secretion rate of corticosterone in basal condition was 251 ± 14 pg/min per adrenal. The concentration-response curve was fitted using the Prism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). \*\**P* < 0.001



**Figure 9 : Proposed model to illustrate the integrated role of PGF<sub>2α</sub> and PGFS of the AKR1B family in adrenal endocrine functions and cortico-medullary interactions.** Free arachidonic acid (AA) is metabolized into PGH<sub>2</sub> by COX enzymes and then converted into PGF<sub>2α</sub> by PGFS of the AKR1B family. FP receptor expression is restricted to the medullary zone. PGF<sub>2α</sub> synthesized in both the cortex and medulla thus signals in an autocrine/paracrine manner on chromaffin cells. This inhibits catecholamines production. Catecholamines produced in the medulla normally stimulate glucocorticoids release by the cortex. Decreased catecholamine production in response to PGF<sub>2α</sub> stimulation thus results in a decrease in glucocorticoids production. The differential expression and regulation of both COX and AKR1B enzymes within the adrenal zones allows the adjustment of PGF<sub>2α</sub> production to limit stress response or control basal steroidogenesis by finely tuning glucocorticoid secretion. In basal conditions, chromaffin cells of the medullary zone constitutively secrete PGF<sub>2α</sub>, most likely through the functional coupling between COX1 and AKR1B3. Under stress conditions, the resulting ACTH surge induces COX2 expression and sustains AKR1B7 levels in the cortex. The functional coupling between COX2 and AKR1B7 triggers a PGF<sub>2α</sub> surge that could act as a local paracrine feedback to limit catecholamine-mediated glucocorticoid release. After the stress response has ended, COX2 returns to undetectable levels. The coupling between AKR1B7 and COX2 does not take place. AKR1B7 then functions only as a detoxifying enzyme of the harmful aldehydes produced under chronic/basal stimulation of steroidogenesis (22).

demonstrated that some aldo-keto reductase 1B (AKR1B) subfamily members expressed in the adrenal gland were endowed with high PGF synthase activity *in vitro* (Kabututu *et al.*, unpublished). Our present work provides new insight in the understanding of PGF<sub>2α</sub> biosynthesis and the role of this prostaglandin in the function of the adrenal gland. Indeed, we establish for the first time that PGF<sub>2α</sub> acts as a negative regulator of adrenal endocrine functions and that the coordinate cell-specific regulation of both cyclooxygenases (COX1 and COX2) and aldo-keto reductases of the AKR1B subfamily (AKR1B7, AKR1B1, AKR1B3) plays a pivotal role in the generation of this signal.

Using *in vivo* approaches and murine cell culture models, we have demonstrated that both cortical (steroidogenic cells) and medullary (chromaffin cells) compartments of the adrenal gland secreted PGF<sub>2α</sub> although the isoforms of COX and AKR1B involved in this biosynthetic pathway differed by their location and sensitivity to hormones. In good agreement with these differential expression patterns, PGF<sub>2α</sub> secretion was found to be modulated by ACTH in steroidogenic cells and to be constitutive in chromaffin cells. Indeed, steroidogenic cells only expressed COX2 and two isoforms of the murine aldose reductases with patent PGF synthase activity *i.e.* AKR1B3 and AKR1B7. Among these enzymes, only COX2 and AKR1B7 were up-regulated by cAMP/ACTH. In particular, we found that ACTH induced a rapid (2h) and transient (persisting until 6-7h and returning to near control level after 17h) increase in COX2 protein. By contrast, chromaffin cells essentially expressed COX1 and AKR1B3 enzymes in a constitutive manner. Consistent with these observations, we have demonstrated that the cAMP/ACTH induction of PGF<sub>2α</sub> release by steroidogenic cortical Y1 cells, was strictly dependent on the expression of AKR1B7. Furthermore, we showed that in the normal human adrenal gland, AKR1B1 and COX2 were colocalized in the steroidogenic cortical cells. AKR1B1 was previously shown to be functionally related to the murine AKR1B7 (23). Therefore, it seems likely that the human adrenal cortex could also have the potential to produce PGF<sub>2α</sub> in response to

ACTH. However, we observed an unexpected sustained expression of COX2 on sections of the human adrenal cortex. Although this might reflect constitutive COX2 expression in the human adrenal cortex, it seems more likely that this high level of COX2 expression reflects the high stress level of hospitalized patients. In this respect and in agreement with our results, stress induced by bacterial lipopolysaccharide injection in rat, was shown to trigger a rapid and transient COX2 mRNA expression in the adrenal cortex (33).

Although both steroidogenic and chromaffin cells of the murine adrenal gland secreted PGF<sub>2α</sub>, we showed that FP receptor expression was restricted to chromaffin cells. This suggested that both autocrine (within chromaffin cells) and paracrine (between steroidogenic and chromaffin cells) mechanisms were relaying PGF<sub>2α</sub> effects. In agreement with our data, high affinity binding sites for PGF<sub>2α</sub> were only detected in the *medulla* within the bovine adrenal gland (34). As expected, PGF<sub>2α</sub> had no effect on steroidogenesis when applied to isolated murine adrenocortical cell lines or rat primary cultures (data not shown). By contrast, PGF<sub>2α</sub> repressed both basal and glucocorticoid-induced catecholamine precursor release from murine chromaffin cell line. Finally, PGF<sub>2α</sub> was shown to repress corticosterone release in a dose dependent manner when applied to isolated rat adrenals in perfusion experiments,. Based on these experimental data, we propose that PGF<sub>2α</sub> is involved in a novel intraadrenal regulatory circuit that controls corticosterone release. The cortico-medullary interactions mediated by PGF<sub>2α</sub> could be involved in both a paracrine feedback to limit stress response or in a local control of basal steroidogenesis. The proposed mechanisms are illustrated in Fig.9 and would occur as follows: 1 / A stress-induced ACTH surge triggers a transient induction of COX2 that couples with AKR1B7 in order to synthesize PGF<sub>2α</sub> in the steroidogenic compartment. Increased amounts of PGF<sub>2α</sub> decrease glucocorticoid secretion through an indirect mechanism. This would involve at least repression of catecholamines release by chromaffin cells. These are known to promote the secretion of adrenocortical cells in a



paracrine manner (35). 2/ In basal conditions, constitutive secretion of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  by chromaffin cells exerts an autocrine control on catecholamines release, thus limiting their paracrine action on adrenal steroidogenesis.

There are few examples of paracrine/autocrine factors that are involved in a negative control of glucocorticoid production by acting directly on the adrenal glands. These include the NT1-11 neurotensin fragment (36), urotensin-II (U-II) (37), leptin (38-40) and the Agouti-related protein (AgRP)(41, 42). Among these peptides, NT1-11 is not produced by the adrenal and thus acts as an endocrine factor. By contrast, the three others may be synthesized within the gland. It is therefore possible that  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -mediated activation of these repressive peptides could constitute an alternative (or a complementary) mechanism to  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -mediated inhibitory tuning of catecholamine secretion. Interestingly, leptin and AgRP were linked to the maintenance of energy balance by acting on food intake in the hypothalamus but also on peripheral tissues such as the adrenal glands. Although leptin is mainly produced by adipocytes, a reciprocal regulation between leptin and AgRP has been characterized at both the central level and within the adrenal (42). Glucocorticoids are known to upregulate the mass of adipose tissue. Interestingly, adrenals are embedded in an adipose mass. There is increasing evidence that glucocorticoids produced by the adrenal and leptin produced by the surrounding adipose tissue reciprocally regulate each other in a paracrine manner (38, 39, 43).

$\text{PGF}_{2\alpha}$  is a potent inhibitor of adipogenic differentiation (44). Interestingly, we have recently established that AKR1B7 as well as COX2 is a pre-adipocyte marker whose expression is down-regulated during adipose differentiation (19). Considering our present results, it seems likely that AKR1B7 anti-differentiating effects on adipocyte precursors could be mediated by its PGF synthase activity and coupling with COX2. An intriguing point is that within adipose masses, peri-adrenal adipose tissue expressed the highest level of AKR1B7. We can thus hypothesize that the peri-adrenal adipose tissue is a major source of  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Locally produced  $\text{PGF}_{2\alpha}$  would repress

glucocorticoid release in the neighboring adrenal gland. This would constitute a new circuit for adipo-adrenal interactions. Conversely, unidentified paracrine factors produced by adipose tissue and acting *via* the Wnt-signaling pathway may have a secretagogue action on adrenal steroidogenesis, although their effect would mostly modulate mineralocorticoid secretion (45, 46).

By detoxifying aldehyde by-products of steroidogenesis (22) and by generating  $\text{PGF}_{2\alpha}$  that inhibits adrenal steroidogenesis, AKR1B7 (and possibly AKR1B1 in human) has complementary actions aimed at protecting the endocrine activity of the adrenal cortex (Fig.9). However, because of the two very different kinetic constants, PGF synthase or isocaproaldehyde reductase activities are likely to be recruited under different circumstances : the low affinity for isocaproaldehyde ( $K_m = 320\mu\text{M}$ ) combined to the highly cAMP/ACTH-dependent expression of AKR1B7 ensures an efficient reduction of isocaproaldehyde under chronic stimulation of steroidogenesis (high flow of substrate) with a limited risk of saturation (22); on the other hand the high affinity for  $\text{PGH}_2$  ( $K_m = 4\mu\text{M}$ ) (Kabutu *et al.*, unpublished) combined with the acute cAMP/ACTH-dependent expression of COX2, allows a rapid response to stress. These observations are reminiscent of the 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and PGF synthase activities of the bovine aldose reductase AKR1B5, that converge to initiate luteolysis in the bovine endometrium (24).

In summary, we have found that  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exerts a negative effect on the endocrine functions of both cortical and medullary zones of the adrenal gland.  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -mediated inhibition of glucocorticoid production is indirect and could require the downregulation of catecholamine production. This would then result in downregulation of adrenal steroidogenesis. Alternatively,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  could up-regulate the expression inhibitory peptides that remain to be identified. We provide evidence that this  $\text{PGF}_{2\alpha}$  signal originates from the differential expression and regulation of COX enzymes and aldose reductases of the AKR1B family.

## ACKNOWLEDGEMENTS



We thank Angélique De Haze and Jean-Paul Saru for excellent technical assistance. We are also grateful to Christine Puchol and Sandrine Plantade for care of the animals. Human adrenal sections were kindly provided by the Cortico et MEDullosurrénale: Etude des Tumeurs Endocrines (COMETE) network. We thank Dr J. Powers (Tufts-New England Medical Center, Boston, MA) for providing the MPC862L cell line and Dr M. Murakami (Showa University, Tokyo, Japan) for the COX2 expression plasmid. We are grateful to Drs P. Val and C. De Jossineau for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental animals and hormonal manipulations**—Animal studies were conducted in agreement with standards described by the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals as well as with the local laws and regulations applicable to animal manipulations in France. For hormonal regulation studies, male mice of the B6D2 F1 strain (4-6-month old) were injected sc with vehicle (sesame oil), dexamethasone acetate for 5 days (75 µg twice daily ; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), or dexamethasone acetate (5 d) plus ACTH (10 µg/g, ip; Synacthene, Novartis Pharma S.A., Rueil-Malmaison, France) for the last 2 h or 17 h. For immunohistochemistry experiments, male mice were treated as described above, except for ACTH (1.2 U, im, daily, Synacthene, Novartis Pharma S.A., Rueil-Malmaison, France) for the last 6 h.

**Rat primary adrenal cells**—Wistar male rats (150-200g) were killed by decapitation. Adrenals were rapidly removed, and the *medulla* was separated from the cortex by squeezing the gland gently after removing the capsula. Then cortical and medullary tissues were separately incubated in HBSS for 20 min at 37°C in the presence of collagenase type I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Dispersed cells were pelleted and the remaining tissues were submitted to 3 or 4 repeated collagenase incubations until

digestion was complete. Supernatants of viable cortical cells were pooled and seeded at a density of 500,000 cells/well in poly-D-lysine-coated 6-well plates (Sigma-Aldrich) and maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified medium (DMEM)/Ham's F12, for 2 days. Medium was supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 2.5% fetal calf serum (FCS), 2.5% horse serum (HS) and 1% insulin-transferrin-sodium selenite (ITS ;Sigma-Aldrich). Dispersed chromaffin cells were pooled and seeded at a density of 300,000 cells in 6-well plates and maintained in DMEM for 2 days. Medium was supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and 10% FCS. On the third day, cells were incubated in serum-free medium for 24 hours. Cortical cells were treated with 10<sup>-9</sup> M ACTH (Sigma-Aldrich) for 6 h or 12 h and culture media were removed for PGF<sub>2α</sub> determination. Cortical cells and chromaffin cells were collected to perform western-blot experiments as described below.

**HEK293 cell lines expressing COX2 and AKR1B7 by stable transfection**—HEK293 cell clones that stably expressed COX2 were transfected using a COX2 expression plasmid bearing neomycin resistance kindly provided by Dr Murakami (Showas University, Tokyo, Japan) and established as previously described (29). In order to establish COX2-AKR1B7 doubly transformed cells, the clone expressing COX2 was subjected to a second transfection with AKR1B7 cDNA which had been subcloned into pcDNA3.1/hygro (Invitrogen) or with empty vector using Exgen (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Briefly, 5 µg of plasmid were mixed with 20 µL of Exgen in 1 mL of 150 mM NaCl and added to cells at 70 % confluence in 100 mm culture dishes. After selection in culture medium supplemented with hygromycine (40 µg/mL) for 4 weeks, single colonies were picked up and expanded. Expression of COX2 and AKR1B7 was assessed by western-blotting as described below.

**Cell cultures**—Y1 clones stably transfected with empty vector or AKR1B7 antisense cDNA (22) were maintained in DMEM/F12





supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 200 µg/mL G418 sulfate. For experiments, Y1 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded into 6-well plates. The next day, cells were placed in serum-free medium containing G418 sulfate in the absence or the presence of  $10^{-5}$  M forskolin (Sigma-Aldrich) for 30 min to 6 h. MPC862L cells (kindly provided by Dr J. Powers, Tufts-New England Medical Center, Boston, MA) were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% HS, 5% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in dishes with collagen coating (47). For experiments, MPC862L cells were treated in the same serum-free medium with or without  $10^{-6}$  M dexamethasone (Sigma-Aldrich) or  $10^{-6}$  M cloprostenol (Sigma-Aldrich) for 12 h. Stably transfected HEK293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 200 µg/mL G418 sulfate and 20 µg/mL hygromycin. For cell activation, HEK293 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded into 6-well plates. After 2 days, the cells were placed in antibiotics-free medium supplemented with 1 % FCS for 24 h. Then, cells were stimulated for 30 min with 10 µM A23187 ionophore (Calbiochem, Darmstadt, Germany) in the same medium.

**Subcellular fractionation**—Y1 cells ( $6 \times 10^7$ ) were scraped gently in PBS-10% glycerol (v/v), washed in PBS and resuspended in 1 mL of hypotonic buffer (0.25 M sucrose, 20 mM Tris (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ ) containing 1 X protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics, Meylan, France), 1 mM NaF and 1 mM  $VO_4Na_3$ . They were then incubated on ice for 30 min. After homogenisation with a Dounce homogenizer (200-300 times), the lysate was subjected to centrifugation at 800 g for 5 min. The cytoplasmic supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C to obtain the heavy membrane pellet (HM). The remaining supernatant was centrifuged at 130,000 x g for 1 hour at 4 °C to obtain the light membrane pellet (LM) and the cytosolic supernatant. HM and LM fractions were resuspended in 2 volumes of Triton X-100 lysis buffer (150 mM

NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA and 1% Triton X-100). Forty µg of total protein from each fraction were analyzed by western-blotting as described below.

**Western-blot experiments**— Western-blotting was performed as previously described (28). Blots were incubated overnight at 4 °C with antibodies against COX1 (Cayman, Ann Arbor, MI, 1:500), COX2 (Cayman, 1:1000), FP receptor (Cayman, 1:500), StAR (1:5000) (48), AKR1B3 (L5, 1:2000), AKR1B7/B1 (L3, 1:5000), AKR1B8 (L7, 1:2000), Tyrosine Hydroxylase (Chemicon, Hampshire, UK, 1:10000), SF1 (1:2000) (49) or  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, 1:3000). Primary antibodies were detected with a secondary antibody conjugated to peroxidase (PARIS, Compiègne, France, 1:10000). Peroxidase activity was detected with the enhanced chemoluminescent system (ECL, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). For the production of antibodies directed against AKR1B isoforms, rabbits were injected with a glutathione S-transferase fusion of the 17 C-terminal amino acid residues of the murine AKR1B3, AKR1B7 and AKR1B8 proteins and the antibodies were obtained and tested as previously described (50). L7 rabbit antiserum specificity, was increased by incubation on a GSTrap column (GE Healthcare, Orsay, France) harbouring the GST-AKR1B7 fusion protein. L3 antiserum is specific for both murine AKR1B7 and human AKR1B1, as previously described (23).

**Immunohistochemistry experiments**— Human adrenal sections were kindly provided by the Cortico et MEDullosurrénale: Etude des Tumeurs Endocrines (COMETE) network. Adrenal tissue was obtained from normal glands removed during the surgery of adjacent non-endocrine tumours. Informed consent was given for adrenal tissue collection as part of a protocol approved by the Institutional Review Board of the Cochin Hospital. Mice were killed by vertebral dislocation and adrenal glands were immediately removed and fixed in Bouin's solution at 4°C overnight. After embedding in paraffin, tissues were sectioned (10 µm) and mounted on slides. Sections were then deparaffinized in toluene and rehydrated in ethanol with increasing concentrations of



water. Quenching of endogenous peroxidase activity, incubation with antibodies and peroxidase staining were performed according to the manufacturer's instructions (Vectastain ABC kit and NovaRED substrate kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Tissue sections were exposed to anti-COX2 antibody (Cayman, 1:250), anti-AKR1B7/B1 antiserum (L3, 1:500), anti-StAR antiserum (1:500) and anti-TH antibody (Chemicon, 1:500) at 4°C overnight. Tissues were counterstained with Harry's hematoxyline and mounted with Crystal Mount (Sigma-Aldrich).

**PGF<sub>2α</sub> production**—PGF<sub>2α</sub> release was measured in 6 h or 12 h culture media. Cellular debris were removed by centrifugation at 15,000 x g and PGF<sub>2α</sub> was quantified with a PGF<sub>2α</sub> ELISA test kit (Neogen, Lexington, KY) according to the manufacturer's instructions.

**Dopamine release**—Dopamine release was measured in MPC862L 12h culture media by HPLC analysis with Chromsystems kit (München, Germany) in the Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France.

**Perfusion experiments**—The effects of PGF<sub>2α</sub> (Sigma-Aldrich) and cloprostenol (Sigma-Aldrich) on corticosterone secretion were studied by a perfusion technique, as described previously (51). Briefly, slices of rat adrenal cortex were layered between several beds of Bio-Gel P2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) into perfusion chambers (equivalent of two adrenal glands/chamber). Adrenal tissue was continuously perfused with CO<sub>2</sub>-saturated HBSS at a constant flow rate (300 μl/min) and temperature (37°C). The glands were allowed to stabilize for 5 h to reach a steady-state level of corticosterone secretion, before any test substance was added. After stabilization, the mean secretion rate of corticosterone in basal conditions was 251 ± 14 pg/min per adrenal. Test compounds were dissolved in CO<sub>2</sub>-saturated HBSS immediately before use and infused into the columns at the same flow rate as HBSS alone. This was achieved through a multichannel peristaltic pump (Desaga, Heidelberg, Germany).

Effluent fractions were collected every 5 min (1.5 ml/fraction), and the tubes were immediately frozen until corticosterone assay. Corticosterone concentration was determined by RIA, without prior extraction, in 100 μl aliquots from each fraction. Sensitivity thresholds of the assays were 20 pg. The intra- and interassay coefficients of variation were 3 and 6%. Each perfusion pattern was established as the mean profile of corticosteroid production (± SEM) calculated from at least six independent experiments. Corticosterone levels were expressed as percentages of the basal values, calculated as the mean of eight samples (40 min), taken just before the infusion of test substances. The concentration-response curves were fitted using the Prism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

**Statistical analysis**—For PGF<sub>2α</sub> and dopamine quantification, statistical analyses were performed by a Student's *t* test. Values of *P* < 0.05 and 0.01 were considered significant and highly significant, respectively. For corticosterone assay, statistical significance was assessed by Bonferroni test after one-way ANOVA. Value of *P* < 0.001 was considered highly significant.

## REFERENCES

1. **Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV, Penning TM** 2003 The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact* 143-144:621-31
2. **Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A** 2005 Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 26:380-92
3. **Ho HT, Chung SK, Law JW, et al.** 2000 Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Cell Biol* 20:5840-6
4. **Aida K, Ikegishi Y, Chen J, et al.** 2000 Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 277:281-6



5. **Yang JY, Tam WY, Tam S, et al.** 2006 Genetic restoration of aldose reductase to the collecting tubules restores maturation of the urine concentrating mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F186-95
6. **Vander Jagt DL, Kolb NS, Vander Jagt TJ, et al.** 1995 Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochim Biophys Acta* 1249:117-26
7. **Matsuura K, Deyashiki Y, Bunai Y, Ohya I, Hara A** 1996 Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch Biochem Biophys* 328:265-71
8. **Taragnat C, Berger M, Jean C** 1988 Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. *J Reprod Fertil* 83:835-42
9. **Pailhoux EA, Martinez A, Veysièrè GM, Jean CG** 1990 Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily. *J Biol Chem* 265:19932-6
10. **Donohue PJ, Alberts GF, Hampton BS, Winkles JA** 1994 A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J Biol Chem* 269:8604-9
11. **Cao D, Fan ST, Chung SS** 1998 Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem* 273:11429-35
12. **Hyndman DJ, Flynn TG** 1998 Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim Biophys Acta* 1399:198-202
13. **Martinez A, Pailhoux E, Berger M, Jean C** 1990 Androgen regulation of the mRNA encoding a major protein of the mouse vas deferens. *Mol Cell Endocrinol* 72:201-11
14. **Lau ET, Cao D, Lin C, Chung SK, Chung SS** 1995 Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem J* 312 ( Pt 2):609-15
15. **Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C, Lessl M** 2000 Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 141:2574-81
16. **Martinez A, Aigueperse C, Val P, et al.** 2001 Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem Biol Interact* 130-132:903-17
17. **Baron S, Manin M, Aigueperse C, et al.** 2003 Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose reductase-like gene *akr1b7* expression in Leydig cells. *J Mol Endocrinol* 31:71-81
18. **Volle DH, Repa JJ, Mazur A, et al.** 2004 Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 18:888-98
19. **Tirard J, Gout J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Begeot M, Naville D** 2007 A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* 148:1996-2005
20. **Aigueperse C, Martinez A, Lefrançois-Martinez AM, Veysièrè G, Jean CI** 1999 Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J Endocrinol* 160:147-54
21. **Aigueperse C, Val P, Pacot C, et al.** 2001 SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 15:93-111
22. **Lefrançois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, et al.** 1999 Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous



- specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 274:32875-80
23. **Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, et al.** 2004 Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3010-9
  24. **Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA, Fortier MA** 2003 An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *J Biol Chem* 278:11205-12
  25. **Ramsay RG, Ciznadija D, Vanevski M, Mantamadiotis T** 2003 Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16:59-67
  26. **McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC** 1999 Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79:263-323
  27. **Val P, Martinez A, Sahut-Barnola I, Jean C, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM** 2002 A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvdp/akr1-b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. *Endocrinology* 143:3435-48
  28. **Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, et al.** 2006 Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147:1805-18
  29. **Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I** 1999 Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 274:3103-15
  30. **Murakami M, Naraba H, Tanioka T, et al.** 2000 Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275:32783-92
  31. **Ueno N, Murakami M, Tanioka T, et al.** 2001 Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. *J Biol Chem* 276:34918-27
  32. **Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP** 1998 Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19:101-43
  33. **Ichitani Y, Holmberg K, Maunsbach AB, et al.** 2001 Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rat kidney and adrenal gland after stimulation with systemic lipopolysaccharide: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res* 303:235-52
  34. **Wiltbank MC, Shiao TF, Bergfelt DR, Ginther OJ** 1995 Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 52:74-8
  35. **Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lubke C, Ehrhart-Bornstein M** 1998 Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology* 139:772-80
  36. **Sicard F, Contesse V, Lefebvre H, et al.** 2006 The N-terminal neurotensin fragment, NT1-11, inhibits cortisol secretion by human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3131-7
  37. **Albertin G, Casale V, Ziolkowska A, et al.** 2006 Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *Int J Mol Med* 17:1111-5
  38. **Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA** 1997 Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46:1235-8
  39. **Pralong FP, Roduit R, Waeber G, et al.** 1998 Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 139:4264-8
  40. **Hsu HT, Chang YC, Chiu YN, Liu CL, Chang KJ, Guo IC** 2006 Leptin





- interferes with adrenocorticotropin/3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling, possibly through a Janus kinase 2-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-phosphodiesterase 3-cAMP pathway, to down-regulate cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme in human adrenocortical NCI-H295 cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2761-9
41. **Doghman M, Delagrangre P, Blondet A, et al.** 2004 Agouti-related protein antagonizes glucocorticoid production induced through melanocortin 4 receptor activation in bovine adrenal cells: a possible autocrine control. *Endocrinology* 145:541-7
  42. **Charbonneau C, Bai F, Richards BS, Argyropoulos G** 2004 Central and peripheral interactions between the agouti-related protein and leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 319:518-24
  43. **Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al.** 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271:5301-4
  44. **Serrero G, Lepak NM, Goodrich SP** 1992 Prostaglandin F2 alpha inhibits the differentiation of adipocyte precursors in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 183:438-42
  45. **Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, et al.** 2003 Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14211-6
  46. **Schinner S, Willenberg HS, Krause D, et al.** 2007 Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int J Obes (Lond)* 31:864-70
  47. **Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P, et al.** 2000 Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. *Cell Tissue Res* 302:309-20
  48. **Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM** 1994 The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269:28314-22
  49. **De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, et al.** 1998 Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18:6653-65
  50. **Morel L, Brochard D, Manin M, Simon AM, Jean C, Veysièrre G** 2001 Mouse seminal vesicle secretory protein of 99 amino acids (MSVSP99): characterization and hormonal and developmental regulation. *J Androl* 22:549-57
  51. **Contesse V, Lenglet S, Grumolato L, et al.** 1999 Pharmacological and molecular characterization of 5-hydroxytryptamine(7) receptors in the rat adrenal gland. *Mol Pharmacol* 56:552-61



**Premier bilan****Mise en évidence et étude du rôle de l'activité PGFS des aldose réductases murines et humaines dans les glandes surrénales.**

Nous avons précédemment démontré en collaboration avec l'équipe du Pr URADE que les protéines recombinantes AKR1B1, AKR1B3 et AKR1B7 possédaient une forte activité PGFS et de meilleures caractéristiques catalytiques pour PGH<sub>2</sub> que les PGFS décrites jusqu'ici (annexe). Dans cet article, nous avons pu mettre en évidence l'implication de ces enzymes dans un nouveau mode de contrôle négatif des fonctions endocrines de la glande surrénale qui utilise PGF<sub>2α</sub> comme signal paracrine et/ou autocrine.

**La cortico- et la medullo-surrénales expriment des acteurs essentiels de la biosynthèse de PGF<sub>2α</sub>.**

Pour étudier l'implication des AKR1B dans la synthèse de PGF<sub>2α</sub> au sein de la glande surrénale, nous avons comparé leurs sites d'expression et leur contrôle hormonal avec ceux des enzymes limitantes de la synthèse des PGs, COX1 et COX2 dans les glandes surrénales humaines et de souris et dans des lignées cellulaires. Nous avons ainsi démontré que AKR1B7 chez la souris et AKR1B1 chez l'homme sont co-localisées avec COX2 dans les cellules stéroïdogènes du cortex surrénalien. Chez la souris, nous avons également montré qu'elles sont co-régulées de manière rapide et transitoire par l'ACTH. Au contraire, AKR1B3 retrouvée dans les deux compartiments surrénaliens et AKR1B8 localisée uniquement dans le cortex présentent une expression constitutive tandis que COX1 et le récepteur FP ne sont exprimés que dans la medullo-surrénale (cellules chromaffines). Ces résultats démontrent que COX2 et AKR1B7 sont exprimées de manière coordonnée dans les cellules stéroïdogènes suggérant que le cortex surrénalien pourrait produire PGF<sub>2α</sub> sous le contrôle de l'ACTH. D'autre part, les cellules chromaffines expriment aussi des enzymes potentiellement impliquées dans la synthèse de PGF<sub>2α</sub> (COX1 et AKR1B3). Notre démonstration de l'expression du récepteur FP exclusivement



dans les cellules médullaires rejoint des travaux réalisés chez le bœuf où des expériences de liaison du ligand avaient mis en évidence une très forte liaison de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le corps jaune et en deuxième lieu dans la *medulla* surrénalienne (Wiltbank et al., 1995). En accord avec nos résultats, une expression rapide et transitoire de l'ARNm de COX2 en réponse à un stress comme l'injection de LPS a été décrite dans le cortex surrénalien de rat (Ichitani et al., 2001). Dans ce modèle comme dans le notre, l'ARNm de COX1 était constitutivement exprimé dans la *medulla*.

### **Il existe un couplage fonctionnel entre COX2 et AKR1B7 permettant la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ .**

L'étude de la localisation intracellulaire des différents acteurs de la biosynthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans les cellules cortico-surréaliennes Y1 a révélé que AKR1B7 et AKR1B3 qui jusqu'ici étaient décrites comme des enzymes cytosoliques sont en fait également associées aux membranes lourdes et dans une moindre proportion aux membranes légères. COX2 comme cela a été décrit dans la littérature (Spencer et al., 1998 ; Liou et al., 2005) est retrouvée uniquement dans les deux fractions membranaires. La co-localisation intracellulaire de COX2 avec ces deux AKR1B possédant une activité PGFS rend possible le couplage fonctionnel de ces enzymes afin de produire  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . En effet, lorsque COX2 et AKR1B7 sont co-exprimées de manière artificielle dans des cellules HEK293 ne possédant pas d'activité COX endogène, la libération de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est fortement augmentée par rapport aux cellules qui expriment uniquement COX2. Ces données démontrent donc qu'il existe un couplage fonctionnel entre COX2 et AKR1B7 permettant aux cellules de synthétiser  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Ce type de couplage fonctionnel a déjà été mis en évidence pour de nombreuses prostaglandine synthases terminales (PGD synthase hématopoïétique, PGE synthases microsomale et cytosolique, PGI synthase) (Ueno et al., 2001 ; Ueno et al., 2005). Par contre, la seule étude réalisée avec la PGFS bovine de type pulmonaire AKR1C7 (Nakashima et al., 2003) n'avait pas pu démontrer de couplage entre les deux isoformes de COX et la PGFS de bœuf remettant en cause l'implication des enzymes de la famille AKR1C dans la biosynthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Toutefois, les auteurs avaient mis en évidence la



présence d'une activité PGFS endogène couplée préférentiellement à COX2 dans les cellules HEK293. Cette activité retrouvée dans différents types cellulaires humains et murins était associée à la membrane, inductible par des stimuli proinflammatoires (LPS, IL-1) et activée par le glutathion réduit (GSH). Ces différentes données correspondent à des caractéristiques décrites pour l'AR. Premièrement, une étude récente a mis en évidence une augmentation des taux protéiques de l'AR dans des macrophages du péritoine de souris stimulés par le LPS (Ramana et Srivastava, 2006). Deuxièmement, au cours de ce travail, nous avons démontré que l'AR murine AKR1B3 était localisée dans le cytosol mais également dans les fractions membranaires. Troisièmement, des travaux réalisés *in vitro* avec l'AR de bœuf (Cappiello et al., 1994) et l'AR humaine (Cappiello et al., 1996), ont montré que la thiolation de l'enzyme par le glutathion oxydé (GSSG) entraînait son inactivation mais que cette modification était réversible par l'ajout de GSH. Cette dernière donnée pourrait expliquer l'activation de l'activité PGFS par le GSH décrite par Nakashima et ses collaborateurs (Nakashima et al., 2003). Pour finir, lors de l'analyse de nos clones HEK293 surexprimant COX2 seul, nous avons détecté en western-blot un signal faible qui pourrait correspondre à AKR1B1 puisque notre anticorps L3 dirigé initialement contre AKR1B7 est également spécifique de AKR1B1 (Lefrancois-Martinez et al., 2004). L'ensemble de ces données suggère donc un rôle potentiel de AKR1B1 dans la synthèse basale de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  observée dans les clones HEK293 surexprimant COX2 seule.

**La production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimulée par l'ACTH dans les cellules cortico-surréaliennes de rongeurs dépend de AKR1B7.**

Nous avons ensuite exploré la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en réponse à une stimulation hormonale (ACTH) dans différentes lignées cortico-surréaliennes. Le dosage de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le milieu de culture des lignées cellulaires a montré que les cellules cortico-surréaliennes de rat (cultures primaires) et de souris (lignée Y1) sécrètent de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et que cette production est stimulée par la voie de l'AMPC/ACTH. Grâce à l'utilisation de clones stables de cellules Y1 n'exprimant plus AKR1B7 (approche anti-sens) nous avons démontré que cette production de





PGF<sub>2α</sub> stimulée par l'ACTH est dépendante de l'expression du gène *akr1b7*. Toutefois, AKR1B3 pourrait être impliquée dans la production basale de PGF<sub>2α</sub> car elle est exprimée de manière constitutive dans ces cellules. L'utilisation d'inhibiteurs de l'AR comme le sorbinil ou le tolrestat devrait permettre de répondre à cette question puisqu'*in vitro* ils inhibent l'activité PGFS de AKR1B1 et de AKR1B3 (kabutu et al., soumis, article en annexe). Une approche par ARN interférants peut également être proposée pour éteindre l'expression de AKR1B3 et en déduire son implication dans la production basale de PGF<sub>2α</sub>.

**PGF<sub>2α</sub> exerce un effet inhibiteur sur les fonctions endocrines de la glande surrénale en réprimant la libération de corticostérone et de catécholamines.**

Comme le récepteur FP n'est pas exprimé par les cellules stéroïdogènes, nous avons recherché quel type cellulaire pouvait être la cible de PGF<sub>2α</sub> au sein de la glande surrénale. Etant donné que les cellules chromaffines exprimaient le récepteur FP, COX1 et AKR1B3 de manière constitutive, nous avons vérifié si elles produisaient PGF<sub>2α</sub> et si elles y répondaient. Nous avons ainsi montré que les cellules chromaffines sécrétaient PGF<sub>2α</sub> dans leur milieu de culture. De plus, nous avons mis en évidence dans ces cellules une répression de la libération des catécholamines par un analogue de PGF<sub>2α</sub> (cloprostenol) en conditions basales ou lors d'une induction par les glucocorticoïdes. Ces résultats suggèrent que PGF<sub>2α</sub> d'origine corticale ou médullaire pourrait avoir un effet inhibiteur sur la production de catécholamines par les cellules chromaffines. Il est maintenant reconnu que les interactions entre les cellules corticales et les cellules chromaffines jouent un rôle important dans les fonctions surrénaliennes (Schinner et Bornstein, 2005). Afin de préserver l'architecture de la glande et les interactions physiques qui existent entre les types cellulaires, nous avons choisi d'utiliser une technique de culture de glandes surrénales de rat en périfusion mise en œuvre par le Laboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire (INSERM U413, Mont St Aignan, France) pour étudier l'effet de PGF<sub>2α</sub> sur la libération de corticostérone. Nous avons ainsi pu montrer que PGF<sub>2α</sub> réprimait la sécrétion de corticostérone



des glandes surrénales isolées de rat. Ces données suggèrent fortement que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exerce son effet répresseur sur la stéroïdogénèse grâce à un circuit paracrine entre le cortex et la *medulla*.

Les catécholamines d'origine medullaire stimulent la libération de glucocorticoïdes par le cortex notamment en exerçant un contrôle positif sur l'expression de gènes impliqués dans le transport du cholestérol (*StAR*) (Haidan et al., 2000) ou la biosynthèse des stéroïdes (*P450<sub>scc</sub>*, *P450<sub>17 $\alpha$</sub>* ) (Ehrhart-Bornstein et al., 1991 ; Haidan et al., 1998). Dans cette étude, nous avons montré que  $\text{PGF}_{2\alpha}$  réprimait la production de catécholamines de cellules chromaffines en culture. Ces différentes données nous permettent de proposer un nouveau circuit de régulation entre les deux compartiments surrénaux qui permet de contrôler la production de corticostérone. En cas de stress, le pic d'ACTH stimule de manière transitoire l'expression de COX2 et de AKR1B7 ce qui permet l'augmentation de la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le cortex.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en se liant au récepteur FP exprimé par les cellules chromaffines réprime alors la libération de catécholamines et de ce fait diminue leur effet positif sur la stéroïdogénèse. En conditions normales, la sécrétion constitutive de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par les cellules chromaffines contrôle de manière autocrine la quantité de catécholamines limitant leur action paracrine sur la stéroïdogénèse.

Lorsque les cellules cortico-surrénales sont privées de l'intégrité du tissu surrénal, elles perdent leur capacité normale de production des glucocorticoïdes et de réponse au stress. Inversement, il est maintenant bien établi que les glucocorticoïdes sont requis pour le maintien des cellules chromaffines et la synthèse des catécholamines (Bornstein et Ehrhart-Bornstein, 2000). Différents modèles de souris transgéniques ont mis en évidence cette interdépendance. En effet, les souris invalidées pour l'enzyme clé de la synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase (TH) présentent une forte altération de la fonction des cellules chromaffines et de leur ultrastructure mais également une forte diminution des taux plasmatiques de corticostérone sans que les taux d'ACTH soient modifiés (Bornstein et al., 2000). Le même type de phénotype a été décrit pour des souris déficientes pour le transporteur de la vitamine C qui est un cofacteur indispensable à la synthèse des catécholamines (Bornstein et al., 2003). A l'inverse, des souris



déficientes pour la 21-hydroxylase qui présentent une faible production des corticoïdes surrénaliens démontrent de sévères dysfonctionnements médullaires (Bornstein et al., 1999). Par notre travail, nous mettons en évidence pour la première fois une boucle de régulation négative entre le cortex et la *medulla* impliquant un facteur paracrine et autocrine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  qui n'avait jusqu'ici jamais été impliqué dans le contrôle de la fonction surrénalienne.

L'importance de cette boucle de régulation dans la physiologie surrénalienne devra être confirmée par l'étude de souris invalidées pour les gènes impliqués dans la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  c'est-à-dire *akr1b7* et *akr1b3* (Aida et al., 2000 ; Ho et al., 2000) ou dans la réponse à ce facteur comme *fp* (Sugimoto et al., 1997) (voir Perspectives).



## **Deuxième partie**

**Création d'outils génétiques nécessaires à l'invalidation conditionnelle de gènes spécifiquement dans le cortex surrénalien ou le canal déférent de souris.**





**ARTICLE 2 : *A Transgenic Mouse Line with Specific Cre Recombinase Expression in the Adrenal Cortex***

Sarah Lambert-Langlais, Pierre Val, Samuel Guyot, Bruno Ragazzon, Isabelle Sahut-Barnola, Angélique De Haze, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, et Antoine Martinez

**Article en cours de préparation**



## A Transgenic Mouse Line with Specific Cre Recombinase Expression in The Adrenal Cortex

Sarah Lambert-Langlais,<sup>1</sup> Pierre Val,<sup>1</sup> Samuel Guyot,<sup>1</sup> Bruno Ragazzon,<sup>2</sup> Isabelle Sahut-Barnola,<sup>1</sup> Angélique De Haze,<sup>1</sup> Anne-Marie Lefrançois-Martinez,<sup>1</sup> and Antoine Martinez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Unité mixte de Recherche 6547, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France.

<sup>2</sup>INSERM U567, Department of Endocrinology, Institut Cochin, 75014 Paris, France

Correspondence to : Dr. A. Martinez, UMR 6547 CNRS-Université Blaise Pascal, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, Complexe universitaire des Cézeaux, 24 avenue des Landais 63177 Aubière Cedex, France. Tel. +33 4 73 40 74 09 ; Fax. +33 4 73 40 70 42 ; E-mail : [antoine.martinez@univ-bpclermont.fr](mailto:antoine.martinez@univ-bpclermont.fr).

Grant sponsors : Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Blaise Pascal, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) N°3815, Ligue contre le Cancer, Région Auvergne/Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA).

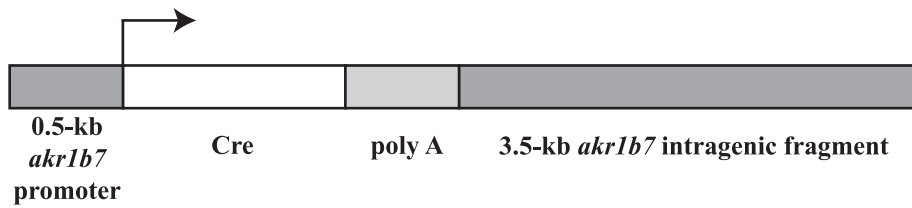
**Summary :** The Cre-loxP system combined with gene targeting strategies has proven to be very useful for gene inactivation in specific tissues and/or cell types. To achieve adrenal cortex specific inactivation of genes *in vivo*, we used a 0.5-kb fragment of the 5'-flanking region of the *akr1b7* gene to drive Cre expression in adrenocortical cells. The resulting 0.5 *akr1b7*-Cre mice express Cre in all zones of adrenal cortex but not in the gonads. In addition, Cre activity was found in localized cells of the kidney and transiently, in the developing brain. This line is the first to show specific Cre expression in the adrenal cortex in the absence of Cre expression in the gonads. This transgene thus provides a valuable tool for specific gene inactivation in the adrenal cortex.

**Key words :** adrenal, Cre, *akr1b7*

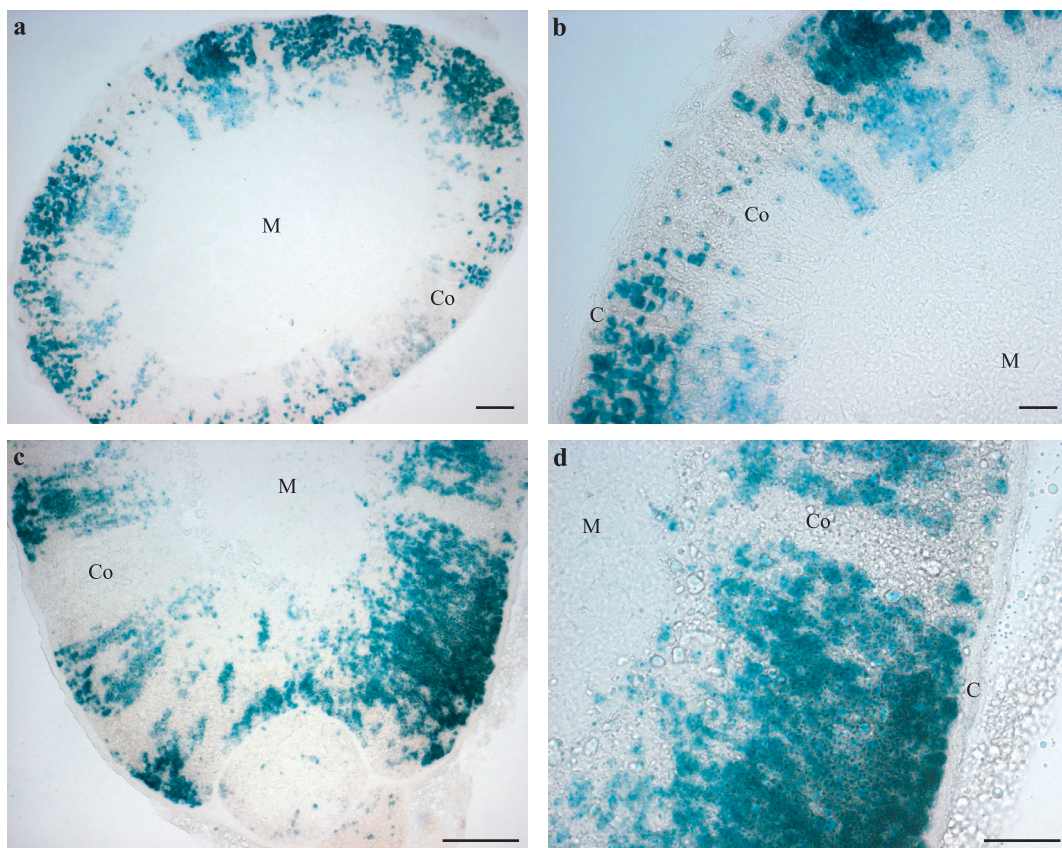
Site specific recombinases such as the Cre-loxP system have revolutionized reverse

genetics in the mammalian organism. Conventional gene inactivation by homologous recombination in embryonic stem (ES) cells has provided invaluable information about gene functions. However, this technique presents different limitations. First, gene targeting in ES cells requires the use of selection markers under the control of a strong promoter. Transcription from this promoter may interfere with the expression of neighbouring genes. Second, the inactivation of a gene can be lethal during early embryonic or postnatal development thus preventing the study of its functions at later stages. Third, if a gene is expressed in multiple tissues, its inactivation may prevent the detailed study of its function in a particular cell lineage. The application of the Cre-loxP strategy in combination with gene targeting techniques has proven to be very useful for gene inactivation in spatially and temporally restricted patterns (Kwan, 2002; Tronche *et al.*, 2002).

In mammals, the gonads and the adrenal cortex are the main steroid producing tissues.



**Fig. 1.** Schematic representation of the 0.5 *akr1b7*-Cre transgene construct. The Cre gene and a polyadenylation signal (poly A) were inserted between a 0.5-kb fragment of 5'-flanking region from mouse *akr1b7* gene and a 3.5-kb intragenic fragment of the *akr1b7* gene.



**Fig. 2.** Cre-mediated recombination in adrenal glands of male (a, b) and female (c, d) adult 0.5 *akr1b7*-Cre/R26R mice. Sections from 8 or 10-weeks-old mice were stained with X-gal as described in Materials and Methods. Images were taken at a 100x magnification (a, c) or 200x (b, d). Scale bars = 100  $\mu$ m. C, capsule, Co, adrenal cortex, M, adrenal *medulla*.

Consistent with their common embryonic origin, many of the genes involved in gonad or adrenal development and steroidogenesis are expressed in both tissues. This has hampered the development of adrenal-specific gene inactivation strategies : different transgenic lines have been established that express the Cre recombinase in the adrenal cortex but also in the gonads. Cre expression in these mice is driven by the promoters of genes expressed in the two tissues (e.g., human *CYP11A1* promoter (Wu *et al.*, 2007), 111-kb of the SF-1 locus (Bingham *et al.*, 2006) or mouse inhibin  $\alpha$  subunit promoter (Jorgez *et al.*, 2006)). To circumvent this problem, we used a 0.5-kb region of the mouse *akr1b7* promoter that was previously shown to contain all the necessary elements required for adrenal cortex specific expression *in vivo* (Martinez *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2003; Ragazzon *et al.*, 2006; Sahut-Barnola *et al.*, 2000).

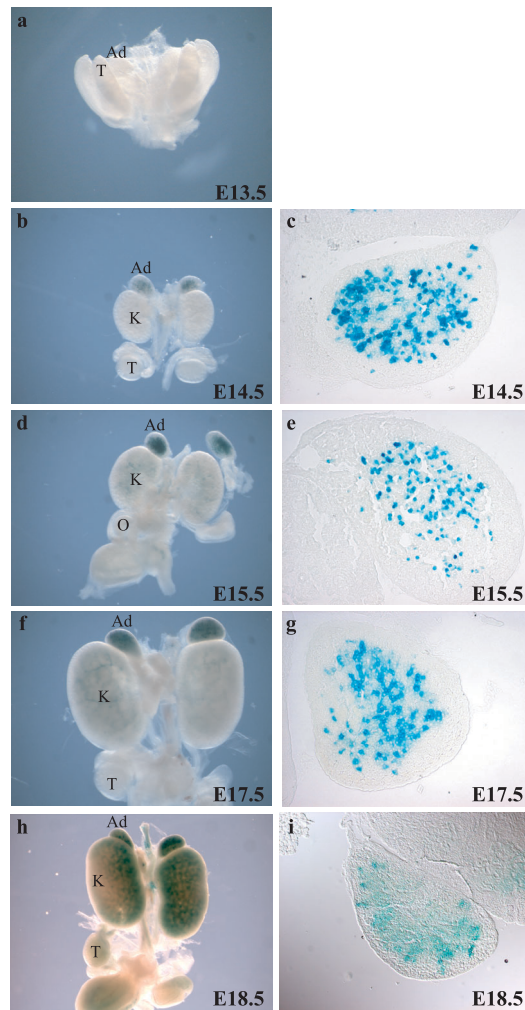
Aldo-keto reductase 1B7 (AKR1B7) is a mouse member of the aldose reductase family (AKR1B). It is highly expressed in the *vas deferens*, in the adrenal cortex where it is involved in the detoxification of harmful aldehydes generated by steroidogenic cytochrome P450 activities (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999) and to a lesser extent in the gonads (Lau *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 2001; Taragnat *et al.*, 1988). Transcription of *akr1b7* is acutely regulated by ACTH in the adrenal cortex (Aigueperse *et al.*, 1999), androgens in the *vas deferens* (Taragnat *et al.*, 1988) and LH in the gonads (Brockstedt *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001). *Akr1b7* expression is also developmentally controlled depending on its expression site. In the adrenal, *akr1b7* expression starts at around embryonic day (E) 13.5, concomitant with the onset of glucocorticoid synthesis and zona fasciculata formation (Sahut-Barnola *et al.*, 2000). In the *vas deferens*, *akr1b7* is expressed postnatally and reaches adult-like levels at puberty, in response to increased circulating androgens (Manin *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 1991). The molecular mechanisms controlling *akr1b7* gene expression in the adrenal cortex

and the *vas deferens* have been dissected *in vivo*. In transgenic mice, a 1.8-kb promoter fragment (-1804/+41) is necessary to recapitulate hormonal and developmental gene regulation in both tissues, while a 0.5-kb promoter (-510/+41) is sufficient to drive adrenal expression (Martinez *et al.*, 1999; Sahut-Barnola *et al.*, 2000). In addition, a 3.5-kb intragenic fragment spanning intron 1 to intron 2 was shown to increase the percentage of expressing mouse lines when included in the transgenic constructs (Martinez *et al.*, 1999).

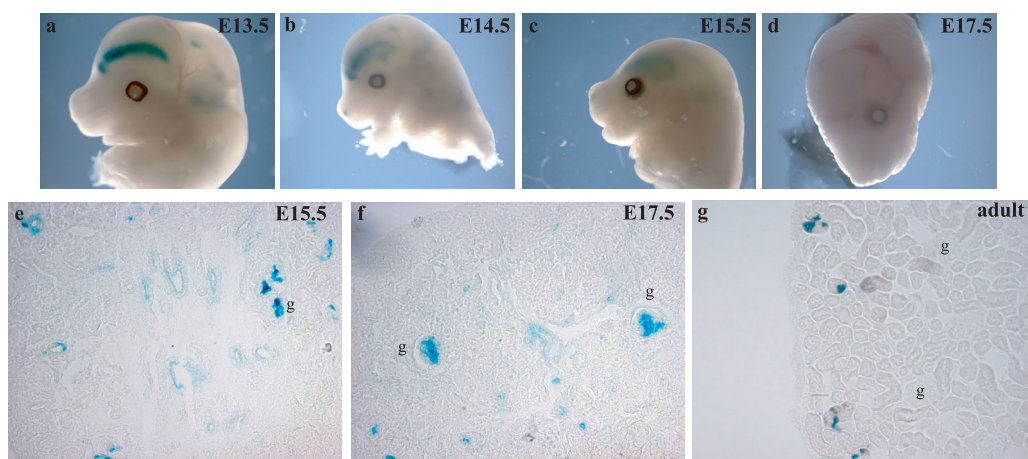
The aim of the present study was to generate a 0.5 *akr1b7*-Cre transgenic mice in which the Cre recombinase expression was under the control of 0.5-kb *akr1b7* promoter to drive transgene expression specifically in the adrenal cortex.

A construct containing the 0.5-kb promoter fragment of *akr1b7*, the Cre coding region and 3' untranslated region, the metallothionein I polyadenylation signal (poly A) and the 3.5-kb intragenic fragment of *akr1b7* was generated. It is referred to as 0.5 *akr1b7*-Cre (Fig. 1). After pronucleus injection of the construct, founder mice were identified by southern-blot analysis. Three independent 0.5 *akr1b7*-Cre transgenic lines were generated. Based on its higher level of Cre expression and consistent expression pattern, we have focused our efforts on the line presented here.

To determine the spatial and temporal expression profile of the Cre transgene, we mated the 0.5 *akr1b7*-Cre transgenic mice with the ROSA26R reporter line (Soriano, 1999). This allows the detection of Cre expression and activity by X-gal staining for  $\beta$ -galactosidase activity. We first assessed Cre-mediated  $\beta$ -galactosidase expression in adult tissues. Consistent with the previously described expression pattern for the 0.5-kb *akr1b7* promoter (Martinez *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2003; Sahut-Barnola *et al.*, 2000), *LacZ* staining was observed in the adrenal cortex (Fig. 2) but was not detected in the gonads or *vas deferens* (data not show). In addition, a few positive cells were



**Fig. 3.** Cre-mediated recombination in embryonic tissues of 0.5 *akr1b7*-Cre/R26R mice. Embryos from 0.5 *akr1b7*-Cre X R26R matings collected at different gestational stages were stained with X-gal. Wholemount adrenals, kidney and gonads stained with X-gal are shown in a, b, d, f and h. Sections of adrenals are shown in c, e, g and i (magnification, 200x). Ad, adrenal, K, kidney, T, testis, O, ovary.



**Fig. 4.** Cre-mediated recombination in embryonic brains (a, b, c, and d), kidneys (e and f) and adult kidneys (g) of 0.5 *akr1b7*-Cre/R26R mice. Embryos from 0.5 *akr1b7*-Cre X R26R matings collected at different gestational stages were stained with X-gal. Wholemount heads stained with X-gal are shown in a, b, c, and d. Sections of kidneys are shown in e and f (magnification, 200x). For adult kidney, sections from 8 or 10-weeks-old mice were stained with X-gal as described in Materials and Methods and are shown in g (magnification, 200x). g, glomerulus.

observed in the cortical area of the kidney (Fig. 4g).

Within the male and female adult adrenal gland, *LacZ* staining was restricted to the cortex and no staining was observed in the chromaffin cells of the medulla or in the capsular fibroblasts (Fig 2). Although *LacZ* staining spanned the three cortical zones, Cre-mediated recombination did not occur in all cortical cells. Such a variegated transgene activity in the adrenal cortex was also reported in the case of *cyp21a1* promoter constructs driving the expression of the *LacZ* reporter gene (Morley *et al.*, 1996).

In order to determine spatial and temporal patterns of Cre expression during development, we examined Cre-mediated  $\beta$ -galactosidase activity by *LacZ* whole-mount staining, at different embryonic time points (Fig. 3). At E13.5, in contrast with endogenous *akr1b7* expression (Sahut-Barnola *et al.*, 2000), no *LacZ* staining was detected in the adrenal primordium (Fig. 3a). A significant signal was first detected in the adrenal at E14.5 (Fig. 3b). This apparent delay may tally with the time required for Cre-mediated recombination of the ROSA26R allele and subsequent expression of  $\beta$ -galactosidase. *LacZ* staining intensified at E15.5 and was observed with similar intensity, at all subsequent stages, (Fig. 3d, f, h). Intriguingly, although *akr1b7* endogenous gene was expressed throughout the cortex during development (data not shown), *LacZ* positive cells were restricted to the innermost regions of the cortex, throughout development (Fig. 3c, e, g et i). This developmental expression pattern was reminiscent of the *LacZ* expression observed in the developing adrenal glands of transgenic mice harbouring a construct of the fetal adrenal enhancer (FadE) of Sf-1 (steroidogenic factor 1), driving *LacZ* expression (Zubair *et al.*, 2006). In this study however, *LacZ* expression remained restricted to the inner adrenal cortex after birth (presumably reflecting the persistence of fetal adrenal cells) and disappeared from male adrenal glands at sexual maturity and from female glands after the first pregnancy.

This suggests that the 0.5-kb *akr1b7* promoter fragment drives gene expression in two distinct cortical cell types: fetal zone cells during embryonic development, followed by definitive zone adrenal cells after birth.

*LacZ* staining was never detected in testes or ovaries throughout development (Fig. 3a, b, d, f et h). In the kidney, a weak *LacZ* staining was initially observed at E14.5 (Fig. 3b). It became stronger at later developmental stages (Fig. 3d, f, h.) and seemed to be localized in collecting ducts and a few maturing glomeruli (Fig. 4e, f). This latter observation is consistent with a recent report showing expression of *akr1b7* transcripts in late maturing glomeruli stages (Takemoto *et al.*, 2006). We also observed a transitory staining in the brain at E13.5, E14.5 and E15.5 (Fig. 4a, b, c). Expression was localized to the telencephalon and disappeared at E17.5 (Fig. 4d). It can be concluded that in addition to the adrenal cortex, the 0.5 *akr1b7*-Cre transgene drives Cre recombinase expression in yet uncharacterized brain cells during embryonic development and in maturing glomureli.

Here, we have characterized the first transgenic mouse line showing specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex but not in the gonads. These transgenic mice constitute a powerful tool for gene inactivation in the adrenal cortex. Although the variegated expression of the transgene in adult adrenal cortex might not be ideal for generating tissue-specific knockouts it will be very useful to create animal models in which tumour suppressor gene inactivation occurs in a subset of adrenocortical cells, mimicking the natural process of tumorigenesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Generation of transgenic 0.5 *akr1b7*-Cre mice

A 2.7-kb *HindIII/XhoI* fragment containing the Cre gene and metallothionein I polyadenylation signal was excised from pBS185 (Sauer and Henderson, 1990) and





was cloned in place of the CAT gene into the 0.5 *akr1b7*-CAT plasmid previously characterised in our lab (Martinez *et al.*, 1999). This construct comprises a 0.5-kb fragment (-510/+44) of the 5'-flanking sequence and a 3.5-kb intragenic segment of the *akr1b7* gene, spanning intron 1 to intron 2 (Fig. 1). After excision with a *HindIII/SacI* digestion, the 7.7-kb transgene fragment was purified and microinjected into pronuclei of fertilized oocytes from B6D2 mice, according to the method of Hogan *et al.* (Hogan *et al.*, 1986). These eggs were then transferred to pseudopregnant females. Transgenic founders termed 0.5 *akr1b7*-Cre, were genotyped by Southern-blot.

### Mouse Genotyping

Mouse genomic DNA was extracted and analyzed by southern-blot and PCR analyses. For southern-blot, tail DNA from the offspring was digested with *EcoRI* and analyzed using a probe that detects a fragment of the CAT gene and the SV40 polyadenylation signal. Genotyping for the 0.5 *akr1b7*-Cre transgene by PCR was carried out using the following conditions : 94°C, 30 s ; 50 °C, 30 s ; 72 °C, 1 min for a total of 35 cycles (primers : 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3' ; 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3').

ROSA26R mice were genotyped by PCR in the same conditions as above (primers : 5'-GACACCAGACCAACTGGTAATGG-3' ; 5'-GCATCGAGCTGGGTAATAAGCG-3').

### LacZ staining

Cre recombinase activity was analyzed by mating 0.5 *akr1b7*-Cre mice with ROSA26R reporter mice (Soriano, 1999). Offsprings carrying both Cre transgene and ROSA26R allele were identified by PCR genotyping. Functional  $\beta$ -galactosidase expression was detected by X-gal staining of whole-mount embryos and of adult tissues cryosections. Briefly, embryos were fixed for 30 min at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) then rinsed three times for 5 min at 4°C in PBT (PBS, Triton X-100 0.1%). They were incubated for

6-8 hours in X-gal staining solution (PBS, 0.02% Nonidet-P40, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 1 mg/mL X-gal) at 37°C. Embryos were rinsed in PBT and fixed in 4% PFA for 30 min at 4°C. For sectioning, embryonic tissues were cryoprotected in sucrose (20% in PBS), embedded in OCT and stored at -80°C. Adult tissues were fixed for 1 h in 4% PFA at 4°C and rinsed three times for 5 min in cold PBS. Tissues were cryoprotected in sucrose overnight at 4°C and embedded in OCT. Sections (10  $\mu$ m) were cut on a Microm cryostat. For adult sections, slides were allowed to dry at room temperature and fixed 10 min in 4% PFA at 4°C and rinsed 3 times for 5 min with cold PBS. Sections were then incubated with X-gal staining solution overnight at 37°C. Embryo and adult sections were rinsed and mounted in PBS-glycerol.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr H el ene Gilgenkrantz (Institut Cochin, Paris, France) for providing ROSA26R mice.

We also thank Christine Puchol and Sandrine Plantade for care of the transgenic mice.

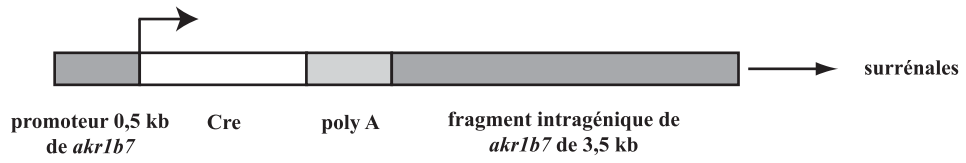
### LITERATURE CITED

- Aigueperse C, Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Veysiere G, Jean CI. 1999. Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldoketo reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J Endocrinol* 160:147-154.
- Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL. 2006. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 44:419-424.
- Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C, Lessl M. 2000. Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 141:2574-2581.
- Hogan B, Constantini F, Lacy E. 1986. *Manipulating the Mouse Embryo.*, first ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jorgez CJ, De Mayo FJ, Matzuk MM. 2006. Inhibin alpha-iCre mice: Cre deleter lines for the gonads, pituitary, and adrenal. *Genesis* 44:183-188.

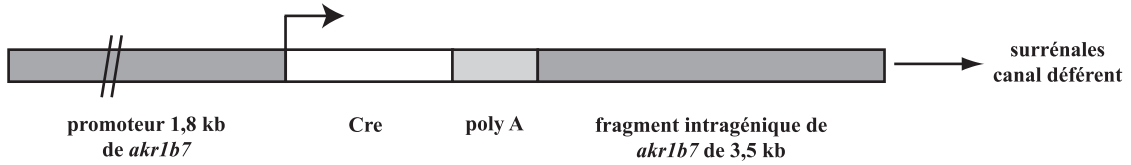


- Kwan KM. 2002. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32:49-62.
- Lau ET, Cao D, Lin C, Chung SK, Chung SS. 1995. Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem J* 312 ( Pt 2):609-615.
- Lefrancois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, Veysiere G, Jean C. 1999. Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 274:32875-32880.
- Manin M, Martinez A, Van Der Schueren B, Reynaert I, Jean C. 2000. Acquisition of androgen-mediated expression of mouse vas deferens protein (MVDP) gene in cultured epithelial cells and in vas deferens during postnatal development. *J Androl* 21:641-650.
- Martinez A, Aigueperse C, Val P, Dussault M, Tournaire C, Berger M, Veysiere G, Jean C, Lefrancois Martinez A. 2001. Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem Biol Interact* 130-132:903-917.
- Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Manin M, Guyot S, Jean-Faucher C, Veysiere G, Kahn A, Jean C. 1999. 5'-flanking and intragenic sequences confer androgenic and developmental regulation of mouse aldose reductase-like gene in vas deferens and adrenal in transgenic mice. *Endocrinology* 140:1338-1348.
- Martinez A, Pailhoux E, Jean C. 1991. Androgen dependence during development of the mouse vas deferens protein mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 76:191-200.
- Martinez A, Val P, Sahut-Barnola I, Aigueperse C, Veysiere G, Lefrancois-Martinez AM. 2003. Steroidogenic factor-1 controls the aldose reductase *akr1b7* gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. *Endocrinology* 144:2111-2120.
- Morley SD, Viard I, Chung BC, Ikeda Y, Parker KL, Mullins JJ. 1996. Variegated expression of a mouse steroid 21-hydroxylase/beta-galactosidase transgene suggests centripetal migration of adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 10:585-598.
- Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, Sahut-Barnola I, Tournaire C, Chambon C, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veysiere G, Martinez A. 2006. Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147:1805-1818.
- Sahut-Barnola I, Lefrancois-Martinez AM, Jean C, Veysiere G, Martinez A. 2000. Adrenal tumorigenesis targeted by the corticotropin-regulated promoter of the aldose reductase *AKR1B7* gene in transgenic mice. *Endocr Res* 26:885-898.
- Sauer B, Henderson N. 1990. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol* 2:441-449.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70-71.
- Takemoto M, He L, Norlin J, Patrakka J, Xiao Z, Petrova T, Bondjers C, Asp J, Wallgard E, Sun Y, Samuelsson T, Mostad P, Lundin S, Miura N, Sado Y, Alitalo K, Quaggin SE, Tryggvason K, Betsholtz C. 2006. Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *Embo J* 25:1160-1174.
- Taragnat C, Berger M, Jean C. 1988. Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. *J Reprod Fertil* 83:835-842.
- Tronche F, Casanova E, Turiault M, Sahly I, Kellendonk C. 2002. When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett* 529:116-121.
- Wu HS, Lin HT, Wang CK, Chiang YF, Chu HP, Hu MC. 2007. Human CYP11A1 promoter drives Cre recombinase expression in the brain in addition to adrenals and gonads. *Genesis* 45:59-65.
- Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. 2006. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol* 26:4111-4121.

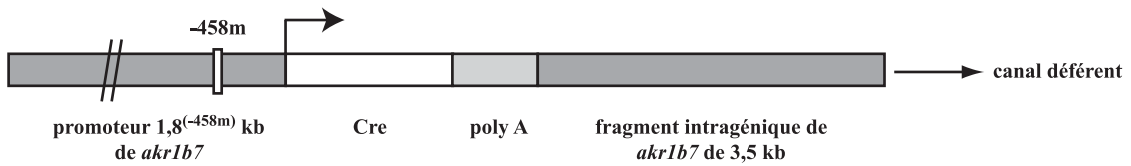
**0.5 *akr1b7*-Cre**



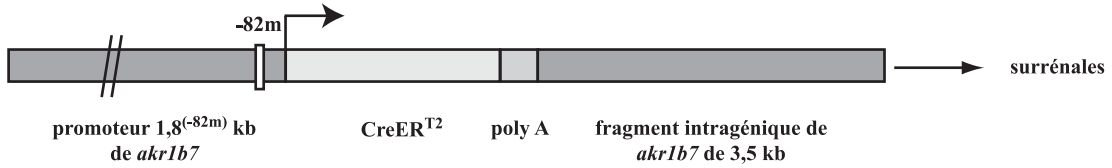
**1.8 *akr1b7*-Cre**



**1.8(-458m) *akr1b7*-Cre**



**1.8(-82m) *akr1b7*-Cre**



**Figure 29 : Constructions utilisées en transgénèse pour l'expression de la recombinaise Cre ou CreERT<sup>2</sup> dans les glandes surrénales et/ou le canal déférent.**

## Deuxième bilan

### **Création d'outils génétiques nécessaires à l'invalidation conditionnelle de gènes spécifiquement dans le cortex surrénalien ou le canal déférent de souris.**

L'invalidation de *akr1b7* restreinte au cortex surrénalien ou au canal déférent nécessite la création de deux outils : 1/ « floxer » le locus *akr1b7* et 2/ créer les souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre constitutive ou inductible par le Tamoxifen (Cre-ER<sup>T2</sup>), sous le contrôle de promoteurs spécifiquement actifs dans l'un ou l'autre de ces organes. En effet, jusqu'ici aucune lignée de souris Cre de ce type n'était disponible. Les souris exprimant l'allèle conditionnel *akr1b7*<sup>lox/lox</sup> ont été réalisées au laboratoire grâce au concours de la plate-forme de recombinaison homologue de l'Institut Cochin. Pour la deuxième partie, nous avons construit un ensemble de transgènes exprimant la recombinaise sous le contrôle des régions promotrices du gène *akr1b7* préalablement validées dans l'équipe. En effet, deux constructions promotrices permettent un ciblage de l'expression du transgène dans le cortex surrénalien : la région -510/+41 (Martinez et al., 1999 ; Sahut-Barnola et al., 2000) ou la région -1804/+41 mutée en -82 (site essentiel pour la régulation androgénique dans le canal déférent) (données non publiés). Le ciblage restreint au canal déférent est quant à lui possible grâce au promoteur -1804/+41 muté en -458 (site essentiel pour l'expression surrénalienne) (Val et al., 2004). Nous avons également utilisé le promoteur -1804/+41 non modifié car il comporte tous les éléments nécessaires à une expression régulée par les hormones et au cours du développement dans les deux organes (Martinez et al., 1999). De plus, un fragment intragénique de 3,5 kb a été inclus dans les constructions transgéniques car il permet d'augmenter le pourcentage de lignées exprimant le transgène (Martinez et al., 1999). Ces différentes constructions sont récapitulées dans la figure 29.

Après analyses par southern-blot, plusieurs fondateurs (F0) ont été identifiés pour chacune des constructions. Afin de sélectionner les lignées de souris transgéniques présentant le

Constructions	Nombre de fondateurs	Identifiant des fondateurs	établissement de lignées	profil d'expression
0.5 <i>akr1b7</i> -Cre	6	11	non	/
		14	oui	expression aléatoire
		19	oui	pas d'expression
		22	oui	expression aléatoire
		26	oui	surrénales
		29	oui	pas d'expression
1.8 <sup>(-82m)</sup> <i>akr1b7</i> -Cre	9	1	non	/
		4	non	/
		6	oui	pas d'expression
		15	oui	surrénales
		18	oui	surrénales
		20	non	/
		21	non	/
		37	oui	pas d'expression
39	oui	pas d'expression		
1.8 <sup>(-458m)</sup> <i>akr1b7</i> -Cre	3	6	oui	canal déférent, surrénales
		14	oui	expression faible
		21	oui	canal déférent
1.8 <i>akr1b7</i> -Cre	9	3	oui	pas d'expression
		9	non	/
		12	oui	pas d'expression
		15	non	/
		17	oui	canal déférent
		18	oui	pas d'expression
		20	oui	expression ubiquiste
		22	oui	canal déférent, surrénales
23	non	/		

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes lignées transgéniques Cre obtenues.** Les profils d'expression de la recombinaise Cre déterminés par RT-PCR et/ou croisement avec la lignée rapporteur ROSA26R sont résumés dans la dernière colonne. Les lignées présentant des profils d'expression intéressants sont surlignées en gris.

meilleur profil d'expression de la recombinaise (expression élevée et restreinte aux organes d'intérêt), une première analyse par RT-PCR semi quantitative a été réalisée sur les organes de souris mâles ayant reçu ou non de l'ACTH (1,2 U i.m.) 16 heures avant leur sacrifice. Trois lignées 0.5 *akr1b7*-Cre et deux lignées 1.8<sup>(-82m)</sup> *akr1b7*-Cre-ER<sup>T2</sup> ont été conservées car elles présentaient une expression forte de la recombinaise dans la surrénale qui de plus était stimulée par l'ACTH. De plus, une lignée 1.8<sup>(-458m)</sup> *akr1b7*-Cre et une lignée 1.8 *akr1b7*-Cre présentant un profil d'expression restreint au canal déférent ont été sélectionnés ainsi qu'une lignée 1.8 *akr1b7*-Cre démontrant une forte expression surrénalienne (Tableau 5).

Pour démontrer la capacité de ces lignées à produire une Cre fonctionnelle dans les tissus, nous avons réalisé leur croisement avec la lignée rapporteur ROSA26R (Soriano, 1999). Ces souris possèdent dans le locus ROSA26 d'expression ubiquiste un gène *LacZ* précédé d'un stop de transcription flanqué par des sites LoxP. La révélation d'une activité  $\beta$ -galactosidase chez les descendants démontre la capacité de Cre à réaliser la recombinaison des sites LoxP au locus *ROSA26*. A ce jour, seules les 3 lignées 0.5 *akr1b7*-Cre ont été analysées de manière poussée. Les lignées 14 et 22 présentaient des profils d'expression du transgène qui ne permettaient pas leur utilisation pour l'inactivation de gènes. En effet, dans ces deux lignées, la pénétrance de l'expression du transgène dans les glandes surrénales était limitée. De plus, elles présentaient des expressions ectopiques de la recombinaise Cre qui différaient d'un individu à l'autre sans être reliées au génotype. Nous avons donc éliminé ces deux lignées de la suite des études. Seule la lignée 26 décrite dans l'article 2 possédait une expression spécifique et suffisamment forte de la recombinaise Cre.

### **Obtention d'une lignée de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre dans le cortex surrénalien (article 2).**

Grâce à l'utilisation du promoteur de 0.5 kb, nous avons obtenu une lignée de souris transgénique exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans le cortex surrénalien (article 2).





Chez l'adulte, au sein de la surrénale, la recombinaison a lieu uniquement dans les cellules corticales et aucun marquage  $\beta$ -galactosidase n'est détecté dans la *medulla* ou la capsule. Bien que le marquage s'étende dans les deux zones corticales (zones réticulo-fasciculée et glomérulée), la recombinaison ne touche pas toutes les cellules. Aucune recombinaison n'a été mise en évidence dans les ovaires, les testicules et le canal déférent. Seul un marquage très ponctuel a été détecté dans le cortex rénal. Au cours du développement, la recombinaison est détectable à partir de 14,5 jours de vie embryonnaire (E) dans la partie interne du cortex surrénalien. Ce profil d'expression, conservé tout au long du développement, diffère de celui du gène *akr1b7* endogène. En effet, son expression est détectable dans la zone interne de la glande surrénale en hybridation *in situ* à E13.5 mais dès E14.5, son expression est localisée dans tout le cortex (Sahut-Barnola et al., 2000).

Le profil d'expression embryonnaire de notre transgène rappelle celui observé chez des souris transgéniques exprimant le gène *LacZ* sous le contrôle de l'« enhancer » fétal surrénalien du facteur SF-1 (FadE) (Zubair et al., 2006). Toutefois, dans ce modèle, l'expression de *LacZ* reste dans la partie interne du cortex après la naissance et disparaît lors de la maturité sexuelle chez le mâle et lors de la première gestation chez la femelle. Cette étude démontre pour la première fois qu'il existe chez la souris un cortex fétal similaire à celui décrit chez l'homme qui est maintenu après la naissance où il correspond à la zone X. Etant donné que notre transgène s'exprime dans tout le cortex chez les adultes, nous pouvons supposer que le promoteur 0.5-kb de *akr1b7* conduit l'expression de Cre dans deux types cellulaires corticaux distincts : des cellules de la zone fétale au cours du développement embryonnaire et des cellules de la zone définitive après la naissance.

Pour confirmer cette hypothèse, nous allons suivre l'expression du transgène tout au long des stades périnataux et au cours de la disparition de la zone X. Pour réaliser ces expériences de lignage cellulaire, nous réaliserons par immunohistochimie la co-localisation de la  $\beta$ -



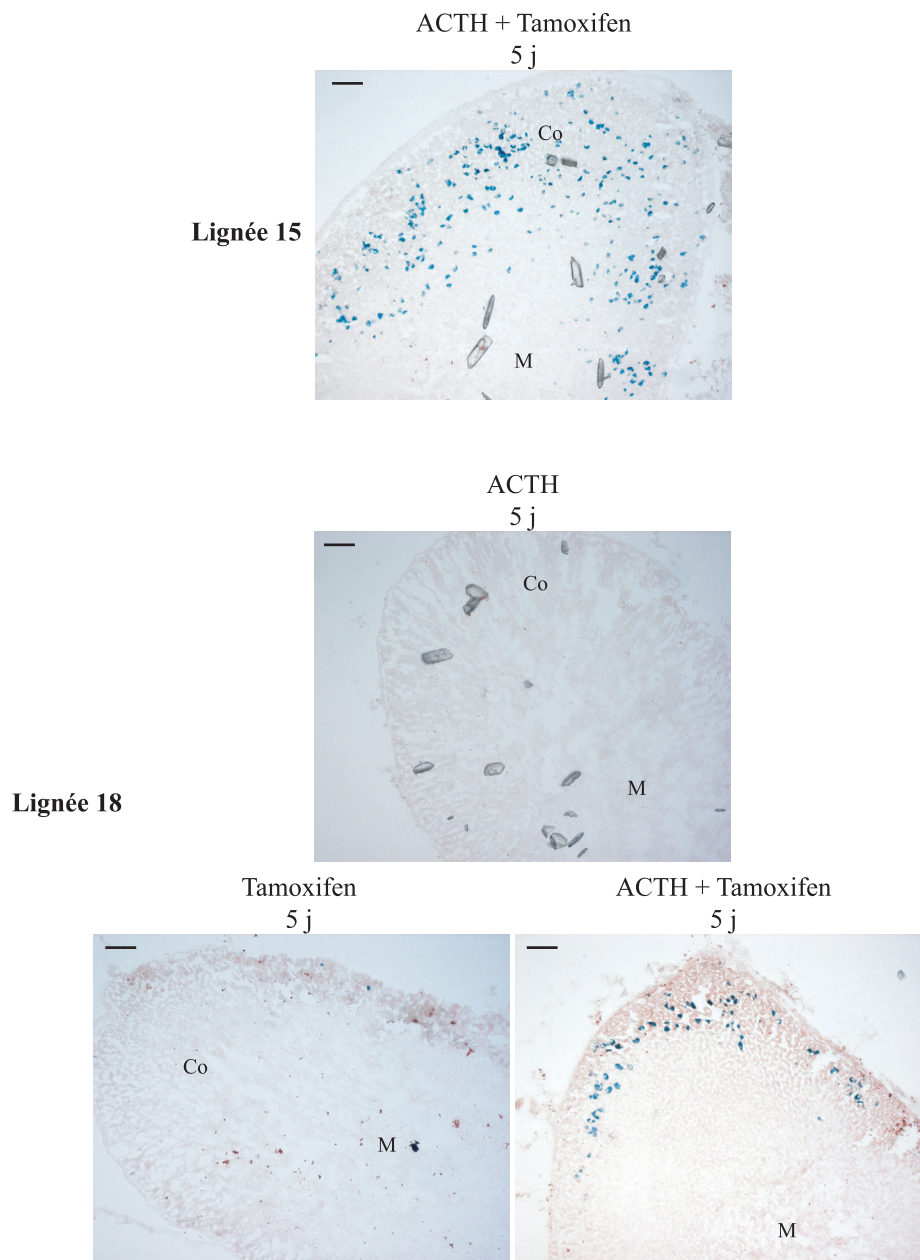
galactosidase avec des marqueurs spécifiques soit de la zone X comme la 20 $\alpha$ -HSD (Hershkovitz et al., 2007) soit de la zone définitive comme la 3 $\beta$ -HSD.

Nous avons créé la première lignée de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre dans le cortex surrénalien sans expression additionnelle dans les gonades. La variabilité de l'expression dans le cortex limitera son utilisation pour réaliser des invalidations géniques complètes dans ce tissu. Toutefois, comme nous le détaillerons dans la partie Perspectives, elles présentent des caractéristiques très intéressantes pour la création de modèles animaux utiles à l'étude des phénomènes de tumorigenèse surrénalienne.

### **Résultats complémentaires**

L'invalidation précoce d'un gène peut entraîner la mort de l'embryon lorsque sa fonction est indispensable au développement ou une réponse adaptative (compensation par un autre gène) entraînant l'absence de phénotype observable chez l'adulte. Pour prévenir ce problème, nous avons donc créé les souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre-ER<sup>T2</sup> inducible par le tamoxifène dans le cortex surrénalien. Dans cette approche, l'activité Cre est régulée au niveau post-transcriptionnel. La fusion de la recombinaise Cre avec le domaine de liaison du ligand (LBD) muté du récepteur des oestrogènes fournit une recombinaise inducible par le tamoxifène (modulateur sélectif du récepteur des oestrogènes) mais pas par l'oestradiol (Feil et al., 1997). En absence de tamoxifène, la protéine chimérique est produite lorsque le transgène est actif mais son activité enzymatique est masquée par les protéines chaperonnes liées au LBD. Lors de l'ajout du ligand, les protéines chaperonnes se dissocient et Cre-ER<sup>T2</sup> est transloquée dans le noyau où elle catalyse la recombinaison des sites LoxP. Ce système devrait nous permettre de réaliser l'invalidation ciblée de gène dans le cortex surrénalien à n'importe quel moment de la vie de l'animal (*in utero*, post-natal, adulte).

Quelques études préliminaires ont été réalisées sur les lignées exprimant la recombinaise Cre-ER<sup>T2</sup> sous le contrôle du promoteur de 1.8 kb muté en -82. L'analyse de l'expression de la



**Figure 30 : Analyse de l'expression de la recombinase Cre-ER<sup>T2</sup> dans les glandes surrénales des souris 1.8<sup>(-82m)</sup> *akr1b7*-CreER<sup>T2</sup>/R26R révélée par un marquage  $\beta$ -galactosidase.** Les souris ont été traitées pendant 5 jours avec 3 mg de tamoxifen/jour (ip) pour démasquer l'activité enzymatique de la Cre-ER<sup>T2</sup> (sauf ACTH 5 j). Certaines d'entre elles ont également reçu de l'ACTH (1,2 UI/jour) pendant 5 jours pour stimuler l'expression du transgène. Les souris ont ensuite été laissées au repos pendant 7 jours avant leur sacrifice. Le marquage  $\beta$ -galactosidase a été réalisé comme décrit dans la partie matériels et méthodes de l'article 2. La barre d'échelle représente 100  $\mu$ m. Les photos ont été prises à un grossissement x100. Co, cortex, M, *medulla*.

recombinase dans ces lignées nécessite le traitement des animaux  $1.8^{(-82m)}$  *akr1b7-Cre-ER<sup>T2</sup>/ROSA26R* par le tamoxifen. Nous avons donc traité les souris en i.p. avec 3 mg de tamoxifen pendant 5 jours. Puis les souris ont été laissées au repos pendant sept jours avant d'être sacrifiées. De plus, certaines d'entre elles ont reçu en parallèle un traitement par l'ACTH pour stimuler l'expression du transgène. L'analyse de la recombinaison par marquage  $\beta$ -galactosidase a mis en évidence la présence de quelques cellules marquées dans le cortex surrénalien des souris traitées par le tamoxifen et l'ACTH (figure 30). Chez les souris qui n'ont reçu que du tamoxifen, nous ne retrouvons que deux ou trois cellules marquées. Les souris qui n'ont pas été traitées avec le tamoxifen ne présentent pas de marquage  $\beta$ -galactosidase. Ces résultats préliminaires indiquent que le transgène conduit bien l'expression de la recombinaison dans le cortex surrénalien, que son expression est stimulée par l'ACTH et qu'en conditions non traitées la recombinaison *CreER<sup>T2</sup>* est inactive. Toutefois, le faible nombre de cellules touchées nous incite à optimiser les conditions de traitement des souris et à étudier l'expression de la recombinaison au cours du développement en traitant les femelles gestantes avec le tamoxifen. De plus, pour l'instant, nous n'avons pas du tout étudié l'expression de la recombinaison dans le reste de l'organisme ce qui nous interdit de conclure que cette lignée présente une expression spécifiquement dans le cortex surrénalien.

Dans les prochains mois, il sera nécessaire de continuer la validation des lignées  $1.8^{(-82m)}$  *akr1b7-Cre-ER<sup>T2</sup>*,  $1.8$  *akr1b7-Cre* et  $1.8^{(-458m)}$  *akr1b7-Cre* par croisement avec la lignée *ROSA26R*. Certaines d'entre elles permettront peut-être de réaliser l'inactivation de *akr1b7* spécifiquement dans le cortex surrénalien ou le canal déférent.



# **PERSPECTIVES**



PGH <sub>2</sub>	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/min/mg)
AKR1B1	2 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>
AKR1B3	9 <sup>a</sup>	53 <sup>a</sup>
AKR1B7	4 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>
AKR1B5	7 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>
AKR1C3	18 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
AKR1C7	10 <sup>c</sup>	2-10 <sup>b</sup>
AKR1C11	25 <sup>d</sup>	2-10 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kabututu et al., soumis

<sup>b</sup> Madore et al., 2003

<sup>c</sup> Watanabe et al., 1985

<sup>d</sup> Suzuki et al., 1999

**Tableau 6 : Paramètres cinétiques de l'activité prostaglandine F synthase catalysée par les différents membres de la superfamille des AKR.**

## I. Activité PGF<sub>2α</sub> synthase des AKR1B : détermination du mécanisme catalytique

Grâce à notre collaboration avec l'équipe du Pr URADE de l'Osaka Bioscience Institute (Japon), nous avons montré que certains membres de la sous-famille AKR1B exprimés chez l'homme (AKR1B1) ou la souris (AKR1B3, AKR1B7) possédaient *in vitro* une bonne activité PGFS alors que d'autres n'étaient pas capables de catalyser la réduction de PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub> (AKR1B8, AKR1B10) (article en annexe). D'autre part, Madore et ses collaborateurs ont démontré en 2003 que l'AR bovine AKR1B5 possédaient également cette activité catalytique et qu'elle constituait la PGFS fonctionnel de l'endomètre bovin (Madore et al., 2003). Comme l'indiquent les différents paramètres cinétiques récapitulés dans le tableau 6, ces quatre protéines présentent une activité PGFS plus forte que celle de la PGFS humaine (AKR1C3) ou des PGFS bovines (AKR1C7 et AKR1C11). Le fait que AKR1B1, -3, -5 et -7 possèdent des propriétés enzymatiques similaires suggère qu'elles pourraient partager des mécanismes catalytiques communs pour la réduction de PGH<sub>2</sub>. De plus, il est pour l'instant difficile d'expliquer pourquoi AKR1B8 et AKR1B10 qui possèdent de 70 à 80% d'identité de séquence en acides aminés avec ces quatre autres membres de la sous-famille sont dépourvues de cette activité enzymatique. La détermination de la structure de différents membres des AKR par cristallographie combinée à des études par mutagenèse dirigée ont permis d'identifier 4 résidus d'acides aminés hautement conservés dans le site actif des AKR : Asp<sup>43</sup>, Tyr<sup>48</sup>, Lys<sup>77</sup> et His<sup>110</sup> (Jez et al., 1997). Comme nous l'avons déjà évoqué dans les chapitres I-B et II-B, cette tétrade catalytique est retrouvée chez toutes les PGFS décrites qu'elles appartiennent aux sous-familles AKR1B, -1C ou -5A. Toutefois, des mécanismes catalytiques différents ont été proposés pour la réduction de PGH<sub>2</sub> par AKR1C3 et AKR5A2. Dans le cas de la PGFS humaine, les auteurs ont suggéré un modèle où le transfert de l'hydrogène du NADPH vers le groupement endopéroxyde de PGH<sub>2</sub> se ferait directement sans l'intervention de résidus d'acides aminés (voir chapitre II-B-4) (Komoto et al.,



2006) tandis que pour la PGFS du Trypanosome le résidu His<sup>110</sup> constituerait le catalyseur acide général indispensable à la catalyse (voir chapitre II-B-6) (Kilunga et al., 2005). De plus, lorsqu'on examine en détail l'alignement des séquences protéiques des AKR1B possédant ou non l'activité PGFS, quelques différences intéressantes apparaissent dans la boucle A au niveau de résidus impliqués dans la poche de spécificité décrite avec certains inhibiteurs (voir chapitre I-B-2) (Urzhumtsev et al., 1997). La plus intéressante concerne le résidu Val<sup>130</sup> qui est présent chez les quatre protéines possédant l'activité PGFS alors qu'il est substitué par un résidu Ile chez AKR1B8 et Ala chez AKR1B10. Afin de déterminer le mode de liaison de PGH<sub>2</sub> dans le site actif de ces enzymes, la détermination de la structure tridimensionnelle de différentes AKR1B co-cristallisées avec le NADPH et un analogue structural de PGF<sub>2α</sub> comme le bimatoprost peut être envisagée. De plus, la substitution par mutagenèse dirigée de résidus clés comme la Val<sup>130</sup> ou les résidus de la tétrade catalytique pourrait nous permettre de déterminer quels acides aminés sont responsables de la spécificité de substrat observée entre les AKR1B et quels résidus sont indispensables à la catalyse. L'ensemble de ces études permettra de proposer un nouveau mécanisme catalytique pour la synthèse de PGF<sub>2α</sub> à partir de PGH<sub>2</sub>.

## **II. Fonctions physiologiques des AKR1B : nouveaux apports de l'activité PGFS.**

### **A. Rôles des AKR1B dans la fonction surrénalienne et la réponse au stress**

Chez les mammifères, la réponse au stress fait intervenir l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HHS) et la médullo-surrénale qui appartient au système nerveux sympathique. L'activation de l'axe HHS par un stress entraîne la libération de CRF (Corticotropin-releasing factor) et de vasopressine par l'hypothalamus qui sont les régulateurs principaux de la libération d'ACTH par l'adénohypophyse. Les glucocorticoïdes



corticostéroïdes dont la production est stimulée par l'ACTH sont les effecteurs finaux de cet axe endocrinien. La *medulla* surrénalienne élabore l'adrénaline et la noradrénaline dont la libération est stimulée par les terminaisons nerveuses sympathiques lors d'un stress. Pendant très longtemps, le cortex et la *medulla* ont été considérés comme deux unités fonctionnelles distinctes toutefois depuis une vingtaine d'années, il devient clair que la fonction surrénalienne est également régulée par des mécanismes paracrines et autocrines impliquant ces deux compartiments mais également le tissu adipeux environnant (Bornstein et Ehrhart-Bornstein, 2000). De très nombreuses molécules ont été impliquées dans ces régulations comme des hormones, des neurotransmetteurs, des neuropeptides ou des cytokines (Ehrhart-Bornstein et al., 1998 ; Delarue et al., 2001). A notre connaissance, notre travail est le premier à impliquer une prostaglandine dans une régulation paracrine au sein de la glande surrénale. Nous avons proposé que lors d'un stress, l'ACTH stimulerait la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par COX2 et AKR1B7 dans le cortex.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par l'intermédiaire de son récepteur FP réprimerait alors la libération de catécholamines par les cellules chromaffines et de ce fait diminuerait leur effet positif sur la libération des glucocorticoïdes. Le modèle que nous proposons permettrait de freiner la production de corticostérone ou tout du moins d'éviter que la réponse au stress ne soit trop amplifiée. De plus, il semble que la *medulla* surrénalienne puisse elle-même produire  $\text{PGF}_{2\alpha}$  puisque les cellules chromaffines expriment COX1 et AKR1B3. En conditions basales, cette sécrétion constitutive pourrait contrôler de manière autocrine la quantité de catécholamines limitant leur action sur la stéroïdogenèse.

Pour démontrer l'importance physiologique de cette boucle de régulation dans le fonctionnement basal de la glande surrénale et/ou dans sa fonction de réponse au stress, nous proposons d'étudier le phénotype de souris invalidées pour les gènes impliqués dans la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  comme *akr1b3* et *akr1b7* ou dans la réponse à ce facteur comme *fp*.

Ces différents modèles de souris sont déjà disponibles puisque les souris *akr1b3*<sup>-/-</sup> et *fp*<sup>-/-</sup> ont déjà été générées pour étudier respectivement le rôle de l'AR dans l'osmorégulation (Aida et



al., 2000 ; Ho et al., 2000) et la fonction de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la lutéolyse (Sugimoto et al., 1997). D'autre part, depuis moins d'un an, les souris invalidées pour *akr1b7* dans la totalité de l'organisme (*akr1b7<sup>-/-</sup>*) sont disponibles au laboratoire. Dans un premier temps, les études porteront sur les souris invalidées pour *akr1b7* qui sont déjà à notre disposition. AKR1B7 semble être une enzyme multifonctionnelle notamment dans le cortex surrénalien grâce à ses deux activités enzymatiques : isocaproaldéhyde réductase (Lefrancois-Martinez et al., 1999) et PGFS (article en annexe). Nous supposons que par sa faible affinité pour l'isocaproaldéhyde ( $K_m = 320 \mu\text{M}$ ) et son expression fortement stimulée par la voie AMPc/ACTH, elle pourrait participer à la détoxification de ce produit secondaire de la stéroïdogénèse toxique pour les cellules sans être saturée lors d'une stimulation chronique de l'axe HHS. Par contre, lors d'une stimulation aiguë par l'ACTH entraînant transitoirement la synthèse de  $\text{PGH}_2$  par COX2, sa forte affinité pour ce substrat ( $K_m = 4 \mu\text{M}$ ) lui permettrait de catalyser la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de limiter ainsi la libération des glucocorticoïdes.

Cette double fonctionnalité pourra être étudiée en faisant subir différents types de stress à des souris sauvages et des souris *akr1b7<sup>-/-</sup>*. L'analyse des phénotypes portera sur le dosage des taux de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au sein du tissu surrénalien, la réponse au stress et si des phénotypes importants se déclenchent, l'analyse histologique des glandes surrénales. La réponse au stress pourra être évaluée par différents dosages : 1) la quantification de la corticostérone et de l'ACTH plasmatiques en ce qui concerne la réponse du cortex et 2) le dosage des catécholamines plasmatiques et du contenu surrénalien en catécholamines pour la réponse de la *medulla*.

En conditions basales, COX2 n'étant pas exprimé dans les cellules stéroïdogènes, il est peu probable que nous observions une modification des taux de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en l'absence de AKR1B7. De plus, son affinité pour l'isocaproaldéhyde étant faible, AKR1B7 est probablement peu impliquée dans la réduction de l'isocaproaldéhyde généré par la stéroïdogénèse basale. Il sera donc certainement difficile d'observer des différences significatives de la quantité de corticostérone en conditions basales. Par contre, lors d'un stress aigu comme l'injection d'ACTH





ou la contention des animaux, nous nous attendons à observer une diminution de la quantité de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  intra-surrénalienne chez les souris invalidées. Cette diminution devrait lever la répression sur la libération de catécholamines par les cellules chromaffines. Par leur action paracrine sur les cellules corticales, les catécholamines devraient augmenter la libération de corticostérone chez les souris *akr1b7<sup>-/-</sup>*. Si AKR1B7 est effectivement impliquée dans la protection du cortex contre les effets toxiques de l'isocaproaldéhyde, un stress chronique devrait entraîner une altération des fonctions endocrines corticales due à l'accumulation de ce composé toxique. En fonction de l'importance de AKR1B7 dans cette fonction, une altération ultrastructurale des cellules voire une destruction du tissu cortical peut être envisagée.

Comme AKR1B7 et AKR1B3 possèdent des activités enzymatiques très proches, une compensation de la perte de AKR1B7 par AKR1B3 n'est pas à exclure. La double invalidation de *akr1b7* et *akr1b3* n'est pas envisageable car les deux gènes sont situés sur le même locus (Ho et al., 1999). Toutefois, si ce problème se pose et qu'aucun phénotype surrénalien n'est détecté, nous pourrions traiter les souris *akr1b7<sup>-/-</sup>* avec des inhibiteurs de l'AR comme le sorbinil et le tolrestat puisque les travaux de Kabututu et al. (annexe) ont démontré que l'activité PGFS de AKR1B3 était sensible à ces inhibiteurs.

D'autre part, pour démontrer le rôle de AKR1B3 dans une synthèse basale de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , nous pourrions réaliser le même type d'étude sur les souris *akr1b3<sup>-/-</sup>*. Si AKR1B3 est responsable d'une production basale de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la glande surrénale, son dosage dans le tissu surrénalien devrait révéler des quantités plus faibles chez les animaux n'exprimant plus *akr1b3* par rapport aux souris sauvages corrélées à une augmentation des taux de catécholamines et de corticostérone plasmatiques.

Pour définitivement prouver l'implication de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans la régulation de la fonction surrénalienne, les souris *fp<sup>-/-</sup>* constitueront également un outil important. En effet, l'apparition d'un phénotype surrénalien chez ces souris lors d'un stress sera directement imputable à  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . En comparant les résultats obtenus avec cette lignée et ceux obtenus avec les souris *akr1b7<sup>-/-</sup>*, il



sera possible de déterminer quelles parts du phénotype est imputable à chacune des activités enzymatiques de AKR1B7.

## **B. Rôle des AKR1B dans l'adipogenèse**

L'équipe de M. Bégeot et D. Naville avec qui nous collaborons a récemment démontré que AKR1B7 comme cela était connu pour COX2 était un marqueur des préadipocytes dont l'expression était réprimée lors de la différenciation adipocytaire (Tirard et al., 2007). De plus, l'expression d'AKR1B7 est spécifique de la localisation du tissu adipeux (péri-surrénalien et péri-épididymaire proximal). Grâce à des études de surexpression et d'extinction de l'expression d'AKR1B7 dans la lignée adipocytaire 3T3-L1, ils ont également pu démontrer son rôle anti-adipogénique. Comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe III-E,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhibe l'adipogenèse dans différentes lignées de cellules adipocytaires (Serrero et al., 1992a ; Serrero et al., 1992b ; Casimir et al., 1996). Nos données obtenues *in vitro* et dans les cellules surrénales ajoutées à ces travaux nous permettent de supposer que AKR1B7 et AKR1B1 grâce à leur activité PGFS exerceraient un effet anti-différenciateur sur le tissu adipeux blanc. Deux mécanismes pourraient être impliqués dans cet effet : 1) une régulation autocrine exercée par  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthétisée par les préadipocytes grâce à l'expression de COX2 et AKR1B7, 2) une boucle de régulation paracrine entre le tissu adipeux péri-surrénalien et la glande surrénale. En effet, le tissu adipeux péri-surrénalien qui présente une très forte accumulation de AKR1B7 pourrait être une source de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  qui réprimerait de manière paracrine la libération des glucocorticoïdes limitant ainsi leur effet adipogénique.

Afin de vérifier ces hypothèses, différentes approches *in vivo* vont être mises en oeuvre. Une première approche « gain de fonction » est envisagée avec la création de souris transgéniques où les ADNc codant pour *akr1b7* et *AKR1B1* seront exprimés de manière ectopique dans les adipocytes matures grâce au promoteur du gène codant l'adipose protein 2 (AP2) (Ross et al., 1990). Une production accrue de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le tissu adipeux blanc de ces



souris devrait être observée entraînant chez ses animaux une réduction de la masse grasse ou une résistance à l'obésité induite par un régime riche en lipides.

D'autre part, l'analyse des souris *akr1b7<sup>-/-</sup>* va permettre d'étudier l'impact de la perte de AKR1B7 sur la formation et la physiologie du tissu adipeux. Nous devrions mettre en évidence une diminution des quantités de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le tissu adipeux. La perte de AKR1B7 pourra alors se traduire soit par une prise de poids plus importante que chez les souris sauvages ou une sensibilité accrue à l'obésité induite.

### C. Rôle des AKR1B dans la fonction de reproduction

La mise en évidence de l'activité PGFS portée par certains membres de la famille AKR1B suggère de nouvelles fonctions pour ces protéines notamment dans la physiologie de la reproduction. Leur présence ne semble pas indispensable à la reproduction puisque les souris *akr1b3<sup>-/-</sup>* ne présentent pas de problème de fertilité (Aida et al., 2000 ; Ho et al., 2000) et une étude récente portant sur l'impact de l'inactivation de *akr1b7* sur la reproduction mâle et femelle n'a pas détecté de défauts de la maturation folliculaire ou du spermogramme (Baumann et al., 2007). Toutefois, des phénotypes plus subtils pourront être recherchés. De plus, AKR1B3 et AKR1B7 étant toutes les deux capables de synthétiser  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , l'absence de phénotype chez les souris *akr1b7<sup>-/-</sup>* provient peut-être d'un phénomène de compensation de la perte de AKR1B7 par AKR1B3. Le traitement de ces souris avec les inhibiteurs de l'AR (Sorbinil et Tolrestat) permettra de s'affranchir de ce type de phénomène.

Chez le mâle,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a été récemment impliquée dans la contractilité spontanée de l'épididyme de bœuf. (chapitre III-F-1, (Mewe et al., 2006)). Or, une expression de l'AR a été rapportée dans l'épithélium épидидymaire du rat (AKR1B4) (Kobayashi et al., 2002), du bœuf (AKR1B5) (Frenette et al., 2003 ; Frenette et al., 2004) et de l'homme (AKR1B1) (Frenette et al., 2006). Pour vérifier si ces différentes AKR1B sont impliquées dans cette fonction, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs de l'AR comme le sorbinil et le tolrestat lors d'études de la



contractilité d'épididymes isolés. Comme AKR1B7 n'est pas exprimée dans l'épididyme de souris, nous ne pouvons pas l'impliquer dans cette fonction. Par contre, par analogie avec le rat, AKR1B3 est très certainement présente dans cette organe. Une étude poussée de la fonction de reproduction chez les mâles *akr1b3*<sup>-/-</sup> comportant par exemple, une étude de la fertilité, une analyse du sperme, l'exploration des capacités contractiles de l'épididyme permettrait peut-être d'impliquer définitivement l'AR dans la fonction de reproduction chez le mâle par son activité PGFS mais également par son rôle dans la voie des polyols.

Chez la femelle, PGF<sub>2α</sub> constitue le principal agent lutéolytique et participe aux contractions utérines lors de la parturition. Jusqu'en 2003, aucune étude n'avait formellement identifié la ou les protéines impliquées dans la synthèse de PGF<sub>2α</sub> au cours de ces processus. Lorsque Madore et ses collaborateurs ont recherché chez le bœuf l'enzyme qui produisait PGF<sub>2α</sub> lors de la lutéolyse, ils ont impliqué pour la première fois les protéines de la famille AKR1B dans la reproduction femelle en démontrant que AKR1B5 était la PGFS de l'endomètre bovin (Madore et al., 2003). Pour déterminer si AKR1B7 ou AKR1B3 chez la souris pourrait être impliquée dans la lutéolyse, nous devons tout d'abord étudier l'expression des ces deux enzymes dans l'endomètre et le corps jaune au cours des différentes phases du cycle oestrien. Si l'une d'entre elles ou les deux présentent un profil d'expression concordant avec cette fonction, une analyse plus poussée de la fonction de reproduction chez les femelles *akr1b7*<sup>-/-</sup> et/ou *akr1b3*<sup>-/-</sup> pourra être réalisée.

### III. Applications des lignées de souris transgéniques Cre

Nous avons créé une lignée de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre dans le cortex surrénalien. Chez ces souris, la recombinaison ne touche pas toutes les cellules corticales ce qui présente un grand intérêt pour la création de modèles murins de pathologies tumorales. En effet, le processus de tumorigenèse se déroule dans un nombre limité de cellules au sein d'un





organe et implique souvent des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs ou au contraire des mutations activatrices de proto-oncogènes. En réalisant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou en recréant les mutations activatrices de proto-oncogènes dans un nombre limité de cellules, nous pouvons mimer le processus naturel de tumorigenèse. Deux projets en cours au laboratoire confirment l'utilité de cette lignée dans ce type d'approche.

En effet, notre lignée est exploitée pour la création d'un modèle physio-pathologique de dysplasie micronodulaire pigmentée du cortex surrénalien (PPNAD). La PPNAD est une lésion bénigne hypersécrétante isolée ou associée à un syndrome multinéoplasique héréditaire rare, le complexe de Carney (CNC). Le gène *PRKARIA* codant la sous-unité régulatrice R1 $\alpha$  de la PKA agirait comme suppresseur de tumeur dans le CNC. En effet, certains patients présentent des mutations inactivatrices de *PRKARIA* qui conduisent à l'instabilité de l'ARNm puis dans les tumeurs à la perte de l'allèle sain par perte d'hétérozygotie (Kirschner et al., 2000). Nous avons pour but de démontrer le lien de causalité entre l'inactivation de ce candidat suppresseur de tumeur et le déclenchement des PPNAD en confinant dans la surrénale les dysfonctionnements observés dans la pathologie par l'inactivation conditionnelle du gène codant R1 $\alpha$  chez la souris en croisant les souris *PRKARIA*<sup>lox/lox</sup> (Kirschner et al., 2005) avec les souris 0.5 *akr1b7*-Cre.

D'autre part, des dérégulations de la voie de signalisation Wnt (wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family)/ $\beta$ -caténine ont récemment été montrées dans les tumeurs de la surrénale (Tissier et al., 2005). L'activité de la  $\beta$ -caténine qui joue un rôle central dans cette voie de signalisation, est contrôlée par sa dégradation par le protéasome. En l'absence de signalisation Wnt, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) et la caséine kinase I associées à APC (adenomatous polyposis coli) et l'axine. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination de la  $\beta$ -caténine et sa dégradation par le protéasome. Les mutations empêchant la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par GSK3 $\beta$  ou les mutations inactivatrices de APC entraînent une activation constitutive de la voie de signalisation Wnt qui est à l'origine de nombreux cancers (Polakis, 2000). Au sein de notre équipe, le Dr P. Val étudie



le rôle de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'étiologie des tumeurs surrenaliennes en développant des modèles cellulaires et de souris transgéniques exprimant un mutant constitutif de la  $\beta$ -caténine. Pour cette deuxième partie, le croisement des souris 0.5 *akr1b7*-Cre avec les souris portant un allèle de la  $\beta$ -caténine dont l'exon 3 est flanqué de sites LoxP (Harada et al., 1999) permettra par recombinaison des sites LoxP, l'expression d'une  $\beta$ -caténine constitutivement active dans le cortex surrenalien. L'apparition de tumeurs chez ces souris permettra de démontrer le rôle de la  $\beta$ -caténine dans l'oncogenèse cortico-surrenalienne.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Slipetz DM et Grygorczyk R (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* **269**:2632-2636.
- Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carriere M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N et Metters KM (2000) The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* **1483**:285-293.
- Adams JW, Migita DS, Yu MK, Young R, Hellickson MS, Castro-Vargas FE, Domingo JD, Lee PH, Bui JS et Henderson SA (1996) Prostaglandin F2 alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* **271**:1179-1186.
- Adams JW, Sah VP, Henderson SA et Brown JH (1998) Tyrosine kinase and c-Jun NH2-terminal kinase mediate hypertrophic responses to prostaglandin F2alpha in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* **83**:167-178.
- Aida K, Tawata M, Ikegishi Y et Onaya T (1999) Induction of rat aldose reductase gene transcription is mediated through the cis-element, osmotic response element (ORE): increased synthesis and/or activation by phosphorylation of ORE-binding protein is a key step. *Endocrinology* **140**:609-617.
- Aida K, Ikegishi Y, Chen J, Tawata M, Ito S, Maeda S et Onaya T (2000) Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* **277**:281-286.
- Aigueperse C, Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G et Jean CI (1999) Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J Endocrinol* **160**:147-154.
- Aigueperse C, Val P, Pacot C, Darne C, Lalli E, Sassone-Corsi P, Veyssiere G, Jean C et Martinez A (2001) SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (*AKR1B7*) expression in adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* **15**:93-111.
- Alexander CL, Miller SJ et Abel SR (2002) Prostaglandin analog treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ann Pharmacother* **36**:504-511.
- Anderson LE, Wu YL, Tsai SJ et Wiltbank MC (2001) Prostaglandin F(2alpha) receptor in the corpus luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. *Biol Reprod* **64**:1041-1047.
- Anthony TL, Pierce KL, Stamer WD et Regan JW (1998) Prostaglandin F2 alpha receptors in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:315-321.
- Anthony TL, Lindsey JD, Aihara M et Weinreb RN (2001) Detection of prostaglandin EP(1), EP(2), and FP receptor subtypes in human sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:3182-3186.
- Arvaisis EW, Romanelli A, Hou X et Davis JS (2006) AKT-independent phosphorylation of TSC2 and activation of mTOR and ribosomal protein S6 kinase signaling by prostaglandin F2alpha. *J Biol Chem* **281**:26904-26913.
- Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, Dani C, Negrel R et Ailhaud G (2000) Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol* **160**:149-156.
- Badr FM, Barcikowski B et Bartke A (1975) Effect of castration, testosterone treatment and hereditary sterility on prostaglandin concentration in the male reproductive system of mice. *Prostaglandins* **9**:289-297.
- Badr FM (1976) Effect of sexual maturation and androgens on prostaglandin levels in tissues of the male reproductive system in mice. *Endocrinology* **98**:1523-1527.





- Bagnasco SM, Uchida S, Balaban RS, Kador PF et Burg MB (1987) Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1718-1720.
- Balwierzczak JL (1991) The relationship of KCl- and prostaglandin F2 alpha-mediated increases in tension of the porcine coronary artery with changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> measured with fura-2. *Br J Pharmacol* **104**:373-378.
- Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB et Pinkert CA (1984) Luteinizing hormone receptors and progesterone content in porcine corpora lutea after prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod* **31**:913-919.
- Baron S, Manin M, Aigueperse C, Berger M, Jean C, Veyssiere G et Morel L (2003) Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose reductase-like gene *akr1b7* expression in Leydig cells. *J Mol Endocrinol* **31**:71-81.
- Baumann C, Davies B, Peters M, Kaufmann-Reiche U, Lessl M et Theuring F (2007) AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success. *Reproduction* **134**:97-109.
- Bedford JJ, Bagnasco SM, Kador PF, Harris HW, Jr. et Burg MB (1987) Characterization and purification of a mammalian osmoregulatory protein, aldose reductase, induced in renal medullary cells by high extracellular NaCl. *J Biol Chem* **262**:14255-14259.
- Bek M, Nusing R, Kowark P, Henger A, Mundel P et Pavenstadt H (1999) Characterization of prostanoid receptors in podocytes. *J Am Soc Nephrol* **10**:2084-2093.
- Bohren KM, Bullock B, Wermuth B et Gabbay KH (1989) The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* **264**:9547-9551.
- Borglum JD, Pedersen SB, Ailhaud G, Negrel R et Richelsen B (1999) Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **57**:305-317.
- Borhani DW, Harter TM et Petrash JM (1992) The crystal structure of the aldose reductase.NADPH binary complex. *J Biol Chem* **267**:24841-24847.
- Bornstein SR, Tajima T, Eisenhofer G, Haidan A et Aguilera G (1999) Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase-deficient mice. *Faseb J* **13**:1185-1194.
- Bornstein SR et Ehrhart-Bornstein M (2000) Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol* **59 Suppl 2**:II/12-17.
- Bornstein SR, Tian H, Haidan A, Bottner A, Hiroi N, Eisenhofer G, McCann SM, Chrousos GP et Roffler-Tarlov S (2000) Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14742-14747.
- Bornstein SR, Yoshida-Hiroi M, Sotiriou S, Levine M, Hartwig HG, Nussbaum RL et Eisenhofer G (2003) Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2). *Faseb J* **17**:1928-1930.
- Bornstein SR, Rutkowski H et Vrezas I (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **215**:135-141.
- Breshnahan BA, Kelefiotis D, Stratidakis I et Lianos EA (1996) PGF2alpha-induced signaling events in glomerular mesangial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **212**:165-173.
- Breyer MD et Breyer RM (2001) G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* **63**:579-605.
- Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C et Lessl M (2000) Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* **141**:2574-2581.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**:813-820.
- Burcham PC (1998) Genotoxic lipid peroxidation products : their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* **13**:287-305.



- Burgess JR, Yang H, Chang M, Rao MK, Tu CP et Reddy CC (1987) Enzymatic transformation of PGH2 to PGF2 alpha catalyzed by glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Res Commun* **142**:441-447.
- Burgess JR et Reddy CC (1997) Isolation and characterization of an enzyme from sheep seminal vesicles that catalyzes the glutathione-dependent reduction of prostaglandin H2 to prostaglandin F2 alpha. *Biochem Mol Biol Int* **41**:217-226.
- Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M et Bachmann S (2003) Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol* **285**:F19-32.
- Cao D, Fan ST et Chung SS (1998) Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem* **273**:11429-11435.
- Cappiello M, Voltarelli M, Giannessi M, Cecconi I, Camici G, Manao G, Del Corso A et Mura U (1994) Glutathione dependent modification of bovine lens aldose reductase. *Exp Eye Res* **58**:491-501.
- Cappiello M, Voltarelli M, Cecconi I, Vilardo PG, Dal Monte M, Marini I, Del Corso A, Wilson DK, Quioco FA, Petrash JM et Mura U (1996) Specifically targeted modification of human aldose reductase by physiological disulfides. *J Biol Chem* **271**:33539-33544.
- Carambula SF, Pru JK, Lynch MP, Matikainen T, Goncalves PB, Flavell RA, Tilly JL et Rueda BR (2003) Prostaglandin F2alpha- and FAS-activating antibody-induced regression of the corpus luteum involves caspase-8 and is defective in caspase-3 deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* **1**:15.
- Casimir DA, Miller CW et Ntambi JM (1996) Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. *Differentiation* **60**:203-210.
- Chang KC, Paek KS, Kim HJ, Lee YS, Yabe-Nishimura C et Seo HG (2002) Substrate-induced up-regulation of aldose reductase by methylglyoxal, a reactive oxoaldehyde elevated in diabetes. *Mol Pharmacol* **61**:1184-1191.
- Chang M, Hong Y, Burgess JR, Tu CP et Reddy CC (1987) Isozyme specificity of rat liver glutathione S-transferases in the formation of PGF2 alpha and PGE2 from PGH2. *Arch Biochem Biophys* **259**:548-557.
- Chang M, Burgess JR, Scholz RW et Reddy CC (1990) The induction of specific rat liver glutathione S-transferase subunits under inadequate selenium nutrition causes an increase in prostaglandin F2 alpha formation. *J Biol Chem* **265**:5418-5423.
- Chen DB, Westfall SD, Fong HW, Roberson MS et Davis JS (1998) Prostaglandin F2alpha stimulates the Raf/MEK1/mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. *Endocrinology* **139**:3876-3885.
- Chen LY, Watanabe K et Hayaishi O (1992) Purification and characterization of prostaglandin F synthase from bovine liver. *Arch Biochem Biophys* **296**:17-26.
- Chen Y, Schnetz MP, Irrazabal CE, Shen RF, Williams CK, Burg MB et Ferraris JD (2007) Proteomic identification of proteins associated with the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP: functional effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**:F981-992.
- Cheung AK, Fung MK, Lo AC, Lam TT, So KF, Chung SS et Chung SK (2005) Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes* **54**:3119-3125.
- Chiquet C et Denis P (2004) [The neuroanatomical and physiological bases of variations in intraocular pressure]. *J Fr Ophtalmol* **27 Spec No 2**:S11-12S18.
- Chung PH, Sandhoff TW et McLean MP (1998) Hormone and prostaglandin F2 alpha regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in human corpora lutea. *Endocrine* **8**:153-160.



- Chung SS et Chung SK (2005) Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets* **6**:475-486.
- Cosentino MJ, Takihara H, Burhop JW et Cockett AT (1984) Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. *J Androl* **5**:216-222.
- Couture JF, Legrand P, Cantin L, Labrie F, Luu-The V et Breton R (2004) Loop relaxation, a mechanism that explains the reduced specificity of rabbit 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, a member of the aldo-keto reductase superfamily. *J Mol Biol* **339**:89-102.
- Crawford K et Kaufman PL (1987) Pilocarpine antagonizes prostaglandin F2 alpha-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F2 alpha. *Arch Ophthalmol* **105**:1112-1116.
- Crosas B, Cederlund E, Torres D, Jornvall H, Farres J et Pares X (2001) A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J Biol Chem* **276**:19132-19140.
- Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, Martras S, Pares X, Flynn TG et Farres J (2003) Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J* **373**:973-979.
- Crowston JG, Lindsey JD, Morris CA, Wheeler L, Medeiros FA et Weinreb RN (2005) Effect of bimatoprost on intraocular pressure in prostaglandin FP receptor knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:4571-4577.
- Crowston JG, Morris CA, Lindsey JD et Weinreb RN (2007) Prostaglandin FP receptors do not contribute to 24-hour intraocular pressure variation in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:2095-2098.
- Curlewis JD, Tam SP, Lau P, Kusters DH, Barclay JL, Anderson ST et Waters MJ (2002) A prostaglandin f(2alpha) analog induces suppressors of cytokine signaling-3 expression in the corpus luteum of the pregnant rat: a potential new mechanism in luteolysis. *Endocrinology* **143**:3984-3993.
- Damm J, Rau T, Maihofner C, Pahl A et Brune K (2001) Constitutive expression and localization of COX-1 and COX-2 in rabbit iris and ciliary body. *Exp Eye Res* **72**:611-621.
- Daoudal S, Tournaire C, Halere A, Veyssiere G et Jean C (1997) Isolation of the mouse aldose reductase promoter and identification of a tonicity-responsive element. *J Biol Chem* **272**:2615-2619.
- Davis JS, Weakland LL, Weiland DA, Farese RV et West LA (1987) Prostaglandin F2 alpha stimulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in bovine luteal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:3728-3732.
- Dekanty A, Giulianelli S, Coso OA, Rudland PS et Jimenez de Asua L (2006) Differential involvement of ERK1-2 and p38MAPK activation on Swiss 3T3 cell proliferation induced by prostaglandin F2alpha. *FEBS Lett* **580**:2512-2516.
- Delarue C, Contesse V, Lenglet S, Sicard F, Perraudin V, Lefebvre H, Kodjo M, Leboulenger F, Yon L, Gallo-Payet N et Vaudry H (2001) Role of neurotransmitters and neuropeptides in the regulation of the adrenal cortex. *Rev Endocr Metab Disord* **2**:253-267.
- Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, Gonzalez RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK et Strauss JF (2002) Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **186**:137-141.
- Diaz FJ et Wiltbank MC (2005) Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2alpha of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. *Domest Anim Endocrinol* **28**:172-189.
- Didolkar AK, Gurjar A, Joshi UM, Sheth AR et Roychowdhury D (1981) Effect of prostaglandins A-1, E-2 and F-2 alpha on blood plasma levels of testosterone, LH and FSH in male rats. *Andrologia* **13**:50-55.



- Dixit BL, Balendiran GK, Watowich SJ, Srivastava S, Ramana KV, Petrash JM, Bhatnagar A et Srivastava SK (2000) Kinetic and structural characterization of the glutathione-binding site of aldose reductase. *J Biol Chem* **275**:21587-21595.
- Donohue PJ, Alberts GF, Hampton BS et Winkles JA (1994) A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J Biol Chem* **269**:8604-8609.
- Dorn GW, 2nd, Becker MW et Davis MG (1992) Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **267**:24897-24905.
- Duncan RA et Davis JS (1991) Prostaglandin F2 alpha stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate formation in bovine luteal cells. *Endocrinology* **128**:1519-1526.
- Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Trzeclak WH, Usadel H, Guse-Behling H, Waterman MR et Scherbaum WA (1991) Adrenaline stimulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 mRNA accumulation in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol* **131**:R5-8.
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA et Vinson GP (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* **19**:101-143.
- Fabre S, Manin M, Pailhoux E, Veyssiere G et Jean C (1994) Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase-like protein specific to the mouse vas deferens. *J Biol Chem* **269**:5857-5864.
- Fairclough RJ, Smith JF et McGowan LT (1981) Prolongation of the oestrous cycle in cows and ewes after passive immunization with PGF antibodies. *J Reprod Fertil* **62**:213-219.
- Farr CH et Ellis LC (1980) In-vitro contractility of rat seminiferous tubules in response to prostaglandins, cyclic GMP, testosterone and 2,4'-dibromoacetophenone. *J Reprod Fertil* **58**:37-42.
- Feil R, Wagner J, Metzger D et Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* **237**:752-757.
- Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB et Garcia-Perez A (1994) Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:10742-10746.
- Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB et Garcia-Perez A (1996) ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **271**:18318-18321.
- Ferraris JD, Persaud P, Williams CK, Chen Y et Burg MB (2002) cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/ osmotic response element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16800-16805.
- Fiedler EP, Plouffe L, Jr., Hales DB, Hales KH et Khan I (1999) Prostaglandin F(2alpha) induces a rapid decline in progesterone production and steroidogenic acute regulatory protein expression in isolated rat corpus luteum without altering messenger ribonucleic acid expression. *Biol Reprod* **61**:643-650.
- Flack JD, Jessup R et Ramwell PW (1969) Prostaglandin stimulation of rat corticosteroidogenesis. *Science* **163**:691-692.
- Flack JD et Ramwell PW (1972) A comparison of the effects of ACTH, cyclic AMP, Dibutyryl cyclic AMP, and PGE2 on corticosteroidogenesis in vitro. *Endocrinology* **90**:371-377.
- Fossom LH, Sterling CR et Tank AW (1992) Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. *Mol Pharmacol* **42**:898-908.





- Foyouzi N, Cai Z, Sugimoto Y et Stocco C (2005) Changes in the expression of steroidogenic and antioxidant genes in the mouse corpus luteum during luteolysis. *Biol Reprod* **72**:1134-1141.
- Frenette G, Lessard C, Madore E, Fortier MA et Sullivan R (2003) Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol Reprod* **69**:1586-1592.
- Frenette G, Lessard C et Sullivan R (2004) Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol Reprod Dev* **69**:448-456.
- Frenette G, Thabet M et Sullivan R (2006) Polyol pathway in human epididymis and semen. *J Androl* **27**:233-239.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Parborell F, Albrecht M, Mayerhofer A et Calandra RS (2006) Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2 alpha in Syrian hamster Leydig cells: Inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production. *Endocrinology* **147**:4476-4485.
- Fuchs AR et Chantharaksri U (1981) Prostaglandin F2alpha regulation of LH-stimulated testosterone production in rat testis. *Biol Reprod* **25**:492-501.
- Fujino H et Regan JW (2001) FP prostanoid receptor activation of a T-cell factor/beta -catenin signaling pathway. *J Biol Chem* **276**:12489-12492.
- Fujino H, Srinivasan D et Regan JW (2002) Cellular conditioning and activation of beta-catenin signaling by the FPB prostanoid receptor. *J Biol Chem* **277**:48786-48795.
- Fukumoto S, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Shibahara J, Taniguchi H, Ishikawa S, Ito H, Yamamoto S, Iwanari H, Hironaka M, Ishikawa Y, Niki T, Sohara Y, Kodama T, Nishimura M, Fukayama M, Dosaka-Akita H et Aburatani H (2005) Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* **11**:1776-1785.
- Fukuyama K, Ichiki T, Ono H, Tokunou T, Iino N, Masuda S, Ohtsubo H et Takeshita A (2005) cAMP-response element-binding protein mediates prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:910-918.
- Gabelt BT et Kaufman PL (1989) Prostaglandin F2 alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* **49**:389-402.
- Gallego O, Belyaeva OV, Porte S, Ruiz FX, Stetsenko AV, Shabrova EV, Kostereva NV, Farres J, Pares X et Kedishvili NY (2006) Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem J* **399**:101-109.
- Garavito RM, Malkowski MG et DeWitt DL (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:129-152.
- Garcia-Perez A, Martin B, Murphy HR, Uchida S, Murer H, Cowley BD, Jr., Handler JS et Burg MB (1989) Molecular cloning of cDNA coding for kidney aldose reductase. Regulation of specific mRNA accumulation by NaCl-mediated osmotic stress. *J Biol Chem* **264**:16815-16821.
- Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G et Al-Gubory KH (2007) Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free Radic Res* **41**:251-259.
- Gaton DD, Sagara T, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL et Weinreb RN (2001) Increased matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 in the monkey uveoscleral outflow pathway after topical prostaglandin F(2 alpha)-isopropyl ester treatment. *Arch Ophthalmol* **119**:1165-1170.
- Gerozissis K et Dray F (1983) In-vitro prostanoid production by the rat vas deferens. *J Reprod Fertil* **67**:389-394.
- Graham A, Brown L, Hedge PJ, Gammack AJ et Markham AF (1991a) Structure of the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* **266**:6872-6877.



- Graham A, Heath P, Morten JE et Markham AF (1991b) The human aldose reductase gene maps to chromosome region 7q35. *Hum Genet* **86**:509-514.
- Graham C, Szpirer C, Levan G et Carper D (1991c) Characterization of the aldose reductase-encoding gene family in rat. *Gene* **107**:259-267.
- Graves PE, Pierce KL, Bailey TJ, Rueda BR, Gil DW, Woodward DF, Yool AJ, Hoyer PB et Regan JW (1995) Cloning of a receptor for prostaglandin F<sub>2</sub> alpha from the ovine corpus luteum. *Endocrinology* **136**:3430-3436.
- Grimshaw CE et Mathur EJ (1989) Immunoquantitation of aldose reductase in human tissues. *Anal Biochem* **176**:66-71.
- Grimshaw CE, Shahbaz M et Putney CG (1990) Mechanistic basis for nonlinear kinetics of aldehyde reduction catalyzed by aldose reductase. *Biochemistry* **29**:9947-9955.
- Grimshaw CE, Bohren KM, Lai CJ et Gabbay KH (1995) Human aldose reductase: rate constants for a mechanism including interconversion of ternary complexes by recombinant wild-type enzyme. *Biochemistry* **34**:14356-14365.
- Gui T, Tanimoto T, Kokai Y et Nishimura C (1995) Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur J Biochem* **227**:448-453.
- Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lubke C et Ehrhart-Bornstein M (1998) Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology* **139**:772-780.
- Haidan A, Bornstein SR, Liu Z, Walsh LP, Stocco DM et Ehrhart-Bornstein M (2000) Expression of adrenocortical steroidogenic acute regulatory (StAR) protein is influenced by chromaffin cells. *Mol Cell Endocrinol* **165**:25-32.
- Hamberg M et Samuelsson B (1967) On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha. *J Biol Chem* **242**:5336-5343.
- Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M et Taketo MM (1999) Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo J* **18**:5931-5942.
- Harrison DH, Bohren KM, Ringe D, Petsko GA et Gabbay KH (1994) An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry* **33**:2011-2020.
- Hayashi H, Fujii Y, Watanabe K, Urade Y et Hayaishi O (1989) Enzymatic conversion of prostaglandin H<sub>2</sub> to prostaglandin F<sub>2</sub> alpha by aldehyde reductase from human liver: comparison to the prostaglandin F synthetase from bovine lung. *J Biol Chem* **264**:1036-1040.
- Hebert RL, Carmosino M, Saito O, Yang G, Jackson CA, Qi Z, Breyer RM, Natarajan C, Hata AN, Zhang Y, Guan Y et Breyer MD (2005) Characterization of a rabbit kidney prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor exhibiting G(i)-restricted signaling that inhibits water absorption in the collecting duct. *J Biol Chem* **280**:35028-35037.
- Hers HG (1960) [The mechanism of the formation of seminal fructose and fetal fructose.]. *Biochim Biophys Acta* **37**:127-138.
- Hershkovitz L, Beuschlein F, Klammer S, Krup M et Weinstein Y (2007) Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. *Endocrinology* **148**:976-988.
- Hirst JJ, Parkington HC, Young IR, Palliser HK, Peri KG et Olson DM (2005) Delay of preterm birth in sheep by THG113.31, a prostaglandin F<sub>2</sub>alpha receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol* **193**:256-266.
- Ho EC, Lam KS, Chen YS, Yip JC, Arvindakshan M, Yamagishi S, Yagihashi S, Oates PJ, Ellery CA, Chung SS et Chung SK (2006) Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes* **55**:1946-1953.



- Ho HT, Jenkins NA, Copeland NG, Gilbert DJ, Winkles JA, Louie HW, Lee FK, Chung SS et Chung SK (1999) Comparisons of genomic structures and chromosomal locations of the mouse aldose reductase and aldose reductase-like genes. *Eur J Biochem* **259**:726-730.
- Ho HT, Chung SK, Law JW, Ko BC, Tam SC, Brooks HL, Knepper MA et Chung SS (2000) Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Cell Biol* **20**:5840-5846.
- Hong Y, Li CH, Burgess JR, Chang M, Salem A, Srikumar K et Reddy CC (1989) The role of selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in the formation of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *J Biol Chem* **264**:13793-13800.
- Hori M, Sato K, Sakata K, Ozaki H, Takano-Ohmuro H, Tsuchiya T, Sugi H, Kato I et Karaki H (1992) Receptor agonists induce myosin phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent contractions in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:506-512.
- Hsu DK, Guo Y, Peifley KA et Winkles JA (1997) Differential control of murine aldose reductase and fibroblast growth factor (FGF)-regulated-1 gene expression in NIH 3T3 cells by FGF-1 treatment and hyperosmotic stress. *Biochem J* **328 ( Pt 2)**:593-598.
- Hummel KP, Dickie MM et Coleman DL (1966) Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* **153**:1127-1128.
- Husain S et Abdel-Latif AA (2001) Effects of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and carbachol on MAP kinases, cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and arachidonic acid release in cat iris sphincter smooth muscle cells. *Exp Eye Res* **72**:581-590.
- Husain S, Jafri F et Crosson CE (2005) Acute effects of PGF<sub>2</sub>alpha on MMP-2 secretion from human ciliary muscle cells: a PKC- and ERK-dependent process. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:1706-1713.
- Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV et Penning TM (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact* **143-144**:621-631.
- Hyndman DJ, Takenoshita R, Vera NL, Pang SC et Flynn TG (1997) Cloning, sequencing, and enzymatic activity of an inducible aldo-keto reductase from Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **272**:13286-13291.
- Hyndman DJ et Flynn TG (1998) Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim Biophys Acta* **1399**:198-202.
- Ichitani Y, Holmberg K, Maunsbach AB, Haeggstrom JZ, Samuelsson B, De Witt D et Hokfelt T (2001) Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rat kidney and adrenal gland after stimulation with systemic lipopolysaccharide: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res* **303**:235-252.
- Irrarrazabal CE, Liu JC, Burg MB et Ferraris JD (2004) ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8809-8814.
- Ishikawa T et Morris PL (2006) A multistep kinase-based sertoli cell autocrine-amplifying loop regulates prostaglandins, their receptors, and cytokines. *Endocrinology* **147**:1706-1716.
- Jaquinod M, Potier N, Klarskov K, Reymann JM, Sorokine O, Kieffer S, Barth P, Andriantomanga V, Biellmann JF et Van Dorsselaer A (1993) Sequence of pig lens aldose reductase and electrospray mass spectrometry of non-covalent and covalent complexes. *Eur J Biochem* **218**:893-903.
- Jeon US, Kim JA, Sheen MR et Kwon HM (2006) How tonicity regulates genes: story of TonEBP transcriptional activator. *Acta Physiol (Oxf)* **187**:241-247.
- Jez JM, Flynn TG et Penning TM (1997) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* **54**:639-647.
- Jia G, Takahashi R, Zhang Z, Tsuji Y et Sone H (2006) Aldo-keto reductase 1 family B7 is the gene induced in response to oxidative stress in the livers of Long-Evans Cinnamon rats. *Int J Oncol* **29**:829-838.



- Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS et Smith MF (1993) Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* **132**:249-254.
- Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM et Niswender GD (1995) Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* **136**:5423-5429.
- Kabututu Z, Martin SK, Nozaki T, Kawazu S, Okada T, Munday CJ, Duszenko M, Lazarus M, Thuita LW, Urade Y et Kubata BK (2003) Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **33**:221-228.
- Kato N, Yashima S, Suzuki T, Nakayama Y et Jomori T (2003) Long-term treatment with fidaestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications* **17**:374-379.
- Kawamura M, Eisenhofer G, Kopin IJ, Kador PF, Lee YS, Tsai JY, Fujisawa S, Lizak MJ, Sinz A et Sato S (1999) Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats. *Biochem Pharmacol* **58**:517-524.
- Kawamura M, Eisenhofer G, Kopin IJ, Kador PF, Lee YS, Fujisawa S et Sato S (2002) Aldose reductase: an aldehyde scavenging enzyme in the intraneuronal metabolism of norepinephrine in human sympathetic ganglia. *Auton Neurosci* **96**:131-139.
- Kelefiotis D, Bresnahan BA, Stratidakis I et Lianos EA (1995) Eicosanoid-induced growth and signaling events in rat glomerular mesangial cells. *Prostaglandins* **49**:269-283.
- Kilunga KB, Inoue T, Okano Y, Kabututu Z, Martin SK, Lazarus M, Duszenko M, Sumii Y, Kusakari Y, Matsumura H, Kai Y, Sugiyama S, Inaka K, Inui T et Urade Y (2005) Structural and mutational analysis of *Trypanosoma brucei* prostaglandin H2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases. *J Biol Chem* **280**:26371-26382.
- Kimball FA, Kirton KT, Forbes AD, Frielink RD, Porteus SE, Wilks JW, Mohberg NR et Turner LF (1979) Serum FSH, LH and testosterone in the male rhesus following prostaglandin injection. *Prostaglandins* **18**:117-126.
- Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P et Merola LO (1979) Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism* **28**:462-469.
- Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS et Stratakis CA (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* **26**:89-92.
- Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns WH, 2nd, Carney JA, Westphal H et Stratakis CA (2005) A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res* **65**:4506-4514.
- Kiser TE, Hafs HD et Oxender WD (1976) Increased blood LH and testosterone after administration of prostaglandin F2alpha in bulls. *Prostaglandins* **11**:545-553.
- Ko BC, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH et Chung SS (1997) Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* **272**:16431-16437.
- Ko BC, Lam AK, Kapus A, Fan L, Chung SK et Chung SS (2002) Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the osmotic response element-binding protein/tonicity-responsive enhancer-binding protein (OREBP/TonEBP). *J Biol Chem* **277**:46085-46092.
- Kobayashi T, Kaneko T, Iuchi Y, Matsuki S, Takahashi M, Sasagawa I, Nakada T et Fujii J (2002) Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J Androl* **23**:674-683.
- Komoto J, Yamada T, Watanabe K et Takusagawa F (2004) Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry* **43**:2188-2198.





- Komoto J, Yamada T, Watanabe K, Woodward DF et Takusagawa F (2006) Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha formation from prostaglandin H<sub>2</sub> by prostaglandin F synthase (PGFS): crystal structure of PGFS containing bimatoprost. *Biochemistry* **45**:1987-1996.
- Kotokorpi P, Gardmo C, Nystrom CS et Mode A (2004) Activation of the glucocorticoid receptor or liver X receptors interferes with growth hormone-induced akr1b7 gene expression in rat hepatocytes. *Endocrinology* **145**:5704-5713.
- Kruger S et Schlegel W (1986) Prostaglandin-E<sub>2</sub> 9-ketoreductase from human uterine decidua vera. *Eur J Biochem* **157**:481-485.
- Kubata BK, Duszenko M, Kabututu Z, Rawer M, Szallies A, Fujimori K, Inui T, Nozaki T, Yamashita K, Horii T, Urade Y et Hayaishi O (2000) Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med* **192**:1327-1338.
- Kubiseski TJ, Hyndman DJ, Morjana NA et Flynn TG (1992) Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. *J Biol Chem* **267**:6510-6517.
- Kunapuli P, Lawson JA, Rokach JA, Meinkoth JL et FitzGerald GA (1998) Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha (PGF<sub>2</sub>alpha) and the isoprostane, 8, 12-iso-isoprostane F<sub>2</sub>alpha-III, induce cardiomyocyte hypertrophy. Differential activation of downstream signaling pathways. *J Biol Chem* **273**:22442-22452.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC et Stallings WC (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**:644-648.
- Lai J, Jin H, Yang R, Winer J, Li W, Yen R, King KL, Zeigler F, Ko A, Cheng J, Bunting S et Paoni NF (1996) Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha induces cardiac myocyte hypertrophy in vitro and cardiac growth in vivo. *Am J Physiol* **271**:H2197-2208.
- Lake S, Gullberg H, Wahlqvist J, Sjogren AM, Kinhult A, Lind P, Hellstrom-Lindahl E et Stjernschantz J (1994) Cloning of the rat and human prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptors and the expression of the rat prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor. *FEBS Lett* **355**:317-325.
- Landsberg L et Young JB (1992) Catecholamines and the Adrenal Medulla, in: *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson JD and Foster DW eds), pp 621-705, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Lau ET, Cao D, Lin C, Chung SK et Chung SS (1995) Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem J* **312** ( Pt 2):609-615.
- Lazarus M, Munday CJ, Eguchi N, Matsumoto S, Killian GJ, Kubata BK et Urade Y (2002) Immunohistochemical localization of microsomal PGE synthase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs. *Endocrinology* **143**:2410-2419.
- Lee AY, Chung SK et Chung SS (1995) Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2780-2784.
- Lee AY et Chung SS (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb J* **13**:23-30.
- Lee EK, Regenold WT et Shapiro P (2002) Inhibition of aldose reductase enhances HeLa cell sensitivity to chemotherapeutic drugs and involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *Anticancer Drugs* **13**:859-868.
- Lee KW, Ko BC, Jiang Z, Cao D et Chung SS (2001) Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs* **12**:129-132.
- Lee SC et Levine L (1975) Purification and regulatory properties of chicken heart prostaglandin E 9-ketoreductase. *J Biol Chem* **250**:4549-4555.
- Lefrancois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, Veyssiere G et Jean C (1999) Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an



- endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* **274**:32875-32880.
- Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C et Martinez A (2004) Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:3010-3019.
- Lindsey JD, Kashiwagi K, Boyle D, Kashiwagi F, Firestein GS et Weinreb RN (1996) Prostaglandins increase proMMP-1 and proMMP-3 secretion by human ciliary smooth muscle cells. *Curr Eye Res* **15**:869-875.
- Liou JY, Deng WG, Gilroy DW, Shyue SK et Wu KK (2001) Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem* **276**:34975-34982.
- Liou JY, Aleksic N, Chen SF, Han TJ, Shyue SK et Wu KK (2005) Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp Cell Res* **306**:75-84.
- Liu L et Clipstone NA (2007) Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *J Cell Biochem* **100**:161-173.
- Liu Q, Merkler KA, Zhang X et McLean MP (2007) Prostaglandin F2{alpha} Suppresses Rat Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression via Induction of Yin Yang 1 Protein and Recruitment of Histone Deacetylase 1 Protein. *Endocrinology*.
- Lopez Bernal A (2003) Mechanisms of labour--biochemical aspects. *Bjog* **110 Suppl 20**:39-45.
- Lovering AL, Ride JP, Bunce CM, Desmond JC, Cummings SM et White SA (2004) Crystal structures of prostaglandin D(2) 11-ketoreductase (AKR1C3) in complex with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs flufenamic acid and indomethacin. *Cancer Res* **64**:1802-1810.
- Ludvigson MA et Sorenson RL (1980) Immunohistochemical localization of aldose reductase. II. Rat eye and kidney. *Diabetes* **29**:450-459.
- Ludvigson MA, Waites GM et Hamilton DW (1982) Immunocytochemical evidence for the specific localization of aldose reductase in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* **26**:311-317.
- Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C et Browner MF (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* **3**:927-933.
- MacDougald OA et Mandrup S (2002) Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* **13**:5-11.
- Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA et Fortier MA (2003) An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *J Biol Chem* **278**:11205-11212.
- Makino S, Zaragoza DB, Mitchell BF, Yonemoto H et Olson DM (2007) Decidual activation: abundance and localization of prostaglandin F2alpha receptor (FP) mRNA and protein and uterine activation proteins in human decidua at preterm birth and term birth. *Placenta* **28**:557-565.
- Malkowski MG, Ginell SL, Smith WL et Garavito RM (2000) The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* **289**:1933-1937.
- Mann T (1946) Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. *Biochem J* **40**:481-491.
- Martin HJ, Breyer-Pfaff U, Wsol V, Venz S, Block S et Maser E (2006) Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos* **34**:464-470.
- Martinez A, Pailhoux E, Berger M et Jean C (1990) Androgen regulation of the mRNA encoding a major protein of the mouse vas deferens. *Mol Cell Endocrinol* **72**:201-211.



- Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Manin M, Guyot S, Jean-Faucher C, Veyssiere G, Kahn A et Jean C (1999) 5'-flanking and intragenic sequences confer androgenic and developmental regulation of mouse aldose reductase-like gene in vas deferens and adrenal in transgenic mice. *Endocrinology* **140**:1338-1348.
- Martinez A, Aigueperse C, Val P, Dussault M, Tournaire C, Berger M, Veyssiere G, Jean C et Lefrancois Martinez A (2001) Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem Biol Interact* **130-132**:903-917.
- Martinez A, Val P, Sahut-Barnola I, Aigueperse C, Veyssiere G et Lefrancois-Martinez AM (2003) Steroidogenic factor-1 controls the aldose reductase akr1b7 gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. *Endocrinology* **144**:2111-2120.
- Masferrer JL, Seibert K, Zweifel B et Needleman P (1992) Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3917-3921.
- Matsuura K, Deyashiki Y, Bunai Y, Ohya I et Hara A (1996) Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch Biochem Biophys* **328**:265-271.
- Matsuura K, Shiraishi H, Hara A, Sato K, Deyashiki Y, Ninomiya M et Sakai S (1998) Identification of a principal mRNA species for human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoform (AKR1C3) that exhibits high prostaglandin D2 11-ketoreductase activity. *J Biochem (Tokyo)* **124**:940-946.
- McCracken JA, Custer EE et Lamsa JC (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* **79**:263-323.
- McLean MP, Billheimer JT, Warden KJ et Irby RB (1995) Prostaglandin F2 alpha mediates ovarian sterol carrier protein-2 expression during luteolysis. *Endocrinology* **136**:4963-4972.
- McMahon A et Sabban EL (1992) Regulation of expression of dopamine beta-hydroxylase in PC12 cells by glucocorticoids and cyclic AMP analogues. *J Neurochem* **59**:2040-2047.
- Melien O, Thoresen GH, Sandnes D, Ostby E et Christoffersen T (1998) Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F2alpha in hepatocytes is sustained, and like the effect of epidermal growth factor, mediated through pertussis toxin-sensitive mechanisms. *J Cell Physiol* **175**:348-358.
- Mene P et Dunn MJ (1990) Prostaglandins and rat glomerular mesangial cell proliferation. *Kidney Int* **37**:1256-1262.
- Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR et Middendorff R (2006) Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol Reprod* **75**:651-659.
- Michl P, Beikler T, Engelhardt D et Weber MM (2000) Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways. *J Neuroendocrinol* **12**:23-28.
- Miller CW, Casimir DA et Ntambi JM (1996) The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha. *Endocrinology* **137**:5641-5650.
- Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS et Kwon HM (1999) Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2538-2542.
- Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, Funk R, Bornstein SR, McCann SM et Rettori V (2005) The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6213-6218.
- Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, Durand P, Naville D et Begeot M (2003) Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* **144**:4773-4782.



- Moriyama T, Garcia-Perez A et Burg MB (1989) Osmotic regulation of aldose reductase protein synthesis in renal medullary cells. *J Biol Chem* **264**:16810-16814.
- Mukhopadhyay P, Bian L, Yin H, Bhattacharjee P et Paterson C (2001) Localization of EP(1) and FP receptors in human ocular tissues by in situ hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:424-428.
- Nackley AC, Shea-Eaton W, Lopez D et McLean MP (2002) Repression of the steroidogenic acute regulatory gene by the multifunctional transcription factor Yin Yang 1. *Endocrinology* **143**:1085-1096.
- Nagaraj NS, Beckers S, Mensah JK, Waigel S, Vigneswaran N et Zacharias W (2006) Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicol Lett* **165**:182-194.
- Nakamura N, Obayashi H, Fujii M, Fukui M, Yoshimori K, Ogata M, Hasegawa G, Shigeta H, Kitagawa Y, Yoshikawa T, Kondo M, Ohta M, Nishimura M, Nishinaka T et Nishimura CY (2000) Induction of aldose reductase in cultured human microvascular endothelial cells by advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med* **29**:17-25.
- Nakashima K, Ueno N, Kamei D, Tanioka T, Nakatani Y, Murakami M et Kudo I (2003) Coupling between cyclooxygenases and prostaglandin F(2alpha) synthase. Detection of an inducible, glutathione-activated, membrane-bound prostaglandin F(2alpha)-synthetic activity. *Biochim Biophys Acta* **1633**:96-105.
- Ng TF, Lee FK, Song ZT, Calcutt NA, Lee AY, Chung SS et Chung SK (1998) Effects of sorbitol dehydrogenase deficiency on nerve conduction in experimental diabetic mice. *Diabetes* **47**:961-966.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I et Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**:787-790.
- Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR et Matzuk MM (1996) Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11699-11704.
- Nishimura C, Graham C, Hohman TC, Nagata M, Robison WG, Jr. et Carper D (1988) Characterization of mRNA and genes for aldose reductase in rat. *Biochem Biophys Res Commun* **153**:1051-1059.
- Nishimura C, Matsuura Y, Kokai Y, Akera T, Carper D, Morjana N, Lyons C et Flynn TG (1990) Cloning and expression of human aldose reductase. *J Biol Chem* **265**:9788-9792.
- Nishinaka T et Yabe-Nishimura C (2001) EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **31**:205-216.
- Nishinaka T et Yabe-Nishimura C (2005) Transcription factor Nrf2 regulates promoter activity of mouse aldose reductase (AKR1B3) gene. *J Pharmacol Sci* **97**:43-51.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK et McIntush EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* **80**:1-29.
- Norel X (2007) Prostanoid receptors in the human vascular wall. *ScientificWorldJournal* **7**:1359-1374.
- Ocklind A (1998) Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res* **67**:179-191.
- Oh DJ, Martin JL, Williams AJ, Peck RE, Pokorny C, Russell P, Birk DE et Rhee DJ (2006) Analysis of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human ciliary body after latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:953-963.
- Ohmichi M, Koike K, Kimura A, Masuhara K, Ikegami H, Ikebuchi Y, Kanzaki T, Touhara K, Sakaue M, Kobayashi Y, Akabane M, Miyake A et Murata Y (1997) Role of mitogen-





- activated protein kinase pathway in prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced rat puerperal uterine contraction. *Endocrinology* **138**:3103-3111.
- Olson DM, Zaragoza DB, Shallow MC, Cook JL, Mitchell BF, Grigsby P et Hirst J (2003) Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor--a review. *Placenta* **24 Suppl A**:S47-54.
- Orlicky DJ et Williams-Skipp C (1992) Immunohistochemical localization of PGF<sub>2</sub> α receptor in the mouse testis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **47**:247-252.
- Orth DN, Kovacs NJ et DeBold CR (1992) The adrenal cortex, in: *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson JD and Foster DW eds), pp 489-619, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Ota T, Aihara M, Narumiya S et Araie M (2005) The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:4159-4163.
- Ota T, Aihara M, Saeki T, Narumiya S et Araie M (2007) The IOP-lowering effects and mechanism of action of tafluprost in prostanoid receptor-deficient mice. *Br J Ophthalmol* **91**:673-676.
- Otto JC, DeWitt DL et Smith WL (1993) N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**:18234-18242.
- Otto TC et Lane MD (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**:229-242.
- Pailhoux EA, Martinez A, Veyssiere GM et Jean CG (1990) Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily. *J Biol Chem* **265**:19932-19936.
- Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N et Ratnam K (2000) Human 3α-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* **351**:67-77.
- Penning TM (2005) AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res* **11**:1687-1690.
- Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD et Chemtob S (2002) THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* **26**:389-397.
- Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA et Murphy BD (1996) Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod* **55**:485-491.
- Petrash JM et Favello AD (1989) Isolation and characterization of cDNA clones encoding aldose reductase. *Curr Eye Res* **8**:1021-1027.
- Petrash JM (2004) All in the family : aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell Mol Life Sci* **61**:737-749.
- Picot D, Loll PJ et Garavito RM (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1. *Nature* **367**:243-249.
- Piekorz RP, Gingras S, Hoffmeyer A, Ihle JN et Weinstein Y (2005) Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20α-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* **19**:431-440.
- Pierce KL, Bailey TJ, Hoyer PB, Gil DW, Woodward DF et Regan JW (1997) Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* **272**:883-887.
- Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**:1837-1851.
- Qiu W, Zhou M, Labrie F et Lin SX (2004) Crystal structures of the multispecific 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5: critical androgen regulation in human peripheral tissues. *Mol Endocrinol* **18**:1798-1807.
- Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, Sahut-Barnola I, Tournaire C, Chambon C, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veyssiere G et Martinez A (2006) Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic



- genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* **147**:1805-1818.
- Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Aggarwal BB et Srivastava SK (2002) Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:32063-32070.
- Ramana KV, Friedrich B, Bhatnagar A et Srivastava SK (2003) Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *Faseb J* **17**:315-317.
- Ramana KV, Bhatnagar A et Srivastava SK (2004a) Aldose reductase regulates TNF-alpha-induced cell signaling and apoptosis in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* **570**:189-194.
- Ramana KV, Bhatnagar A et Srivastava SK (2004b) Inhibition of aldose reductase attenuates TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Faseb J* **18**:1209-1218.
- Ramana KV, Friedrich B, Srivastava S, Bhatnagar A et Srivastava SK (2004c) Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes* **53**:2910-2920.
- Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A et Srivastava SK (2005) Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **54**:818-829.
- Ramana KV, Bhatnagar A, Srivastava S, Yadav UC, Awasthi S, Awasthi YC et Srivastava SK (2006a) Mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): role of aldose reductase-catalyzed reduction of the HNE-glutathione conjugates in regulating cell growth. *J Biol Chem* **281**:17652-17660.
- Ramana KV, Fadl AA, Tammali R, Reddy AB, Chopra AK et Srivastava SK (2006b) Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J Biol Chem* **281**:33019-33029.
- Ramana KV et Srivastava SK (2006) Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages. *Cytokine* **36**:115-122.
- Ramana KV, Willis MS, White MD, Horton JW, DiMaio JM, Srivastava D, Bhatnagar A et Srivastava SK (2006c) Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition. *Circulation* **114**:1838-1846.
- Ramana KV, Reddy AB, Tammali R et Srivastava SK (2007) Aldose reductase mediates endotoxin-induced production of nitric oxide and cytotoxicity in murine macrophages. *Free Radic Biol Med* **42**:1290-1302.
- Rao GN, Madamanchi NR, Lele M, Gadiparthi L, Gingras AC, Eling TE et Sonenberg N (1999) A potential role for extracellular signal-regulated kinases in prostaglandin F2alpha-induced protein synthesis in smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**:12925-12932.
- Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST et Lazar MA (1998) Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **273**:1855-1858.
- Reingold DF, Kawasaki A et Needleman P (1981) A novel prostaglandin 11-keto reductase found in rabbit liver. *Biochim Biophys Acta* **659**:179-188.
- Ricke WA, Smith GW, McIntush EW et Smith MF (2002a) Analysis of luteal tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 during prostaglandin F(2alpha)-induced luteolysis. *Biol Reprod* **66**:1387-1394.
- Ricke WA, Smith GW et Smith MF (2002b) Matrix metalloproteinase expression and activity following prostaglandin F(2 alpha)-induced luteolysis. *Biol Reprod* **66**:685-691.
- Romanelli F, Valenca M, Conte D, Isidori A et Negro-Vilar A (1995) Arachidonic acid and its metabolites effects on testosterone production by rat Leydig cells. *J Endocrinol Invest* **18**:186-193.



- Rondeau JM, Tete-Favier F, Podjarny A, Reymann JM, Barth P, Biellmann JF et Moras D (1992) Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **355**:469-472.
- Ross SR, Graves RA, Greenstein A, Platt KA, Shyu HL, Mellovitz B et Spiegelman BM (1990) A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9590-9594.
- Rueda BR, Wegner JA, Marion SL, Wahlen DD et Hoyer PB (1995) Internucleosomal DNA fragmentation in ovine luteal tissue associated with luteolysis: in vivo and in vitro analyses. *Biol Reprod* **52**:305-312.
- Ruef J, Liu SQ, Bode C, Tocchi M, Srivastava S, Runge MS et Bhatnagar A (2000) Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:1745-1752.
- Sagara T, Gatton DD, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL et Weinreb RN (1999) Topical prostaglandin F<sub>2</sub>alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch Ophthalmol* **117**:794-801.
- Sahut-Barnola I, Lefrancois-Martinez AM, Jean C, Veyssiere G et Martinez A (2000) Adrenal tumorigenesis targeted by the corticotropin-regulated promoter of the aldo-keto reductase AKR1B7 gene in transgenic mice. *Endocr Res* **26**:885-898.
- Saito O, Guan Y, Qi Z, Davis LS, Komhoff M, Sugimoto Y, Narumiya S, Breyer RM et Breyer MD (2003) Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**:F1164-1170.
- Sakamoto K, Ezashi T, Miwa K, Okuda-Ashitaka E, Houtani T, Sugimoto T, Ito S et Hayaishi O (1994) Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor. *J Biol Chem* **269**:3881-3886.
- Sales KJ, Milne SA, Williams AR, Anderson RA et Jabbour HN (2004) Expression, localization, and signaling of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor in human endometrial adenocarcinoma: regulation of proliferation by activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:986-993.
- Sales KJ, List T, Boddy SC, Williams AR, Anderson RA, Naor Z et Jabbour HN (2005) A novel angiogenic role for prostaglandin F<sub>2</sub>alpha-FP receptor interaction in human endometrial adenocarcinomas. *Cancer Res* **65**:7707-7716.
- Samuels LT, Harding BW et Mann T (1962) Aldose reductase and ketose reductase in male accessory organs of reproduction. Distribution and relation to seminal fructose. *Biochem J* **84**:39-45.
- Sandhoff TW et McLean MP (1999) Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF<sub>2</sub>alpha is modulated by the negative transcription factor DAX-1. *Endocrine* **10**:83-91.
- Saraswat M, Mrudula T, Kumar PU, Suneetha A, Rao Rao TS, Srinivasulu M et Reddy B (2006) Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Med Sci Monit* **12**:CR525-529.
- Saruta T et Kaplan NM (1972) Adrenocortical steroidogenesis: the effects of prostaglandins. *J Clin Invest* **51**:2246-2251.
- Sawada T, Asada M et Mori J (1994) Effects of single and repeated administration of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on secretion of testosterone by male rats. *Prostaglandins* **47**:345-352.
- Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD et Niswender GD (1990) Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF<sub>2</sub> alpha. *Domest Anim Endocrinol* **7**:229-237.
- Scaramuzzi RJ et Baird DT (1976) The oestrous cycle of the ewe after active immunization against prostaglandin F-2 alpha. *J Reprod Fertil* **46**:39-47.
- Schade SZ, Early SL, Williams TR, Kezdy FJ, Heinrikson RL, Grimshaw CE et Doughty CC (1990) Sequence analysis of bovine lens aldose reductase. *J Biol Chem* **265**:3628-3635.



- Schieber A, Frank RW et Ghisla S (1992) Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. Identity with human carbonyl reductase. *Eur J Biochem* **206**:491-502.
- Schinner S et Bornstein SR (2005) Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol* **16**:91-98.
- Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M et Nusing RM (2002) Expression and localization of FP and EP prostanoid receptor subtypes in human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:1475-1487.
- Scuric Z, Stain SC, Anderson WF et Hwang JJ (1998) New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **27**:943-950.
- Seo HG, Nishinaka T et Yabe-Nishimura C (2000) Nitric oxide up-regulates aldose reductase expression in rat vascular smooth muscle cells: a potential role for aldose reductase in vascular remodeling. *Mol Pharmacol* **57**:709-717.
- Serrero G, Lepak NM et Goodrich SP (1992a) Prostaglandin F2 alpha inhibits the differentiation of adipocyte precursors in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **183**:438-442.
- Serrero G, Lepak NM et Goodrich SP (1992b) Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F2 alpha inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* **131**:2545-2551.
- Serrero G et Lepak NM (1997) Prostaglandin F2alpha receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochem Biophys Res Commun* **233**:200-202.
- Sharif NA, Kelly CR et Crider JY (2003) Human trabecular meshwork cell responses induced by bimatoprost, travoprost, unoprostone, and other FP prostaglandin receptor agonist analogues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:715-721.
- Shea-Eaton W, Sandhoff TW, Lopez D, Hales DB et McLean MP (2002) Transcriptional repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by the AP-1 family member c-Fos. *Mol Cell Endocrinol* **188**:161-170.
- Singh SK et Dominic CJ (1986) Prostaglandin F2 alpha-induced changes in the sex organs of the male laboratory mouse. *Exp Clin Endocrinol* **88**:309-315.
- Smith WL, Garavito RM et DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**:33157-33160.
- Smith WL et Song I (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:115-128.
- Song I et Smith WL (1996) C-terminal Ser/Pro-Thr-Glu-Leu tetrapeptides of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 target the enzymes to the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **334**:67-72.
- Song Z, Fu DT, Chan YS, Leung S, Chung SS et Chung SK (2003) Transgenic mice overexpressing aldose reductase in Schwann cells show more severe nerve conduction velocity deficit and oxidative stress under hyperglycemic stress. *Mol Cell Neurosci* **23**:638-647.
- Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**:70-71.
- Sotrel G, Helvacioğlu A, Dowers S, Scommegna A et Auletta FJ (1981) Mechanism of luteolysis: effect of estradiol and prostaglandin F2 alpha on corpus luteum luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and cyclic nucleotides in the rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* **139**:134-140.
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer, II et Smith WL (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* **273**:9886-9893.
- Spite M, Baba SP, Ahmed Y, Barski OA, Nijhawan K, Petrash JM, Bhatnagar A et Srivastava S (2007) Substrate specificity and catalytic efficiency of aldo-keto reductases with phospholipid aldehydes. *Biochem J* **405**:95-105.





- Spycher S, Tabataba-Vakili S, O'Donnell VB, Palomba L et Azzi A (1996) 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **226**:512-516.
- Spycher SE, Tabataba-Vakili S, O'Donnell VB, Palomba L et Azzi A (1997) Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells. *Faseb J* **11**:181-188.
- Srivastava S, Chandra A, Bhatnagar A, Srivastava SK et Ansari NH (1995) Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **217**:741-746.
- Srivastava S, Chandra A, Wang LF, Seifert WE, Jr., DaGue BB, Ansari NH, Srivastava SK et Bhatnagar A (1998a) Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart. *J Biol Chem* **273**:10893-10900.
- Srivastava S, Harter TM, Chandra A, Bhatnagar A, Srivastava SK et Petrash JM (1998b) Kinetic studies of FR-1, a growth factor-inducible aldo-keto reductase. *Biochemistry* **37**:12909-12917.
- Srivastava S, Watowich SJ, Petrash JM, Srivastava SK et Bhatnagar A (1999) Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. *Biochemistry* **38**:42-54.
- Srivastava S, Spite M, Trent JO, West MB, Ahmed Y et Bhatnagar A (2004) Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids. *J Biol Chem* **279**:53395-53406.
- Srivastava S, Ramana KV, Tammali R, Srivastava SK et Bhatnagar A (2006) Contribution of aldose reductase to diabetic hyperproliferation of vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **55**:901-910.
- Srivastava SK, Ramana KV et Bhatnagar A (2005) Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* **26**:380-392.
- Steuber H, Zentgraf M, La Motta C, Sartini S, Heine A et Klebe G (2007) Evidence for a novel binding site conformer of aldose reductase in ligand-bound state. *J Mol Biol* **369**:186-197.
- Stier CT, Jr., Roberts LJ, 2nd et Wong PY (1987) Renal response to 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **243**:487-491.
- Stocco C, Callegari E et Gibori G (2001) Opposite effect of prolactin and prostaglandin F(2 alpha) on the expression of luteal genes as revealed by rat cDNA expression array. *Endocrinology* **142**:4158-4161.
- Stocco C, Djiane J et Gibori G (2003) Prostaglandin F(2alpha) (PGF(2alpha)) and prolactin signaling: PGF(2alpha)-mediated inhibition of prolactin receptor expression in the Corpus luteum. *Endocrinology* **144**:3301-3305.
- Stocco C (2004) In vivo and in vitro inhibition of cyp19 gene expression by prostaglandin F2alpha in murine luteal cells: implication of GATA-4. *Endocrinology* **145**:4957-4966.
- Stocco C, Telleria C et Gibori G (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* **28**:117-149.
- Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF et Gibori G (2000) Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* **275**:37202-37211.
- Stocco CO, Lau LF et Gibori G (2002) A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* **277**:3293-3302.
- Sugimoto Y, Hasumoto K, Namba T, Irie A, Katsuyama M, Negishi M, Kakizuka A, Narumiya S et Ichikawa A (1994) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J Biol Chem* **269**:1356-1360.
- Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A



- et Narumiya S (1997) Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* **277**:681-683.
- Suzuki T, Fujii Y, Miyano M, Chen LY, Takahashi T et Watanabe K (1999) cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. *J Biol Chem* **274**:241-248.
- Suzuki-Yamamoto T, Nishizawa M, Fukui M, Okuda-Ashitaka E, Nakajima T, Ito S et Watanabe K (1999) cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett* **462**:335-340.
- Takahashi M, Fujii J, Miyoshi E, Hoshi A et Taniguchi N (1995) Elevation of aldose reductase gene expression in rat primary hepatoma and hepatoma cell lines: implication in detoxification of cytotoxic aldehydes. *Int J Cancer* **62**:749-754.
- Takatori T et Yamaoka A (1978) Effects of prostaglandins on the metabolism of cholesteryl ester in rat testes: changes in the synthesis and hydrolysis of cholesteryl ester and the activity of cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Endocrinol* **79**:41-48.
- Takemoto M, He L, Norlin J, Patrakka J, Xiao Z, Petrova T, Bondjers C, Asp J, Wallgard E, Sun Y, Samuelsson T, Mostad P, Lundin S, Miura N, Sado Y, Alitalo K, Quaggin SE, Tryggvason K et Betsholtz C (2006) Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *Embo J* **25**:1160-1174.
- Tammali R, Ramana KV, Singhal SS, Awasthi S et Srivastava SK (2006) Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin e2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res* **66**:9705-9713.
- Tammali R, Ramana KV et Srivastava SK (2007) Aldose reductase regulates TNF-alpha-induced PGE2 production in human colon cancer cells. *Cancer Lett* **252**:299-306.
- Tanabe T et Tohnai N (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:95-114.
- Taragnat C, Berger M et Jean C (1988) Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. *J Reprod Fertil* **83**:835-842.
- Thieme H, Schimmat C, Munzer G, Boxberger M, Fromm M, Pfeiffer N et Rosenthal R (2006) Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F2alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:938-945.
- Tirard J, Gout J, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A, Begeot M et Naville D (2007) A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* **148**:1996-2005.
- Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, Rene-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C et Bertherat J (2005) Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* **65**:7622-7627.
- Tokuda H, Niwa M, Ishisaki A, Nakajima K, Ito H, Kato K et Kozawa O (2004) Involvement of stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) in prostaglandin F2alpha-induced heat shock protein 27 in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**:441-447.
- Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Usui T, Murakami N, Fukushima M, Nakai Y, Hirai Y et Imura H (1991) Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology* **128**:526-531.
- Tripiciano A, Filippini A, Ballarini F et Palombi F (1998) Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2alpha. *Mol Cell Endocrinol* **138**:143-150.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M et Margioris AN (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* **38**:1654-1661.
- Tsuboi K, Sugimoto Y, Iwane A, Yamamoto K, Yamamoto S et Ichikawa A (2000) Uterine expression of prostaglandin H2 synthase in late pregnancy and during parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Endocrinology* **141**:315-324.



- Turnbull AV et Rivier CL (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* **79**:1-71.
- Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y et Kudo I (2001) Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. *J Biol Chem* **276**:34918-34927.
- Ueno N, Takegoshi Y, Kamei D, Kudo I et Murakami M (2005) Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:70-76.
- Ulug U, Goldman S, Ben-Shlomo I et Shalev E (2001) Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F(2alpha) and indomethacin. *Mol Hum Reprod* **7**:1187-1193.
- Urzhumtsev A, Tete-Favier F, Mitschler A, Barbanton J, Barth P, Urzhumtseva L, Biellmann JF, Podjarny A et Moras D (1997) A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* **5**:601-612.
- Val P, Aigueperse C, Lefrancois-Martinez AM, Jean C, Veyssiere G et Martinez A (2002a) Role of three SF-1 binding sites in the expression of the mvdp/akr1-b7 isocaproaldehyde reductase in Y1 cells. *Endocr Res* **28**:527-533.
- Val P, Martinez A, Sahut-Barnola I, Jean C, Veyssiere G et Lefrancois-Martinez AM (2002b) A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvdp/akr1-b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. *Endocrinology* **143**:3435-3448.
- Val P, Aigueperse C, Ragazzon B, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM et Martinez A (2004) Adrenocorticotropin/3',5'-cyclic AMP-mediated transcription of the scavenger akr1-b7 gene in adrenocortical cells is dependent on three functionally distinct steroidogenic factor-1-responsive elements. *Endocrinology* **145**:508-518.
- Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Robinson B, Stangebye LA et Deck LM (1990) Aldehyde and aldose reductases from human placenta. Heterogeneous expression of multiple enzyme forms. *J Biol Chem* **265**:10912-10918.
- Vander Jagt DL, Kolb NS, Vander Jagt TJ, Chino J, Martinez FJ, Hunsaker LA et Royer RE (1995) Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochim Biophys Acta* **1249**:117-126.
- Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J, Caira F, Veyssiere G, Mangelsdorf DJ et Lobaccaro JM (2004) Regulation of the aldo-keto reductase gene akr1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* **18**:888-898.
- Walch L, Clavarino E et Morris PL (2003) Prostaglandin (PG) FP and EP1 receptors mediate PGF2alpha and PGE2 regulation of interleukin-1beta expression in Leydig cell progenitors. *Endocrinology* **144**:1284-1291.
- Wang Z, Tamura K, Yoshie M, Tamura H, Imakawa K et Kogo H (2003) Prostaglandin F2alpha-induced functional regression of the corpus luteum and apoptosis in rodents. *J Pharmacol Sci* **92**:19-27.
- Warren JC, Murdock GL, Ma Y, Goodman SR et Zimmer WE (1993) Molecular cloning of testicular 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: identity with aldose reductase. *Biochemistry* **32**:1401-1406.
- Watanabe K, Yoshida R, Shimizu T et Hayaishi O (1985) Enzymatic formation of prostaglandin F2 alpha from prostaglandin H2 and D2. Purification and properties of prostaglandin F synthetase from bovine lung. *J Biol Chem* **260**:7035-7041.
- Watanabe K, Iguchi Y, Iguchi S, Arai Y, Hayaishi O et Roberts LJ, 2nd (1986) Stereospecific conversion of prostaglandin D2 to (5Z,13E)-(15S)-9 alpha,11 beta,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid (9 alpha,11 beta-prostaglandin F2) and of prostaglandin H2 to



- prostaglandin F2 alpha by bovine lung prostaglandin F synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:1583-1587.
- Watanabe K, Fujii Y, Nakayama K, Ohkubo H, Kuramitsu S, Kagamiyama H, Nakanishi S et Hayaishi O (1988) Structural similarity of bovine lung prostaglandin F synthase to lens epsilon-crystallin of the European common frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:11-15.
- Watanabe K (2002) Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:401-407.
- Watanabe T, Nakao A, Emerling D, Hashimoto Y, Tsukamoto K, Horie Y, Kinoshita M et Kurokawa K (1994) Prostaglandin F2 alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca(2+)-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *J Biol Chem* **269**:17619-17625.
- Weber MM, Michl P, Auernhammer CJ et Engelhardt D (1997) Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells. *Endocrinology* **138**:2207-2210.
- Weinreb RN, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Tsukahara S et Lindsey JD (1997) Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:2772-2780.
- Weinreb RN, Toris CB, Gabelt BT, Lindsey JD et Kaufman PL (2002) Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol* **47 Suppl 1**:S53-64.
- Weinreb RN, Lindsey JD, Marchenko G, Marchenko N, Angert M et Strongin A (2004) Prostaglandin FP agonists alter metalloproteinase gene expression in sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:4368-4377.
- Wendling WW et Harakal C (1991) Effects of prostaglandin F2 alpha and thromboxane A2 analogue on bovine cerebral arterial tone and calcium fluxes. *Stroke* **22**:66-72.
- Wermuth B (1981) Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J Biol Chem* **256**:1206-1213.
- Wilson DK, Bohren KM, Gabbay KH et Quioco FA (1992) An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **257**:81-84.
- Wilson DK, Tarle I, Petrash JM et Quioco FA (1993) Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9847-9851.
- Wilson DK, Nakano T, Petrash JM et Quioco FA (1995) 1.7 Å structure of FR-1, a fibroblast growth factor-induced member of the aldo-keto reductase family, complexed with coenzyme and inhibitor. *Biochemistry* **34**:14323-14330.
- Wiltbank MC, Shiao TF, Bergfelt DR et Ginther OJ (1995) Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod* **52**:74-78.
- Winter JS, Gow KW, Perry YS et Greenberg AH (1990) A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. *Endocrinology* **127**:1904-1909.
- Wintergalen N, Thole HH, Galla HJ et Schlegel W (1995) Prostaglandin-E2 9-reductase from corpus luteum of pseudopregnant rabbit is a member of the aldo-keto reductase superfamily featuring 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Eur J Biochem* **234**:264-270.
- Woenckhaus M, Klein-Hitpass L, Grepmeier U, Merk J, Pfeifer M, Wild P, Bettstetter M, Wuensch P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F et Dietmaier W (2006) Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol* **210**:192-204.
- Wong PY (1981) Purification and partial characterization of prostaglandin D2 11-keto reductase in rabbit liver. *Biochim Biophys Acta* **659**:169-178.





- Wurtman RJ et Axelrod J (1966) Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* **241**:2301-2305.
- Yabe-Nishimura C, Nishinaka T, Iwata K et Seo HG (2003) Up-regulation of aldose reductase by the substrate, methylglyoxal. *Chem Biol Interact* **143-144**:317-323.
- Yadav UC, Srivastava SK et Ramana KV (2007) Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:4634-4642.
- Yadav VK, Lakshmi G et Medhamurthy R (2005) Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* **280**:10357-10367.
- Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada Ri R, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C et Kokai Y (2001) Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* **124**:2448-2458.
- Yamamoto M, Hashimoto J, Takaba H et Miyake K (1987) Response of the isolated human seminiferous tubule to prostaglandins F<sub>1</sub> alpha, F<sub>2</sub> alpha, E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>. *J Urol* **137**:345-348.
- Yan R, Zu X, Ma J, Liu Z, Adeyanju M et Cao D (2007) Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention. *Int J Cancer*.
- Yang JY, Tam WY, Tam S, Guo H, Wu X, Li G, Chau JF, Klein JD, Chung SK, Sands JM et Chung SS (2006) Genetic restoration of aldose reductase to the collecting tubules restores maturation of the urine concentrating mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**:F186-195.
- Ye Q, Hyndman D, Li X, Flynn TG et Jia Z (2000) Crystal structure of CHO reductase, a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proteins* **38**:41-48.
- Yew SF, Reeves KA et Woodward B (1998) Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on intracellular pH, intracellular calcium, cell shortening and L-type calcium currents in rat myocytes. *Cardiovasc Res* **40**:538-545.
- Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Takemura M, Wada Y, Sato T, Ito A et Fujii S (2002) Prostaglandin F<sub>2</sub>(alpha), cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* **8**:681-687.
- Yoshitake H, Takahashi M, Ishikawa H, Nojima M, Iwanari H, Watanabe A, Aburatani H, Yoshida K, Ishi K, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Kodama T et Araki Y (2007) Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*.
- Zeindl-Eberhart E, Jungblut PR, Otto A, Kerler R et Rabes HM (1997) Further characterization of a rat hepatoma-derived aldose-reductase-like protein--organ distribution and modulation in vitro. *Eur J Biochem* **247**:792-800.
- Zeindl-Eberhart E, Klugbauer S, Dimitrijevic N, Jungblut PR, Lamer S et Rabes HM (2001) Proteome analysis of rat hepatomas: carcinogen-dependent tumor-associated protein variants. *Electrophoresis* **22**:3009-3018.
- Zook TE et Strandhoy JW (1981) Mechanisms of the natriuretic and diuretic effects of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *J Pharmacol Exp Ther* **217**:674-680.
- Zu X, Yan R, Robbins S, Krishack PA, Liao DF et Cao D (2007) Reduced 293T cell susceptibility to acrolein due to aldose reductase-like-1 protein expression. *Toxicol Sci* **97**:562-568.
- Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K et Morohashi K (2006) Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prepl complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol* **26**:4111-4121.



# **ANNEXE**



**Prostaglandin F<sub>2α</sub> synthase activities of members of 1B subfamily of  
aldose-keto reductases**

Zakayi Kabututu,<sup>1</sup> Michèle Manin,<sup>2</sup> Jean-Christophe Pointud,<sup>2</sup> Toshihiko Maruyama,<sup>1</sup>  
Nanae Nagata,<sup>1</sup> Sarah Lambert,<sup>2</sup> Anne-Marie Lefrançois-Martinez,<sup>2</sup> Antoine Martinez,<sup>2</sup>  
and Yoshihiro Urade<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, 6-2-4  
Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan*

<sup>2</sup>*CNRS, UMR6247 - Genetic, Reproduction & Development (GReD) ; Clermont  
University ; 24 avenue des Landais, 63177 Aubière, France*

**Running title:** Aldose reductases with prostaglandin F<sub>2α</sub> synthase activity

**Key words:** prostaglandin F<sub>2α</sub>, prostaglandin H<sub>2</sub>, prostaglandin H<sub>2</sub> F<sub>2α</sub>-reductase,  
tolrestat, sorbinil, aldose reductase.

---

\* To whom correspondence should be addressed. Tel. +81-6-6872-4851. Fax: +81-6-6872-2841. E-mail:

[uradey@obi.ne.jp](mailto:uradey@obi.ne.jp)



## Summary

The enzymes responsible for the production of prostaglandin (PG)  $F_{2\alpha}$  in mammalian organisms have not been clearly characterized. In the present study, we show that 3 enzymes belonging to the 1B group of the aldo-keto reductase (AKR) superfamily, i.e., human placental aldose reductase (AKR1B1), mouse kidney aldose reductase (AKR1B3), and mouse *vas deferens* protein (AKR1B7), catalyze the reduction of  $PGH_2$ , a common intermediate of various prostanoids, to form  $PGF_{2\alpha}$ , in the presence of NADPH. However, 2 other members of the 1B group, mouse fibroblast growth factor 1-induced protein (AKR1B8) and human small intestine reductase (AKR1B10), did not show the  $PGF$  synthase activity. AKR1B1, AKR1B3, and AKR1B7 displayed higher affinities for  $PGH_2$  ( $K_m = 2, 9, \text{ and } 4 \mu\text{M}$ , respectively) and  $V_{\text{max}}$  values (26, 53, and 44 nmol/min/mg protein, respectively) than did human  $PGF_{2\alpha}$  synthase (AKR1C3 ; 18  $\mu\text{M}$  and 4 nmol/min/mg protein, respectively). The  $PGF_{2\alpha}$  synthase activity of AKR1B1 and AKR1B3 was efficiently inhibited by 2 AKR inhibitors, tolrestat ( $IC_{50} = 3 \text{ and } 2 \mu\text{M}$ , respectively) and sorbinil ( $IC_{50} = 24 \text{ and } 6 \mu\text{M}$ , respectively), in a reaction that was not competitive, whereas that of AKR1B7 was not sensitive to these inhibitors ( $IC_{50} = 15,000 \mu\text{M}$  for both inhibitors). These data are useful for further investigation of the functional roles of these AKR members in the production of  $PGF_{2\alpha}$  in mammals.





## 1. Introduction

Prostaglandins (PGs) are oxygenated polyunsaturated 20-carbon fatty acids containing a cyclopentane ring. They are derived from arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids released from phospholipids within biomembranes by the action of phospholipases. In the arachidonate cascade,  $\text{PGH}_2$  synthase (cyclooxygenase, COX) catalyzes the di-oxygenation of arachidonic acid to  $\text{PGG}_2$  and the subsequent peroxidation from  $\text{PGG}_2$  to  $\text{PGH}_2$ , an unstable common intermediate for various prostanoids of the 2 series [1].  $\text{PGH}_2$  is readily converted to various prostanoids, such as  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$ , and thromboxane  $\text{A}_2$ , by the action of each prostanoid synthase.

In mammalian systems,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is actively produced in many tissues and plays various important biological roles such as the contraction of uterine, bronchial, vascular, and arterial smooth muscle [2] ; regulation of intraocular pressure [3], renal filtration [4], and the ovarian cycle through induction of luteolysis [5] ; stimulation of hair growth [6] ; and inhibition of adipose differentiation [7]. However, the mechanism for the production of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in mammalian organisms is not clearly understood. Three different pathways have been reported in terms of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production [2], i.e., 9,11-endoperoxide reduction of  $\text{PGH}_2$ , 9-ketoreduction of  $\text{PGE}_2$ , and 11-ketoreduction of  $\text{PGD}_2$  (Fig. 1) ; although the last results in the production of  $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$ , a stereo-isomer of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  [8].

The conversion of the 9,11-endoperoxide group of  $\text{PGH}_2$  to 9- and 11-hydroxy groups of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is catalyzed by  $\text{PGF}$  synthase (PGFS). This pathway is considered to be the most selective one for the production of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  among the 3 possible pathways of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production. Most enzymes known to catalyze this conversion belong to the aldo-



keto reductase (AKR) superfamily, which comprises monomeric proteins that bind nicotinamide cofactors. AKR proteins are widely distributed in mammals, amphibians, plants, yeast, protozoa, and bacteria, and metabolize a number of substrates including aldehydes, monosaccharides, steroids, polycyclic hydrocarbons, isoflavonoids, and PGs [9]. To date, PGFS activity has been demonstrated for various AKR members. In mammals, AKR1C subfamily enzymes with PGFS activity were isolated from bovine lung [10] and liver [10, 11], as well as sheep uterus [12], and were also identified in human lung [13]. Protozoan enzymes designated as AKR5A2 and AKR5A1 were isolated from *Trypanosoma brucei* [14] and the old-world species of *Leishmania* [15], respectively.

Aldose reductase, the prototype of AKR1B subfamily, named AKR1B1 in human and AKR1B3 in mouse, is the first and rate-limiting enzyme of the polyol pathway that reduces glucose to sorbitol and contribute to secondary diabetic complications [16]. In addition, AKR1B subfamily enzymes catalyze the reduction of toxic aldehydes generated by several metabolic pathways including lipid peroxidation and steroidogenesis with much better efficiency than the reduction of glucose, supporting the view that they are components of a cellular antioxidant defense mechanism [17, 18]. However, recent evidences suggest that members of the AKR1B subfamily may also be endowed with PGFS activity. Indeed, the bovine aldose reductase, AKR1B5, was shown to cumulate both 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity and catalytic ability to produce PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in endometrium [19]. Beside the canonical aldose reductases (AR) with ubiquitous expressions (AKR1B1, AKR1B3, AKR1B5), a second group named aldose reductase-like proteins (ARLP) have been characterized on the basis of sequence homology (at least 60-70% identity with AR).



Several ARLP differing from AR by both a poor efficiency in reducing glucose and a more tissue-restricted expression have been identified in mouse, AKR1B7 [20-22], AKR1B8 [23] and in human, AKR1B10 [24, 25]. In this study, we examined whether human and murine AKR1B members could produce PGF<sub>2α</sub> from PGH<sub>2</sub>. We report that in human and mouse species, the canonical aldose reductases AKR1B1 and AKR1B3 are efficient PGFS and mouse AKR1B7 is the sole aldose reductase-like endowed with this activity.

## 2. Materials and Methods

### *Expression and purification of recombinant AKR enzymes*

Open reading frames of *AKR1B1*, *-B3*, *-B7*, *-B8*, and *-B10* were inserted between *EcoRI* and *NdeI* restriction sites of the expression vector pET-28a and used for transformation of *E. coli* BL21DE3. Transformed cells were precultured overnight at 30 °C. Induction was started by the addition of 1 mM IPTG once the OD value at 600 nm of the cultures had reached 0.5-0.6. The cultures were maintained at 30°C for 5 hrs. Recombinant proteins were purified by chromatography with Ni-NTA His-Bind resin (Novagen) according to the manufacturer's protocol. Each resulting recombinant protein was then applied to a Hiloal 16/60 Superdex 200 pg gel filtration column (Amersham Biosciences) and eluted with PBS. AKR1C3 was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

Protein purity was assessed by SDS-PAGE on 12.5 % gels after staining with Coomassie Brilliant Blue. Protein concentration was determined by bicinchinonic acid protein assay.



### *Enzyme assays*

The PGFS activity was determined as described previously by Kubata *et al.* (2000) [14]. In brief, the purified recombinant enzymes (20 µg) were incubated at 37°C for 2 min with 10 µM [1-<sup>14</sup>C] PGH<sub>2</sub> in the presence of 500 µM NADPH in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. The reaction was stopped by the addition of 300 µl of a solution consisting of diethyl ether/methanol/2 M citric acid (30:4:1 vol/vol/vol). The PG products were extracted, and then separated by TLC or HPLC as described previously [26]. *p*-Nitrobenzaldehyde reductase activities of AKR1B enzymes were determined spectrophotometrically as reported previously [14]. For enzyme inhibition assays, AKR1B enzymes were incubated with various concentrations of tolrestat or sorbinil.

### *LC-MS Analysis*

LC-MS analyses of PGF<sub>2α</sub> were performed by using a Waters Alliance LC-MS system equipped with a 2690 separation module, 996 photodiode array, ZQ4000 mass detectors, and an Inertsil-ODS3 2.1 X 250-mm column (GL Sciences Inc.) that had a 37 °C column temperature. PGF<sub>2α</sub> was generated as described above, by incubating 100 µg of cold 9,11-endoperoxide PGH<sub>2</sub> (Cayman Chemical) with 200 µg recombinant AKR1B proteins. The product was then extracted, dried, and resuspended in 100 µl of ethanol, and then applied to the column.

## 3. Results

### *Heterologous expression of AKR1B enzymes in Escherichia coli*





Recombinant AKR1B1, -B3, -B7, -B8, and -B10 proteins were expressed in *E. coli* and purified to apparent homogeneity as described in Materials and Methods. The purified proteins migrated as single bands of similar mobility on SDS-PAGE indicating a molecular mass of about 35,000 (Fig. 2A). This mass is in agreement with the calculated molecular masses of 35,722, 35,615, 35,844, 35,989 and 35,890, respectively, and smaller than that of human PGF<sub>2α</sub> synthase AKR1C3, which is 36,842 [13].

#### *Formation of PGF<sub>2α</sub> from PGH<sub>2</sub> by AKR1B enzymes*

To test the ability of AKR1B proteins to catalyze the formation of PGF<sub>2α</sub>, we incubated these proteins with [1-<sup>14</sup>C] PGH<sub>2</sub> in the presence of NADPH and analyzed the reaction products by thin-layer chromatography (TLC, Fig. 2B). AKR1B1, -B3, and -B7, but not -B8 or -B10, reduced the 9,11-endoperoxide group of PGH<sub>2</sub> to produce PGF<sub>2α</sub>. Heat treatment at 100°C for 5 min completely inactivated the PGFS activity of AKR1B1, -B3, and -B7. This PGFS activity was strictly dependent on the presence of NADPH. Although AKR1B8 and -B10 lacked PGFS activity, both proteins catalyzed the reduction of *p*-nitrobenzaldehyde ; and this activity was inhibited by tolrestat and sorbinil, as shown later in Table II. Thus, the inability of AKR1B8 and -B10 to synthesize PGF<sub>2α</sub> from PGH<sub>2</sub> was not due to the inactivation during the preparation of the recombinant proteins but rather to an intrinsic property of these enzymes. Interestingly, as opposed to previously reported AKR activities, the PGFS activity of AKR1B7 was not dependent on NADH [27].

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis (Fig. 3) revealed that the product of catalytic activity of AKR1B1 toward PGH<sub>2</sub> eluted at the same position as that of genuine PGF<sub>2α</sub>. Mass spectrometric analysis showed that AKR1B1-



derived PGF<sub>2α</sub> displayed a negative ion ([M-H]<sup>-</sup>) identical to genuine PGF<sub>2α</sub> at m/z 353.2 (Fig. 3, right column). A similar elution profile as well as mass pattern was obtained when AKR1B3 or -B7 was used for the enzyme assays (data not shown). These data provide evidence that the reaction product from AKR1B-catalyzed reduction of PGH<sub>2</sub> was indeed PGF<sub>2α</sub>.

#### *Kinetic parameters of AKR1B-catalyzed PGFS activity*

We next determined the kinetic parameters of the PGFS activity of AKR1B proteins. As summarized in Table I, AKR1B1, -B3, and -B7 showed  $K_m$  values for PGH<sub>2</sub> of 2, 9, and 4 μM, respectively, which were clearly lower than that value of the human PGFS classified as AKR1C3 (18 μM). The  $K_m$  values of AKR1B1, -B3, and -B7 for NADPH were 6, 7, and 9 μM, respectively. The  $V_{max}$  values of the PGFS activity of AKR1B1, -B3, and -B7 (26, 53, and 44 nmol/min/mg protein, respectively) were 7-, 13-, and 11-fold higher than that value of AKR1C3 (4 nmol/min/mg protein).

#### *Inhibition of the PGFS activity of AKR1B proteins by tolrestat and sorbinil*

We then examined the inhibitory effect of tolrestat and sorbinil, 2 well-studied aldose reductase inhibitors (ARI), on the PGFS activity of AKR1B1, -B3, and -B7 (Table II). Tolrestat was 8- and 3-fold more potent than sorbinil as an inhibitor of the PGFS activity of AKR1B1 and -B3, respectively (respective IC<sub>50</sub> values of 3 and 2 μM for tolrestat and 24 and 6 μM for sorbinil). However, both tolrestat and sorbinil only weakly inhibited the PGFS activity of AKR1B7, with a calculated IC<sub>50</sub> value of 15 mM. These results are in agreement with those reported by Lefrançois-Martinez *et al.* (1999) [27], who showed that the NADH-linked isocaproaldehyde reductase activity of AKR1B7 was insensitive to ARI. On the other hand, the *p*-nitrobenzaldehyde reductase



activities of AKR1B8 and -B10 were efficiently inhibited by tolrestat ( $IC_{50} = 26$  and  $3$  nM, respectively) and less so by sorbinil ( $IC_{50} = 150$  and  $1.3 \mu\text{M}$ , respectively), although neither AKR showed the PGFS activity.

We then determined the mode of inhibition of the PGFS activities of AKR1B1, -B3, and -B7 by the 2 ARIs. Tolrestat inhibited the PGFS activity of AKR1B1 in a non-competitive manner, as demonstrated by the decrease in  $V_{\text{max}}$  without a change in  $K_m$  for  $\text{PGH}_2$  (Fig. 4A). The inhibition profile of AKR1B1 by sorbinil was characterized as a mixed type mechanism of inhibition, resulting in a decrease in  $V_{\text{max}}$  coupled to a decrease in  $K_m$  values (Fig. 4B). Tolrestat and sorbinil also inhibited the PGFS activity of both AKR1B3 (Fig. 4C and 4D, respectively) and -B7 (Fig. 4E and 4F, respectively) in a non-competitive fashion. These results suggest that the substrate  $\text{PGH}_2$  and the inhibitors bound to different sites of these AKR1B enzymes.

#### 4. Discussion

Here, we demonstrated that the PGFS activity catalyzed by AKR1B1, -B3, and -B7 ( $K_m$  for  $\text{PGH}_2 = 2, 9,$  and  $4 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}} = 26, 53,$  and  $44$  nmol/min/mg protein, respectively) was higher than that of the human PGFS classified as AKR1C3 ( $K_m$  for  $\text{PGH}_2 = 18 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}} = 4$  nmol/min/mg protein). The fact that AKR1B1, -B3, and -B7 exhibited similar PGFS enzymatic properties suggests that they may share common catalytic mechanisms for the reduction of the  $\text{PGH}_2$  substrate. Amino-acid sequence alignment of AKR1B1, -B3, and -B7 revealed about 70% sequence identity, whereas these enzymes are known to be 47% identical to AKR1C3 and 24% to AKR5A2 [27, 28]. X-ray crystallographic structures of members of the AKR superfamily have already



shown a common three-dimensional fold known as the  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel fold [28-31]. Combined with amino-acid sequence alignments and site-directed mutagenesis, these crystallographic studies identified 4 highly conserved amino-acid residues in the active site of AKR1B/AKR1C proteins [9], i.e., Asp-43/50, Tyr-48/55, Lys-77/84, and His-110/117, (Fig. 5). The general arrangement of this catalytic tetrad is well conserved among AKR members and shows proximity of Tyr-48/55 and His-110/117 to the C-4 position of the nicotinamide ring of NAD(P)H cofactor in the enzyme active site. Recently reported crystal structures of PGFS, such as those of AKR1C3 and AKR5C2, have provided a wealth of information on the catalytic activity of AKR members in the presence of prostaglandin substrates [28, 32]. Like in the AKR-catalyzed oxidation/reduction reaction for other substrates, the role of Tyr-55 or His-117 of the human PGFS (AKR1C3) as the general acid catalyst was shown to be protonation of the carbonyl O-11 of PGD<sub>2</sub> [32]. Interestingly, in the *T. brucei* PGFS (AKR5A2)-catalyzed reaction, His-110 acts as the general acid catalyst for the reduction of the PGH<sub>2</sub> substrate ; whereas Tyr-52 plays this role in the reduction of the carbonyl substrate 9,10-phenanthrenequinone [28]. (Our preliminary mutagenetic studies on AKR1B1 suggest that His-110 acts as the proton donor to the O-11 position of PGH<sub>2</sub> while O-9 receives a hydride from the NADPH cofactor to generate PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Thus, the catalytic mechanism for the reduction of PGH<sub>2</sub> by AKR1B1 seems to be closer to that of *T. brucei* PGFS than to that of the human PGFS, AKR1C3.) Interestingly, we found that murine AKR1B8 and human AKR1B10 lacked PGFS activity although they shared at least 70% identity with human AKR1B1, murine AKR1B3/B7 and bovine AKR1B5. It can be assumed that the ability to use PGH<sub>2</sub> as a substrate is linked to amino acids residues conserved among AKR1B members with PGFS activity. The sequences





comparison revealed that only two residues conserved in this latter group were found to diverge in AKR1B8 and AKR1B10: Val-130 and Hist-312 were substituted by Ile or Ala, and by Asp, respectively (Fig. 5). Importantly, these substitutions laid within loops A and C, two structures that were shown to protrude from the  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel and to face each other and that were proposed to ensure proper orientation of specific substrates in the active site [29, 33, 34].

Crystal structures of the complexes of AKR1B1 with ARI, such as sorbinil, tolrestat or zopolrestat, revealed that these inhibitors bind to the active site of AKR through their polar heads near the NADPH-binding site. In contrast, their hydrophobic moieties either bind to the native active site in the case of sorbinil or protrude into a pocket opened by conformational changes in the walls of the active site cleft and bind there in the case of tolrestat or zopolrestat [35, 36]. As tolrestat and sorbinil inhibited the PGFS activity of AKR1B1 and AKR1B3 with  $IC_{50}$  values of 2 to 24  $\mu$ M, resulting in non-competitive and mixed-type inhibition profiles, respectively, the ternary complex structures of AKR-NADPH-ARI and AKR-NADPH-PGH<sub>2</sub>/PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  analogues might be useful to determine the binding mode of PGH<sub>2</sub> to the catalytic site of these AKR enzymes. At last, the PGFS activity of AKR1B7 was remarkably resistant to inhibition by tolrestat and sorbinil ( $IC_{50}$  = 15 mM), suggesting that mode of binding of PGH<sub>2</sub> and ARI to AKR1B7 was largely different from that in the case of AKR1B1 and AKR1B3.

Members of the AKR1B subfamily are clearly different from each other in terms of their ability to produce PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  from PGH<sub>2</sub>. This PGFS activity could make them direct actors of cell signaling with potentially autocrine, paracrine or endocrine actions. Interestingly, PGFS activity was carried by the canonical and widely expressed aldose reductases in different species *e.g.* human (AKR1B1), mouse (AKR1B3) (present data)



and bovine (AKR1B5) [19]. By contrast, within the tissue-restricted aldose reductase-like proteins (human AKR1B10 and mouse AKR1B7 and -B8) only the mouse AKR1B7 was shown to exhibit PGFS activity. Collectively these data imply that the mechanisms by which aldose reductases contribute to cellular protection in physiological conditions or to chronic tissue lesions in diabetic complications should be re-examined with respect to their PGFS activity [16-18]. Indeed, ARI attenuated most hyperglycemia-induced osmotic and oxidative stress linked to activation of the polyol pathway in diabetic mice models [37-41], in diabetic patients [42, 43] and in cultured cells from kidney [44], vascular tissue [45-47], retina [48] or nerve [49]. However, as we showed here, PGFS activity of AKR1B1 and AKR1B3 is sensitive to classical ARI, indicating that in the absence of selective inhibitors discriminating the different catalytic activities, it will be impossible to decipher the respective part of the polyol pathway activation, aldehyde detoxification and  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthesis in the protective or deleterious functions of aldose reductases. Although AKR1B7 was initially characterized as a mouse *vas deferens* androgen- dependent protein, adrenal cortex expression and ACTH responsiveness of AKR1B7 were two features conserved among rodents [50, 51]. In this steroidogenic gland, AKR1B7 was proposed to ensure the detoxification of isocaproaldehyde, a steroid biosynthesis byproduct [27]. Interestingly, this function appeared to be taken in charge by the aldose reductase AKR1B1 in human adrenocortical cells where its expression is also sensitive to ACTH/cAMP signaling pathway [52]. The possibility that these two proteins could share some regulating functions on adrenal gland endocrine activities through production of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  remains a crucial question to address as the role of this prostanoid in adrenal physiology is completely unknown. By contrast, in the adipose tissue,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is a well known and



potent inhibitor of adipocyte differentiation [7, 53, 54]. Recently, we found that AKR1B7 was expressed in preadipocyte-enriched fractions obtained from periepididymal and peri-adrenal adipose tissues [55]. In the same study, we also found that expression of AKR1B7 was down-regulated during the differentiation of adipose stromal cells in primary culture. Over-expression of AKR1B7 in 3T3 preadipocytes inhibited their differentiation to adipocytes whereas knock-down accelerated adipogenic differentiation. Taken together with our present data, these observations support the possibility that the PGFS activity of AKR1B7 may be recruited to maintain a pool of pre-adipocytes and somehow repress the triggering of adipogenic differentiation.

In conclusion, our data show that certain members of the AKR1B sub-family can now be considered as genuine PGFSs in human and mouse species. This finding sheds new light on the way by which members of AKR1B sub-family modulate various physiological functions, *e.g.* renal filtration, reproduction, adipose tissue homeostasis or steroidogenesis, and could influence the onset of diabetic complications.

## Acknowledgements

This work was supported in part by the Japan Society for the Promotion of Science Postdoctoral Fellowship (no. 02271 to Z. K), Takeda Foundation (to M. M.), Osaka City and Fondation pour la Recherche Medicale (to S. L.). We thank Dr. Michael Lazarus and Dr. Bruno K. Kubata, Osaka Bioscience Institute, for their assistance during the early stage of this research ; Ms. Yukiko Kusakari and Dr. Tsuyoshi Inoue, Osaka University, for discussion on the chemical reaction of AKR enzymes ; and Megumi Yamaguchi, Megumi Yamada, and Taeko Nishimoto, Osaka Bioscience Institute, for



secretarial assistance. Finally we thank Dr. P. Val (CNRS UMR6247 - GReD, France) for critical reading of the manuscript.





## References

- 1 Smith, W. L. and Song, I. (2002) Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**, 115-28
- 2 Watanabe, K. (2002) Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**, 401-7
- 3 Crawford, K., Kaufman, P. L. and Gabelt, B. T. (1987) *Curr Eye Res* **6**, 1035-44
- 4 Weber, P. C. (1980) *Contrib Nephrol* **23**, 83-92
- 5 McCracken, J. A., Custer, E. E. and Lamsa, J. C. (1999) *Physiol Rev* **79**, 263-323
- 6 Sasaki, S., Hozumi, Y. and Kondo, S. (2005) *Exp Dermatol* **14**, 323-8
- 7 Serrero, G., Lepak, N. M. and Goodrich, S. P. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **183**, 438-42
- 8 Liston, T. E., Oates, J. A. and Roberts, L. J., 2nd. (1985) *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **15**, 365-7
- 9 Jez, J. M., Flynn, T. G. and Penning, T. M. (1997) *Biochem Pharmacol* **54**, 639-47
- 10 Suzuki, T., Fujii, Y., Miyano, M., Chen, L. Y., Takahashi, T. and Watanabe, K. (1999) *J Biol Chem* **274**, 241-8
- 11 Kuchinke, W., Barski, O., Watanabe, K. and Hayaishi, O. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **183**, 1238-46
- 12 Wu, W. X., Ma, X. H., Yoshizato, T., Shinozuka, N. and Nathanielsz, P. W. (2001) *J Soc Gynecol Investig* **8**, 69-76
- 13 Suzuki-Yamamoto, T., Nishizawa, M., Fukui, M., Okuda-Ashitaka, E., Nakajima, T., Ito, S. and Watanabe, K. (1999) *FEBS Lett* **462**, 335-40
- 14 Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2000) *J Exp Med* **192**, 1327-38
- 15 Kabututu, Z., Martin, S. K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C. J., Duszenko, M., Lazarus, M., Thuita, L. W., Urade, Y. and Kubata, B. K. (2003) *Int J Parasitol* **33**, 221-8
- 16 Yabe-Nishimura, C. (1998) *Pharmacol Rev* **50**, 21-33
- 17 Srivastava, S. K., Ramana, K. V. and Bhatnagar, A. (2005) *Endocr Rev* **26**, 380-92
- 18 Spite, M., Baba, S. P., Ahmed, Y., Barski, O. A., Nijhawan, K., Petrash, J. M., Bhatnagar, A. and Srivastava, S. (2007) *Biochem J* **405**, 95-105
- 19 Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J. A. and Fortier, M. A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 11205-12
- 20 Taragnat, C., Berger, M. and Jean, C. (1988) *J Reprod Fertil* **83**, 835-42
- 21 Pailhoux, E. A., Martinez, A., Veysiere, G. M. and Jean, C. G. (1990) *J Biol Chem* **265**, 19932-6
- 22 Lau, E. T., Cao, D., Lin, C., Chung, S. K. and Chung, S. S. (1995) *Biochem J* **312 ( Pt 2)**, 609-15
- 23 Donohue, P. J., Alberts, G. F., Hampton, B. S. and Winkles, J. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 8604-9
- 24 Cao, D., Fan, S. T. and Chung, S. S. (1998) *J Biol Chem* **273**, 11429-35
- 25 Hyndman, D. J. and Flynn, T. G. (1998) *Biochim Biophys Acta* **1399**, 198-202



- 26 Kilunga Kubata, B., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Mitamura, T., Tai, K., Hayaishi, O. and Horii, T. (1998) *J Exp Med* **188**, 1197-202
- 27 Lefrancois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssiere, G. and Jean, C. (1999) *J Biol Chem* **274**, 32875-80
- 28 Kilunga, K. B., Inoue, T., Okano, Y., Kabututu, Z., Martin, S. K., Lazarus, M., Duszenko, M., Sumii, Y., Kusakari, Y., Matsumura, H., Kai, Y., Sugiyama, S., Inaka, K., Inui, T. and Urade, Y. (2005) *J Biol Chem* **280**, 26371-82
- 29 Wilson, D. K., Bohren, K. M., Gabbay, K. H. and Quijcho, F. A. (1992) *Science* **257**, 81-4
- 30 Wilson, D. K., Nakano, T., Petrash, J. M. and Quijcho, F. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 14323-30
- 31 Hoog, S. S., Pawlowski, J. E., Alzari, P. M., Penning, T. M. and Lewis, M. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2517-21
- 32 Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K. and Takusagawa, F. (2004) *Biochemistry* **43**, 2188-98
- 33 Rondeau, J. M., Tete-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J. M., Barth, P., Biellmann, J. F. and Moras, D. (1992) *Nature* **355**, 469-72
- 34 Borhani, D. W., Harter, T. M. and Petrash, J. M. (1992) *J Biol Chem* **267**, 24841-7
- 35 Nakano, T. and Petrash, J. M. (1996) *Biochemistry* **35**, 11196-202
- 36 Urzhumtsev, A., Tete-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J. F., Podjarny, A. and Moras, D. (1997) *Structure* **5**, 601-12
- 37 Lee, A. Y., Chung, S. K. and Chung, S. S. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2780-4
- 38 Yagihashi, S., Yamagishi, S., Wada, R., Sugimoto, K., Baba, M., Wong, H. G., Fujimoto, J., Nishimura, C. and Kokai, Y. (1996) *Diabetes* **45**, 56-9
- 39 Yagihashi, S., Yamagishi, S. I., Wada, R., Baba, M., Hohman, T. C., Yabe-Nishimura, C. and Kokai, Y. (2001) *Brain* **124**, 2448-58
- 40 Song, Z., Fu, D. T., Chan, Y. S., Leung, S., Chung, S. S. and Chung, S. K. (2003) *Mol Cell Neurosci* **23**, 638-47
- 41 Ho, E. C., Lam, K. S., Chen, Y. S., Yip, J. C., Arvindakshan, M., Yamagishi, S., Yagihashi, S., Oates, P. J., Ellery, C. A., Chung, S. S. and Chung, S. K. (2006) *Diabetes* **55**, 1946-53
- 42 Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. (1999) *Diabetes* **48**, 1-9
- 43 Parry, G. J. (1999) *Am J Med* **107**, 27S-33S
- 44 Ishii, H., Tada, H. and Isogai, S. (1998) *Diabetologia* **41**, 362-4
- 45 Ramana, K. V., Friedrich, B., Srivastava, S., Bhatnagar, A. and Srivastava, S. K. (2004) *Diabetes* **53**, 2910-20
- 46 Ramana, K. V., Friedrich, B., Tammali, R., West, M. B., Bhatnagar, A. and Srivastava, S. K. (2005) *Diabetes* **54**, 818-29
- 47 Srivastava, S., Ramana, K. V., Tammali, R., Srivastava, S. K. and Bhatnagar, A. (2006) *Diabetes* **55**, 901-10
- 48 Miwa, K., Nakamura, J., Hamada, Y., Naruse, K., Nakashima, E., Kato, K., Kasuya, Y., Yasuda, Y., Kamiya, H. and Hotta, N. (2003) *Diabetes Res Clin Pract* **60**, 1-9



- 49 Kamiya, H., Nakamura, J., Hamada, Y., Nakashima, E., Naruse, K., Kato, K., Yasuda, Y. and Hotta, N. (2003) *Diabetes Metab Res Rev* **19**, 131-9
- 50 Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssiere, G. and Jean, C. I. (1999) *J Endocrinol* **160**, 147-54
- 51 Val, P., Martinez, A., Sahut-Barnola, I., Jean, C., Veyssiere, G. and Lefrancois-Martinez, A. M. (2002) *Endocrinology* **143**, 3435-48
- 52 Lefrancois-Martinez, A. M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallo-Payet, N., Hyndman, D., Veyssiere, G., Bertagna, X., Jean, C. and Martinez, A. (2004) *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3010-9
- 53 Lepak, N. M. and Serrero, G. (1993) *Prostaglandins* **46**, 511-7
- 54 Casimir, D. A., Miller, C. W. and Ntambi, J. M. (1996) *Differentiation* **60**, 203-10
- 55 Tirard, J., Gout, J., Lefrancois-Martinez, A. M., Martinez, A., Begeot, M. and Naville, D. (2007) *Endocrinology* **148**, 1996-2005



**Table 1:**  
Kinetic parameters of PGFS and AKR activity catalyzed by members of the AKR superfamily

Protein	PGFS activity			AKR activity	
	PGH <sub>2</sub>		NADPH	<i>p</i> -nitrobenzaldehyde	
	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>V<sub>max</sub></i> (nmol/min/mg)	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>V<sub>max</sub></i> (nmol/min/mg)
AKR1B1	2	26	6	9.1	417.5
AKR1B3	9	53	7	6.4	481.5
AKR1B7	4	44	9	9.0	52.4
AKR1C3	18	3.9	ND <sup>a</sup>	16.7	74.1

<sup>a</sup>ND=not determined.





**Table II:**IC<sub>50</sub> (μM) of tolrestat and sorbinil for the inhibition of AKR enzymes

Enzyme	PGH <sub>2</sub>		<i>p</i> -nitrobenzaldehyde	
	Tolrestat	Sorbinil	Tolrestat	Sorbinil
AKR1B1	3	24	0.17	0.48
AKR1B3	2	6	0.30	0.38
AKR1B7	15,000	15,000	> 500	3700
AKR1B8	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	0.026	150
AKR1B10	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	0.003	1.3

<sup>a</sup>ND=not determined.



## Legends of figures

### **Fig. 1 : PGF<sub>2α</sub> biosynthetic pathways**

**Fig. 2: PGFS activity of recombinant AKR1B proteins.** AKR1B1, -B3, -B7, -B8, and -B10 proteins were expressed in *E. coli* and purified as described in Materials and Methods. **(A)** SDS-PAGE of purified recombinant AKR1B1, -B3, -B7, -B8, -B10, and AKR1C3 ; M, molecular mass marker proteins. **(B)** Autoradiogram of TLC after incubation of AKR1B proteins with 1-[<sup>14</sup>C] PGH<sub>2</sub>. The substrate, 10 μM 1-[<sup>14</sup>C] PGH<sub>2</sub>, was incubated with the purified AKR1B proteins (each 20 μg) in the presence of 0.5 mM NADPH at 37°C for 2 min.

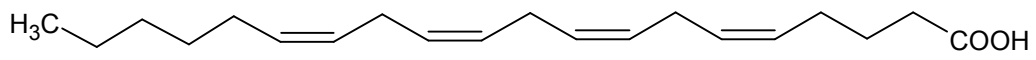
**Fig. 3: Molecular identification of AKR1B-generated PGF<sub>2α</sub>.** Elution profiles by LC (**left column**) of genuine PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, and PGH<sub>2</sub> (**top**) and of the products from PGH<sub>2</sub> after incubation without (**center**) and with (**bottom**) AKR1B1. Mass spectra of the [MH]<sup>+</sup> ions (**right column**) of genuine PGH<sub>2</sub> (**top**), PGF<sub>2α</sub> (**center**), and AKR1B1-produced PGF<sub>2α</sub> (**bottom**).

**Fig. 4: Lineweaver-Burk plots of the inhibition of PGFS activity of AKR1B proteins by tolrestat and sorbinil.** AKR1B proteins (A and B, AKR1B1 ; C and D, AKR1B3 ; and E and F, AKR1B7) were incubated with 1-[<sup>14</sup>C] PGH<sub>2</sub> at 37 °C for 2 min in the presence of various concentrations of tolrestat (A, C, and E) or sorbinil (B, D, and F). TOL, tolrestat. SBI, sorbinil.



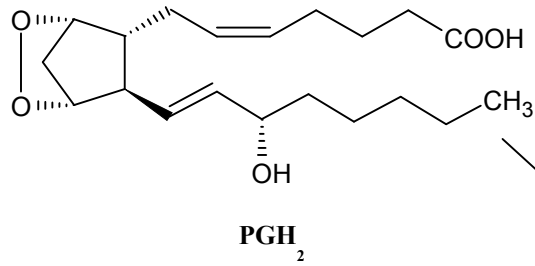
**Fig. 5 : Structural alignment of aldose reductase and aldose reductase-like members of the AKR1B sub-family.** Alignments were calculated with ClustalW program. Human AKR1B1, mouse AKR1B3 and bovine AKR1B5 are considered as canonical aldose reductases whereas mouse AKR1B7/B8 and human AKR1B10 belong to the aldose reductase-like group. Although the five proteins share at least 70% amino-acid sequence identity, AKR1B1, -B3, -B7 (present data) and AKR1B5 [19] were endowed with PGFS activity whereas AKR1B8 and -B10 (present data) were not. Open boxes point highly conserved amino-acids residues of the catalytic tetrad and grey tint boxes point residues conserved between AKR1B with PGFS activity and diverging in members without PGFS activity. The positions of the A, B and C loops derived from the aldose reductase tri-dimensional structure are indicated below the alignment. Amino-acids residues are numbered above the alignment. Conserved residues (\*), conservative substitutions (:), and partially conserved substitutions (.) are indicated below.



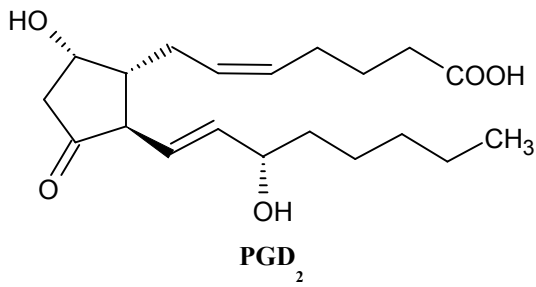


Arachidonic acid

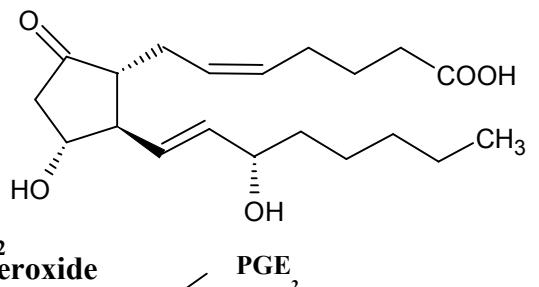
cyclooxygenase



PGH<sub>2</sub>



PGD<sub>2</sub>



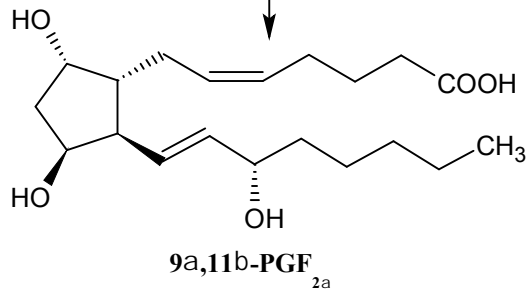
PGH<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub>

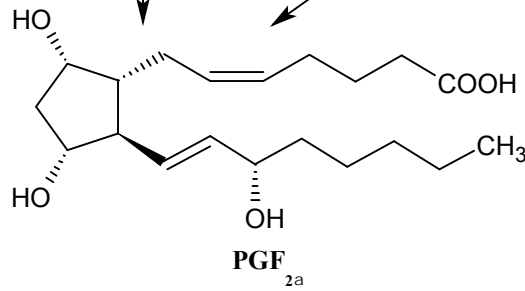
9-,11-endoperoxide reductase

PGE<sub>2</sub> 9-ketoreductase

PGD<sub>2</sub> 11-ketoreductase



9a,11b-PGF<sub>2a</sub>

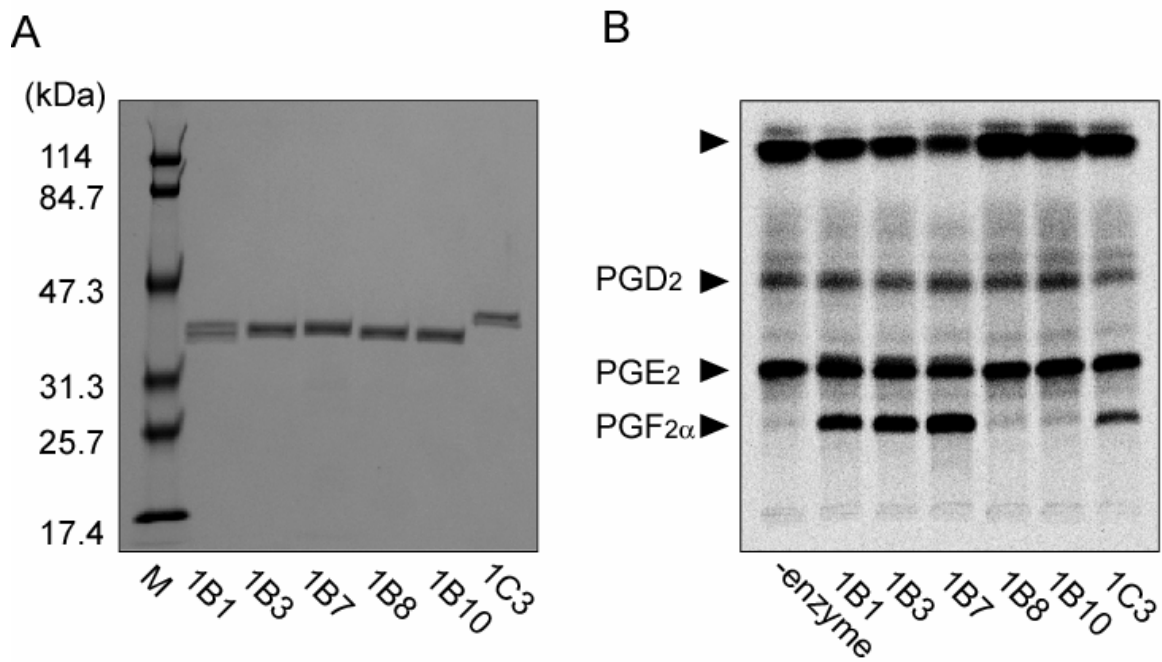


PGF<sub>2a</sub>



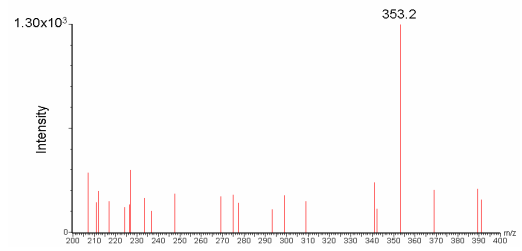
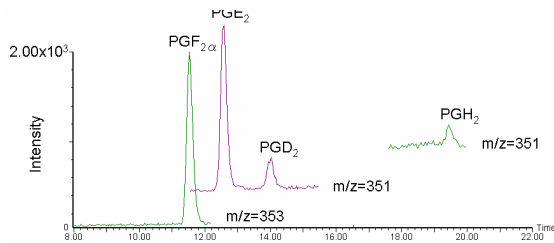
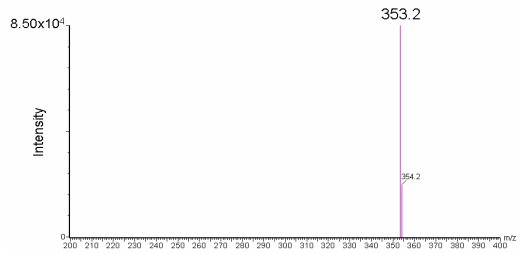
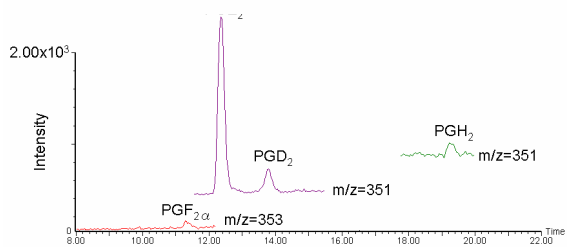
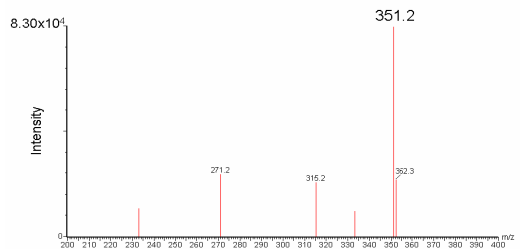
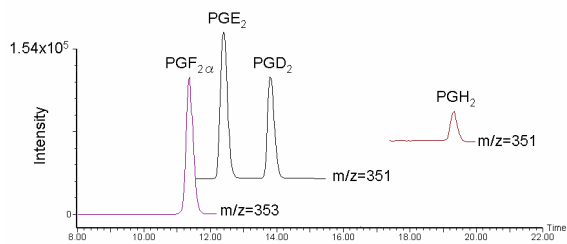


# Fig. 2





# Fig. 3









```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5          15          25          35          45          55
AKR1B1 ASRLLLNNGAKMPIGLGLGTWKSPPGQVTEAVKVAIDVGYRHIDCAHVYQNENEVGVAIQE
AKR1B3 ASHLELNNGTKMPTLGLGLGTWKSPPGQVTEAVKVAIDLGYRHIDCAQVYQNEKEVGVALQE
AKR1B5 ANHIVLYTGAKMPIGLGLGTWKSPPGKVTEAVKVAIDLGYRHIDCAHVYQNENEVGLALQA
AKR1B7 ATFVELSTKAKMPLVGLGLGTWKSPPGQVKEAVKAAIDAGYRHIDCAYVYHNENEVGEAIQE
AKR1B8 ATFVELSTKAKMPIVGLGLGTWKSPPNQVKEAVKAAIDAGYRHIDCAYAYCNENEVGEAIQE
AKR1B10 ATFVELSTKAKMPIVGLGLGTWKSPLGKVKEAVKVAIDAGYRHIDCAYVYQNEHEVGEAIQE
Clustal Co *. : * . :*** :*****. :*.****.* ** ***** . * **:* ** *:*

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      65          75          85          95          105          115
AKR1B1 KLREQVVKREELFIVSKLWCTYHEKGLVKGACQKTLSDLKLDYLDLYLIHWPTGFKPGKE
AKR1B3 KLKEQVVKRQDLFIVSKLWCTFHDKSMVKGAFQKTLSDLQLDYLDLYLIHWPTGFKPGPD
AKR1B5 KLQEKVVKREDLFIVSKLWCTYHDKDLVKGACQKTLSDLKLDYLDLYLIHWPTGFKPGKD
AKR1B7 KIKENAVKREDLFIVSKLWATFFFEKSLVKKAFQNTLSDLKLDYLDLYLVHWPOGFQAGNA
AKR1B8 KIKEKAVQREDLFIVSKLWPTCFEKKLLKEAFQKTLTDLKLDYLDLYLIHWPOGLQPGKE
AKR1B10 KIQEKAVKREDLFIVSKLWPTFFFERPLVRKAFEKTLKDLKLSYLDVYLIHWPOGFKSGDD
Clustal Co *::*:.*:.*:***** * .:: ::: * :*:.*:.*:*****:*** ** *:.:*

```

loop A

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      125          135          145          155          165          175
AKR1B1 FFPLDESGNVVPSDTNILDWAAMEELVDEGLVKAIGISNFNHLQVEMILNKPGLKYKPA
AKR1B3 YFPLDASGNVIPSDTDFVDTWTAMEQLVDEGLVKTIGVSNFNPLQIERILNKPGLKYKPA
AKR1B5 FFPLDEEDGNVIPSEKDFVDTWTAMEELVDEGLVKAIGVSNFNHLQVEKILNKPGLKYKPA
AKR1B7 LLPKDNKKGKVLKSTFLDAWEAMEELVDQGLVKALGIVSNFNHFQIERLLNKPGLKHKPV
AKR1B8 LFPKDDQGRILTSKTTFLAWEGMEELVDQGLVKALGVSFNFNHFQIERLLNKPGLKHKPV
AKR1B10 LFPKDDKGNVIGGKATFLDAWEAMEELVDEGLVKALGVSFNFSHFQIEKLLNKPGLKYKPV
Clustal Co :* * .*. :. . ::::* .**:*:***:****:***:***. :*: * :*****:***.

```

loop A

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      185          195          205          215          225          235
AKR1B1 VNQIECHPYLTQEKLQYQSKGIVVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSLLEDPRIKAIAAKH
AKR1B3 VNQIECHPYLTQEKLIEYCHSKGIVVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSLLEDPRIKAIAAKY
AKR1B5 VNQIECHPYLTQEKLQYQSKGIVVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSILEDPRIKAIADKY
AKR1B7 TNQIESHPYLTQEKLQYQSKGIAVTAYSPLGSPDRPYAKPEDPVVMEIPKIKEIAAKH
AKR1B8 TNQVECHPYLTQEKLQYCHSKGISVTAYSPLGSPDRPSAKPEDPSLLEDPKIKEIAAKH
AKR1B10 TNQVECHPYLTQEKLQYCHSKGITVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSLLEDPKIKEIAAKH
Clustal Co .**:*.******:***:*** ***** ***** ***** :*: * ** * *:*

```

loop B

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      245          255          265          275          285          295
AKR1B1 NKTAAQVLRIRFPMQRNLVVIKSVTPERIAENFKVDFDFELSSQDMTLLSYNRNWRVVAL
AKR1B3 NKTAAQVLRIRFPIQRNLVVIKSVTPVRIAENLKVDFDFEVSSEDMATLLSYNRNWRVVAL
AKR1B5 NKTAAQVLRIRFPIQRNLVVIKSVTPERIAENFKVDFDFELDKEDMNTLLSYNRDWRACAL
AKR1B7 KKTVAQVLRIRFHVQRNVVVIKSVTPSRIQENLQVDFDFQLSEEDMAAIIISFNRNWRACDL
AKR1B8 EKTTAAQVLRIRFHIQRNVVVIKSVTPSRIQENIQVDFDFQLSDEEMATILSFNRNWRACLL
AKR1B10 KKTAAQVLRIRFHIQRNVVVIKSVTPARIVENIQVDFDFKLSDEEMATILSFNRNWRACNV
Clustal Co :** ***** :***:***** ** **:*****:.....: * :*:***:***. * :

```

loop C

```

.....|.....|.....|.
      305          315
AKR1B1 LSCTSHKDYPFHHEEF
AKR1B3 MSCAKHKDYPFHAEV
AKR1B5 VSCASHRDYPFHHEEF
AKR1B7 LDARTEEDYPFHHEEY
AKR1B8 PETVNMEEYPYDAEY
AKR1B10 LQSSHLEDYPFHAEY
Clustal Co . :***. *

```

loop C



La protéine murine AKR1B7 appartient à la famille des aldose réductases. Par son expression limitée à un petit nombre de tissus et son contrôle hormonal, elle constitue un modèle de choix pour l'étude des fonctions physiologiques de cette famille enzymatique. D'une part, ces travaux de thèse ont permis de démontrer *ex vivo* le rôle de l'activité prostaglandine F synthase des aldose réductases murines et humaines dans la glande surrénale. Nous avons mis en évidence une nouvelle boucle de régulation négative des fonctions endocrines surrénaliennes qui utilise la prostaglandine F<sub>2alpha</sub> comme signal paracrine et/ou autocrine entre le cortex et la *medulla*. D'autre part, nous avons développé la première lignée de souris transgéniques exprimant spécifiquement la recombinaise Cre dans la cortico-surrénale pour réaliser l'inactivation conditionnelle de gènes dans ce tissu. Cette lignée constitue un outil très puissant pour la création de modèles murins de pathologies tumorales surrénaliennes.

The murine AKR1B7 protein belongs to the aldose reductase family. By its tissue-restricted expression and its tissue-specific hormonal regulation, it is a good model for the study of aldose reductase physiological functions. On the one hand, these doctoral work demonstrated *ex vivo* the role of murine and human aldose reductase prostaglandin F synthase activity in the adrenal gland. We highlighted a new feed-back loop between the cortex and the *medulla* using prostaglandin F<sub>2alpha</sub> as paracrine and/or autocrine signal. On the other hand, to achieve adrenal cortex specific inactivation of genes, we have developed the first transgenic mouse line showing specific Cre recombinase expression in this tissue. This line is a very powerful tool to create animal models of adrenal tumors.