



HAL
open science

Métabolisme et effets hépatoprotecteurs des dérivés de l'Anisyldithiolthione

Amor Sassi

► **To cite this version:**

Amor Sassi. Métabolisme et effets hépatoprotecteurs des dérivés de l'Anisyldithiolthione. Chimie thérapeutique. PARIS XI, 1986. Français. NNT: . tel-01246344v1

HAL Id: tel-01246344

<https://theses.hal.science/tel-01246344v1>

Submitted on 18 Dec 2015 (v1), last revised 19 Jul 2017 (v2)

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.

UNIVERSITE PARIS - SUD
UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année : 1985 - 1986

Série DOCTORAT n° 18

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

MENTION : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Monsieur Amor S A S S I

Titre de la thèse : METABOLISME ET ORIGINE DES EFFETS HEPATOPROTECTEURS
DES DERIVES DE L'ANISYLDITHIOLTHIONE.

Soutenue le : 17 avril 1986

Jury : M. Jean AGNERAY Président
M. Jacques HAKIM
M. Michel PLAT
Mme Marie-Odile CHRISTEN
M. Daniel MANSUY

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI

MENTION

Sciences pharmaceutiques et biologiques

RESUME DE LA THESE

Présentée par monsieur Amor SASSI

Sujet: Métabolisme et origine des effets hépatoprotecteurs des dérivés de l'anisyldithiolthione.

L'anisyldithiolthione (SULFARLEM, ADT) est utilisé comme cholérétique depuis 1947. Cette molécule n'est pas toxique chez l'homme. De plus, récemment, des propriétés hépatoprotectrices lui ont été attribuées en se basant sur le fait que l'ADT protège les souris contre la mortalité provoquée par le paracétamol ou le tétrachlorure de carbone (hépatotoxiques) (O.Foussard.Blanpin et M.O.Christen, résultats non publiés, LTM).

En 1983, Bueding a constaté que les taux des transaminoses sanguins chez des souris prétraitées par 500 mg/kg d'ADT puis intoxiquées par le paracétamol ou le tétrachlorure de carbone restent normaux. Ces taux augmentent chez des souris traitées uniquement par le tétrachlorure de carbone ou par le paracétamol. Ces résultats suggèrent que l'ADT prévient la cytolysse hépatique et confirment qu'il possède des propriétés hépatoprotectrices mais ne permettent pas d'expliquer les mécanismes par lesquels il agit. De plus, ces effets ont été constatés à des doses d'ADT très supérieures aux doses utilisées chez l'homme.

Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'origine des effets hépatoprotecteurs de l'ADT.

Le tétrachlorure de carbone et le paracétamol exercent leur toxicité hépatique en induisant une peroxydation des lipides qui produit des radicaux libres toxiques. D'où l'idée d'étudier l'effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite in vitro et in vivo.

Dans les expériences in vitro, des microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital ont été utilisés. La peroxydation des lipides microsomaux a été induite par une production de radicaux libres soit chimiquement, par le sulfate ferreux qui réduit O_2 en \bar{O}_2 soit enzymatiquement par la réduction du CCl_4 en $\cdot CCl_3$ en présence des cytochromes P-450 et de NADPH.

Nous avons montré que l'ADT est un bon inhibiteur de la peroxydation des lipides induite par le CCl_4 . Il exerce sur la peroxydation des lipides induite chimiquement un effet inhibiteur similaire. Dans ce système cette

inhibition ne peut s'expliquer que par un piégeage des radicaux libres (effet antioxydant). L'inhibition de la peroxydation des lipides n'est donc pas simplement due à un blocage du métabolisme du CCl_4 en $\cdot\text{CCl}_3$.

Dans le système chimique les produits testés vis à vis de la peroxydation de lipides ne sont pas métabolisés. Nous pouvons donc estimer l'activité spécifique du produit étudié. Ainsi, nous avons pu montrer, après une étude comparative de l'ADT et de certains de ses dérivés, que la structure dithiolthione est indispensable aux effets antioxydants de l'ADT.

Pour étudier l'effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides in vivo, nous avons mis au point un test permettant d'estimer la peroxydation des lipides chez l'animal vivant. Les lipides peroxydés se fragmentent en produisant des hydrocarbures volatils, notamment de l'éthane qui peut être dosé par chromatographie phase gazeuse dans l'air expiré par l'animal.

Nous avons utilisé le paracétamol et le CCl_4 pour induire une peroxydation des lipides hépatiques chez la souris et le rat, et le paraquat et la bléomycine pour induire une peroxydation des lipides pulmonaires.

Nous avons obtenu les premiers résultats montrant que l'ADT est un inhibiteur de la peroxydation des lipides induite in vivo. De plus, l'originalité de nos résultats est d'avoir montré que cet effet est exercé à des doses proches de celles utilisées en thérapeutique humaine. En effet à des doses de l'ordre de 1 mg/kg, l'ADT inhibe complètement la peroxydation des lipides induite chez la souris par 500 mg/kg de paracétamol. Cette inhibition s'accompagne d'une protection importante contre la mortalité (70% à 5 mg/kg) ou totale à des doses supérieures ou égales à 25mg/kg. Il est ainsi, le meilleur protecteur connu à ce jour vis à vis de l'hépatotoxicité du paracétamol.

L'ADT est aussi un inhibiteur efficace de la peroxydation des lipides hépatiques induite par le CCl_4 . Il inhibe moins efficacement celle des lipides pulmonaires induite par le paraquat ou par la bléomycine. Il est donc surtout un hépatoprotecteur. Néanmoins, le fait que l'ADT inhibe la peroxydation des lipides induite par la bléomycine prouve bien qu'il piège les radicaux libres formés in vivo. En effet, il est connu que la toxicité de la bléomycine est due à sa capacité de catalyser la production d' $\cdot\text{O}_2$ et non pas à une activation métabolique.

L'étude des effets de quelques analogues structuraux de l'ADT et de certains de ses dérivés sur la peroxydation des lipides a montré que la structure dithiolthione joue un rôle important dans les effets antioxydants de l'ADT in vivo.

La dernière partie de notre travail était l'étude du métabolisme et de la pharmacocinétique de l'ADT.

Nous avons identifié les métabolites formés après incubation de l'ADT radioactif en présence de microsomes hépatiques de rats et nous les avons synthétisés chimiquement.

Les métabolites éliminés dans les urines de rats traités par l'ADT radioactif ont été aussi isolés et identifiés.

Nous avons, enfin, mis au point des conditions de chromatographie liquide haute performance qui nous ont permis de doser en UV les métabolites de l'ADT dans le sang et les urines humaines.

La comparaison du métabolisme de l'ADT chez l'homme, la souris et le rat a montré qu'il subit chez ces trois espèces deux réactions importantes, une O-déméthylation et une désulfuration oxydative.

P L A N

I - INTRODUCTION GENERALE.....	p.
I-1 SULFARLEM : Structure chimique et indications thérapeutiques.....	p.
I-2 Les systèmes enzymatiques du métabolisme des xénobioti- ques.....	p.
I-2-1 La phase I et la phase II.....	p.
I-2-1-1 Les enzymes de la phase I.....	p.
I-2-1-2 Les enzymes de la phase II.....	p.
I-2-1-2-1 La glucuroconjugaison.....	p.
I-2-1-2-2 La sulfoconjugaison.....	p.
I-2-1-2-3 Formation d'acides mercaptu- riques.....	p.
I-2-1-3 Localisation subcellulaire et tissulaire du cytochrome P-450.....	p.
I-2-1-4 Multiplicité et inductibilité du cyto- chrome P-450.....	p.
I-2-1-5 Constitution d'une monooxygénase à cyto- chrome P-450.....	p.

a uny/6i

I-2-1-5-1	Le cytochrome P-450.....	p.
I-2-1-5-2	La NADPH cytochrome P-450 réductase.....	p.
I-2-1-5-3	Les lipides.....	p.
I-2-1-6	Cycle catalytique du cyt.P-450.....	p.
I-3	Toxicités dues à des agressions oxydantes : Implica- tion des dérivés de réduction de l'oxygène et rôle de la peroxydation des lipides.....	p.
I-3-1	Introduction.....	p.
I-3-2	Les dérivés de réduction de l'oxygène.....	p.
I-3-3	Production des dérivés de réduction de l'oxygène par une cellule aérobie à l'état physiologique normal.....	P.
I-3-3-1	Enzymes produisant H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$	p.
I-3-3-1-1	Production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 par la xanthine oxydase.....	p.
I-3-3-1-2	Production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 par la NADPH cyt.P-450 réductase.....	p.
I-3-3-1-3	Production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 par les cytochromes P-450.....	p.
I-3-3-2	Production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 par autoxyda- tion des constituants cellulaires.....	p.

I-3-3-2-1	Formation d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 au cours de l'autoxydation de l'hémoglobine et l'oxyhémoglobine.....	p.
I-3-3-2-2	Formation d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 dans les mitochondries par autoxydation de certains constituants de la chaîne respiratoire.....	p.
I-3-4	Rôle des dérivés de réduction de l'oxygène dans la peroxydation des lipides.....	p.
I-3-4-1	Introduction.....	p.
I-3-4-2	Mécanismes du déclenchement de la peroxydation des lipides.....	p.
I-3-4-2-1	La phase d'initiation.....	p.
I-3-4-2-2	La phase de propagation.....	p.
I-3-4-2-3	La phase de terminaison.....	p.
I-3-4-3	Produits formés lors de la peroxydation des lipides.....	p.
I-3-4-4	Techniques de mesure de la peroxydation des lipides.....	p.
I-3-4-4-1	Dosage du malondialdéhyde...	p.
I-3-4-4-2	Dosage des lipofuschines....	p.
I-3-4-4-3	Dosage de l'éthane et du pentane.....	p.

I-3-5	Les systèmes biologiques de défense contre les dérivés de réduction de l'oxygène.....	p.
I-3-5-1	Les superoxydes dismutases (SOD).....	p.
I-3-5-2	La catalase et la glutathion peroxydase	p.
I-3-5-3	Les caroténoïdes.....	p.
I-3-5-4	Les antioxydants.....	p.
	I-3-5-4-1 La vitamine E.....	p.
	I-3-5-4-2 Le GSH et l'acide ascorbique	p.
I-3-5-5	Autres systèmes de défense.....	p.
I-3-6	Rapport entre la production et la réduction des dérivés oxygénés réactifs à l'état physiologique normal.....	p.
I-3-7	Les causes de surproduction des dérivés de réduction de l'oxygène et le déclenchement de la peroxydation des lipides.....	p.
I-3-7-1	Composés exogènes agissant par surproduction d' $O_2^{\cdot-}$	p.
	I-3-7-1-1 Les sels de bipyridinium: Paraquat, diquat.....	p.
	I-3-7-1-2 Les dérivés aromatiques ou hétérocycliques nitrés : nitrofurantoiné, métronidazole.....	p.

I-3-7-1-3	Les dérivés quinoniques : Adriamycine, Ménadione.....	p.
I-3-7-2	Composés exogènes qui agissent par production de radicaux R [•] réactifs : CCl ₄	p.
I-3-7-3	Cas particulier du paracétamol.....	p.
I-3-8	Conséquences biochimiques de la peroxydation des lipides.....	p.
I-4	Buts et plan du travail	p.
I-4-1	Résumé des situations qui augmentent la production des dérivés de réduction de l'oxygène.....	p.
I-4-2	Buts.....	p.
I-4-3	Plan du travail.....	p.
1	Métabolisme in vitro et in vivo de l'ADT.....	p.
2	Comportement de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides.....	p.
2-1	in vitro.....	p.
2-2	in vivo.....	p.
3	Détermination des mécanismes biochimiques et chimiques de l'inhibition de la peroxydation des lipides par l'ADT.....	p.

II - METABOLISME ET PHARMACOCINETIQUE DE L'ADT.....	p.
II-1 Etude du métabolisme du $^{14}\text{C}_5$ -ADT in vitro.....	p.
II-1-1 Méthode employée.....	p.
II-1-2 Profil CLHP des métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT.....	p.
II-1-3 Détermination de la structure des métabolites d'ADT.....	p.
II-1-4 Etude comparative des proportions de chaque métabolite dans le milieu réactionnel en fonction du temps d'incubation.....	p.
II-1-5 Discussion des résultats du métabolisme de l'ADT in vitro.....	p.
II-2 Etude de l'élimination urinaire du $^{14}\text{C}_5$ -ADT chez le rat	p.
II-2-1 Méthode employée.....	p.
II-2-2 Profil CLHP des métabolites urinaires du $^{14}\text{C}_5$ -ADT	p.
II-2-3 Détermination de la nature des métabolites uri- naires de l'ADT.....	p.
II-2-4 Bilan de l'élimination urinaire et biliaire...	p.
II-2-5 Etude de l'influence de l'administration répétée de l'ADT chez le rat sur son propre métabolisme	p.
II-2-6 Discussion.....	p.

II-2-6-1	Discussion des principales transformations métaboliques que l'ADT subit avant son élimination dans les urines de rats.....	P.
II-2-6-2	Comparaison du métabolisme de l'Oltipraz et de l'ADT.....	P.
II-2-6-3	Discussion de l'effet de l'administration répétée de l'ADT aux rats sur son propre métabolisme.....	P.
II-2-6-4	Discussion des différences entre le métabolisme in vitro et in vivo de l'ADT.....	P.
II-3	Etude de l'élimination urinaire de l'ADT et de ses métabolites chez l'homme et la souris en utilisant de l'ADT non radioactif	P.
II-3-1	Analyse qualitative en CLHP des métabolites urinaires de l'ADT chez l'homme.....	P.
II-3-2	Caractérisation de la structure chimique des métabolites de l'ADT éliminés dans les urines humaines.....	P.
II-3-3	Dosage UV des métabolites de l'ADT dans les urines humaines.....	P.
II-3-4	Etude des métabolites d'ADT éliminés dans les urines de souris.....	P.
II-3-5	Discussion de l'élimination urinaire de l'ADT chez l'homme, la souris et le rat.....	P.

II-4	Etude succincte de la pharmacocinétique de l'ADT chez l'homme, la souris et le rat.....	p.
II-4-1	Etude effectuée chez le rat.....	p.
II-4-1-1	Nature des dérivés de l'ADT présents dans le sang de rat.....	p.
II-4-1-2	Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites d'ADT dans le sang de rats.....	p.
II-4-2	Etude effectuée chez la souris.....	p.
II-4-2-1	Nature des dérivés de l'ADT présents dans le sang de souris.....	p.
II-4-2-2	Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang de souris.....	p.
II-4-3	Etude effectuée chez l'homme.....	p.
II-4-3-1	Nature des dérivés de l'ADT présents dans le sang humain.....	p.
II-4-3-2	Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang humain.....	p.
II-4-4	Discussion des résultats de l'étude pharmacocinétique chez l'homme, la souris et le rat	p.

III - EFFETS DE L'ADT ET DE SES DERIVES SUR LA PEROXYDATION DES LIPIDES IN VITRO ET IN VIVO : ORIGINE DE SES EFFETS HEPATO- PROTECTEURS.....	p.
III-1 Etat du problème au début de l'étude.....	p.
III-2 Choix des modèles expérimentaux.....	p.
III-2-1 In vitro.....	p.
a - Induction de la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques par un système chimi- que constitué de sulfate ferreux et d'un réducteur.....	p.
b - Induction de la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques par un système enzy- matique utilisant la réduction de CCl_4 par les cyt P-450 comme moyen de production de radicaux.....	p.
III-2-1-1 Avantages et inconvénients du système CCl_4 + NADPH + microsomes.....	p.
III-2-1-2 Avantages et inconvénients des systè- mes chimiques.....	p.
III-2-2 In vivo.....	p.
III-2-2-1 Toxicité induite par le tétrachlorure de carbone.....	p.
III-2-2-2 Toxicité induite par le paracétamol	p.

III-2-2-3	Toxicité induite par le paraquat	p.
III-2-2-4	Toxicité induite par la bléomycine	p.
III-3	Etude des effets de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite in vitro.....	p.
III-3-1	Effet de l'ADT sur la production de malondialdéhyde (MDA) due à une peroxydation des lipides induite par la réduction enzymatique de CCl_4 dans des microsomes hépatiques de rats.....	p.
III-3-1-1	Cinétique de formation de malondialdéhyde par ce système.....	p.
III-3-1-2	Détermination de la relation entre la dose d'ADT et l'inhibition de la production de MDA.....	p.
III-3-2	Inhibition par l'ADT de la production de MDA au cours de la peroxydation des lipides induite chimiquement par FeSO_4 et un réducteur dans des microsomes hépatiques de rats.....	p.
III-3-2-1	Cinétique de formation de MDA par ces systèmes.....	p.
III-3-2-2	Détermination de la relation entre la dose d'ADT et l'inhibition de la production de MDA.....	p.
III-3-3	Comparaison de la capacité de l'ADT d'inhiber la peroxydation des lipides à celle d'antioxydants connus.....	p.

III-3-3-1	Résultats obtenus avec le système enzymatique.....	p.
III-3-3-2	Résultats obtenus avec les systèmes chimiques.....	p.
III-3-4	Comparaison de la capacité de l'ADT d'inhiber la peroxydation des lipides à celles de certains de ses dérivés et de l'Oltipraz	p.
III-3-4-1	Comparaison par rapport aux dérivés de l'ADT.....	p.
III-3-4-2	Comparaison des pouvoirs inhibiteurs de la peroxydation des lipides de l'ADT et de l'oltipraz.....	p.
III-3-5	Effet de l'ADT sur la production de C_2H_6 in vitro par des microsomes hépatiques de rats incubés en présence de NADPH et de CCl_4	p.
III-3-5-1	Cinétique de formation de C_2H_6	p.
III-3-5-2	Détermination de la relation entre la concentration de l'inhibiteur et l'effet sur la production d'éthane.....	p.
III-3-6	Discussion des résultats concernant les effets de l'ADT et de ses dérivés sur la peroxydation des lipides in vitro.....	p.
III-4	Effets de l'ADT et de ses dérivés sur la peroxydation des lipides induite, in vivo, par le tétrachlorure de carbone chez le rat.....	p.

III-4-1	Cinétique de production d'éthane par le rat intoxiqué par le CCl_4 comparativement à celle d'un rat témoin.....	p.
III-4-2	Effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite par le CCl_4 chez le rat.....	p.
III-4-3	Détermination de la relation entre la dose d'ADT et l'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides.....	p.
III-4-4	Comparaison des capacités de l'ADT d'inhiber la peroxydation des lipides induite chez le rat par le CCl_4 à celles de certains de ses dérivés.....	p.
III-5	Effets de l'ADT sur la mortalité et la peroxydation des lipides provoquées chez la souris par injection i.p. d'une dose toxique de paracétamol.....	p.
III-5-1	Cinétique de production d'éthane par la souris intoxiquée par le paracétamol comparativement à celle d'une souris témoin.....	p.
III-5-2	Effets de l'ADT injecté i.p. à la souris trois heures avant le paracétamol sur l'hépatotoxicité et la peroxydation des lipides.....	p.
III-5-2-1	Etude de l'inhibitoir de l'expiration d'éthane en fonction de la dose d'ADT	p.
III-5-2-2	Corrélation entre les doses d'ADT administrées aux souris, l'inhibition de la peroxydation des lipides et la protection vis-à-vis de la mortalité induite par le paracétamol.....	p.

III-5-3	Comparaison des effets hépatoprotecteurs et inhibiteurs de la peroxydation des lipides de l'ADT à ceux d'hépatoprotecteurs connus.....	p.
III-5-4	Comparaison des effets hépatoprotecteurs et inhibiteurs de la peroxydation des lipides, de l'ADT à ceux de ses dérivés et de l'oltipraz.....	p.
III-5-5	Effets de l'ADT, administré per os à des souris trois heures avant le paracétamol, sur l'hépatotoxicité et la peroxydation des lipides.....	p.
III-5-6	Effets de l'ADT vis-à-vis de la mortalité et de la peroxydation des lipides induites par le paracétamol chez la souris en fonction du temps d'administration i.p. de l'ADT par rapport au paracétamol	p.
III-5-6-1	Effets de la coadministration des deux produits.....	p.
III-5-6-2	Effets d'une administration de l'ADT postérieure à celle du paracétamol...	p.
III-5-6-3	Effets d'une administration prolongée de l'ADT mais longtemps avant le paracétamol.....	p.
III-6	Effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite chez la souris par le paraquat.....	p.
III-6-1	Cinétique de production d'éthane par des souris intoxiquées ou non par le paraquat.....	p.

III-6-2	Inhibition par l'ADT de la peroxydation des lipides induite chez la souris par injection de paraquat seul et de paraquat + FeSO ₄	p.
III-6-3	Discussion par rapport aux résultats obtenus avec le paracétamol.....	p.
III-7	Effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite chez la souris par la bléomycine.....	p.
IV -	CONCLUSION GENERALE.....	p.
IV-1	Origine des effets hépatoprotecteurs de l'ADT.....	p.
IV-2	Optimisation de l'effet protecteur de l'ADT.....	p.
IV-3	Facteurs structuraux responsables de l'hépatoprotection	p.
IV-4	Sélectivité de l'ADT vis-à-vis des organes.....	p.
IV-5	Spéculations et perspectives.....	p.
V -	PARTIE EXPERIMENTALE.....	p.
V-1	Préparation des microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.....	p.
V-2	Métabolisme de l'ADT in vitro.....	p.
V-2-1	Conditions opératoires.....	p.
V-2-2	Conditions d'analyse des métabolites en CLHP.....	p.
V-2-3	Dosage radioactif des métabolites du ¹⁴ C ₅ -ADT.....	p.

V-2-4	Isolement des métabolites de l'ADT et détermination de leur structure par spectrométrie de masse UV-visible et RMN ¹ H.....	p.
V-2-5	Synthèse des métabolites de l'ADT.....	p.
V-2-5-1	Synthèse du paraméthoxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène-3-one (Anéthole dithiolone, ADO)	p.
V-2-5-2	Synthèse du parahydroxyphényl-5-dithio-1,2-cyclopentène-3-thione (dmADT) et du parahydroxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène-3-one (dmADO)	p.
V-3	Etude de la pharmacocinétique et de l'élimination urinaire de l'ADT chez le rat, l'homme et la souris.....	p.
V-3-1	Administration de l'ADT et recueil des échantillons sanguins et urinaires.....	p.
V-3-1-1	Chez le rat.....	p.
V-3-1-2	Chez la souris.....	p.
V-3-1-3	Chez l'homme.....	p.
V-3-2	Traitement des échantillons sanguins et urinaires	p.
V-3-2-1	Incubation avec la sulfatase.....	p.
V-3-2-2	Incubation avec la glucuronidase.....	p.
V-3-3	Analyse en CLHP des urines avant et après traitement par la glucuronidase ou par la sulfatase.....	p.

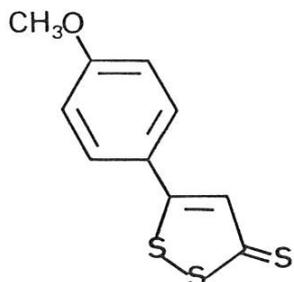
V-3-4	Dosage UV des métabolites sanguins ou urinaires après déconjugaison.....	p.
V-4	Inhibition de la peroxydation des lipides induite in vitro.....	p.
V-4-1	Conditions opératoires.....	p.
V-4-1-1	Inhibition de la production de malondialdéhyde (MDA) par des microsomes hépatiques de rats incubés en présence de FeSO_4 et de cystéine ou d'ascorbate.....	p.
V-4-1-2	Inhibition de la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques induite par la réduction métabolique de CCl_4 en présence de NADPH et de cytochrome P-450.....	p.
V-4-1-2-1	Inhibition de la production de MDA.....	p.
V-4-1-2-2	Inhibition de la production de C_2H_6	p.
V-4-2	Evaluation quantitative de la peroxydation des lipides microsomaux.....	p.
V-4-2-1	Mesure de la concentration de MDA.....	p.
V-4-2-2	Mesure du taux d'éthane.....	p.
V-5	Inhibition de la peroxydation des lipides induite in vivo	p.
V-5-1	Inhibition de la peroxydation des lipides chez le rat traité par le CCl_4	p.

V-5-2	Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par le paracétamol.....	p.
V-5-3	Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par le paraquat et FeSO_4	p.
V-5-4	Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par le paraquat seul.....	p.
V-5-5	Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par la bléomycine et FeSO_4	p.
V-5-6	Dispositif permettant l'accumulation de l'éthane expiré par l'animal au cours du temps.....	p.
V-5-7	Dosage de l'éthane en chromatographie gazeuse..	p.

REFERENCES.....	p.
-----------------	----

I - INTRODUCTION GENERALE

I-1 SULFARLEM^R : Structure chimique et indications thérapeutiques



p-méthoxyphényl-5 dithia-1,2 cyclopentène
3-thione (Anisyldithiolthione, ADT)

La molécule d'ADT est le seul principe actif médicamenteux présentant dans sa formule chimique le motif structural $\overset{\text{S}}{\text{C}}-\text{S}-\text{S}$. Elle entre dans la composition d'un médicament commercialisé pour la première fois en 1947 sous le nom de SULFARLEM. C'est un cholérétique proposé dans le traitement symptomatique des troubles dyspeptiques (1) :

- ballonnements épigastriques
- lenteur à la digestion
- éructations
- flatulences
- états nauséux

En 1971, le SULFARLEM S 25 est mis sur le marché. Il a la même composition chimique que le SULFARLEM sauf que la dose d'ADT est de 25 mg par comprimé dragéifié au lieu de 12,5 mg par granule dans le cas du SULFARLEM. On remarque aussi une extension de ses indications thérapeutiques. En plus de son utilisation en tant que cholérétique, il est indiqué dans le traitement des insuffisances salivaires induites par l'emploi de diverses thérapeutiques médicamenteuses ou par les irradiations, d'où son utilisation actuelle dans les cas (1) :

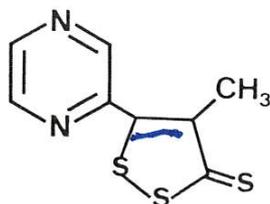
- d'hyposialies médicamenteuses dues aux neuroleptiques, antidépresseurs, inhibiteurs des monoaminoxydases, tranquillisants, antiparkinsoniens et autres médications entraînant des sécheresses buccales
- hyposialies consécutives à l'irradiation de la sphère ORL
- hyposialies d'origines diverses dès lors qu'il existe encore des possibilités de stimulation du parenchyme salivaire.

Malgré l'utilisation de l'ADT en médecine humaine depuis 1947, ses propriétés biochimiques ont été très peu étudiées.

Les rapports industriels internes de la firme Latéma mentionnent que le prétraitement de souris par l'ADT avant de leur injecter des fortes doses de tétrachlorure de carbone ou de paracétamol les protège contre la mortalité. Ces deux molécules étant des hépatotoxiques, la conclusion tirée est que l'ADT possède des propriétés hépatoprotectrices.

En dehors de ces résultats, les seuls travaux mentionnés dans la littérature, concernant les propriétés hépatoprotectrices de l'ADT, ont été publiés en 1983 (2) par Bueding et Coll. Ces auteurs constatent que les souris traitées par l'ADT avant de leur injecter de fortes doses de paracétamol ou de CCl_4 sont non seulement protégées contre la mortalité, mais aussi que les taux des transaminases glutamate-pyruvate et glutamate-oxaloacétate ainsi que de sorbitol deshydrogénase dans leur sang sont normaux. Ces taux augmentent chez les souris traitées uniquement par le CCl_4 ou le paracétamol. Ces résultats suggèrent que l'ADT prévient la cytolyse hépatique et confirment qu'il possède des propriétés hépatoprotectrices, mais ne permettent pas d'expliquer les mécanismes biochimiques par lesquels il agit.

D'un autre côté, le métabolisme des dithiolthiones est mal connu. Parmi cette famille de molécules, une seule a été bien étudiée, c'est la 4-méthyl-5(2-pyrazinyl)-1,2-dithiole-3-thione (OLTIPRAZ) (3).



En ce qui concerne l'ADT, les résultats d'une étude très incomplète de son métabolisme chez le rat et le chien nous ont été communiqués par la firme Latéma. Environ 25 % seulement de la dose d'ADT administrée ont été retrouvés dans les urines dont 0,5 % sous forme de produit initial et 6 % sous

forme d'ADT déméthylé, libre, sulfo ou glucuroconjugée. Les autres métabolites (93,5 % des métabolites urinaires) n'ont pas été identifiés.

Dans le sang, des dosages de la radioactivité globale ont été effectués après administration aux animaux de l'ADT radioactif, mais aucun métabolite n'a été identifié.

Ces résultats ne donnent aucune indication sur le métabolisme du cycle dithiolthione.

De plus, le métabolisme de l'Oltipraz ne donne pas de renseignements sur celui de l'ADT. En effet, la présence d'un méthyle sur le carbone 4 et d'une pyrazine sur le carbone 5 du cycle dithiolthione de l'Oltipraz au lieu d'un hydrogène et de l'anisole respectivement dans le cas de l'ADT change complètement les voies métaboliques que ces deux molécules subissent.

Etant données les carences de connaissances en ce qui concerne le métabolisme et les propriétés biochimiques du motif structural $C \overset{S}{=} S-S$ et l'utilisation de l'ADT depuis près de 40 ans en thérapeutique humaine sans engendrer de toxicité, nous nous sommes intéressés au métabolisme et aux activités biologiques de l'ADT et en particulier à l'implication du motif structural original ($C \overset{S}{=} S-S$) dans ses effets hépatoprotecteurs.

Notre étude comporte deux parties :

- l'étude du métabolisme de l'ADT
- l'effet de l'ADT et plus particulièrement du motif structural $C \overset{S}{=} S-S$ vis-à-vis des agressions oxydantes

I-2 Les systèmes enzymatiques du métabolisme des xénobiotiques

I-2-1 La phase I et la phase II

Les xénobiotiques possèdent généralement des groupements hydrophobes (R-H). Transportées au niveau sanguin par l'albumine (4), ces substances

TABLEAU 1

REACTIONS CATALISEES PAR LE CYTOCHROME P450 MICROSOMIQUE HEPATIQUE

D'APRES WISLOCKI ET COLL. (8)

TYPE DE REACTION	EXEMPLE DE SUBSTRAT	PRODUIT
<u>Réactions d'oxydations :</u>		
Hydroxylation aliphatique	Acide laurique Cyclo hexane Testosterone	Acide ω -hydroxy-laurique Cyclohexanol OH-testosterone
Oxydation aromatique	Benzène Benzo(a)pyrène Aniline	Phénol 3-OH benzo(a)pyrène 4-amino-phénol
Epoxydation d'alcenes	Aflatoxine B ₁	Epoxyde en 2-3
N-désalkylation et désamination oxydative	Benzphétamine Amphétamine	N-desméthyl-benzphé- tamine + Formol Phénylacétone
O-désalkylation	4 nitroanisole 7-éthoxycoumarine	4-nitro phénol + Formol 7-OH-coumarine + acétaldéhyde
N-oxydation	Amphétamines	N-OH amphétamines
Désulfuration oxydative	Parathion	Para-oxon
Déshalogénation oxydative	Chloroforme	Phosgène
Dénitrification oxydative	2-nitropropane	Acétone + nitrite
<u>Réactions de réduction :</u>		
Nitro réduction	RNO ₂	RNHOH
Azo réduction	Amaranthe	
Réduction des N-oxydes d'amines tertiaires	Imipramine N-oxyde	Imipramine
Réduction des arènes oxydes	Benzo(a)pyrène 4-5 oxyde	Benzo(a)pyrène
Déshalogénation réductive	Tétrachlorure de carbone	Chloroforme

pénètrent facilement dans les cellules. Dans le cytoplasme, le transport se fait grâce à la ligandine ou à la protéine Z (5). Ainsi, le composé parvient au réticulum endoplasmique où il peut être métabolisé par les enzymes de la phase I (fonctionnalisation). Il s'agit généralement d'hydroxylation par des monooxygénases à cytochrome P-450, puis par les enzymes de la phase II (conjugaison) (Figure 1). Au cours de ces deux phases, un xénobiotique subit des transformations sans lesquelles il serait stocké indéfiniment dans les structures lipophiles des membranes cellulaires. Ainsi transformé en métabolites plus polaires, il est éliminé plus facilement dans la bile ou dans les urines (6, 7).

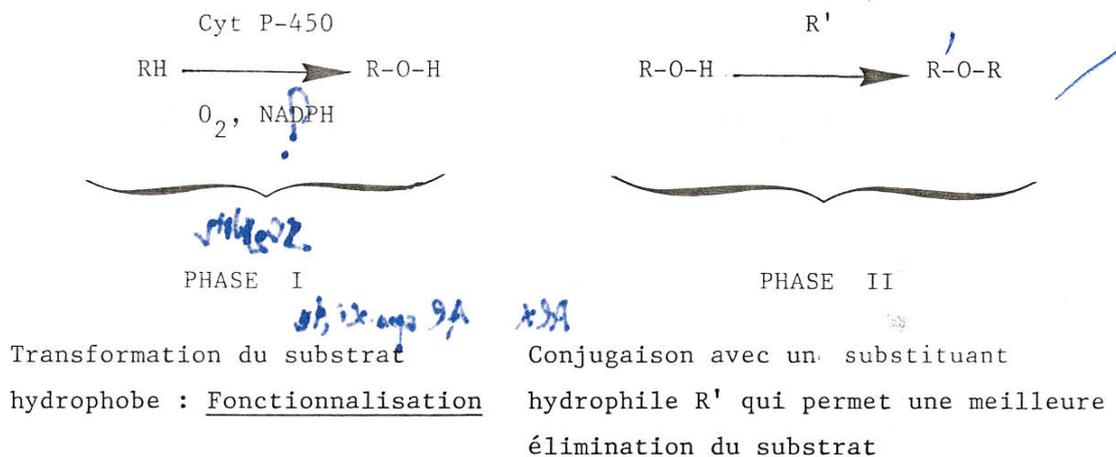


Figure 1 Schéma général du métabolisme d'un xénobiotique

I-2-1-1 Les enzymes de la phase I

Ce sont en général les monooxygénases dépendant du cytochrome P-450 (cyt.P-450). Ces enzymes dont le rôle général est d'introduire un atome d'oxygène sur la substance hydrophobe (Figure 1), peuvent catalyser plusieurs types de réactions qui sont résumées dans le Tableau 1 (8).

Ce tableau montre que le cytochrome P-450 peut agir comme catalyseur non seulement de réactions d'oxydation mais également de réactions de réduc-

PRINCIPALES REACTIONS DE CONJUGAISON

REACTION DE CONJUGAISON	FONCTION CONJUGUEE	REACTIF CONJUGANT
Glucuronidation	-OH, -COOH, -NH ₂ , R ₃ N	UDP glucuronate
Glucosidation	NH, R ₃ N ⁺ -H, -SH,	UDP glucose
Sulfatation	Ar-OH, Ar-NH ₂ , Al-OH	P.A.P.S.
Méthylation	Ar-OH, -NH ₂ , NH,=N, - SH	S-adénosylméthionine
Acétylation	ArNH ₂ , Al-NH ₂ ? hydrazides, -SO ₂ , -NH ₂ SC ₂ NH ₂	AcétylCoA
Synthèse des acides mercapturiques	ArX, Ar-NO ₂ , Ar-époxydes ArX Ar époxyde	G-SH
Conjugaison par la glycine et la glutamine	Ar-COOH, Al-COOH	Glycine et glutamine
Epoxyde hydrolase	Epoxydes	H ₂ O

D'après les Références 6 et 9.

Ar = Aromatique ; Al = Aliphatique

CoA = Coenzyme A

GSH = glutathion

PAPS = phosphoadénosylphosphosulfate

tion ; de plus, le tableau met bien en évidence la grande variété de substrats que cette enzyme est capable de transformer.

I-2-1-2 Les enzymes de la phase II

Les xénobiotiques subissent, selon leur structure chimique, différentes réactions de conjugaison catalysées par les enzymes de la phase II (Tableau 2). Trois de ces réactions nous intéressent directement et seront développées.

a - La sulfo et la glucuroconjugaison

Elles concernent les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques qui possèdent des fonctions - OH ou NH_2 ainsi que d'autres molécules (Tableau 2).

b - La conjugaison avec le glutathion (GSH)

Elle concerne les molécules électrophiles et aboutit à la formation de mercapturates.

Le résultat global est l'augmentation de l'hydrophilie de la molécule exogène hydrophobe permettant ainsi son élimination (6, 7, 9).

I-2-1-2-1 La glucuroconjugaison (10)

La plupart des xénobiotiques sont éliminés en majorité sous forme de glucuronides. La glucuronidation est une réaction de condensation de l'acide D-glucuronique sur la molécule à éliminer. Elle nécessite une activation de l'acide glucuronique en acide α -uridine-5'-diphosphoglucuronique (AUDPG). Les molécules glucuronidées sont plus acides que les molécules de départ grâce au groupement carboxylique libre qu'elles acquièrent (Figure 2). Les glucuronides sont de ce fait plus ionisés à pH physiologique. Ce genre de composés traverse difficilement les membranes cellulaires et ne subit

Figure 2 : Glucuronidation d'un substrat fonctionnalisé RXH : cas particulier du phénol (10)

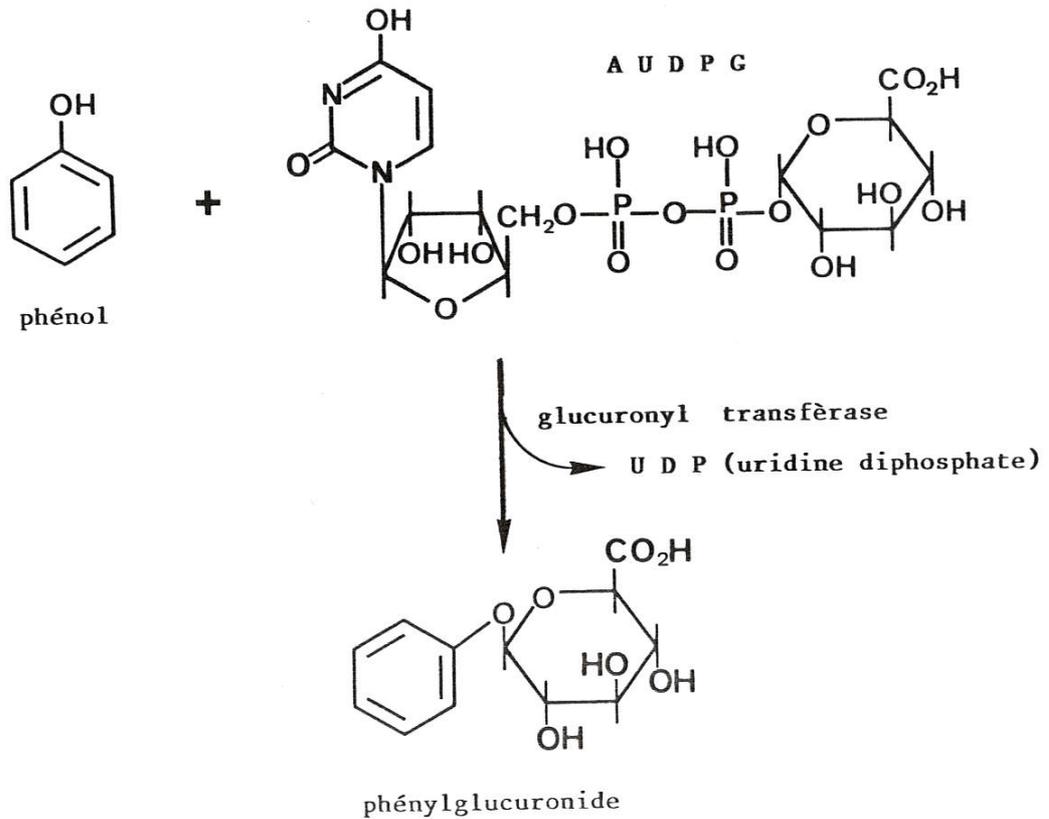
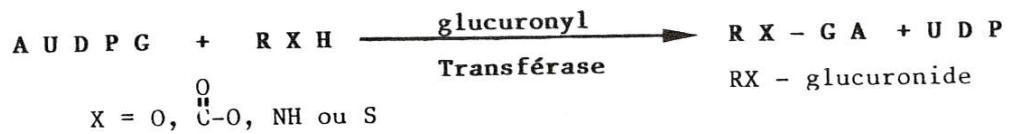
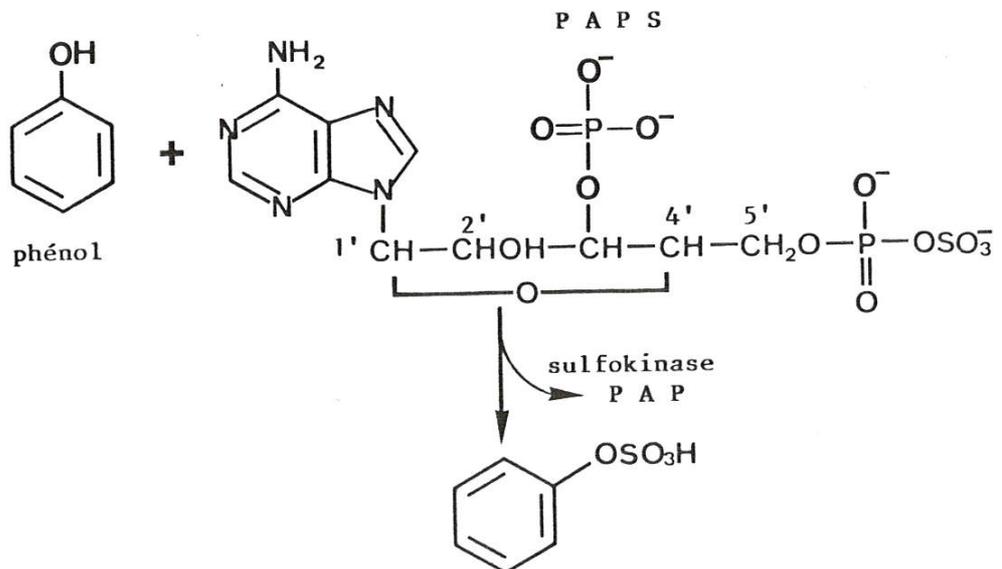


Figure 3 : Sulfoconjugaison d'un substrat RXH : Exemple du phénol (10)



X = O ou NH



qu'une très faible réabsorption rénale ce qui accélère leur élimination.

I-2-1-2-2 La sulfoconjugaison (10)

Cette forme de conjugaison est moins importante que celle impliquant l'acide glucuronique en raison de la concentration limitée de la cellule en sulfates. La sulfoconjugaison nécessite d'abord l'activation des sulfates $\text{SO}_4^{=}$ en 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) par une série de réactions qui utilisent de l'ATP. Le transfert d'un groupement sulfate du PAPS à la molécule réceptrice est catalysé par une sulfokinase.

Parmi les molécules sulfoconjuguées figurent des phénols, des alcools et des composés aminés. La Figure 3 représente une réaction générale de sulfoconjugaison ainsi que l'exemple de conjugaison du phénol.

I-2-1-2-3 Formation d'acides mercapturiques (10)

Le glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) se combine avec divers agents alkylants ou arylants (Tableau 2) pour conduire à des mercapturates facilement éliminés dans les urines.

La Figure 4 représente les différentes réactions qu'un glutathion-conjugué subit pour aboutir au mercapturate.

Les autres types de conjugaison ne nous intéressent pas directement et ne seront donc pas développés ici.

I-2-1-3 Localisation subcellulaire et tissulaire du cytochrome P-450

Le cytochrome P-450 responsable de la détoxification des xénobiotiques est principalement localisé dans le réticulum endoplasmique (microsomes) des hépatocytes (11). D'autres tissus contiennent également du cytochrome P-450 ; ce sont par exemple : les reins (12), les poumons (13), l'intestin (13, 14), les glandes surrénales (15), les testicules (16), les ovaires (17),

GLUTATHION (GSH)

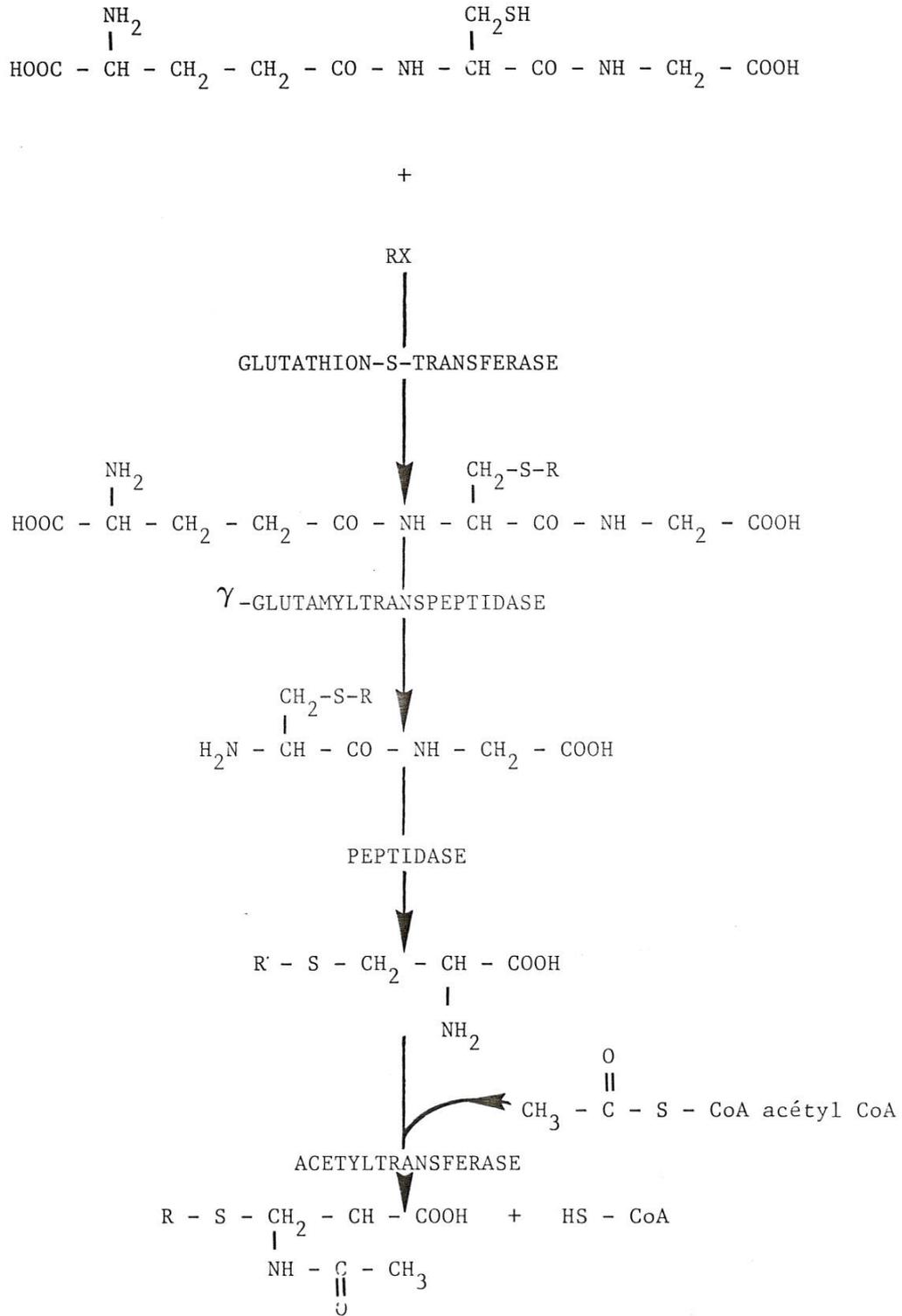


Figure 4 Synthèse d'un mercapturate à partir d'un substrat RX. RX peut être un hydrocarbure aliphatique ou aromatique halogéné. D'après la référence 10.

la peau (18) et le cerveau (19).

Dans le foie, les reins, les glandes surrénales et les gonades, les mitochondries contiennent également des cytochromes P-450 (20, 21, 22, 23). Mais à l'opposé des cytochromes P-450 du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques, pulmonaires ou rénales, ce type de cytochromes possède une étroite spécificité de substrat et de réaction : hydroxylation des stéroïdes dans les surrénales et les gonades, 1- α -hydroxylase de la vit D₃ rénale, hydroxylation d'acides biliaires hépatiques...

I-2-1-4 Multiplicité et inductibilité du cytochrome P-450

Du fait qu'un grand nombre de molécules de structures chimiques complètement différentes sont substrats du cytochrome P-450, le problème de l'unicité ou de la multiplicité du cytochrome P-450 s'est posé. On pensait au départ qu'il s'agissait d'une enzyme unique et aspécifique. Mais les constantes améliorations des techniques de purification enzymatique ont abouti à l'isolement de différents cytochromes P-450 et ont du même coup apporté la preuve de la diversité de ces enzymes. Actuellement, plusieurs isoenzymes du cytochrome P-450 ont été isolées à partir des membranes microsomales de foie de rats et de souris (24, 25, 26).

Les cytochromes P-450 sont différemment inductibles, la résultante du phénomène d'induction est une augmentation de la concentration des cyt.P-450 dans le foie (Tableau 3). Cette induction procède d'une synthèse de novo d'hémoprotéines puisqu'elle peut être bloquée par les inhibiteurs de la synthèse protéique comme l'actinomycine, le cycloheximide et la puromycine (27, 28).

Nous remarquons dans le Tableau 3, qu'un seul inducteur augmente différemment plusieurs activités enzymatiques. Ce tableau résume les effets des inducteurs classiques, phénobarbital, 3-méthylcholanthrène et l'aroclor 1254 (biphényl-polychloré) sur les activités monooxygénasiques dépendant du cytochrome P-450 : L'aniline hydroxylase est peu sensible aux inducteurs (29, 30), la benzphétamine-N-déméthylase est principalement augmentée par le phénobarbital, la benzo(a)pyrène hydroxylase et la 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase

Tableau 3

EFFETS DU PHENOBARBITAL (PB), du 3-METHYL-CHOLANTHRENE (3 MC) ET DE
L'AROCHLOR 1254 SUR LES MICROSOMES HEPATIQUES DE RATS

TRAITEMENT	0	PB	3 MC	AROCHLOR 1254
Protéines microsomales ^(a)	17	23	17	23
Cytochrome P-450 ^(b)	0.7	2.3	1.7	2
Aniline hydroxylase ^(c)	0.6	1.15	1.35	1.13
Benzphétamine-N-déméthylase ^(c)	2.7	24.3	2.3	12.2
Benzopyrène-hydroxylase ^(c)	0.07	0.27	0.9	0.7
7-éthoxycoumarine-O-dééthylase ^(c)	0.2	2.2	5.4	-
Inhibition par la métyrapone 2.10 ⁻⁵ M ^(d)	52	72	0	-
par 1' α-naphtoflavone 10 ⁻⁵ M ^(d)	5	3	90	-

(a) = mg protéines x g⁻¹ foie (poids frais)

(b) = nmol x mg⁻¹ protéines

(c) = nmol x min⁻¹ x mg protéines

(d) = pourcentage d'inhibition

d'après Alvares et Kappas (29)
et Ullrich (31)

par le 3-méthylcholanthrène. De plus la sensibilité aux inhibiteurs varie fortement selon le traitement des animaux.

Ces résultats sont une illustration de l'existence de plusieurs isoenzymes du cyt.P-450 à large spécificité de substrats.

I-2-1-5 Constitution d'une monooxygénase à cytochrome P-450

C'est un complexe multienzymatique localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique et constitué de 3 éléments indispensables à son activité (Tableau 4). Il s'agit de flavoprotéines et de cytochromes qui fonctionnent comme des transporteurs d'électrons ou des activateurs de l'oxygène moléculaire. Au cours d'étapes nécessitant de l'oxygène et des nucléotides pyridiniques réduits, l'ensemble de ces réactions permet de transformer les xénobiotiques en métabolites plus polaires.

I-2-1-5-1 Le cytochrome P-450

C'est une hémoprotéine décrite pour la première fois par Klingenberg (32) et Grafinkel (33). Elle doit son nom à la position du pic d'absorption à 450 nm (bande de solet) qui apparaît sur le spectre UV-visible du complexe cyt. P-450 réduit-CO.

- La partie protéique est constituée d'une seule chaîne polypeptidique et diffère selon les isoenzymes par sa composition en aminoacides. Une portion de cette protéine est fortement hydrophobe. C'est sur cette partie, appelée site actif, que vont se fixer les substrats par des interactions hydrophobes non spécifiques.

- L'hème, isolé du milieu aqueux par la protéine, est la protoporphyrine IX du fer, dans laquelle le fer, à l'état d'ion ferrique Fe^{III} , est lié aux quatre atomes d'azote du cycle porphyrinique. D'autre part le cytochrome P-450 natif (A, Figure 6) est en équilibre sous deux formes : une forme haut spin, penta-

Tableau 4 COMPOSANTS DU SYSTEME D'OXYDATIONS MICROSOMALES HEPATIQUES ET LEURS FONCTIONS

CYTOCHROME P-450

GROUPE PROSTHETIQUE Fer - Protoporphyrine IX

- FONCTIONS : 1 - Site de liaison de l'O₂ et de divers substrats
2 - Détermine la spécificité de substrat du système : formes multiples avec des spécificités de substrat croisées

NADPH - CYTOCHROME P-450 REDUCTASE

GROUPE PROSTHETIQUE : FMN et FAD

FONCTION : Transferts d'électrons du NADPH au cytochrome P-450

PHOSPHOLIPIDES

COMPOSANT ACTIF : Phosphatidylcholine (55 %) et autres phospholipides

FONCTION : Facilitent le transfert d'électrons de la réductase au cytochrome P-450 et la formation de complexe entre les deux composants mais ils ne sont pas transporteurs d'électrons par eux-mêmes.

*Ce point
n'est pas
présent
dans
le tableau
de
autre
part.*

180°

*numéroté
les pages
suivantes*

coordonnée, où l'hème est fixé de façon non covalente à la protéine qui l'entoure par l'intermédiaire d'une liaison axiale entre l'ion Fe^{III} et un ligand thiolate provenant d'une cystéine (34) et une forme bas spin, hexacoordinée, par une deuxième liaison axiale entre le Fe^{III} et une fonction $-\text{OH}$ d'un amino-acide ou de H_2O .

I-2-1-5-2 La NADPH cyt P-450 réductase

C'est une enzyme réductrice qui assure le transfert au cyt.P-450 des électrons provenant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). Cette enzyme microsomale est une flavoprotéine de poids moléculaire 80.000, sa purification à partir du foie et ses propriétés ont été décrites par Strobel et Coll. (35). Elle ne contient pas de métaux, mais deux cofacteurs flaviniques : La flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) (1 mole de chaque cofacteur/mole d'enzyme) (36).

I-2-1-5-3 Les lipides

Les lipides sont l'un des trois composants indispensables au fonctionnement catalytique du système oxydatif des microsomes (37, 38). La phosphatidylcholine en est le composant majeur (55 %). Bien que le mécanisme de l'effet des lipides sur l'activité du système ne soit pas bien connu, il semble qu'ils facilitent la formation du complexe substrat-cyt.P-450 ainsi que le transport des électrons entre la NADPH cyt.P-450 réductase et le cytochrome P-450 (39). De plus, il est probable que les lipides ont un rôle protecteur et stabilisateur du cyt.P-450 ; en effet, lorsque celui-ci est isolé de la membrane microsomale et solubilisé, il peut se dénaturer rapidement en cytochrome P-420. Les lipides minimisent cette conversion. Les détergents non ioniques, par leur structure physicochimique, peuvent lorsqu'ils sont liés au cytochrome P-450 jouer ce même rôle protecteur et assurer le fonctionnement catalytique du système oxydatif reconstitué (40).

Les lipides modulent aussi la fixation du substrat sur le cytochrome P-450 (41). Ils jouent également un rôle important dans l'induction in vivo

du cyt.P-450 microsomal hépatique par le phénobarbital (42).

La chaîne de transport des électrons durant l'oxydation d'un substrat RH par une monooxygénase à cyt.P-450 est décrite sur la Figure 5. Pour assurer cette oxydation le cyt.P-450 est réduit à deux électrons. Le premier provient du NADPH, tandis que le deuxième peut provenir soit du NADPH par l'intermédiaire de la NADPH cyt.P-450 réductase, soit du NADH par l'intermédiaire de la cyt.b₅ réductase.

Le cytochrome b₅ est une hémoprotéine présente dans le réticulum endoplasmique, mais également dans les mitochondries. Sa purification à partir des microsomes de foie ainsi que ses propriétés sont définies (43). Bien que possédant, comme le cyt.P-450, un atome de fer lié aux quatre noyaux pyrrole de l'hème, celui-ci est incapable de fixer des ligands comme l'oxygène ou l'oxyde de carbone. En effet, les six positions de coordination du fer, contrairement à celles du cyt.P-450, sont occupées par des atomes de la protéine. Il ne possède aucune activité catalytique connue à ce jour et son taux reste inchangé après traitement par des inducteurs.

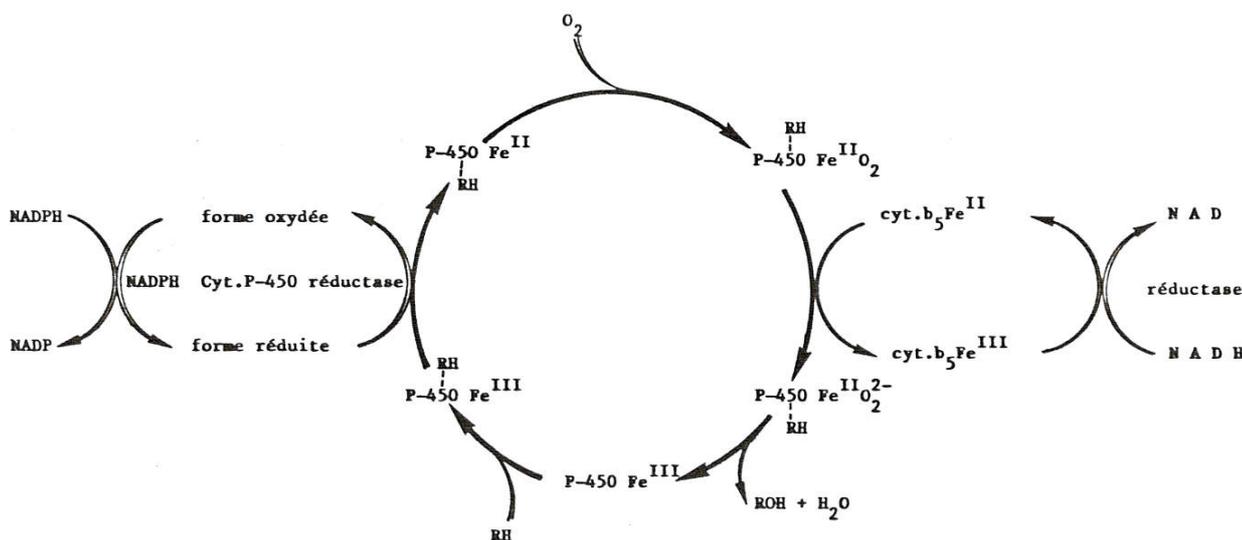


Figure 5. Chaîne de transport des électrons durant l'hydroxylation d'un alcane R-H en alcool R-OH en présence d'une monooxygénase à cytochrome P-450.

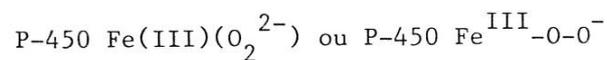
I-2-1-6 Cycle catalytique du cytochrome P-450

- 1 - Dans une première étape, le substrat lipophile RH vient se fixer dans la cavité hydrophobe de l'hémoprotéine pour former un complexe enzyme-substrat $\text{RH-cyt.P-450 Fe(III)}$. Ceci provoque une modification conformationnelle de la protéine et son passage à l'état haut spin ; ainsi l'équilibre entre les formes bas spin et haut spin (B) est déplacé vers la deuxième forme.
- 2 - Réduction du Fe(III) par un électron provenant du NADPH via la NADPH cyt.P-450 réductase et formation du complexe $\text{RH-cyt.P-450 Fe(II)}$. Cette étape nécessite la présence d'un phospholipide (Strobel et Coll. 39) qui faciliterait le transfert d'électrons (44).
- 3 - Fixation réversible d'une molécule d'oxygène sur le site de coordination vacant du Fe(II) pour former le complexe oxycytochrome P-450 (D) qui pourrait conduire à un complexe superoxo du Fe(III) (33).



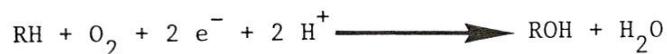
forme mésomère qui fait apparaître la structure de l'anion superoxyde

- 4 - Réduction de ce complexe par un second électron qui conduit à un complexe peroxy du Fe(III), c'est un complexe à oxygène actif (E) qui peut s'écrire sous les formes suivantes :



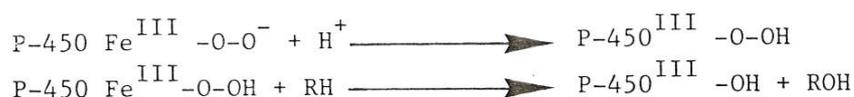
- 5 - Le complexe (E) est très instable, il se décompose par transfert d'un atome d'oxygène sur le substrat et élimination d'une molécule d'eau.

La réaction globale s'écrit :

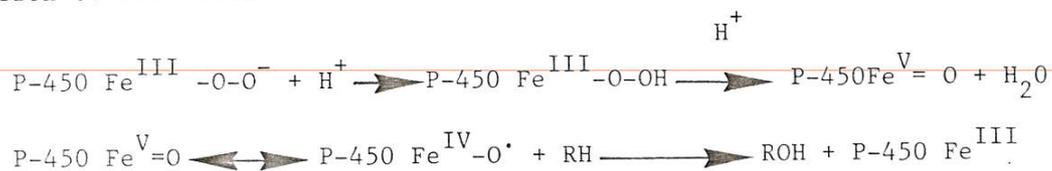


Deux mécanismes sont actuellement proposés (45) pour expliquer l'intercalation d'un atome d'oxygène sur un substrat R-H.

a) Le complexe peroxy pourrait après protonation réagir comme un peroxyacide :



b) Un complexe oxo du fer, intermédiaire, serait formé par double protonation et élimination d'eau :



Hétérolytique

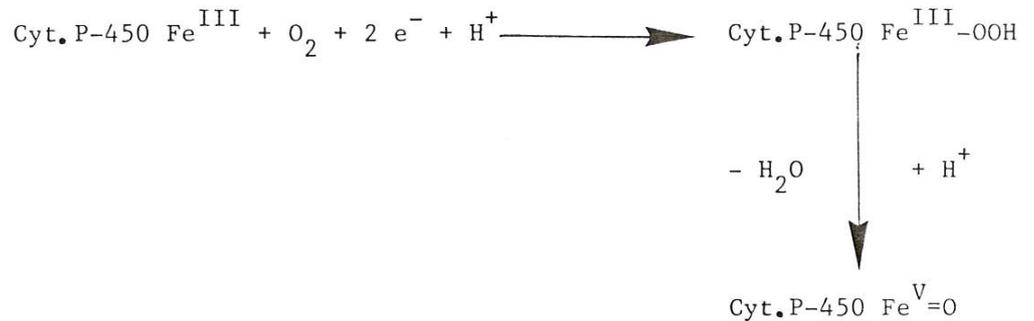
Dans ce cas, la cassure de la liaison O-O se produit avant le transfert de l'atome d'oxygène au substrat.

De nombreux arguments sont en faveur de la deuxième hypothèse :

- Certaines hémoprotéines (catalase, peroxydases) réagissent avec H_2O_2 en provoquant une cassure de la liaison O-O et en produisant un complexe oxo du fer, comme cela a pu être montré sans ambiguïté par des méthodes spectroscopiques en raison de la plus grande stabilité de ces intermédiaires (46).



On est en présence d'une situation tout-à-fait analogue avec le cytochrome P-450, l'oxygène subissant une réduction à deux électrons, conduisant ainsi à l'état peroxydique O_2^{2-} .



- Il est possible de remplacer l'oxygène (en présence de NADPH) par divers oxydants donneurs d'atome d'oxygène tel que l'iodosobenzène $\text{C}_6\text{H}_6\text{IO}$ (47) des hydroperoxydes ROOH (48), NaOCl (49) ou NaIO_4 (50) sans changer considérablement les spécificités d'oxydations catalysées par le cyt. P-450 in vitro, ainsi que les distributions des produits.

Il est donc généralement admis que le complexe à oxygène actif contient un seul atome d'oxygène plutôt qu'un groupe peroxy.

I-3 Toxicité due à des agressions oxydantes : Implication des dérivés de réduction de l'oxygène et rôle de la peroxydation des lipides

I-3-1 Introduction

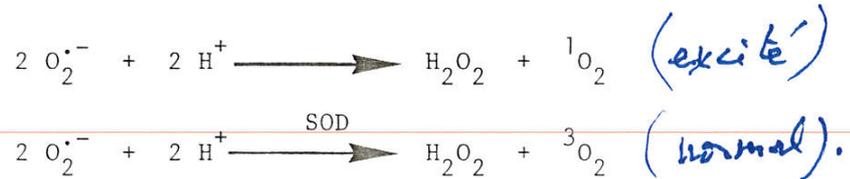
L'oxygène est indispensable à la vie de toutes les cellules aérobies. Sa réduction en eau au niveau des mitochondries apporte l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) (51). Cet ATP contient des liaisons phosphate (P-P) riches en énergie et constitue le principal réservoir énergétique que la cellule utilise pour accomplir un grand nombre de réactions métaboliques (51).

La réduction de l'oxygène au niveau des mitochondries fait intervenir des réactions d'oxydoréduction couplées et se passe au niveau de la chaîne respiratoire composée de catalyseurs de transfert d'électrons (nucléotides pyridiniques, flavoprotéines (Fp), fer non hémique (FeNH), protéines fer-soufre (Fe-S), ubiquinone (Q), cytochromes dont des cyt. b et c et la

*NaOCl₂
Cyt P-450*

dement des réactions qui produisent d'autres dérivés de réduction de l'oxygène très réactifs.

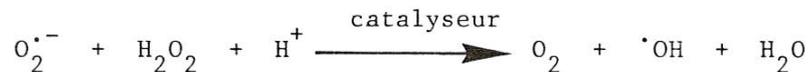
$1 - O_2^{\bullet -}$ se dismute en effet spontanément dès sa formation dans le milieu de réaction. Cette dismutation est très rapide et produit H_2O_2 et l'oxygène singulet (1O_2). D'un autre côté, il a été montré qu'en présence de superoxyde dismutase (SOD : Metalloenzyme qui catalyse la dismutation de $O_2^{\bullet -}$), la dismutation d' $O_2^{\bullet -}$ produit l'eau oxygénée et l'oxygène moléculaire à l'état fondamental triplet 3O_2 (61).



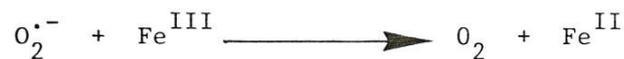
$2 - O_2^{\bullet -}$ peut donner selon la réaction d'Haber-Weiss, en présence d' H_2O_2 des radicaux $\cdot OH$ très réactifs (62) :



La formation des radicaux $\cdot OH$ par cette réaction a été étudiée dans des systèmes chimiques et biologiques et elle s'est avérée très lente. Ce n'est qu'en présence de traces de métaux de transitions chélatés ou non que la production d' $\cdot OH$ est importante (63).



En présence de Fe^{III} , la réaction d'Haber-Weiss se fait en deux étapes distinctes : Réaction de Fenton



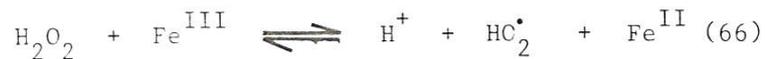
3 - H_2O_2 peut aussi réagir avec une quinone réduite (Q^\ominus) et former des radicaux $\cdot\text{OH}$ (64).



4 - A faibles pH, O_2^\ominus donne par protonation une entité HO_2^\bullet très réactive.



Cette même entité peut aussi être formée à partir de H_2O_2 en présence de Fe^{III} .



Tous ces dérivés de réduction de l'oxygène (Tableau 5) sont dangereux et peuvent s'ils sont formés in vivo en quantités trop fortes déclencher la peroxydation des lipides des membranes cellulaires.

I-3-3 Production des dérivés de réduction de l'oxygène par une cellule aérobie à l'état physiologique normal

Au niveau cellulaire, O_2^\ominus et H_2O_2 peuvent provenir de l'activité aérobie de certaines enzymes ou de l'autoxydation de certains constituants cellulaires. Ces deux entités sont maintenues à des taux cellulaires très faibles grâce aux systèmes de détoxification de l'organisme. Produits à un taux physiologique normal, ils sont donc atoxiques, mais si leur production est accélérée et s'ils accumulent à trop fortes concentrations dans la cellule, ils seraient responsables de la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ très réactifs, capables d'induire une peroxydation des lipides membranaires. Chimiquement, la formation du radical $\cdot\text{OH}$ à partir d' O_2^\ominus et d' H_2O_2 a été prouvée (64), il est donc important de connaître les systèmes enzymatiques et les constituants cellulaires autoxydables, responsables de la production d' O_2^\ominus et H_2O_2 .

I-3-3-1 Enzymes produisant H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$

L'eau oxygénée et l'anion-radical superoxyde sont produits in vivo par diverses oxydases, dans la plupart des compartiments subcellulaires. Les enzymes responsables de la production d' H_2O_2 sont surtout les flavoprotéines oxydases et les cuproprotéines oxydases alors que $O_2^{\cdot-}$ est surtout produit par les molybdoflavoprotéines oxydases (xanthine oxydase), les flavoprotéines déshydrogénases (NADPH cyt.P-450 réductase) et les polymorphonucléaires neutrophiles (Tableau 6). Les neutrophiles constitueraient le système physiologique le plus producteur d' $O_2^{\cdot-}$ (67). L'enzyme responsable de cette activité est une flavoprotéine : la NADPH oxydase, elle est normalement inactive, mais est activée au cours de la phagocytose où l'augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ est responsable en partie du pouvoir bactéricide (68).

I-3-3-1-1 Production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 par la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une molybdoflavoprotéine qui se trouve dans le lait maternel et dont le rôle est de catalyser l'oxydation de la xanthine en urate.

En 1949, Horecker et Heppel ont constaté que l'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase s'accompagne d'une réduction du cytochrome C et que cette réduction dépend de la concentration en oxygène (70). Plus tard, Mc Cord et Fridovich (71) ont montré que, d'une façon générale, si la réduction du cytochrome C est oxygène-dépendante, c'est la preuve d'une production d' $O_2^{\cdot-}$. Enfin, l'inhibition par la superoxyde dismutase de la réduction du cytochrome c en présence de xanthine et de xanthine oxydase (72) a apporté une preuve supplémentaire de la formation d' $O_2^{\cdot-}$ par la xanthine oxydase au cours de son cycle catalytique.

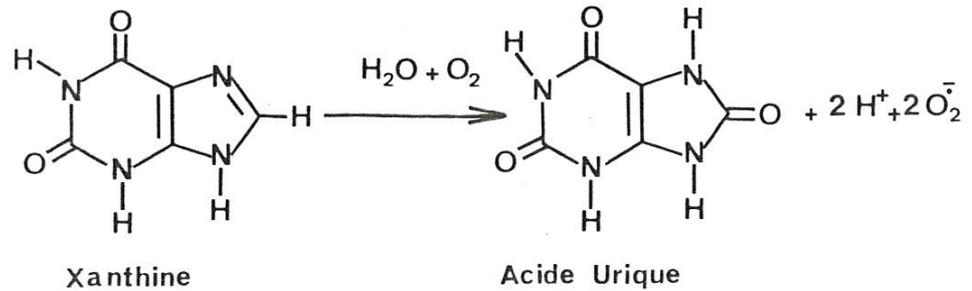


Figure 7 : Production d' O_2^- au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase.

I-3-3-1-2 Production d' O_2^- et H_2O_2 par la NADPH cytochrome P-450 réductase

La NADPH cytochrome P-450 réductase est une flavoprotéine (Fp) hépatique qui assure le transfert au cytochrome P-450 de deux électrons provenant du NADPH. Elle n'est capable de transférer qu'un électron à la fois et peut ainsi réaliser une réduction monoélectronique de l'oxygène en O_2^- .

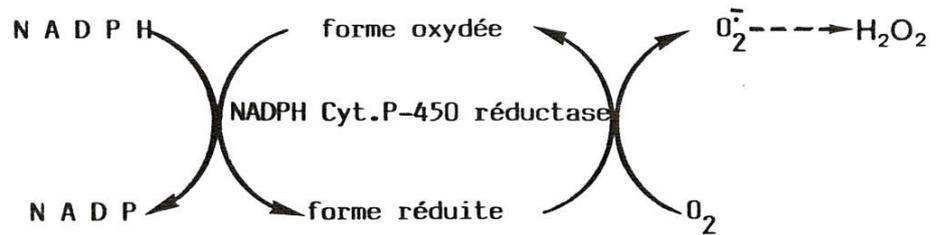


FIGURE 8 : Production d' O_2^- et H_2O_2 par la NADPH cytochrome P-450 réductase.

En 1957, Gillette et Coll. (73) étaient les premiers à remarquer que les microsomes hépatiques de foie de rat catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en $O_2^{\bar{}}$ et H_2O_2 ; mais ils étaient incapables de dire si ces dérivés sont produits par la NADPH cytochrome P-450 réductase ou le cytochrome P-450.

En 1977, Bortoli et Coll. (74) ont travaillé sur des microsomes préparés à partir de foie de rat en cours de développement et ils ont étudié la production d' $O_2^{\bar{}}$ par ces microsomes en fonction des taux de NADPH cytochrome P-450 réductase et de cytochrome P-450 qu'ils contiennent. Ils en déduisent ainsi le taux d' $O_2^{\bar{}}$ produit par chacune des deux enzymes. Leur conclusion était que 50 % de la totalité d' $O_2^{\bar{}}$ produit par des microsomes de foie de rat adulte est formé par la NADPH cytochrome P-450 réductase.

En 1981, Bosterling et Trudell (75) et Graves et Piette (76) travaillent sur la NADPH cytochrome P-450 réductase purifiée et montrent définitivement qu'elle catalyse la réduction monoélectronique d' O_2 en $O_2^{\bar{}}$.

I-3-3-1-3 Production d' $O_2^{\bar{}}$ et H_2O_2 par le cytochrome P-450 au cours de son cycle catalytique (Figure 9)

Les complexes $Fe^{II}-O_2$ et $Fe^{III}-O_2^{\bar{-}}$ du cyt. P-450 (paragraphe I.2.1.1) peuvent se dissocier en redonnant le cyt. P-450 Fe^{III} et respectivement $O_2^{\bar{}}$ et H_2O_2 .

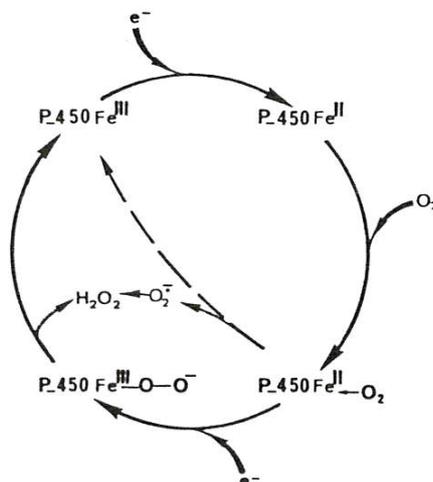


Figure 9 : Production d' $O_2^{\bar{-}}$ et H_2O_2 par le cyt. P-450 au cours de son cycle catalytique (77).

I-3-3-2 Production d' O_2^- et H_2O_2 par autoxydation des constituants cellulaires

La production d' O_2^- et H_2O_2 au cours de l'autoxydation de plusieurs constituants cellulaires est maintenant prouvée expérimentalement. L'hémoglobine et l'oxyhémoglobine (78), le cytochrome b_5 (79) (transporteur d'électrons du NADH vers le cytochrome F-450), l'ubiquinone (80) (une quinone de la chaîne respiratoire mitochondriale qui sert de transporteur d'électrons vers O_2) et les flavines réduites sont des exemples de constituants cellulaires qui produisent O_2^- et H_2O_2 au cours de leur autoxydation.

I-3-3-2-1 Formation d' O_2^- et H_2O_2 au cours de l'autoxydation de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est une hémoprotéine ($HbFe^{II}$). Au niveau pulmonaire, elle fixe l'oxygène et le transporte dans les cellules. La liaison entre le Fe^{II} et l'oxygène est réversible. C'est ainsi qu'au cours d'un cycle normal d'oxygénation, l'oxyhémoglobine (HbO_2) se dissocie en O_2 et $HbFe^{II}$. Mais la présence d'anions dans la poche hémique hydrophobe (l'eau par exemple) favorise la libération d' O_2^- (80) et aboutit à la formation de la méthémoglobine (Fe^{III}) incapable de fixer O_2 (Figure 10).

Chez un individu sain, environ 3 % de l'hémoglobine circulante sont transformés chaque jour, par ce mécanisme en méthémoglobine (81).

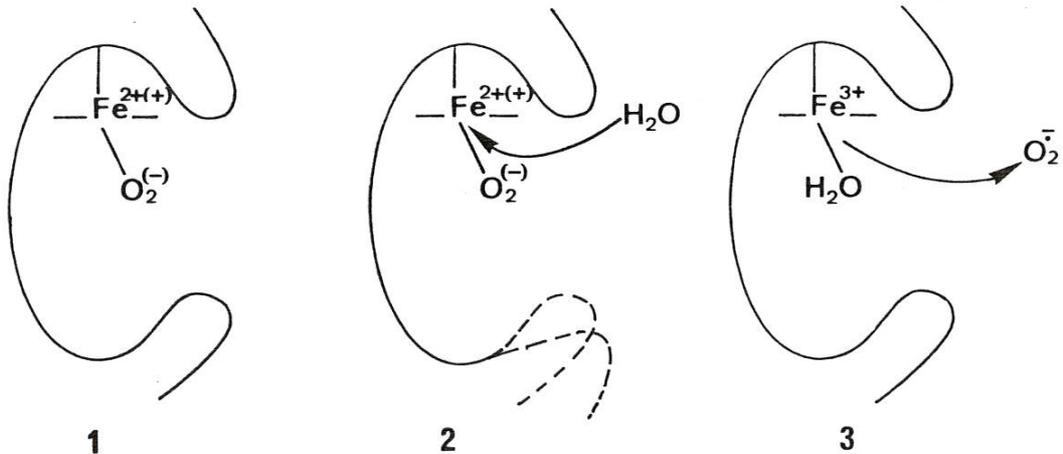


Figure 10 : Formation d' O_2^- et de méthémoglobine à partir de l'oxyhémoglobine selon Carrel et Coll. (82). 2—des petites distortions de la poche hémique peuvent favoriser la pénétration d'eau ce qui engendre la formation d' O_2^- et de MetHb.

I-3-3-2-2 Formation d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 dans les mitochondries par autoxydation de certains constituants de la chaîne respiratoire

La production d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 au niveau des mitochondries a été mise en évidence par plusieurs équipes. Boveris et Chance (83) ont montré, en particulier, que les mitochondries hépatiques isolées et incubées in vitro dans des conditions similaires aux conditions physiologiques réduisent environ 2 % de la totalité d'oxygène qu'ils consomment en $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . Enfin une étude détaillée a permis à Loschen de démontrer qu'au niveau des mitochondries H_2O_2 provient de la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ et non d'une réduction de l'oxygène à 2 électrons (84).

Plusieurs composants de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent réaliser une réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire. Les cytochromes b, l'ubiquinone, la NADPH déshydrogénase sont capables de produire $O_2^{\cdot-}$ au niveau des mitochondries. Mais $O_2^{\cdot-}$ est surtout formé par l'autoxydation de l'ubiquinone réduite ($Q^{\cdot-}$) (85). Le mécanisme de formation d' $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 est représenté sur la Figure 11.

I-3-4 Rôle des dérivés de réductions de l'oxygène dans la peroxydation des lipides

I-3-4-1 Introduction

La peroxydation des lipides a été définie par Tappel (86) comme étant une détérioration oxydative des acides gras polyinsaturés des lipides des membranes cellulaires.

London

— Du point de vue incidence, elle touche tous les systèmes biologiques aérobies. Au niveau cellulaire, tous les compartiments de la cellule (lysosomes, mitochondries, etc ...) peuvent la subir. Quant aux conséquences, elle

engendre une dégénérescence cellulaire avec les perturbations enzymatiques, métaboliques et biologiques qui en découlent.

Du point de vue physiologique, elle se traduit par une lyse cellulaire et par conséquent une nécrose tissulaire plus ou moins importante selon le degré de l'atteinte.

Chez l'homme, la peroxydation des lipides a été incriminée dans le vieillissement cellulaire (87) et serait responsable de l'apparition des "pigments d'âge" chez les personnes âgées. D'autre part, elle serait la cause principale de la toxicité d'une large gamme de substances chimiques d'où l'intérêt de plus en plus grandissant qu'elle suscite chez les toxicologues.

I-3-4-2 Mécanismes du déclenchement de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est une réaction entre l'oxygène et les lipides polyinsaturés. Cette réaction forme des radicaux hydroperoxylipidiques et des lipohydroperoxydes qui engendrent des réactions radicalaires en chaîne. Ces réactions en chaîne se déroulent en trois étapes (87) et aboutissent à la fragmentation des lipides et donc à la désorganisation des membranes cellulaires.

I-3-4-2-1 La phase d'initiation

Cette phase est l'étape clé des réactions radicalaires en chaîne ; elle génère à partir d'un lipide (LH) un radical lipidique (L[•]) qui, en réagissant avec l'oxygène moléculaire, provoque le déclenchement de la peroxydation des lipides.

L'oxygène moléculaire, à l'état fondamental triplet, $^3\text{O}_2$, possède deux électrons célibataires à spins parallèles et peut être considéré comme un biradical stable (88) peu réactif et incapable d'arracher un hydrogène

lipidique. Par contre, certains de ses dérivés de réduction sont très réactifs et peuvent arracher un hydrogène lipidique et former des radicaux (L^{\cdot}). Des radicaux organiques R^{\cdot} ($\cdot CCl_3$ par exemple) peuvent aussi arracher un hydrogène lipidique et sont la cause d'une peroxydation des lipides (89).

La capacité d'arracher un hydrogène lipidique par les différents dérivés de réduction de l'oxygène est très discutée dans la littérature.

1 - Dans les conditions physiologiques, $O_2^{\cdot-}$ est le dérivé de réduction de l'oxygène prédominant, mais du point de vue réactivité chimique, il est impossible qu' $O_2^{\cdot-}$ arrache un hydrogène lipidique. De plus, Fong et Coll. (90) ont montré que la peroxydation des lipides induite in vitro par l'oxydation du NADPH via la NADPH cytochrome P-450 réductase nécessite la présence d'un chélate de Fe^{III} et est inhibée par les piègeurs de radicaux $\cdot OH$ (mannitol, éthanol et benzoate) ; ils en concluent qu' $O_2^{\cdot-}$ produit par la NADPH cytochrome P-450 réductase n'est pas directement responsable de l'induction de la peroxydation des lipides.

$O_2^{\cdot-}$ peut donner par protonation une entité HO_2^{\cdot} suffisamment réactive dont la capacité d'induire la peroxydation des lipides a été démontrée dans des systèmes chimiques in vitro (65), mais cette protonation se fait à pH faible et la formation d' HO_2^{\cdot} n'est possible in vivo que dans les vacuoles phagocytaires des neutrophiles où le pH est assez faible.

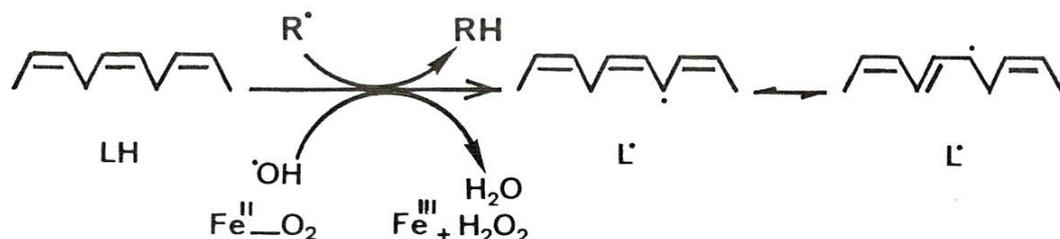
2 - La dismutation spontanée d' $O_2^{\cdot-}$ dans une cellule aérobie est improbable car la superoxyde dismutase existe dans toutes les cellules aérobies et elle catalyse la dismutation de la majorité d' $O_2^{\cdot-}$ cellulaire en H_2O_2 et O_2 (62). Il est donc improbable qu'in vivo 1O_2 formé par dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ soit responsable de la peroxydation des lipides, en plus H_2O_2 en absence de traces de métaux de transition n'est pas inducteur de la peroxydation des lipides (91).

3 - L'implication directe des radicaux $\cdot OH$ dans l'initiation de la peroxydation des lipides a été récemment prouvée grâce à l'utilisation des systèmes chimiques (63). D'autre part, la peroxydation des lipides induite

par la xanthine oxydase en présence de xanthine est inhibée par les piègeurs de radicaux $\cdot\text{OH}$ ce qui confirme l'implication de ces radicaux dans le déclenchement des réactions de peroxydation lipidique (92).

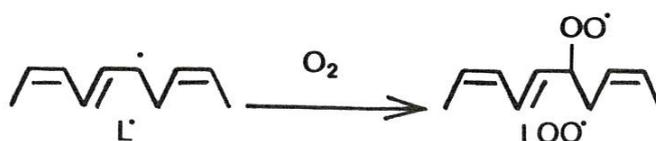
4 - Récemment, Bucher et Coll. (93) ont remarqué que le Fe^{II} ou le Fe^{III} en présence d'un chélateur (EDTA, ADP, ATP) catalysent la peroxydation des lipides in vitro. Dans ce cas, $\text{O}_2^{\cdot-}$ réduit le Fe^{III} en Fe^{II} avec formation d'un complexe chélateur- $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2^{\cdot-} \longleftrightarrow -\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^{\cdot-}$ capable d'arracher un hydrogène lipidique. Le Fe^{III} chélaté peut aussi catalyser la production des radicaux $\cdot\text{OH}$ qui induisent la peroxydation des lipides (94, 95).

Actuellement, on admet que les dérivés de réduction de l'oxygène capables d'induire la peroxydation des lipides in vivo sont soit les radicaux $\cdot\text{OH}$ soit les complexes chélatés de métaux de transition - $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ces dérivés tout comme certains radicaux organiques (R^{\cdot}) sont capables d'arracher un hydrogène allylique d'un lipide et de former des radicaux (L^{\cdot}), point de départ des réactions radicalaires en chaîne (87).



I-3-4-2-2 La phase de propagation

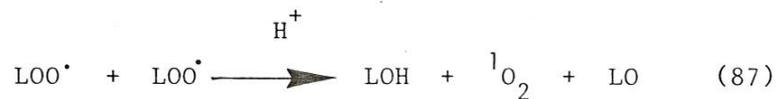
c'est une réaction en chaîne où les radicaux L^{\cdot} formés lors de la phase d'initiation réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux lipohydroperoxy LOO^{\cdot} (93).



- Un radical LOO^\bullet peut arracher un hydrogène à un autre lipide insaturé et perpétuer ainsi la chaîne des réactions radicalaire.



- Deux radicaux LOO^\bullet peuvent réagir ensemble et donner par dismutation spontanée de l'oxygène singulet.

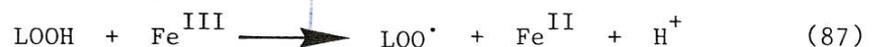
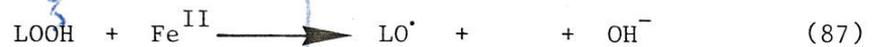


- Les lipohydroperoxydes LOOH peuvent :

- a) réagir sur O_2^{T} et produire des radicaux LO^\bullet



- b) subir une décomposition catalysée par des traces de métaux de transition et produire des radicaux LO^\bullet et LOO^\bullet .



- Les radicaux LO^\bullet et LOO^\bullet peuvent non seulement réintégrer le circuit des réactions radicalaires et contribuer à leur propagation mais se fragmentent ce qui aboutit à la désorganisation de la structure des membranes cellulaires.

I-3-4-2-3 La phase de terminaison

Cette phase est constituée par une série de réactions qui permettent le piégeage des radicaux formés.





En réalité les réactions a, b et c ne sont pas aussi simples. Deux radicaux peuvent non seulement se combiner pour donner un produit non radicalaire, mais aussi former des produits comme des oléfines, des alcools, des alcanes et des produits carboxylés (87).

En particulier, il est connu que la réaction c forme d'abord un tétraoxyde L0000L qui se décompose en deux radicaux LO^\cdot et en O_2 . Les deux radicaux alkoxy se combinent et donnent LOOL ou réintègrent le circuit des réactions radicalaires en chaîne.

L'importance relative des réactions a, b et c dépend de la pression partielle d' O_2 ($p\text{O}_2$). A faibles $p\text{O}_2$, les radicaux L^\cdot sont plus abondants que LOO^\cdot , donc la réaction a est favorisée alors que si la $p\text{O}_2$ est forte, la concentration de LOO^\cdot est supérieure à celle de L^\cdot et la réaction c est favorisée.

I-3-4-3 Produits formés lors de la peroxydation des lipides

Aux produits déjà formés lors des phases d'initiation et de propagation (diènes conjugués, LOO^\cdot , LOOH et LO^\cdot), s'ajoutent des produits qui proviennent de la fragmentation des radicaux alkoxy (LO^\cdot) et lipoperoxy (LOO^\cdot). La Figure 12 représente les différentes étapes de la peroxydation de l'acide linoléique à partir de la phase d'initiation jusqu'à la fragmentation.

La cassure des radicaux LO^\cdot aboutit notamment à la formation de radicaux alkyls ou alcényls et d'aldéhydes lipidiques. Les radicaux alkyls ou alcényls arrachent un hydrogène lipidique et se transforment en alcanes ou alcènes correspondants, alors que L^\cdot formé, réintègre le circuit des réactions radicalaires en chaîne. La Figure 12 montre clairement que l'éthane est formé à partir des acides gras insaturés en position 3 du côté CH_3 terminal ($\omega - 3$ acides gras) alors que le n-pentane provient des $\omega - 6$ acides gras (91).

- La fragmentation des radicaux LOO^{\bullet} aboutit à la formation de malondialdéhyde de radicaux alcényls ou alkyls et d'aldéhydes lipidiques insaturés. Cette fragmentation n'est pas directe, le radical LOO^{\bullet} subit une cyclisation en radical endoperoxy (91) qui après un réarrangement intramoléculaire fixe O_2 puis arrache un hydrogène lipidique et se transforme ainsi en endoperoxyhydroperoxyde. Celui-ci est le précurseur directe du malondialdéhyde (Figure 12).
- Le malondialdéhyde formé au cours des réactions de peroxydation des lipides *in vivo*, réagit rapidement avec des molécules biologiques renfermant des fonctions amines primaires. Il se forme une base de Schiff conjuguée ayant la structure générale suivante $R - N = CH - CH = CH - NH - R$ où R peut être un aminoacide, une protéine ou un acide nucléique (87).

I-3-4-4 Techniques de mesure de la peroxydation des lipides

I-3-4-4-1 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

C'est la technique la plus utilisée. Le malondialdéhyde se condense à chaud et à pH acide avec l'acide thiobarbiturique (TBA) et donne un composé rose dosé par colorimétrie (91). Cette technique donne des résultats satisfaisants quand il s'agit de mesurer le taux de peroxydation lipidique in vitro. Elle a aussi été utilisée couramment in vivo, faute de moyens d'investigations directes. Dans ce cas, on mesure le malondialdéhyde dans le sang, les tissus ou les organes après sacrifice de l'animal. Le problème est que le malondialdéhyde est dégradé in vivo (96) et réagit rapidement sur certains composants cellulaires (87). Il faut de ce fait interpréter avec prudence les résultats in vivo, particulièrement si le taux de peroxydation dépasse de peu la peroxydation normale, comme cela devrait être le cas dans les intoxications chroniques ou au cours de certaines maladies. Dans ces cas bien particuliers mais assez courants, l'incapacité de détecter les substances réactives vis-à-vis du TBA ne devrait être interprétée en aucun cas comme une évidence de l'absence de peroxydation lipidique.

I-3-4-4-2 Dosage des lipofuschines (pigments d'âge)

Le malondialdéhyde réagit rapidement in vivo avec les amines primaires, le produit formé est une base de schiff conjuguée ayant la structure générale suivante : $R - N = CH - CH = CH - NH - R$ où R peut être un amino-acide, une protéine ou un acide nucléique (87). Ce produit communément désigné sous le nom de pigment d'âge est fluorescent et stable in vivo. Il permet donc après extraction et purification sur colonne de Séphadex (87) d'évaluer la peroxydation des lipides in vivo.

I-3-4-4-3 Dosage de l'éthane ou du pentane

C'est la méthode la plus récente. Son avantage est de permettre la mesure de la peroxydation des lipides sur des animaux vivants. Riely, Cohen et Liberman ont les premiers remarqué que des souris traitées au tétrachlorure de carbone exhalaient de l'éthane à un taux plus élevé que le taux physiologique normal (97). Plus tard, ce phénomène a été confirmé et attribué à la peroxydation des lipides (98). D'autres études sont venues confirmer que l'éthane et le pentane sont produits dans divers cas d'agressions oxydantes induites in vivo chez l'animal par différents produits lipoperoxydants tel que le paraquat toxique pulmonaire très puissant (99, 100).

Cette technique peut aussi être utilisée in vitro dans le cas d'étude de la peroxydation des lipides induite dans des homogénats d'organes d'animaux ou de préparations microsomales de divers organes.

I-3-5 Les systèmes biologiques de défense contre les dérivés de réduction de l'oxygène

Les cellules aérobies sont continuellement le siège de plusieurs réactions produisant des dérivés de réduction de l'oxygène responsables de

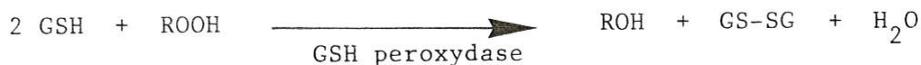
l'initiation et de la propagation de la peroxydation des lipides. En conséquence, ces cellules ont développé des moyens de défense contre ces dérivés de réduction (Tableau 7).

I-3-5-1 Les superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD sont des métalloprotéines cytoplasmiques présentes dans toutes les cellules aérobies (91). Elles catalysent la dismutation de la majorité d'O₂⁻ produit par une cellule saine en O₂ et H₂O₂ (61). Les SOD agissent au niveau de la phase d'initiation de la peroxydation des lipides et protègent uniquement contre la toxicité d'O₂⁻. En effet, H₂O₂ produit, peut donner en présence d'un métal de transition des radicaux [•]OH, selon la réaction de Fenton.

I-3-5-2 La catalase et la glutathion peroxydase

Ce sont deux enzymes qui contrôlent la concentration d'H₂O₂ dans la cellule. La catalase est une hémoprotéine qui se trouve dans les peroxy-somes et catalyse spécifiquement la réduction d'H₂O₂, alors que la glutathion peroxydase est une sélénoenzyme qui catalyse la réduction de tous les hydroperoxydes organiques (31).



Cette synergie dans la réduction d'H₂O₂ entre la catalase et la GSH peroxydase prévient la décomposition d'H₂O₂ selon la réaction de Fenton et empêche la formation des radicaux [•]OH. Le résultat est une inhibition de la peroxydation des lipides au niveau de la phase d'initiation.

La sélénoprotéine-glutathion peroxydase réduit expérimentalement

les lipohydroperoxydes isolés en alcools (101), mais elle est incapable de réduire les lipohydroperoxydes présents dans les phospholipides intacts (Grossman et Wendel 1983 (108) . Pour ces raisons, on ignore jusqu'à maintenant si la GSH peroxydase est capable, in vivo, de réduire les hydroperoxydes lipidiques dans les membranes cellulaires. Si la réponse est oui, elle peut empêcher la réduction des lipohydroperoxydes (LOOH) selon la réaction de Fenton en LO[•] et LOO[•] et inhiber ainsi la peroxydation des lipides au niveau de la phase de propagation.

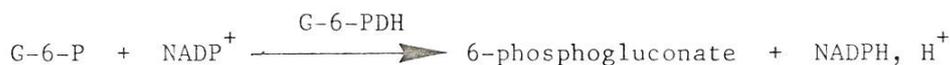
Des études récentes effectuées entre 1982 et 1983 ont permis de découvrir une protéine capable de réduire les hydroperoxydes membranaires. C'est une protéine qui a une activité similaire à celle de la GSH peroxydase (103) et serait responsable de la réduction des lipohydroperoxydes membranaires in vivo.

Enfin, Sévanian et Coll. en 1981 et 1983 (104) et Grossman et Wendel en 1983 (105) montrent que la phospholipase A₂ est activée au cours de la peroxydation des lipides et libère les lipohydroperoxydes formés de leurs membranes cellulaires, permettant ainsi leur réduction en LOH par la glutathion peroxydase et donc une inhibition de la phase de propagation des réactions radicalaires en chaîne de la peroxydation des lipides.

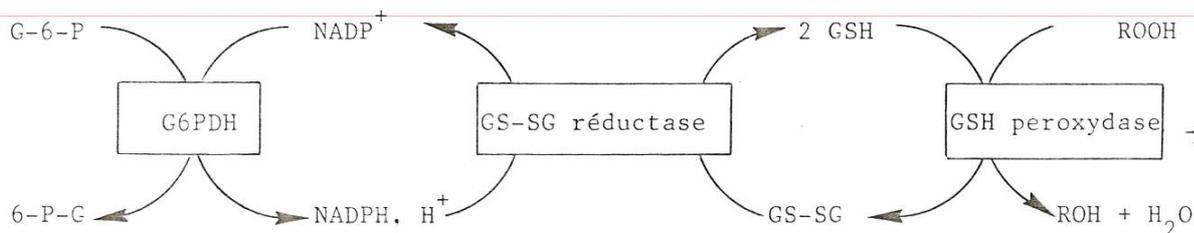
La GSH peroxydase utilise spécifiquement le GSH comme donneur d'hydrogène pour réduire les hydroperoxydes en alcools correspondants. L'efficacité de cette réduction dépend donc de la concentration cellulaire en GSH. Dans le cas d'un stress oxydant, il y a surproduction d'hydroperoxydes dont la réduction par la glutathion peroxydase s'accompagne d'une oxydation du GSH en GS-SG. Comme la concentration de GSH dans la cellule est limitée, il est très important que celui-ci puisse être réduit au fur et à mesure de son oxydation : C'est le rôle de la glutathion réductase, une enzyme cytosolique à coenzyme flavinique qui catalyse en présence de NADPH la réduction du GS-SG (106).



Le NADP⁺ est lui-même réduit en présence de glucose-6-phosphate (G6P) par la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) ce qui permet la régulation de la concentration de GSH dans la cellule (106).



La GSH peroxydase, la GS-SG réductase et la glucose-6-phosphate deshydrogénase agissent donc en synergie, selon le schéma suivant, pour assurer la réduction des hydroperoxydes formés dans la cellule.



I-3-5-3 Les caroténoïdes : β-carotène et vitamine A

L'activité antioxydante du β-carotène est liée à sa capacité d'inactiver ¹O₂. Physiquement, le transfert d'énergie de ¹O₂ vers le β-carotène et son retour à l'état triplet est connu depuis 1968 (107). Mais c'est Mattheus (108) qui a apporté la preuve que le β-carotène inactive ¹O₂ in vivo. Cet auteur a montré que la coadministration à des souris du β-carotène en même temps qu'un photosensibilisateur (hématoporphyrine) les protège contre l'effet létal photodynamique alors que les souris qui ne reçoivent pas du β-carotène meurent. Comme les photooxydations font intervenir ¹O₂, il conclut que le β-carotène inactive ¹O₂.

I-3-5-4 Les antioxydants

Ce sont des molécules biologiques qui protègent les lipides des membranes cellulaires contre les intermédiaires radicalaires formés au cours des réactions en chaîne. Ces molécules piègent les radicaux très réactifs

en formant des radicaux plus stables. Il en résulte une diminution de vitesse des réactions radicalaires en chaîne.

Ces moyens de défense sont centrés sur deux types d'antioxydants biologiques : Les antioxydants hydrosolubles représentés principalement par l'acide ascorbique et le GSH, et un antioxydant liposoluble, l'α-tocophérol ou Vitamine E (Vit E-OH).

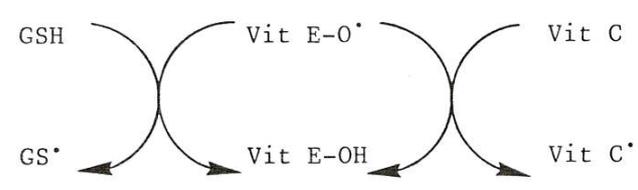
I-3-5-4-1 La Vitamine E

La vitamine E est localisée dans les membranes cellulaires à proximité des lipides ; elle est, de ce fait, l'antioxydant biologique le plus efficace. L'α-tocophérol réagit aussi bien avec les radicaux L• que LOO•. Elle les transforme en LH et LOOH et se transforme elle-même en radical (Vit E-O•) relativement stable (109).



(Vit E-O•) peut être réduit par certaines molécules biologiques et régénérer (Vit E-OH). Parmi les molécules réductrices figurent l'acide ascorbique (Vit C) et secondairement le glutathion (GSH) (111).

α



I-3-5-4-2 Le glutathion et l'acide ascorbique

Le GSH réagit avec les radicaux libres (112) et se transforme

en radical GS[•]



GS[•] n'est pas un radical inerte, il peut réagir directement avec les nucléophiles cellulaires (113) ou fixer l'oxygène moléculaire et former un radical peroxy (GSOO[•]) qui peut par dismutation donner ¹O₂ (114).



Le glutathion comme l'acide ascorbique ne paraissent pas réagir directement sur les radicaux lipidiques (110, 111, 115). Ils exercent plutôt une inhibition de la peroxydation des lipides en régénérant la vit E à partir du radical Vit E-O[•].

I-3-5-5 Autres systèmes de défense

La nature des membranes cellulaires constitue déjà un moyen de défense contre les réactions de peroxydation des lipides. La membrane cellulaire est constituée d'une partie hydrophobe interne et riche en protéines (116), enrobée entre deux couches hydrophiles. Les lipides insaturés sont constitués d'une partie hydrophobe dirigée vers le centre de la membrane et d'une partie hydrophile dirigée vers l'extérieur. La membrane cellulaire constitue ainsi une barrière qui protège les lipides contre les agressions oxydantes, puisque les radicaux qui sont en général de nature anionique ou cationique ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur de cette membrane et restent loin des hydrogènes allyliques faciles à arracher.

D'un autre côté, la transferrine, la ferritine et la céruléoplasmine séquestrent le Fer de l'organisme et jouent ainsi un rôle antioxydant puisqu'ils minimisent la formation de complexes Fe^{II}-O₂ et la décomposition des hydroperoxydes lipidiques (117).

I-3-6 Rapport entre la production et la réduction des dérivés oxygénés réactifs à l'état physiologique normal (Figure 12b)

Biologiquement, l'activation de l'oxygène est sans trop de conséquences graves pour l'organisme. D'une part, parce que la quantité d'oxygène activée par une cellule saine est faible pour provoquer des dommages notoires, et de l'autre, parce que l'organisme est bien équipé pour se défendre contre ces entités réactives.

Dans les conditions physiologiques normales, les systèmes de défense sont rarement dépassés par la production des dérivés de réduction de l'oxygène. Il existe en général un équilibre entre leur production et leur réduction immédiate si bien qu'ils sont maintenus à des concentrations cellulaires tellement faibles qu'il est très difficile de détecter la peroxydation des lipides physiologique normale.

Dans certains cas pathologiques, comme les intoxications involontaires par des produits chimiques ou dans certaines thérapeutiques comme la chimiothérapie du cancer, la nature chimique des produits à laquelle la cellule se trouve confrontée, fait qu'il y a hyperproduction d'entités réactives de l'oxygène au cours de certaines étapes du métabolisme. Une agression oxydante pourrait alors s'établir d'autant plus importante que l'organisme est appauvri en ses moyens de défense naturels.

I-3-7 Les causes de surproduction des dérivés de réduction de l'oxygène et le déclenchement de la peroxydation des lipides

La phase d'initiation de la peroxydation des lipides peut être déclenchée, soit par des radicaux organiques R^{\cdot} qui arrachent directement un hydrogène allylique aux lipides membranaires (89), soit par un dérivé de réduction de l'oxygène généralement $\cdot OH$ ou $ADP-Fe^{II}-O_2$ (95). Ces deux cas ne diffèrent que par la phase d'initiation, la phase de propagation et la phase terminale sont les mêmes et l'entretien de la phase de propagation se

fait par une activation continue de l'oxygène moléculaire.

Une peroxydation des lipides peut donc être induite in vivo soit par une forte dose d'un produit organique métabolisé en radical R^\bullet réactif, soit par des xénobiotiques qui catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en $O_2^{\bullet-}$ puis en $\bullet OH$ ou $ADP-Fe^{II}-O_2$.

I-3-7-1 Composés exogènes agissant par surproduction d' $O_2^{\bullet-}$

La plupart des compartiments subcellulaires contiennent des oxydo-réductases à coenzymes flaviniques ou métalliques (Tableau 6) qui catalysent le transfert d'un électron du NADPH ou du NADH à différents substrats. Ces enzymes produisent normalement $O_2^{\bullet-}$, mais la vitesse de cette réaction est faible.

Plusieurs molécules exogènes peuvent être réduites par ces enzymes puis se réoxydent facilement catalysant ainsi la production d' $O_2^{\bullet-}$. C'est le cas de plusieurs familles de composés organiques dont des médicaments des herbicides et autres (91).

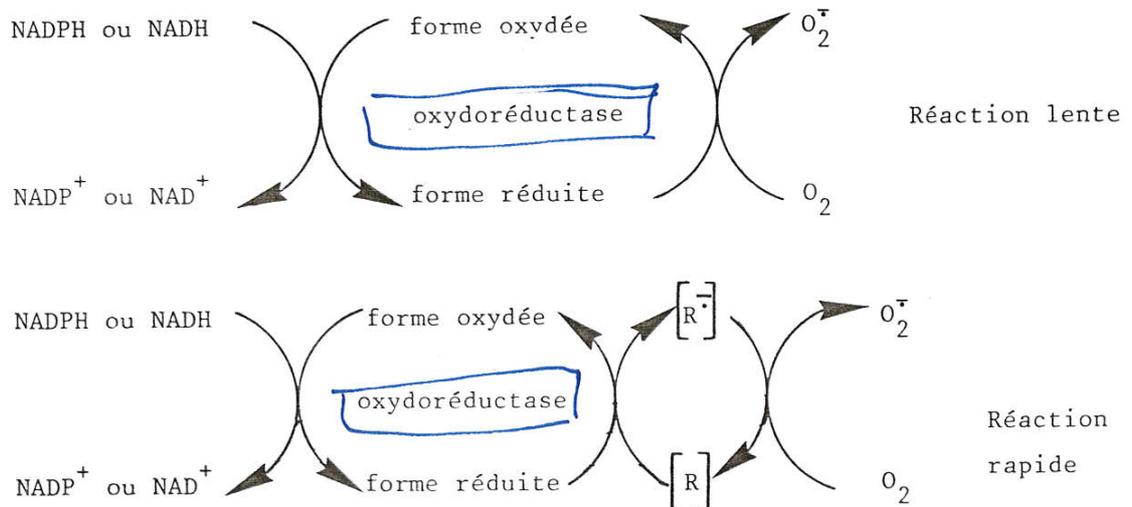


Figure 13 : Catalyse de la réduction de l'oxygène en $O_2^{\bullet-}$

I-3-7-1-1 Les sels de bipyridinium du type paraquat et diquat

Le paraquat est un herbicide qui peut subir une réduction à un électron par les flavoenzymes et former ainsi un cation radical stable. En 1933, Michaelis et Hill montrent que ce radical peut réduire l'oxygène moléculaire en $O_2^{\cdot-}$ (119).

En 1960, Homes et Coll. travaillant sur des analogues structuraux du paraquat, trouvent une corrélation entre leur potentiel de réduction et leur activité herbicide et suggèrent que la réduction du paraquat est à la base de cette activité (120).

D'un autre côté, il a été montré que l'activité herbicide du paraquat nécessite de l'oxygène (121) et que cette activité s'accompagne d'une accumulation de malondialdéhyde chez les plantes (122). Il a été déduit que le paraquat est réduit dans les chloroplastes au cours de la photosynthèse en cation radical, qui en s'oxydant, réduit l'oxygène moléculaire avec formation d' $O_2^{\cdot-}$ responsable de la peroxydation des lipides et de l'activité herbicide.

Les expériences sur les animaux de laboratoire ont montré que le paraquat s'accumule dans les poumons et provoque une fibrose pulmonaire souvent mortelle (123). La superoxyde dismutase diminue l'ampleur de cette fibrose suggérant ainsi que cette toxicité est due au moins en partie à une surproduction d' $O_2^{\cdot-}$ au niveau des poumons (124). Enfin, d'autres expériences ont montré que les souris traitées par le paraquat expirent plus d'éthane que des souris témoins, ce qui prouve son implication dans le processus d'initiation de la peroxydation des lipides (99).

Chez l'homme, plusieurs cas d'intoxication par le paraquat ont été rapportés. Cette intoxication provoque l'apparition d'une fibrose pulmonaire similaire à celle observée chez les animaux de laboratoire intoxiqués par le paraquat, l'évolution de cette fibrose est généralement défavorable (125).

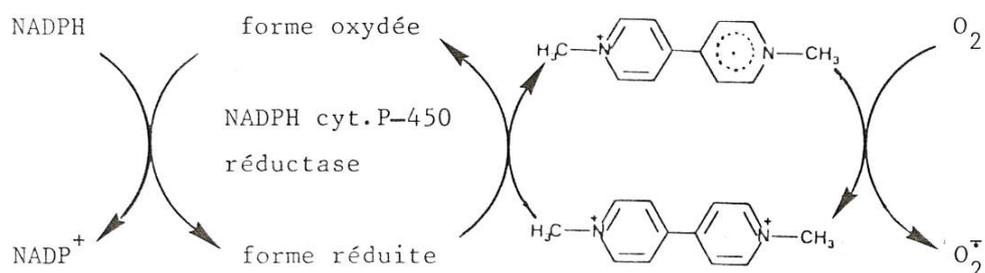
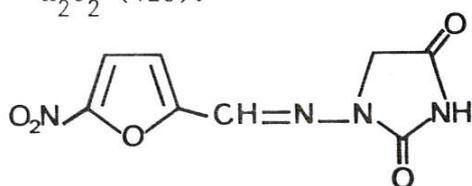


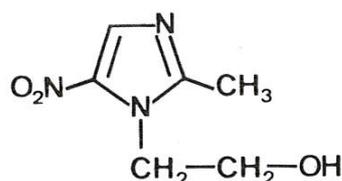
Figure 14 : Activation de l'oxygène par le Paraquat selon la référence 126.

I-3-7-1-2 Les dérivés aromatiques ou hétéro-cycliques nitrés

Le nitrobenzène et plusieurs médicaments antibactériens nitrés provoquent à hautes doses une toxicité qui semble être due à une surproduction d' $O_2^{\cdot -}$. En effet, les composés de structure $ArNO_2$ sont réduits en présence de nitroréductases intestinales ou hépatiques en anion radical $ArNO_2^{\cdot -}$. Cet anion radical nitro peut se transformer en dérivé nitroso $Ar-N=O$ ou revenir par un mécanisme proche de celui du paraquat rapidement au dérivé nitré de départ en réduisant l'oxygène en $O_2^{\cdot -}$ (127). C'est ainsi que la nitrofurantoïne antibactérien urinaire puissant et le métronidazole, anti-amibien, provoquent à fortes doses une toxicité pulmonaire attribuée à la production d' $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 (128).



Nitrofurantoïne



Métronidazole

I-3-7-1-3 Les dérivés quinoniques ou apparentés

Les molécules à structure quinonique peuvent subir une réduction

monoélectronique in vivo et donner des semiquinones. Diverses flavoenzymes sont capables de réaliser cette réduction. La NADPH-cytochrome P-450 réductase, la NADH-cytochrome b₅ réductase et la NADH-ubiquinone oxydoréductase catalysent expérimentalement cette réduction (129).

Les structures semi-quinoniques formées sont autoxydables. En redonnant les quinones de départ, elles catalysent la réduction d'O₂ en O₂⁻ avec formation ultérieure d'eau oxygénée.

Parmi les molécules à structure quinonique pour lesquelles de telles réactions ont été démontrées figurent l'adriamycine (antibiotique antimittotique)(130) et la ménadione antihémorragique dérivé de la naphtoquinone)(131).

Les hydroquinones peuvent aussi être oxydées en semiquinones par les myéloperoxydases et lactoperoxydases (132) en présence d'H₂O₂ et être ainsi capable de réduire l'oxygène en O₂⁻.

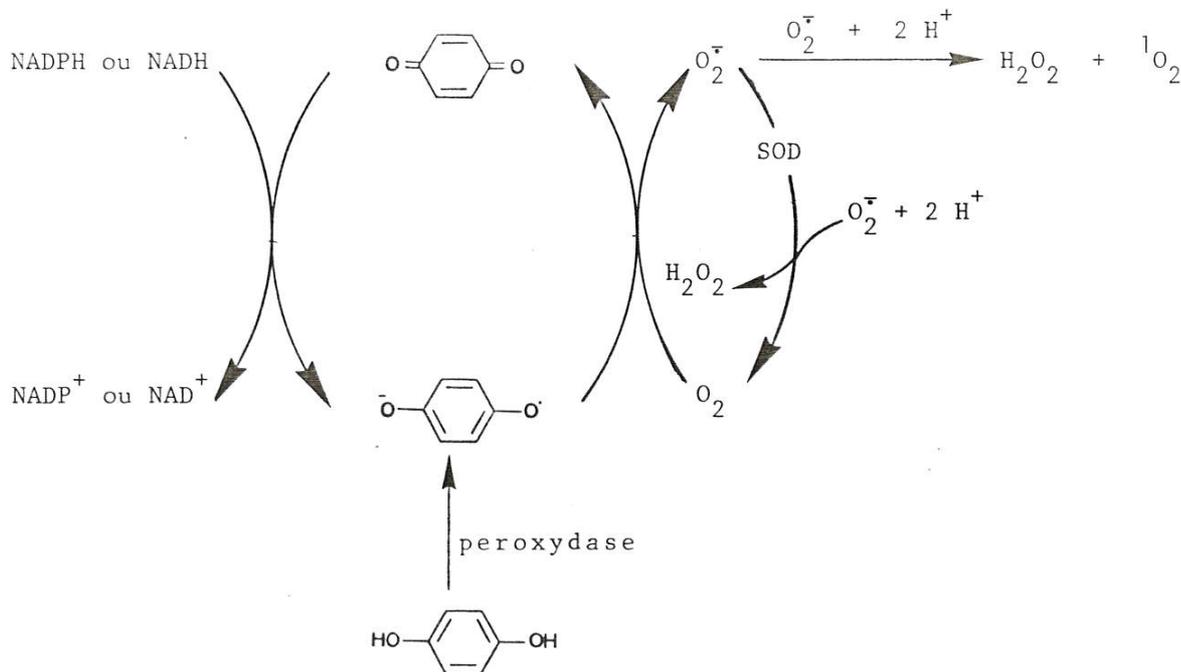
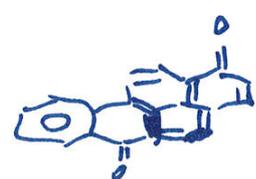


Figure 15 : Formation d'un radical semiquinone (Q[•]) à partir de la quinone ou de l'hydroquinone correspondante et réduction de l'oxygène moléculaire en O₂⁻ ; figure modifiée de la référence (132b)

idem 
 BP 1,6 Q
 GP 3,6 Q
 BP 6,12 Q

I-3-7-2 Composés exogènes qui agissent par production de radicaux R' réactifs

Les hydrocarbures halogénés sont réduits par le cytochrome P-450 puis éliminés de l'organisme sous forme d'alcane ou d'alcène correspondants (133). Cette réduction se fait par étapes successives à un électron qui produisent des intermédiaires métaboliques radicalaires très réactifs. Ces radicaux peuvent se lier d'une façon covalente aux macromolécules cellulaires, détruire le cytochrome P-450, causer la libération des enzymes cytosoliques dans le sang et sont capables de déclencher la phase d'initiation de la peroxydation des lipides.

Exemple du tétrachlorure du carbone

La réduction métabolique du tétrachlorure de carbone forme transitoirement des radicaux $\cdot\text{CCl}_3$ et $\text{CCl}_3\text{-OO}\cdot$ (Figure 16) qui réagissent sur les lipides cellulaires et induisent leur peroxydation.

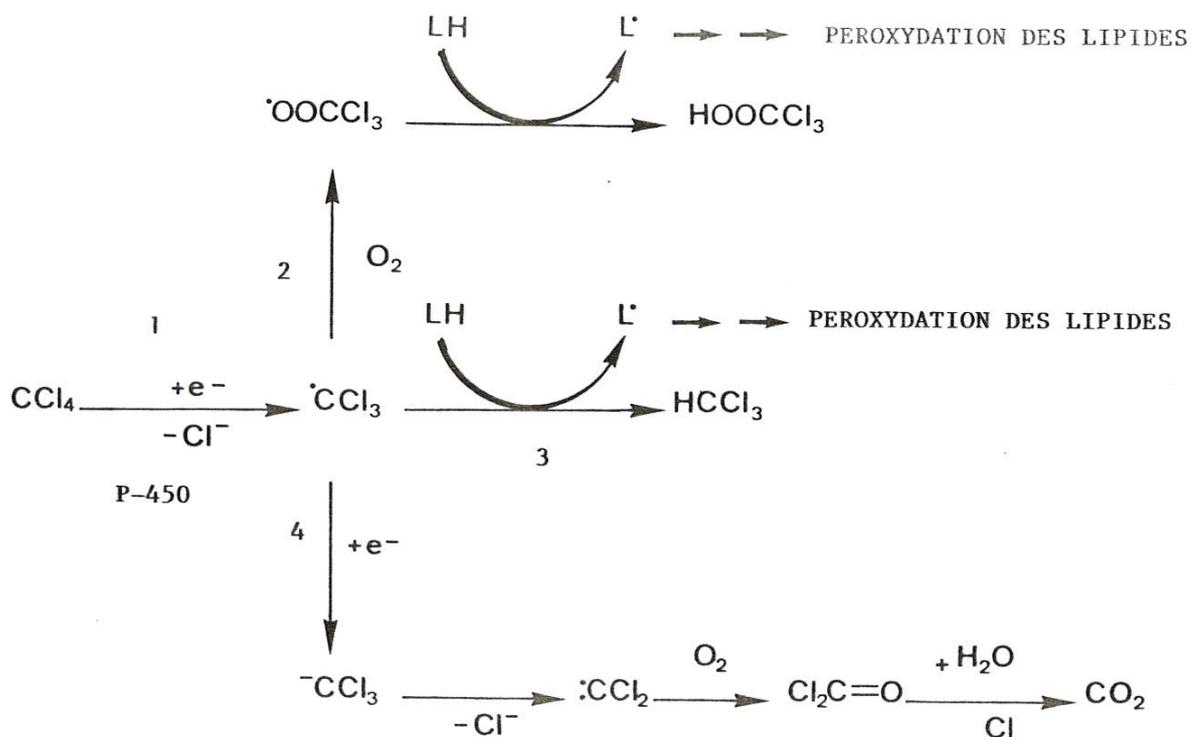


FIGURE 16 : Voies & intermédiaires métaboliques du CCl_4 . LH = lipide ; $\text{L}\cdot$ = radical lipidique (référence 138).


 Dans l'organisme, le CCl_4 subit une première réduction en radical $\cdot\text{CCl}_3$. Une preuve indirecte en est fournie pour la première fois en 1975 (134) par Bini et Coll. qui ont identifié dans les tissus d'animaux traités par le CCl_4 un produit de dimérisation de $\cdot\text{CCl}_3$: L'hexachloroéthane. Depuis, la réduction de CCl_4 en $\cdot\text{CCl}_3$ a été formellement prouvée par des méthodes physiques (135) et par des expériences réalisées avec un système monooxygénase reconstitué à partir de NADPH cyt.P-450 réductase, de vésicules de phospholipides et de cyt.P-450 purifiés (136). Trudell et Coll. ont identifié en incubant le CCl_4 en présence de ce système le 9- et le 10-trichlorométhylstéarate qui proviennent probablement de la réaction entre $\cdot\text{CCl}_3$ et la dioleoylphosphatidylcholine.

~~$\cdot\text{CCl}_3$ est réduit en chloroforme en arrachant un hydrogène à un lipide et déclenche du même coup la phase d'initiation de la peroxydation des lipides. La preuve que cette réduction se fait par une réaction entre $\cdot\text{CCl}_3$ et un lipide (réaction 3) et non pas après une réduction de $\cdot\text{CCl}_3$ en carbanion trichlorométhyl $\bar{\text{CCl}}_3$ puis protonation est donnée en 1981 par Kubie et Anders (89). Ces auteurs ont étudié le métabolisme du CCl_4 en présence de microsomes hépatiques et D_2O , et ils ont montré que la quantité de CCl_4 métabolisé en deutérochloroforme est négligeable par rapport à la quantité totale de chloroforme formée ce qui élimine l'hypothèse d'une protonation de $\bar{\text{CCl}}_3$.~~

$\cdot\text{CCl}_3$ peut aussi réagir avec l'oxygène et former un radical peroxy $\cdot\text{OCCl}_3$ (réaction 2). Celui-ci peut arracher un proton lipidique et déclenche ainsi la phase d'initiation de la peroxydation des lipides (137).

Les réactions 2 et 3 conduisent finalement au phosgène puis au dioxyde de carbone, deux métabolites connus du CCl_4 , alors que la réaction 4 peut donner en plus de ces deux métabolites, du monooxyde de carbone (138).

I-3-7-3 Cas particulier du paracétamol

Le paracétamol, p-hydroxyacétophénétidine (PHAP), est un médicament analgésique dont le surdosage cause une nécrose hépatique sévère et souvent mortelle aussi bien chez l'homme que chez l'animal de laboratoire (139). Cette toxicité a été associée à la peroxydation des lipides membranaires de l'hépatocyte (140) et serait due à une bioactivation du composé de départ par le cyt.P-450 en un intermédiaire réactif (141).

Il est actuellement communément admis que le paracétamol exerce sa toxicité au moins en partie par production de N-acétyl-p-benzoquinonimine (NAPQI). Ce composé serait détoxifié par conjugaison avec le GSH (142), mais en cas de surdosage, les capacités de conjugaison seraient dépassées par épuisement du stock de GSH cellulaire et une liaison avec les macromolécules cellulaires ou un stress oxydant s'installe, déclenchant des phénomènes toxiques qui entraînent la mort de la cellule (143).

La formation de NAPQI au cours du métabolisme du paracétamol n'est prouvée qu'indirectement. Les seuls résultats concrets dont on dispose à propos du métabolisme et de la toxicité du paracétamol se résument dans les quatre points suivants :

- A doses thérapeutiques, la majeure partie du paracétamol s'élimine inchangé dans les urines sous formes glucuro et sulfoconjuguées (144)
- Chez l'homme ou l'animal 4 à 7 % du paracétamol administré s'élimine dans les urines sous forme de mercapturate (144).
- La peroxydation des lipides induite in vivo chez la souris par le paracétamol est 25 fois plus importante chez des souris qui ont été traitées de façon à diminuer leur taux de GSH cellulaire que chez des souris témoins (140).
- Chez l'animal traité au paracétamol, la liaison covalente aux macromolécules de la cellule ne se manifeste qu'à des doses qui diminuent de 70 % ou plus le taux de GSH cellulaire (145).

Ces informations montrent que le paracétamol est métabolisé en partie en un intermédiaire électrophile détoxifié par le GSH. Tout le monde s'accorde à penser que le NAPQI est cet intermédiaire (146) et plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer sa formation. De ces mécanismes, on ne retiendra que les deux plus probables (Figure 17).

- 1 - Le paracétamol en présence de cyt.P-450 est oxydé en un premier temps en N-hydroxyparacétamol qui par perte d'une molécule d'eau donnerait la NAPQI (147)
- 2 - Le paracétamol subit une oxydation monoélectronique en donnant un dérivé radicalaire qui par transfert d'un électron à l'oxygène se transforme en NAPQI avec formation d' O_2^- responsable du déclenchement de la peroxydation des lipides (147).

Le N-hydroxyparacétamol a été dernièrement synthétisé ; il est encore plus toxique que le paracétamol mais sa vitesse de déshydratation en NAPQI s'est révélée très faible (148). L'hypothèse la plus probable est donc celle qui propose le passage par un dérivé radicalaire. En effet, il a été montré que la superoxyde dismutase responsable de la dismutation d' O_2^- inhibe la peroxydation des lipides due à un surdosage de paracétamol chez l'animal de laboratoire (149).

Récemment, la NAPQI a été synthétisée chimiquement (150) et électrochimiquement (151). Cette molécule réagit spontanément avec le GSH et la N-acétylcystéine et donne les mêmes composés d'addition que donne le paracétamol lorsqu'il est incubé en présence de microsomes hépatiques de rat et les mêmes nucléophiles (151). De plus, elle s'est avérée beaucoup plus toxique que le paracétamol chez la souris (151).

I-3-8 Conséquences biochimiques de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides a des prolongements toxiques beaucoup plus graves que l'effet de base qui est la détérioration des lipides membra-

naires. La juxtaposition des lipides et des protéines membranaires au niveau cellulaire favorise des réactions secondaires entre les lipides activés et les protéines avoisinantes. Les enzymes membranaires sont constituées par une partie protéique enfouie dans un environnement lipidique qui est une partie intégrante de l'enzyme et qui module son activité. Au cours de la peroxydation des lipides et surtout au cours de la phase finale de piégeage des radicaux, deux radicaux lipidiques (L^{\bullet} , LO^{\bullet} , LOO^{\bullet}) peuvent s'associer et forment un produit non radicalaire. Dans ce cas, le lipide ne peut plus faciliter le transfert des électrons vers les cyt.P-450 par exemple, ce qui provoque une perturbation de l'activité enzymatique (152). Les radicaux LOO^{\bullet} pour leur part pourraient arracher des atomes d'hydrogène aux protéines avoisinantes d'où la formation de liaisons protéine-protéine ou lipide-protéine (153), avec en conséquence la perturbation des structures et des activités enzymatiques membranaires. Tappel (154) a démontré que les enzymes à fonction -SH sont les plus sensibles à l'inactivation par lipoperoxydation aussi bien par altération de la structure membranaire que par formation de pont disulfure. Ainsi donc les conséquences biochimiques d'une agression oxydante au niveau membranaire sont très complexes et dépassent le simple stade de peroxydation lipidique pour perturber les protéines, partie intégrante de la membrane cellulaire. Les membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique renferment une forte proportion d'acides gras insaturés (155). Ils sont riches en hémoprotéines (cyt.P-450) et en Fer, tous deux des catalyseurs de la lipoperoxydation. Ils sont donc très sensibles aux peroxydations avec toutes les perturbations enzymatiques et biologiques qui en découlent.

La peroxydation des lipides cause enfin une lyse cellulaire. Dans ce cas non seulement la cellule ne peut plus assurer ses activités physiologiques, mais elle libère dans le sang ses enzymes et les produits de cassure des lipides peroxydés (156) dont le malondialdéhyde qui s'est révélé cancérigène chez la souris (157) et mutagène dans le test d'Ames (158).

En conclusion, les complications dues à une peroxydation des li-

pides sont très complexes et très difficiles à cerner en totalité. La peroxydation des lipides une fois déclenchée ne s'arrête que par l'intervention d'antioxydants piègeurs de radicaux ou par l'épuisement des lipides membranaires ce qui explique l'étendue des manifestations toxiques qu'elle engendre.

I-4 Buts et plan du travail

I-4-1 Résumé des situations qui augmentent la production des dérivés de réduction de l'oxygène

La production des dérivés de réduction de l'oxygène est augmentée dans l'organisme principalement dans trois cas :

- 1 - Par les produits exogènes (médicaments ou toxiques) qui s'intercalent dans la chaîne des réactions d'oxydoréduction du métabolisme de l'oxygène et catalysent la production d' O_2^- .

Parmi ces produits, le paraquat, l'adriamycine, la mitomycine c, la 6-hydroxyloppamine, l'alloxane, la nitrofurantoïne, le métronidazole et la bléomycine, etc... sont des producteurs potentiels d' O_2^- .

- 2 - Par les produits exogènes (RH) métabolisés dans l'organisme en radicaux R^\bullet réactifs qui arrachent un hydrogène lipidique et favorisent ainsi la réduction de l'oxygène par les radicaux L^\bullet formés. Parmi ces produits, on peut citer le tétrachlorure de carbone, l'éthanol, les barbiturates, la cocaïne et les organophosphates (91).

- 3 - Par certaines maladies : Les anémies hémolytiques, les thalassémies, l'ischémie, l'hyperuricémie, les inflammations, la dystrophie musculaire, l'infarctus du myocarde, la cirrhose hépatique et l'athérosclérose ont été attribués en partie à la peroxydation des lipides (91).

Des complications de nature cancérigène ont été attribuées à la peroxydation des lipides après que certains chercheurs aient montré que le malondialdéhyde est mutagène dans le test d'Ames (157) et cancérigène chez la souris (158).

I-4-2 Buts

Etant donné l'implication de la peroxydation des lipides dans de très nombreux cas de pathologie, il est intéressant du point de vue clinique de trouver des composés non toxiques, capables de contrôler une agression oxydante, dans le but de les utiliser :

- ~~En association avec les médicaments dont les effets secondaires sont dus à une peroxydation des lipides~~
- Comme piègeurs de radicaux libres produits lors du traitement de certains cancers par les rayonnements
- Dans les cas d'intoxication par des produits organiques qui provoquent une peroxydation des lipides

Notre intérêt s'est porté sur l'ADT car c'est une molécule qui a été utilisée depuis 1947 en thérapeutique humaine sans engendrer le moindre cas de toxicité. De plus, elle possède des propriétés hépato et radioprotectrices (3) qui ont été très peu étudiées.

- Comme son métabolisme est mal connu, nous l'avons étudié in vitro et in vivo.
- Nous nous sommes en plus intéressés à voir s'il y avait une relation entre ses propriétés hépatoprotectrices et un éventuel pouvoir antioxydant
- Nous avons enfin étudié la relation structure-activité pharmacologique en testant comparativement l'ADT par rapport à des analogues structuraux synthétisés dans le laboratoire.

I-4-3 Plan du travail

Ce travail comporte trois parties.

- 1 - Métabolisme in vivo et in vitro de l'ADT
- 2 - Comportement de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides
 - 2-1 Induite in vitro
 - 2-2 Induite in vivo
- 3 - Détermination des mécanismes biochimiques et chimiques de l'inhibition de la peroxydation des lipides par l'ADT grâce à une étude comparative de l'ADT et de certains de ses dérivés

II - METABOLISME ET PHARMACOCINETIQUE DE L'ADT

II-1 Etude du métabolisme du $^{14}\text{C}_5$ -ADT in vitro

II-1-1 Méthode employée

Le métabolisme du $^{14}\text{C}_5$ -ADT a été étudié en présence de microsomes de foie (de rat traité par le phénobarbital) et de NADPH, cofacteur des mono-oxygénases à cytochrome P-450 mais en absence des cofacteurs des enzymes de conjugaison. Dans ce système, seules les réactions réalisées par les enzymes de la phase I sont catalysées.

Après un temps déterminé d'incubation à 37°C, le mélange réactionnel est extrait immédiatement plusieurs fois par deux fois son volume d'acétate d'éthyle jusqu'à disparition complète de la radioactivité dans la phase aqueuse.

Les différents extraits d'acétate d'éthyle sont regroupés et évaporés à sec sous azote ou à l'aide d'un rotavapor. L'extrait sec est alors dissous dans un volume de méthanol égal au cinquième du volume réactionnel de départ. Cette solution méthanolique servira pour l'analyse des métabolites de l'ADT en chromatographie liquide haute performance (CLHP).

II-1-2 Profil CLHP des métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT

Les métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT ont été séparés et isolés par CLHP phase inverse. Nous travaillons dans des conditions isocratiques avec une phase mobile constituée d'un mélange de méthanol et d'eau contenant de l'acide acétique et une colonne analytique remplie de silice comportant des chaînes hydrocarbonées C_{18} . Les métabolites sont détectés à la fois par radioactivité et par leur absorption en UV.

La Figure 18 représente le profil d'élution en CLHP d'un extrait méthanolique d'un mélange de $^{14}\text{C}_5$ -ADT et de microsomes incubés pendant

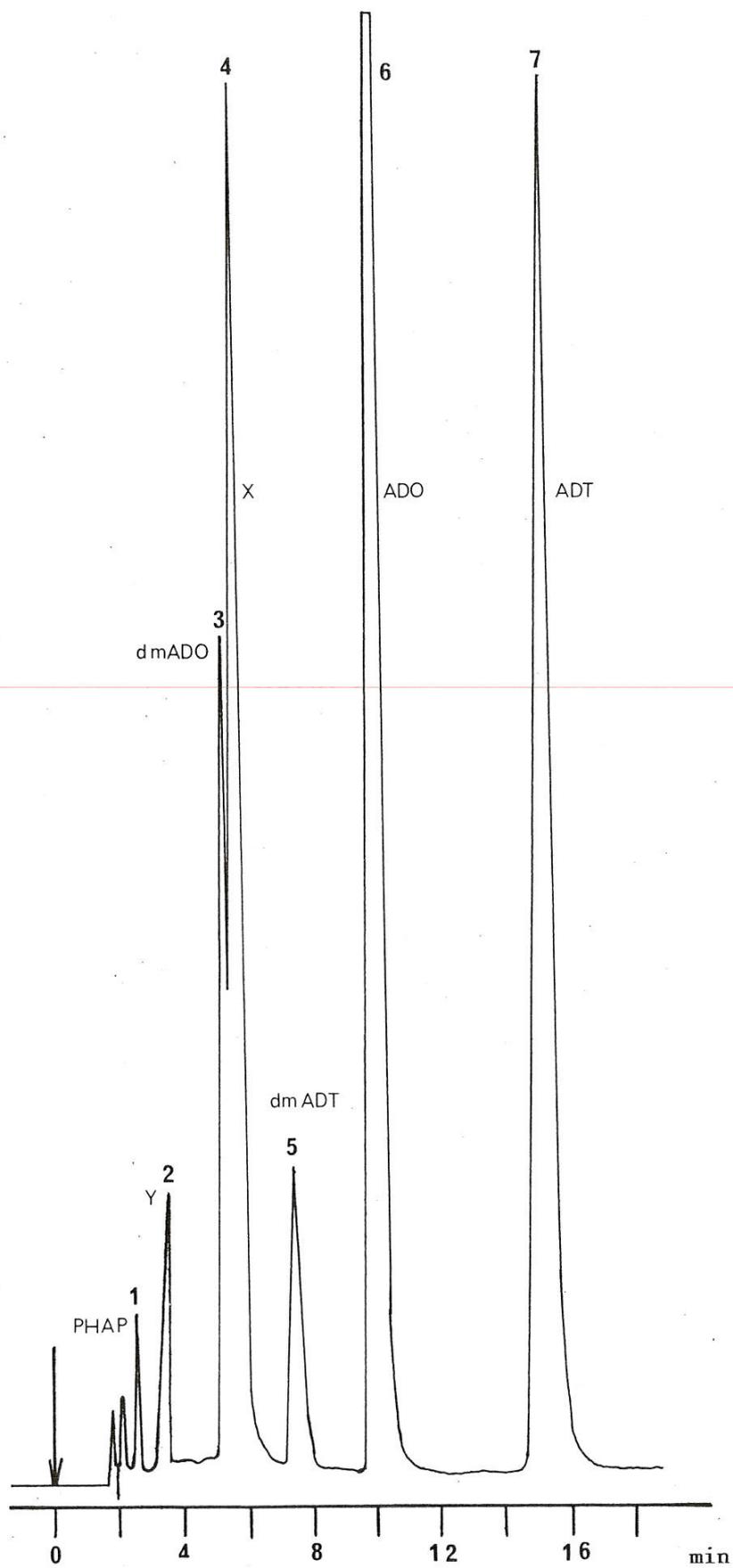


FIGURE 19 : Profil d'élution en CLHP des métabolites d'ADT obtenus par synthèse chimique. Les conditions CLHP sont les mêmes que pour la FIGURE 18 mis à part la détection réalisée ici en UV (310nm)

I-3-7-3 Cas particulier du paracétamol

Le paracétamol, p-hydroxyacétophénétidine (PHAP), est un médicament analgésique dont le surdosage cause une nécrose hépatique sévère et souvent mortelle aussi bien chez l'homme que chez l'animal de laboratoire (139). Cette toxicité a été associée à la peroxydation des lipides membranaires de l'hépatocyte (140) et serait due à une bioactivation du composé de départ par le cyt.P-450 en un intermédiaire réactif (141).

Il est actuellement communément admis que le paracétamol exerce sa toxicité au moins en partie par production de N-acétyl-p-benzoquinonimine (NAPQI). Ce composé serait détoxifié par conjugaison avec le GSH (142), mais en cas de surdosage, les capacités de conjugaison seraient dépassées par épuisement du stock de GSH cellulaire et une liaison avec les macromolécules cellulaires ou un stress oxydant s'installe, déclenchant des phénomènes toxiques qui entraînent la mort de la cellule (143).

La formation de NAPQI au cours du métabolisme du paracétamol n'est prouvée qu'indirectement. Les seuls résultats concrets dont on dispose à propos du métabolisme et de la toxicité du paracétamol se résument dans les quatre points suivants :

- A doses thérapeutiques, la majeure partie du paracétamol s'élimine inchangé dans les urines sous formes glucuro et sulfoconjuguées (144)
- Chez l'homme ou l'animal 4 à 7 % du paracétamol administré s'élimine dans les urines sous forme de mercapturate (144).
- La peroxydation des lipides induite in vivo chez la souris par le paracétamol est 25 fois plus importante chez des souris qui ont été traitées de façon à diminuer leur taux de GSH cellulaire que chez des souris témoins (140).
- Chez l'animal traité au paracétamol, la liaison covalente aux macromolécules de la cellule ne se manifeste qu'à des doses qui diminuent de 70 % ou plus le taux de GSH cellulaire (145).

Ces informations montrent que le paracétamol est métabolisé en partie en un intermédiaire électrophile détoxifié par le GSH. Tout le monde s'accorde à penser que le NAPQI est cet intermédiaire (146) et plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer sa formation. De ces mécanismes, on ne retiendra que les deux plus probables (Figure 17).

- 1 - Le paracétamol en présence de cyt.P-450 est oxydé en un premier temps en N-hydroxyparacétamol qui par perte d'une molécule d'eau donnerait la NAPQI (147)
- 2 - Le paracétamol subit une oxydation monoélectronique en donnant un dérivé radicalaire qui par transfert d'un électron à l'oxygène se transforme en NAPQI avec formation d' $O_2^{\cdot-}$ responsable du déclenchement de la peroxydation des lipides (147).

Le N-hydroxyparacétamol a été dernièrement synthétisé ; il est encore plus toxique que le paracétamol mais sa vitesse de déshydratation en NAPQI s'est révélée très faible (148). L'hypothèse la plus probable est donc celle qui propose le passage par un dérivé radicalaire. En effet, il a été montré que la superoxyde dismutase responsable de la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ inhibe la peroxydation des lipides due à un surdosage de paracétamol chez l'animal de laboratoire (149).

Récemment, la NAPQI a été synthétisée chimiquement (150) et électrochimiquement (151). Cette molécule réagit spontanément avec le GSH et la N-acétylcystéine et donne les mêmes composés d'addition que donne le paracétamol lorsqu'il est incubé en présence de microsomes hépatiques de rat et les mêmes nucléophiles (151). De plus, elle s'est avérée beaucoup plus toxique que le paracétamol chez la souris (151).

I-3-8 Conséquences biochimiques de la peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides a des prolongements toxiques beaucoup plus graves que l'effet de base qui est la détérioration des lipides membra-

naires. La juxtaposition des lipides et des protéines membranaires au niveau cellulaire favorise des réactions secondaires entre les lipides activés et les protéines avoisinantes. Les enzymes membranaires sont constituées par une partie protéique enfouie dans un environnement lipidique qui est une partie intégrante de l'enzyme et qui module son activité. Au cours de la peroxydation des lipides et surtout au cours de la phase finale de piégeage des radicaux, deux radicaux lipidiques (L^{\bullet} , LO^{\bullet} , LOO^{\bullet}) peuvent s'associer et forment un produit non radicalaire. Dans ce cas, le lipide ne peut plus faciliter le transfert des électrons vers les cyt.P-450 par exemple, ce qui provoque une perturbation de l'activité enzymatique (152). Les radicaux LOO^{\bullet} pour leur part pourraient arracher des atomes d'hydrogène aux protéines avoisinantes d'où la formation de liaisons protéine-protéine ou lipide-protéine (153), avec en conséquence la perturbation des structures et des activités enzymatiques membranaires. Tappel (154) a démontré que les enzymes à fonction -SH sont les plus sensibles à l'inactivation par lipoperoxydation aussi bien par altération de la structure membranaire que par formation de pont disulfure. Ainsi donc les conséquences biochimiques d'une agression oxydante au niveau membranaire sont très complexes et dépassent le simple stade de peroxydation lipidique pour perturber les protéines, partie intégrante de la membrane cellulaire. Les membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique renferment une forte proportion d'acides gras insaturés (155). Ils sont riches en hémoprotéines (cyt.P-450) et en Fer, tous deux des catalyseurs de la lipoperoxydation. Ils sont donc très sensibles aux peroxydations avec toutes les perturbations enzymatiques et biologiques qui en découlent.

La peroxydation des lipides cause enfin une lyse cellulaire. Dans ce cas non seulement la cellule ne peut plus assurer ses activités physiologiques, mais elle libère dans le sang ses enzymes et les produits de cassure des lipides peroxydés (156) dont le malondialdéhyde qui s'est révélé cancérigène chez la souris (157) et mutagène dans le test d'Ames (158).

En conclusion, les complications dues à une peroxydation des li-

pides sont très complexes et très difficiles à cerner en totalité. La peroxydation des lipides une fois déclenchée ne s'arrête que par l'intervention d'antioxydants piègeurs de radicaux ou par l'épuisement des lipides membranaires ce qui explique l'étendue des manifestations toxiques qu'elle engendre.

I-4 Buts et plan du travail

I-4-1 Résumé des situations qui augmentent la production des dérivés de réduction de l'oxygène

La production des dérivés de réduction de l'oxygène est augmentée dans l'organisme principalement dans trois cas :

- 1 - Par les produits exogènes (médicaments ou toxiques) qui s'intercalent dans la chaîne des réactions d'oxydoréduction du métabolisme de l'oxygène et catalysent la production d' O_2^- .

Parmi ces produits, le paraquat, l'adriamycine, la mitomycine c, la 6-hydroxylopatamine, l'alloxane, la nitrofurantoïne, le métronidazole et la bléomycine, etc... sont des producteurs potentiels d' O_2^- .

- 2 - Par les produits exogènes (RH) métabolisés dans l'organisme en radicaux R \cdot réactifs qui arrachent un hydrogène lipidique et favorisent ainsi la réduction de l'oxygène par les radicaux L \cdot formés. Parmi ces produits, on peut citer le tétrachlorure de carbone, l'éthanol, les barbiturates, la cocaïne et les organophosphates (91).

- 3 - Par certaines maladies : Les anémies hémolytiques, les thalassémies, l'ischémie, l'hyperuricémie, les inflammations, la dystrophie musculaire, l'infarctus du myocarde, la cirrhose hépatique et l'athérosclérose ont été attribués en partie à la peroxydation des lipides (91).

Des complications de nature cancérigène ont été attribuées à la peroxydation des lipides après que certains chercheurs aient montré que le malondialdéhyde est mutagène dans le test d'Ames (157) et cancérigène chez la souris (158).

I-4-2 Buts

Etant donné l'implication de la peroxydation des lipides dans de très nombreux cas de pathologie, il est intéressant du point de vue clinique de trouver des composés non toxiques, capables de contrôler une agression oxydante, dans le but de les utiliser :

- En association avec les médicaments dont les effets secondaires sont dus à une peroxydation des lipides
- Comme piègeurs de radicaux libres produits lors du traitement de certains cancers par les rayonnements
- Dans les cas d'intoxication par des produits organiques qui provoquent une peroxydation des lipides

Notre intérêt s'est porté sur l'ADT car c'est une molécule qui a été utilisée depuis 1947 en thérapeutique humaine sans engendrer le moindre cas de toxicité. De plus, elle possède des propriétés hépato et radio-protectrices (3) qui ont été très peu étudiées.

- Comme son métabolisme est mal connu, nous l'avons étudié in vitro et in vivo.
- Nous nous sommes en plus intéressés à voir s'il y avait une relation entre ses propriétés hépatoprotectrices et un éventuel pouvoir antioxydant
- Nous avons enfin étudié la relation structure-activité pharmacologique en testant comparativement l'ADT par rapport à des analogues structuraux synthétisés dans le laboratoire.

I-4-3 Plan du travail

Ce travail comporte trois parties.

- 1 - Métabolisme in vivo et in vitro de l'ADT
- 2 - Comportement de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides
 - 2-1 Induite in vitro
 - 2-2 Induite in vivo
- 3 - Détermination des mécanismes biochimiques et chimiques de l'inhibition de la peroxydation des lipides par l'ADT grâce à une étude comparative de l'ADT et de certains de ses dérivés

II - METABOLISME ET PHARMACOCINETIQUE DE L'ADT

II-1 Etude du métabolisme du $^{14}\text{C}_5$ -ADT in vitro

II-1-1 Méthode employée

Le métabolisme du $^{14}\text{C}_5$ -ADT a été étudié en présence de microsomes de foie (de rat traité par le phénobarbital) et de NADPH, cofacteur des monooxygénases à cytochrome P-450 mais en absence des cofacteurs des enzymes de conjugaison. Dans ce système, seules les réactions réalisées par les enzymes de la phase I sont catalysées.

Après un temps déterminé d'incubation à 37°C, le mélange réactionnel est extrait immédiatement plusieurs fois par deux fois son volume d'acétate d'éthyle jusqu'à disparition complète de la radioactivité dans la phase aqueuse.

Les différents extraits d'acétate d'éthyle sont regroupés et évaporés à sec sous azote ou à l'aide d'un rotavapor. L'extrait sec est alors dissous dans un volume de méthanol égal au cinquième du volume réactionnel de départ. Cette solution méthanolique servira pour l'analyse des métabolites de l'ADT en chromatographie liquide haute performance (CLHP).

II-1-2 Profil CLHP des métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT

Les métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT ont été séparés et isolés par CLHP phase inverse. Nous travaillons dans des conditions isocratiques avec une phase mobile constituée d'un mélange de méthanol et d'eau contenant de l'acide acétique et une colonne analytique remplie de silice comportant des chaînes hydrocarbonées C_{18} . Les métabolites sont détectés à la fois par radioactivité et par leur absorption en UV.

La Figure 18 représente le profil d'élution en CLHP d'un extrait méthanolique d'un mélange de $^{14}\text{C}_5$ -ADT et de microsomes incubés pendant

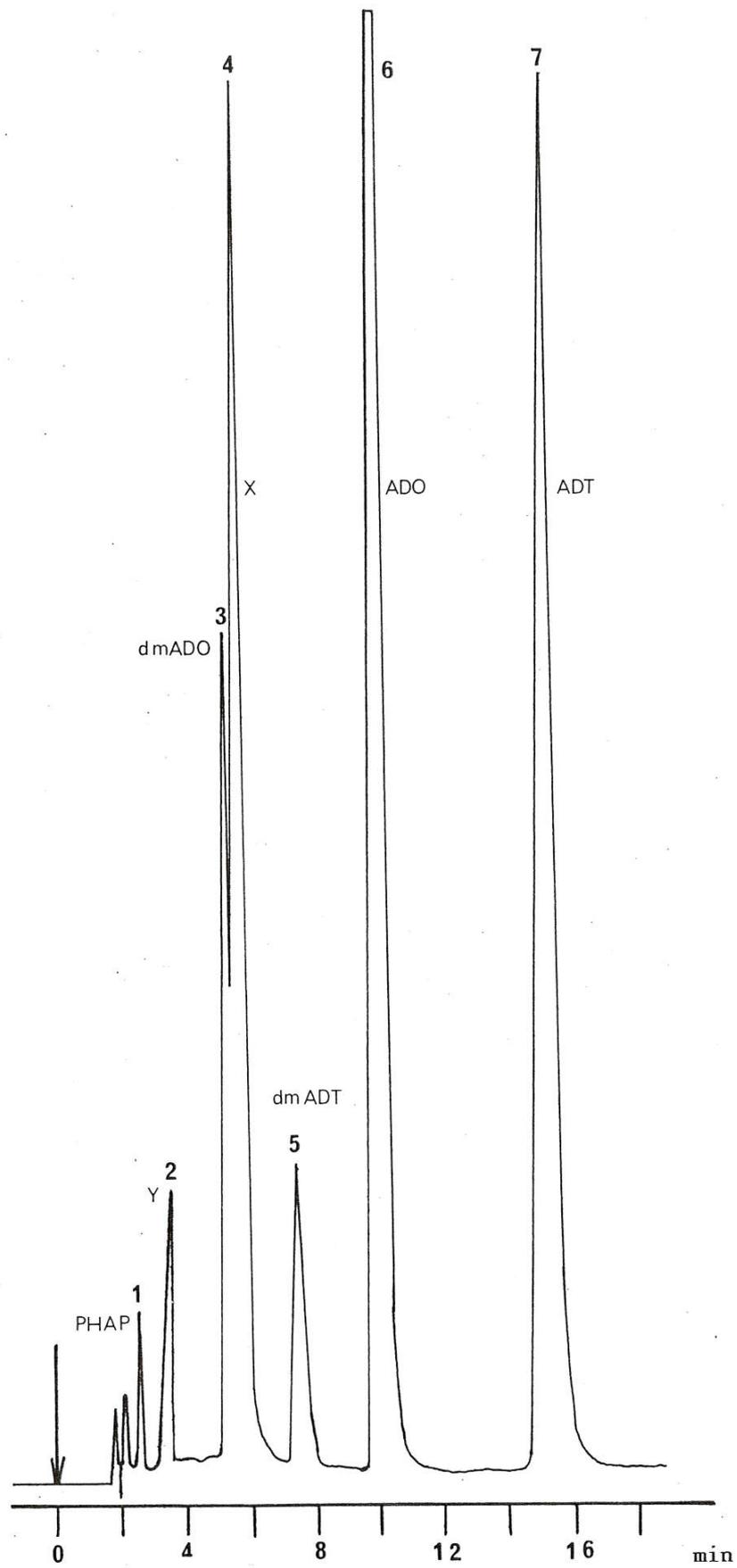


FIGURE 19 : Profil d'élution en CLHP des métabolites d'ADT obtenus par synthèse chimique. Les conditions CLHP sont les mêmes que pour la FIGURE 18 mis à part la détection réalisée ici en UV (310nm)

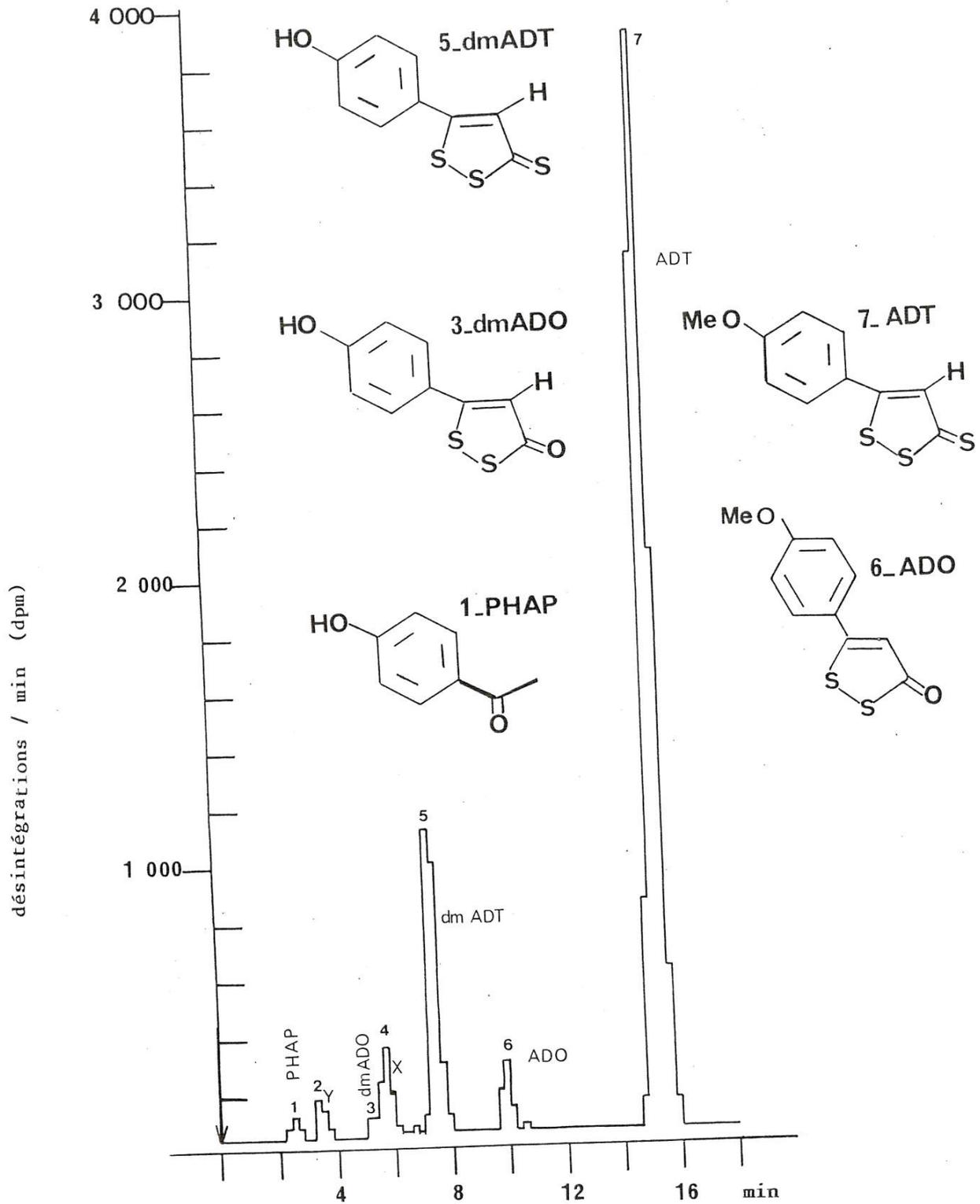


FIGURE 18 : Profil d'éluion en CLHP des métabolites du $^{14}\text{C}_5\text{ADT}$, obtenus par incubation avec des microsomes hépatiques de rats traités au phénobarbital. Les métabolites sont extraits du milieu réactionnel selon la méthode mentionnée au paragraphe (II.1.1.) puis analysés en CLHP dans les conditions décrites au paragraphe (II.1.2.) et leur détection se fait par radioactivité.

2 min à 37°C. Cette figure montre qu'en plus de l'ADT (pic n° 7), il y a six produits radioactifs qui apparaissent dans le mélange réactionnel, après seulement 2 minutes d'incubation.

II-1-3 Détermination de la structure des métabolites de l'ADT

Pour déterminer la structure chimique des métabolites de l'ADT, on incube de l'ADT non radioactif en présence de microsomes hépatiques dans les conditions décrites précédemment, mais on travaille sur une quantité beaucoup plus importante d'ADT de façon à pouvoir isoler en CLHP des quantités suffisantes de métabolites pour les analyser en spectrométrie de masse, UV-visible et RMN.

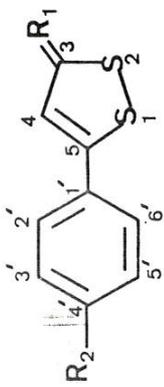
La durée d'incubation est de 10 min et les sept produits sont détectés par leur absorption en lumière UV à 310 nm et isolés.

II-1-3-1 Produit correspondant au pic n° 7

Les données de ce produit en spectrophotométrie UV-visible et en spectrométrie de masse et de RMN¹H correspondent parfaitement à celles de l'ADT (Tableaux 8 et 9). Ce produit est donc de l'ADT non métabolisé.

II-1-3-2 Produit correspondant au pic n° 6

L'analyse en spectrométrie de masse de ce produit (Tableau 9) montre que son poids moléculaire est de 224 soit une perte de masse de 16 par rapport à l'ADT. Les données spectrales en RMN (Tableau 8) montrent que ce métabolite contient encore 4 protons aromatiques symétriques deux à deux et qui donnent deux doublets correspondant chacun à 2 protons. Le doublet (d) à 7,63 ppm avec une constante de couplage $J = 8,5$ Hz correspond aux protons 2' et 6' alors que le doublet à 7,03 ppm ($J = 8,5$ Hz) correspond aux protons 3' et 5'. Sur le spectre RMN sont présents en plus deux singulets, l'un à 3,90 ppm qui intègre pour 3 protons : ce sont les 3 protons de la



DONNEES RMN ¹ H DES METABOLITES DISSOUS DANS C ₃ D ₆ O						DONNEES UV-VISIBLES DES METABOLITES DISSOUS DANS DU TAMPON PHOSPHATE 0.1 M, pH 7,4		
Métabolite	R ₂	R ₁	Protons n° 2' et 6'	Protons 3' et 5'	Protons de la fonction R ₂	Proton H ₄	λ _{max}	ε (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
ADT	OCH ₃	S	2 H, d à 7,68 ppm J = 8,5 Hz	2 H, d à 7,04 ppm J = 8,5 Hz	3 H, s 3,92 ppm	1 H, s 7,46 ppm	355 nm 415 nm	19 000 17 000
dmADT	OH	S	2 H, d à 7,94 ppm J = 8,5 Hz	2 H, d à 7,14 ppm J = 8,5 Hz	1 H, s 9,52 ppm	1 H, s 7,66 ppm	360 nm 420 nm	15 600 18 400
ADO	OCH ₃	O	2 H, d à 7,63 ppm J = 8,5 Hz	2 H, d à 7,03 ppm J = 8,5 Hz	3 H, s 3,90 ppm	1 H, s 6,81 ppm	315 nm	23 100
dmADO	OH	O	2 H, d à 7,88 ppm J = 8,5 Hz	2 H, d à 7,16 ppm J = 8,5 Hz	1 H, s 9,42 ppm	1 H, s 7,12 ppm	320 nm	22 800

Tableau 8 Données RMN¹H et UV-visible des métabolites de l'ADT aussi bien synthétisés chimiquement qu'obtenus par incubation de l'ADT avec des microsomes de foie de rat traité au PB. d = doublet, s = singulet, J = constante de couplage, λ_{max} = longueur d'onde d'absorption maximale, ε = coefficient d'extinction molaire

fonction méthoxy en position 4' du phényl, l'autre à 6,81 ppm et intègre pour 1 proton, c'est le proton en position 4 du cycle dithia-1,2-cyclopentène.

En comparant les données spectrales du métabolite N° 6 et de l'ADT, on remarque que ce métabolite renferme encore la structure p-méthoxyphényl-5 dithia-1,2-cyclopentène, mais que son poids moléculaire est de 224 au lieu de 240 pour l'ADT. Cette différence correspond au remplacement de la fonction C=S de l'ADT par une fonction C=O, on conclut que le métabolite n° 6 est la paraméthoxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène-3-one (ADO). L'ADO a été synthétisé chimiquement en faisant réagir sur l'ADT l'acétate de mercure en présence d'acide acétique (159). Cet authentique de synthèse a les mêmes caractéristiques spectrales que le produit n° 6 isolé après incubation de l'ADT en présence de microsomes. Son temps de rétention en CLHP correspond parfaitement à celui du pic n° 6 (Figure 19), ce qui confirme d'une façon univoque que ce dernier correspond bien à l'ADO.

II-1-3-3 Produit correspondant au pic n° 5

Les caractéristiques complètes de ce produit en spectrométrie de masse sont indiquées sur le Tableau 9. C'est un métabolite dont le poids moléculaire est 226, soit une perte de masse de 14 par rapport à l'ADT.

Les caractéristiques de ce produit en RMN¹H sont indiquées sur le Tableau 8. Sur le spectre RMN, on remarque deux doublets à 7,94 ppm (J = 8,5 Hz) et 7,14 ppm (J = 8,5 Hz) ; ils correspondent respectivement aux protons aromatiques (2',6') et (3',5') ; un singulet à 7,66 ppm qui intègre pour un seul proton, c'est le proton en position 4 du cycle dithia-1,2-cyclopentène, mais par rapport au spectre de l'ADT, on remarque l'absence du singulet à 3,90 ppm qui correspond aux 3 protons de la fonction méthoxy sur le carbone n° 4' du phényl. Par contre, sur ce spectre il y a apparition d'un singulet à 9,52 ppm qui n'existe pas sur le spectre de l'ADT. Ce singulet intègre pour un proton et correspond à un hydrogène phénolique. On

ADT		ADO		dmADT		dmADO		PHAP	
M/e	ab rel (%)								
		Met	Aut	Met	Aut	Met	Aut	Met	Aut
240 (M ⁺)	100	224 (M ⁺)	100	226 (M ⁺)	60	210 (M ⁺)	35	136 (M ⁺)	36
225	5	209	4	210	6	182	8	121	100
175	92	196	30	182	4	145	43	93	35
160	16	181	8	161	100	118	100	85	30
151	11	159	80	150	7	94	10	43	10
132	44	132	96	137	15	89	30	-	-
120	16	121	20	118	42	63	30	-	-
116	14	89	44	93	15	58	41	-	-
108	16	63	55	89	30	-	-	-	-
101	13	58	26	63	35	-	-	-	-
93	11	-	-	58	57	-	-	-	-
89	38	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 9 Données de spectrométrie de masse des métabolites de l'ADT synthétisés chimiquement ou obtenus par incubation de l'ADT avec des microsomes de foie de rat traité au PB. ab rel = abondance relative (% du pic de base); Met = métabolite; Aut = authentique de synthèse; M⁺ = pic moléculaire.

conclut d'après ces données RMN¹H et en spectrométrie de masse que le métabolite n° 5 est l'ADT déméthylé, p-hydroxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène-3-thione (dm-ADT).

Le dmADT a été synthétisé chimiquement en faisant réagir sur l'ADT du chlorhydrate de pyridinium dans des conditions déjà décrites (160). Cet authentique de synthèse a les mêmes caractéristiques spectrales que le métabolite n° 5 isolé à partir d'incubations microsomales en présence d'ADT. Son temps de rétention correspond à celui du pic n° 5 (Figures 18, 19), donc celui-ci correspond bien au dmADT.

II-1-3-4 Métabolite correspondant au pic n° 3

Sur le spectre RMN¹H de ce métabolite, on remarque la présence d'un singulet à 9,42 ppm. Ce singulet n'existe pas sur le spectre de l'ADT et intègre pour 1 proton. Par contre, le singulet à 3,92 ppm qui existe sur le spectre de l'ADT et qui correspond aux 3 protons de la fonction méthoxy en position 4' sur le phényl n'existe plus sur ce spectre ; on conclut que le produit n° 3 est un dérivé phénolique qui provient de la déméthylation de la fonction ether de l'ADT. On retrouve sur le spectre tous les autres protons que contient l'ADT (Tableau 8).

De plus, la spectrométrie de masse montre que ce produit a un poids moléculaire de 210, soit une perte de masse de 16 par rapport au dmADT, ce qui correspond à un remplacement du C=S du dmADT par un C=O.

Les données spectrales en RMN et en masse combinées suggèrent que ce métabolite est le p-hydroxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène-3-one, (dmADO).

Le dmADO a été synthétisé chimiquement à partir de l'ADO selon une méthode déjà décrite (160). Les données spectrales et le temps de rétention en CLHP (Figures 18, 19) de cet authentique de synthèse ont con-

firmé d'une façon définitive que le métabolite qui correspond au pic n° 3 est bien le dmADO.

II-1-3-5 Métabolite correspondant au pic n° 1 de la Figure 18

Ce métabolite a été isolé à partir d'incubations microsomales contenant de l'ADT. Il a été identifié, par son temps de rétention, en CLHP (Figures 18 et 19) et ses données spectrales en RMN et en masse, à la para-hydroxyacétophénone

II-1-3-6 Métabolites correspondant aux pics n° 2 et 4 Figure 18

Ce sont deux métabolites qui ont été isolés et identifiés selon leurs données spectrales et leur temps de rétention en CLHP, mais dont la structure ne sera pas donnée pour des raisons de confidentialité. Ils seront dénommés X et Y.

II-1-3-7 Représentation schématique des voies de synthèse des métabolites de l'ADT

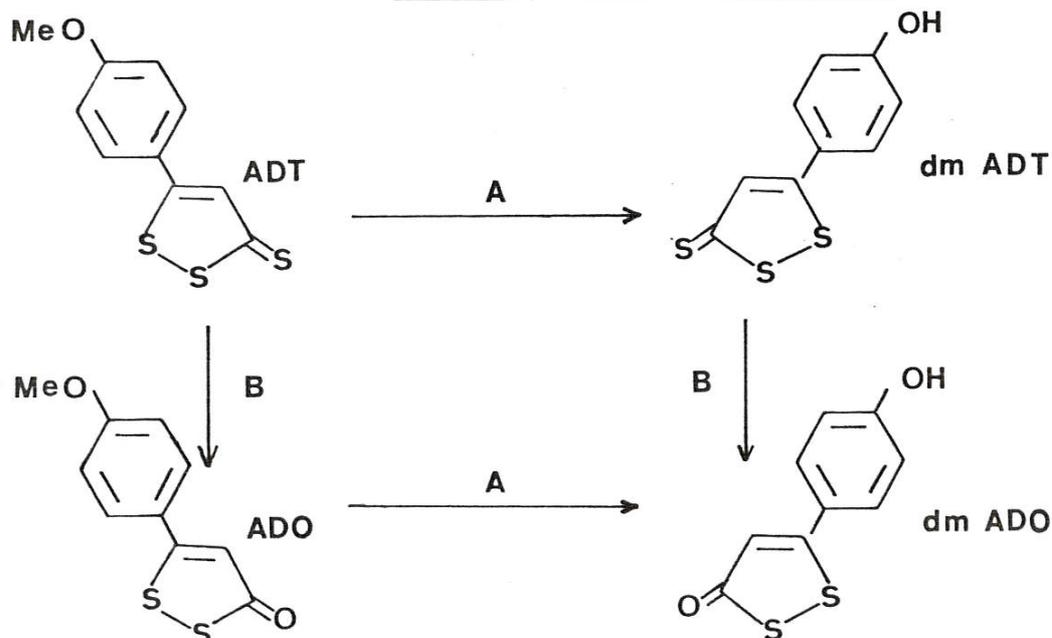


FIGURE 20 : A : déméthylation par le chlorure de pyridinium
B : désulfuration par l'acétate de mercure

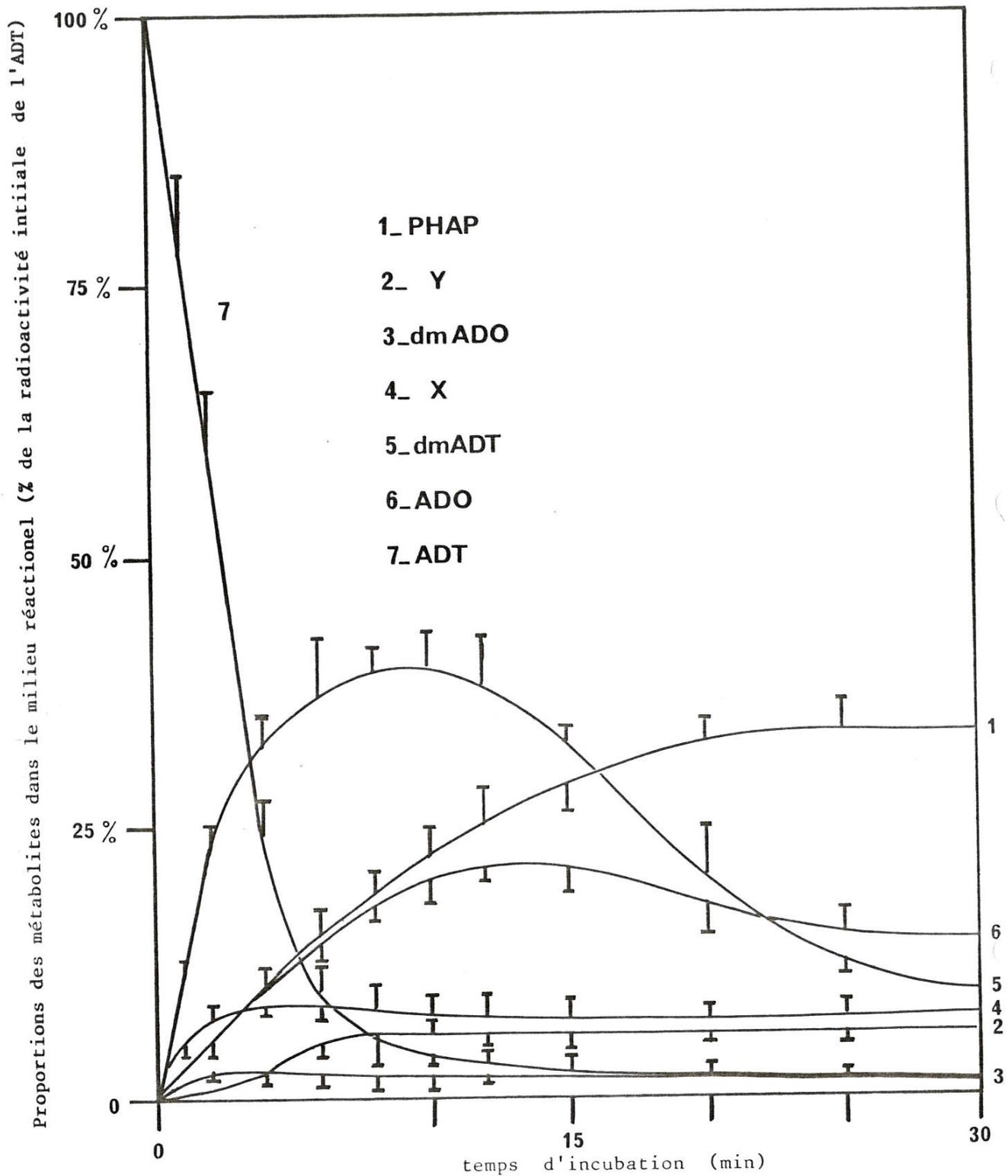


FIGURE 21 : Evolution en fonction du temps d'incubation de la proportion des métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT dans un mélange réactionnel contenant du $^{14}\text{C}_5$ -ADT (0,1mM), des cytochromes P-450 (2 μM) et du NADPH (2mM). Le dosage des métabolites est fait par radioactivité et les résultats sont les moyennes \pm ESM* de trois expériences indépendantes.

* ESM = Erreur standard moyenne.

II-1-4 Etude comparative des proportions des métabolites en fonction du temps d'incubation

On incube le $^{14}\text{C}_5$ -ADT en présence de microsomes de foie de rats traités par le phénobarbital et de NADPH et on arrête les réactions après des temps d'incubation à 37°C variant entre 1 et 30 min.

Les milieux réactionnels sont ensuite traités de la façon décrite au paragraphe II-1-1, ce qui nous permet d'obtenir un extrait méthanolique directement analysable en CLHP.

A la sortie de la colonne de CLHP, les métabolites sont collectés à l'aide d'un collecteur de fraction. Chaque fraction collectée est ensuite analysée à l'aide d'un compteur de radioactivité à scintillation liquide et la proportion de chaque métabolite présent dans l'extrait est calculée par rapport à la radioactivité totale de l'extrait.

Cette étude nous a permis d'établir la figure 21 qui représente l'évolution des proportions de chaque métabolite en fonction du temps d'incubation de l'ADT en présence de microsomes hépatiques.

II-1-4-1 Disparition de l'ADT du milieu réactionnel

La disparition de l'ADT du milieu réactionnel est linéaire jusqu'à 4 min après le début de l'incubation. En 4 minutes, 75 % de l'ADT est transformé en métabolites et en 15 min plus de 95 % de l'ADT est déjà métabolisé.

En tenant compte du fait que le milieu réactionnel contient 100 nmoles d'ADT (10^{-4}M) pour 2 mg de protéines microsomales, la vitesse initiale de dégradation de l'ADT est d'environ 10 nmoles/mg de protéine/min.

En une minute, les six métabolites de l'ADT déjà mentionnés apparaissent dans le milieu réactionnel.

II-1-4-2 Apparition du dmADT dans le milieu réactionnel

Le dmADT est un métabolite qui provient directement de l'ADT après une O-déméthylation par les monooxygénases à cyt.P-450, c'est le métabolite qui apparaît le plus vite. La vitesse de son apparition est linéaire entre 0 et 2 min, et elle est de 6 nmol/mg de protéines/min. Cette vitesse décroît entre 2 et 6 min si bien que la concentration du dmADT dans le milieu réactionnel atteint un plateau ($0,4 \times 10^{-4}M$) entre 6 et 12 min, puis décroît montrant ainsi que le dmADT est lui-même métabolisé.

II-1-4-3 Apparition de l'ADO dans le milieu réactionnel

Ce métabolite apparaît moins vite que le dmADT, c'est le deuxième métabolite avec le dmADT qui ne peut provenir que de l'ADT directement après une désulfuration oxydative de celui-ci par les monooxygénases à cyt.P-450. Sa vitesse d'apparition est linéaire entre 0 et 6 min et elle est de 1.25 nmol/mg de protéines/min. La concentration d'ADO dans le milieu réactionnel atteint un plateau ($0,22 \times 10^{-4}M$) à la 10ème minute, reste stable jusqu'à 15 min puis décroît progressivement ce qui indique que ce produit est un intermédiaire métabolique lui-même métabolisé au fur et à mesure de sa formation.

II-1-4-4 Evolution de la concentration du dmADO dans le milieu réactionnel

En 2 minutes, la concentration du dmADO dans le milieu réactionnel atteint $0.025 \times 10^{-4}M$, soit 2,5 % de la concentration de départ de l'ADT. Cette concentration reste stable dans le milieu réactionnel jusqu'à 30 min d'incubation ce qui suggère que le dmADO est un intermédiaire métabolique dégradé au fur et à mesure de sa formation.

Notons que le dmADO est le métabolite commun de l'ADO et du dmADT. En effet, celui-ci peut être formé par une O-déméthylation du premier ou une désulfuration oxydative du deuxième.

II-1-4-5 Evolution de la concentration de la parahydroxyacétophénone dans le milieu réactionnel en fonction du temps

La parahydroxyacétophénone est le métabolite de l'ADT qui s'accumule dans le milieu réactionnel. La vitesse initiale de sa formation est de 1.25 nmol/mg de protéines/min. Au bout de 30 min d'incubation, il représente 35 % des métabolites présents dans le milieu, alors que dmADT, ADO, dmADO, X et Y représentent respectivement 10, 15, 2,5, 8 et 6 % de la totalité des métabolites.

II-1-4-6 Evolution des concentrations des métabolites X et Y en fonction du temps d'incubation

Ces deux produits sont des intermédiaires métaboliques de l'ADT. Ils sont dégradés aussi vite qu'ils sont formés puisque leur proportion dans le milieu réactionnel reste constante à partir de la 6ème minute d'incubation : X = 8 % et Y = 6 %.

II-1-5 Discussion des résultats du métabolisme de l'ADT in vitro

L'ADT en présence de microsomes de foie de rat traité par du PB subit rapidement une O-déméthylation et une désulfuration oxydative qui conduisent au dmADT et à l'ADO. Ces deux produits sont eux-mêmes métabolisés au fur et à mesure de leur formation en dmADO.

La parahydroxyacétophénone, métabolite final qui s'accumule le plus dans le milieu réactionnel peut provenir du dmADT ou du dmADO après une coupure oxydante du cycle dithiolthione ou dithiolone, mais nous n'avons pas d'indications sur le nombre d'étapes de cette réaction car on n'a pas détecté des métabolites de structures intermédiaires entre la parahydroxyacétophénone et le dmADT ou le dmADO.

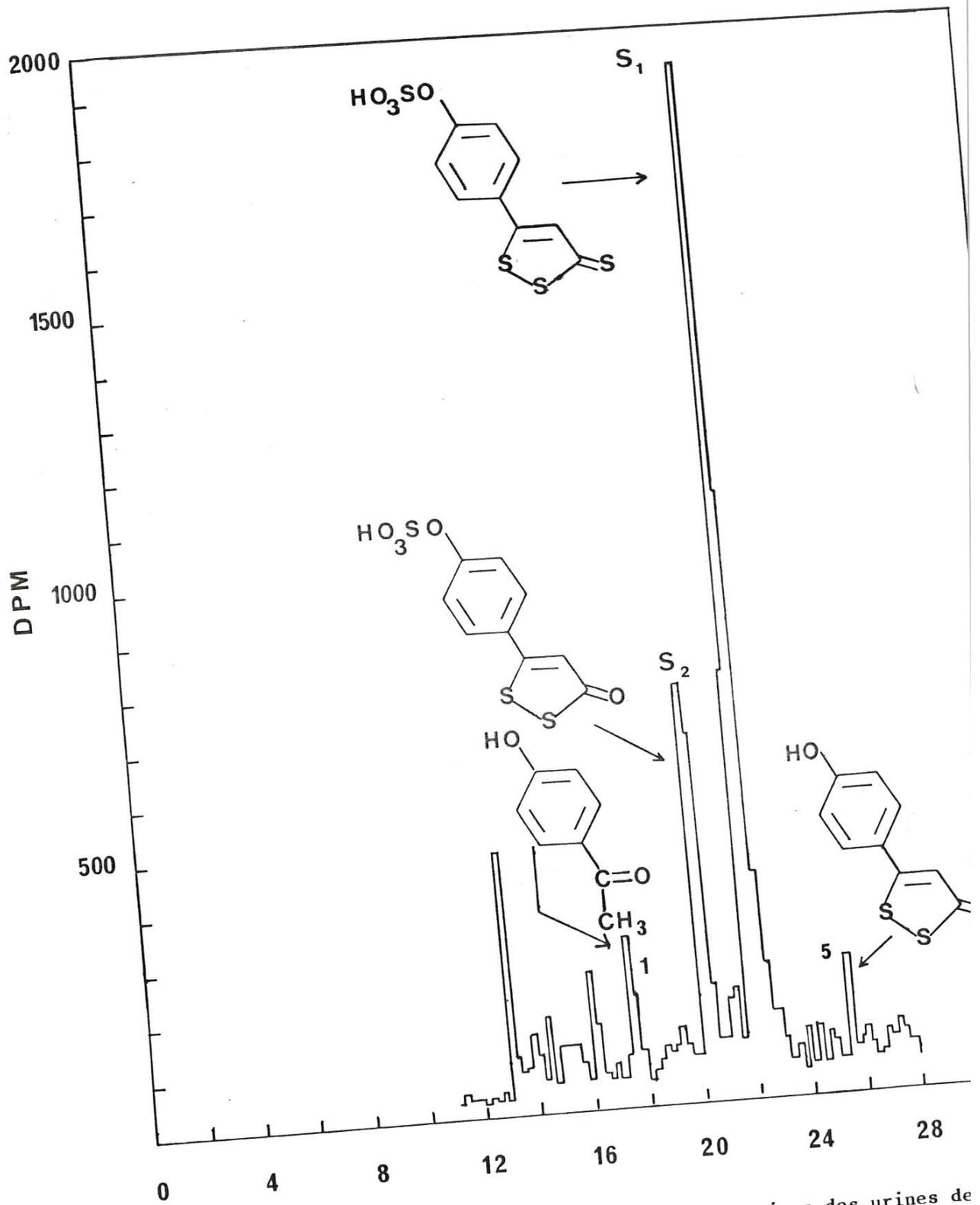


FIGURE 22 : Profil d'élution en CLHP semipréparatives des urines de traités par 24 mg de $^{14}\text{C}_5$ -ADT/kg. Les métabolites sont séparés grâce à un gradient de 0 : de méthanol et détectés par radioactivité.

II-2 Etude de l'élimination urinaire du $^{14}\text{C}_5$ -ADT chez le rat

II-2-1 Méthode employée

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant 250 g en moyenne et ayant libre accès à l'eau et à la nourriture sont utilisés. Chaque rat reçoit par injection intrapéritonéale 24 mg/kg d'ADT radioactif. Les rats sont placés dans des cages à métabolisme juste après l'injection et les urines sont recueillies aux temps voulus et sont conservées au congélateur à -20°C ou étudiées immédiatement.

II-2-2 Profil CLHP des métabolites urinaires du $^{14}\text{C}_5$ -ADT

Les conditions d'analyse sont différentes de celles utilisées in vitro. Dans le cas présent, la colonne est une semi-préparative et la phase mobile est la même que précédemment, mais les métabolites ont été séparés par un gradient de solvant (0 à 100 % de méthanol). Ces conditions nous ont permis :

- 1 - de mieux séparer les métabolites de l'ADT des produits endogènes urinaires
- 2 - de reconnaître les métabolites éliminés sous forme conjuguée et ceux éliminés sous forme libre en injectant en CLHP l'urine avant et après traitement par la sulfatase et la glucuronidase
- 3 - d'isoler facilement des quantités de métabolites suffisantes pour les analyses physiques (RMN, masse, UV-visible)

La figure 22 représente le profil d'élution des métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT obtenu en analysant en CLHP un échantillon d'urine radioactive collectée 6 heures après l'injection de l'ADT aux rats. Les métabolites ont été collectés à la sortie de la colonne puis dosés par radioactivité.

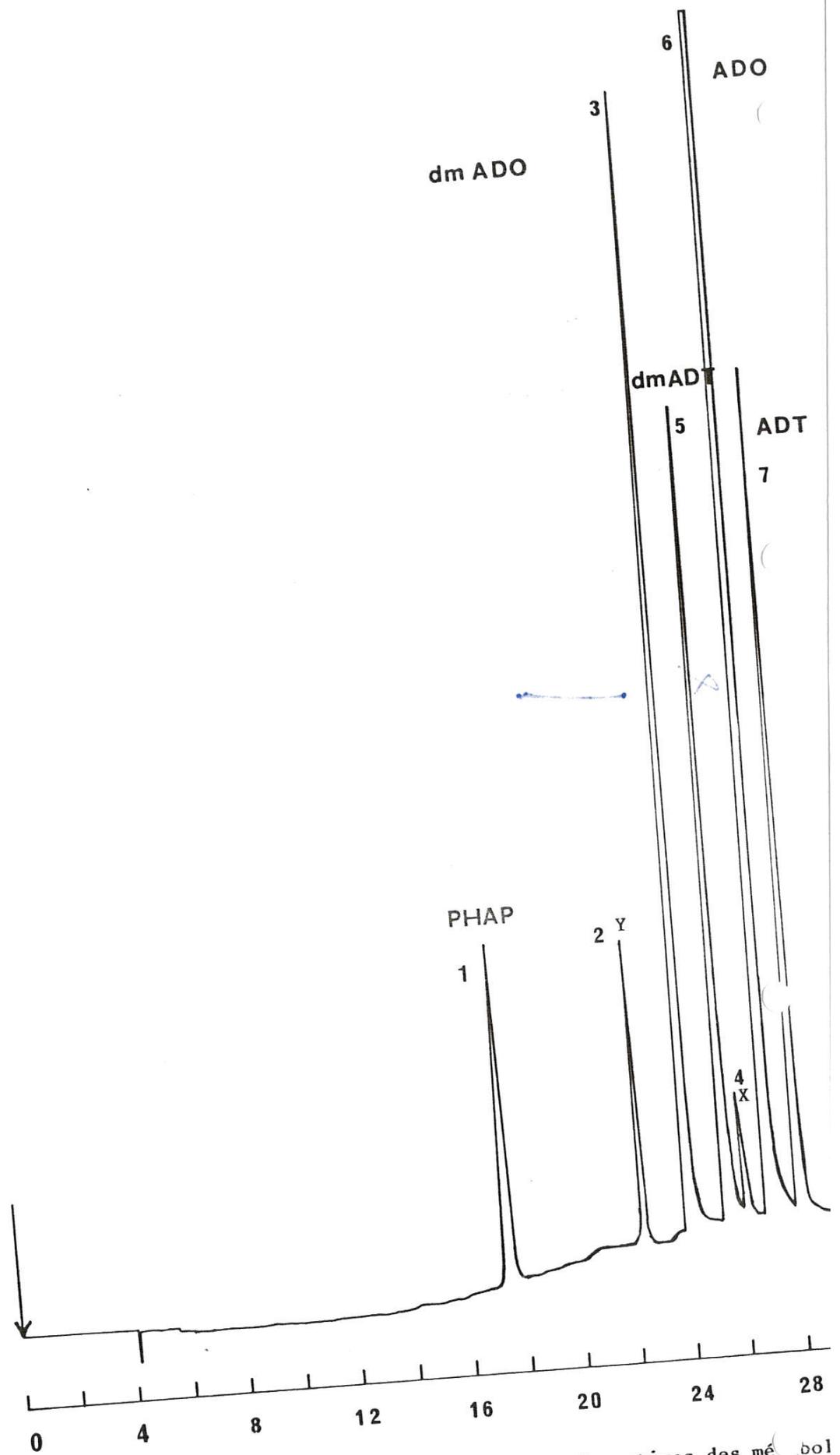


FIGURE 23 : Profil d'élution en CLHP semi-préparatives des mé. bol l'ADT synthétisés chimiquement. Les conditions CLHP se mêmes que pour la figure 22.

La Figure 23 représente le profil d'élution en CLHP des métabolites de l'ADT synthétisés chimiquement.

En comparant les deux figures, on remarque que le métabolite correspondant au pic n° 5 de la figure 22 a le même temps de rétention que le dmADT synthétisé chimiquement (Figure 24). Le métabolite correspondant au pic n° 1 de la figure 22 a le même temps de rétention que la parahydroxy-acétophénone commerciale (Figure 23).

L'ADT, l'ADO et le dmADO existent dans les urines en quantités négligeables à peine détectées en radioactivité (Figure 22).

En plus des métabolites de l'ADT déjà identifiés in vitro, deux métabolites majoritaires apparaissent sur le profil d'élution en CLHP des métabolites du ¹⁴C₅-ADT éliminés dans les urines de rat. Ce sont les métabolites qui correspondent aux pics S₁ et S₂ de la Figure 22. Leurs temps de rétention ne correspondent à aucun de ceux des métabolites de l'ADT synthétisés chimiquement, et ils sont encore plus polaires que ces derniers, il est donc probable qu'il s'agisse de métabolites conjugués.

II-2-3 Détermination de la nature des métabolites correspondant aux pics S₁ et S₂ de la Figure 22

Pour déterminer la structure chimique de ces deux métabolites, les deux manipulations suivantes ont été faites.

1 - Un échantillon d'urine de rat traité par du ¹⁴C₅-ADT a été incubé en présence de sulfatase. Etant donné que cette enzyme commerciale contient aussi un peu de glucuronidase, pour étudier spécifiquement l'action de la sulfatase, nous avons été obligés d'ajouter dans le milieu réactionnel un inhibiteur de la glucuronidase : la β-saccharolactone. Après incubation de cet échantillon d'urine à 37°C pendant 12 heures, on l'extrait à l'acétate d'éthyle jusqu'à ce que la phase aqueuse ne soit plus radioactive.

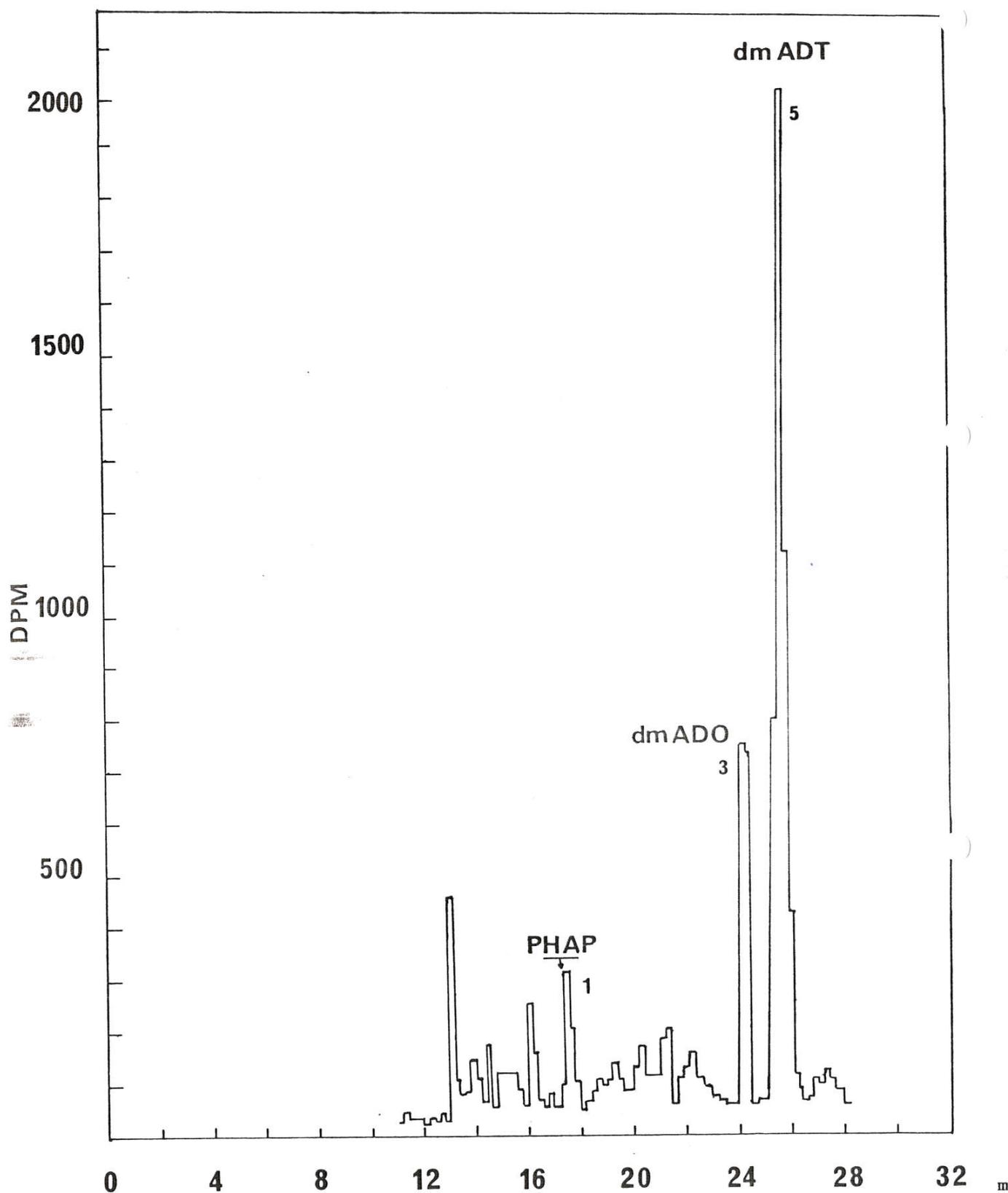


FIGURE 24 : Profil d'élution en CLHP des métabolites du $^{14}\text{C}_5$ -ADT présents dans les urines de rats après incubation en présence de sulfatase. Les conditions CLHP sont les mêmes que pour la FIGURE 22.

L'extrait est alors évaporé à sec et dissout dans du méthanol. Cette solution a été ensuite analysée en CLHP dans les conditions décrites au paragraphe II-2-2.

La Figure 24 représente le profil d'élution CLHP des métabolites urinaires de l'ADT après traitement des urines à la sulfatase. Sur ce profil, les pics S_1 et S_2 (Figure 22) n'existent plus, ils ont été remplacés par les pics 5 et 3. De plus, toute la radioactivité contenue dans les fractions collectées correspondant aux pics S_1 et S_2 de la figure 22 est retrouvée respectivement dans les fractions collectées correspondant aux pics n° 5 et 3 de la Figure 24.

Les produits n° 5 et 3 ont les temps de rétention respectifs du dmADT et du dmADO. Ces deux produits ont été isolés en utilisant la totalité des urines de 24 heures de deux rats. Les données spectrales en masse, RMN¹H et UV-visible, confirment que ce sont le dmADO (pic n° 3, Figure 24) et le dmADT (pic n° 5, Figure 24) (données spectrales déjà discutées dans le chapitre II-3-1 et mentionnées aux tableaux 8 et 9).

Le métabolite S_2 (Figure 22) est donc le sulfate du dmADO alors que le métabolite S_1 est le sulfate du dmADT.

Le traitement à la sulfatase n'affecte que ces deux produits, ils sont donc les seuls métabolites de l'ADT éliminés dans les urines de rat sous forme de sulfate.

2 - Pour voir s'il y a des métabolites de l'ADT éliminés dans les urines de rat sous forme glucuroconjuguée, un deuxième échantillon d'urine est incubé en présence de glucuronidase pure pendant 12 heures puis traité de la façon décrite précédemment. La solution méthanolique obtenue à la fin a été analysée en CLHP, mais aucune variation du chromatogramme des métabolites de l'ADT n'a été observée.

De plus, l'importance quantitative de chaque métabolite reste

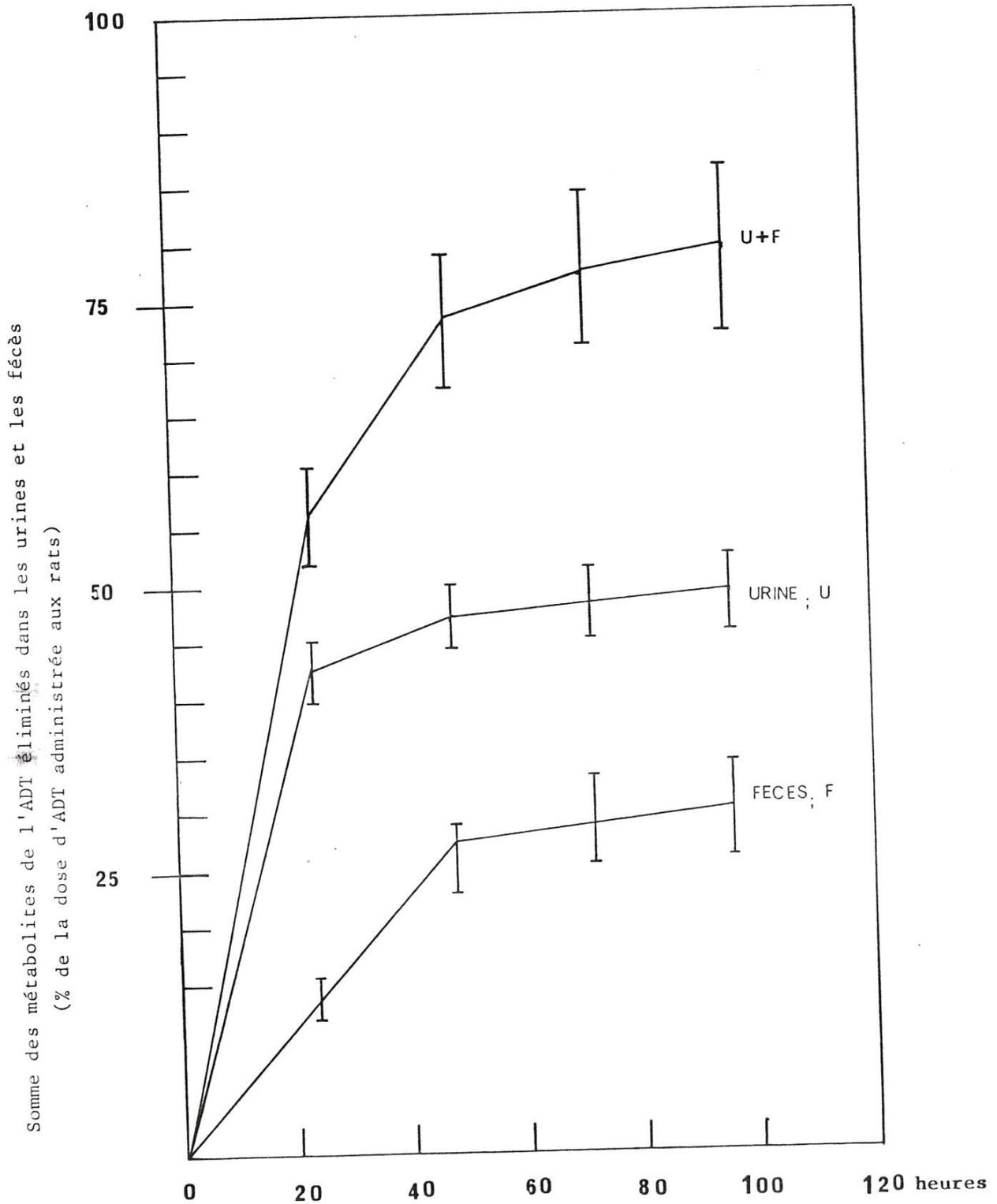


FIGURE 25 : Bilan de l'élimination urinaire et fécale de l'ADT
chez le rat traité par 24 mg/kg de $^{14}\text{C}_5$ ADT i.p.
Résultats \pm ESM (4 rats)

la même après traitement de l'urine à la glucuronidase ce qui prouve qu'aucun métabolite de l'ADT n'est éliminé sous forme glucuronidée.

II-2-4 Bilan de l'élimination urinaire et biliaire

La radioactivité globale éliminée dans les urines de rats traités au $^{14}\text{C}_5$ -ADT (24 mg/kg à 0,2 mCi/mme) est mesurée en fonction du temps jusqu'à 120 heures après injection intrapéritonéale du médicament. La Figure 25 montre l'évolution de cette élimination. Dans les urines, on ne retrouve que $49 \pm 3,5$ % de la radioactivité totale administrée, l'essentiel de l'élimination se fait entre 0 et 40 heures après administration de l'ADT puis devient négligeable à partir de 48 heures.

Tous les métabolites majeurs éliminés dans les urines en 24 heures (environ 40 % de la dose administrée) ont été identifiés.

Le Tableau 10 représente un bilan détaillé de l'élimination de chaque métabolite en fonction du temps.

La radioactivité qui ne s'élimine pas dans les urines a été recherchée dans les fèces. Une étude sommaire nous a permis de détecter la présence d'au moins le dmADT et le dmADO dans les déjections des rats. Mais notre but était plus simplement de quantifier la radioactivité éliminée par cette voie. Pour cela, les fèces sont séchés dans une étuve à 80°C pendant une semaine, puis ils sont pesés et 80 ^{mg} g sont mis à digérer par 1 ml de Soluène* pendant 2 jours. On décolore alors par 100 µl H_2O_2 9 M, on ajoute le liquide scintillant et on compte la radioactivité. Environ 30 % de la radioactivité totale administrée au rat est éliminée dans les fèces en 4 jours.

Le bilan total d'élimination de la radioactivité dans les urines et les fèces est de 80 ± 6 % de la dose administrée au rat en 4 jours, la Figure 25 représente en détail l'élimination fécale et urinaire de la radioactivité en fonction du temps.

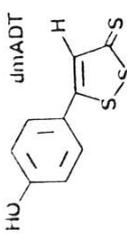
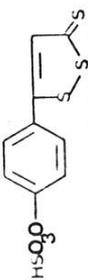
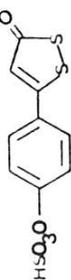
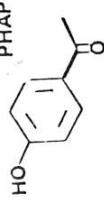
METABOLITES	URINES 0-6 H		URINES 6-24 H	
	(1) % DE LA DOSE ADMINISTREE	(2) % DE LA RADIOACTIVITE ELIMINEE DANS LES URINES	(1) % DE LA DOSE ADMINISTREE	(2) % DE LA RADIOACTIVITE ELIMINEE DANS LES URINES
dmADT 	0,4 ± 0,03	2,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	2,8 ± 0,5
Sulfate de dmADT 	8,3 ± 0,7	55 ± 5	10,8 ± 0,7	42 ± 3
Sulfate de dmADO 	0,5 ± 0,03	21 ± 2	3,4 ± 0,2	12 ± 1
PHAP 	0,5 ± 0,7	3,0 ± 0,5	2,5 ± 0,1	10 ± 0,5
Total des métabolites identifiés	12,5 ± 1,1	81,5 ± 7,7	17,4 ± 1,2	66,8 ± 5

Tableau 10 Tableau récapitulatif des différents métabolites identifiés dans les urines de rats traités au $^{14}\text{C}_5$ -ADT et leurs proportions relatives (1) en % de la dose d'ADT radioactif administré au rat, (2) en % de la quantité de radioactivité éliminée dans les urines. Chaque valeur indiquée dans le tableau est le résultat ± ESM de 4 déterminations indépendantes sur des échantillons urinaires de différents rats traités au $^{14}\text{C}_5$ -ADT.

II-2-5 Etude de l'influence de l'administration répétée d'ADT chez le rat sur son propre métabolisme

L'influence de l'administration répétée d'ADT sur son propre métabolisme a été étudiée chez le rat. Dans ce but, les rats reçoivent i.p. pendant 4 jours, une dose d'ADT non radioactif de 50 mg/kg, puis, au 5ème jour, ils sont traités par 24 mg de $^{14}\text{C}_5\text{-ADT/kg}$.

L'élimination urinaire de l'ADT et de ses métabolites dans les urines a été suivie dans le temps en mesurant la radioactivité présente dans les échantillons urinaires collectés à différents temps après l'injection du médicament. La courbe représentant la radioactivité (en pourcent de la dose administrée) éliminée dans les urines en fonction du temps est identique aux erreurs près à celle de la figure 25. $42 \pm 2\%$ de la radioactivité totale administrée sont éliminés dans les urines de 24 heures et 96 heures après l'injection du $^{14}\text{C}_5\text{-ADT}$, on récupère dans les urines $48 \pm 3,5\%$ de la totalité de la radioactivité injectée au rat.

Le profil CLHP des métabolites de l'ADT présents dans les urines de rat prétraité à l'ADT est également identique à celui obtenu avec les urines de rat non prétraité.

L'incubation des urines avec la glucuronidase et la sulfatase puis leur analyse en CLHP confirme que la structure chimique des métabolites ainsi que leurs proportions relatives ne changent pas dans les urines de rat prétraité par l'ADT.

Le dosage en CLHP des métabolites urinaires de l'ADT après leur déconjugaison montre qu'environ 50, 17 et 16 % de la radioactivité éliminée dans les urines de 24 heures correspondent respectivement au dmADT, dmADO et à la parahydroxyacétophénone. Ces résultats sont identiques aux erreurs près, à ceux obtenus avec les urines de rat non prétraité par l'ADT.

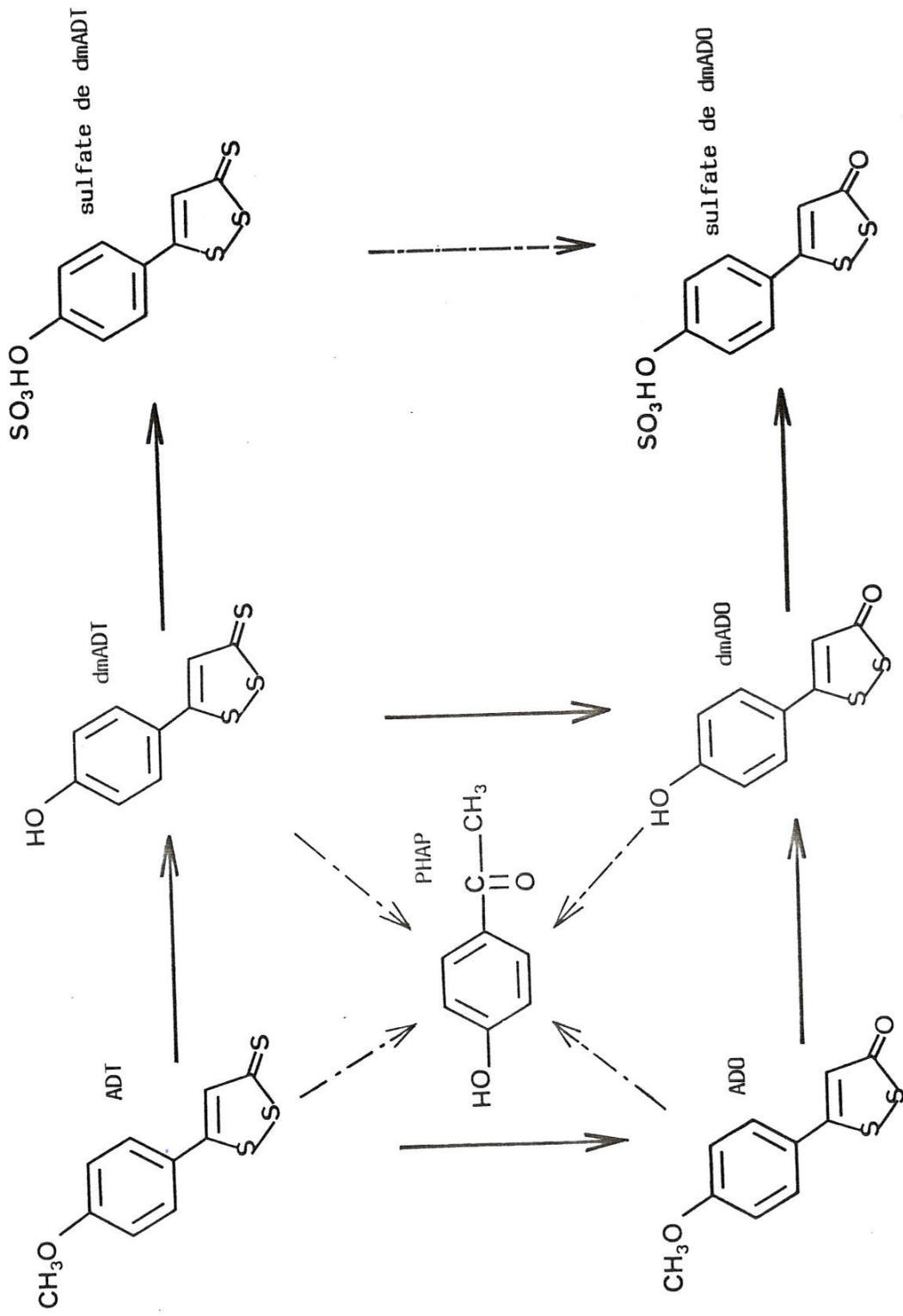


Figure 26 différentes voies du métabolisme de l'ADT *in vivo* chez le rat.

II-2-6 Discussion

II-2-6-1 Discussion des principales transformations métaboliques que l'ADT subit avant son élimination dans les urines de rats (Figure 26)

L'étude des métabolites de l'ADT dans les urines de rats montre que cette molécule subit surtout deux réactions d'oxydation : une O-déméthylation et une oxydation de sa fonction thione.

La O-déméthylation est quantitativement la réaction la plus importante ; elle conduit au dmADT, le métabolite majoritaire de l'ADT présent dans les urines de rat principalement sous forme de sulfate et secondairement sous forme libre en plus faibles quantités (Tableau 10).

Le deuxième métabolite prépondérant dans les urines est le sulfate de dmADO (Tableau 10). In vivo, ce produit peut être formé à partir de l'ADT par trois voies différentes (Figure 26) :

- a) Une désulfuration oxydative du sulfate de dmADT si elle se produit conduirait directement au sulfate de dmADO.
- b) Une désulfuration oxydative du dmADT en dmADO suivie d'une sulfoconjugaison conduirait aussi au sulfate de dmADO.
- c) Le sulfate de dmADO pourrait enfin provenir de l'oxydation de l'ADT en ADO, suivie par une déméthylation en dmADO et une sulfoconjugaison de la fonction phénol du dmADO.

La parahydroxyacétophénone est quantitativement le troisième métabolite du point de vue importance dans les urines de rat 0-24 h (Tableau 10). Ce métabolite est éliminé sous forme libre et est proportionnellement plus important dans les urines de 6-24 h que dans celles de 0-6 h.

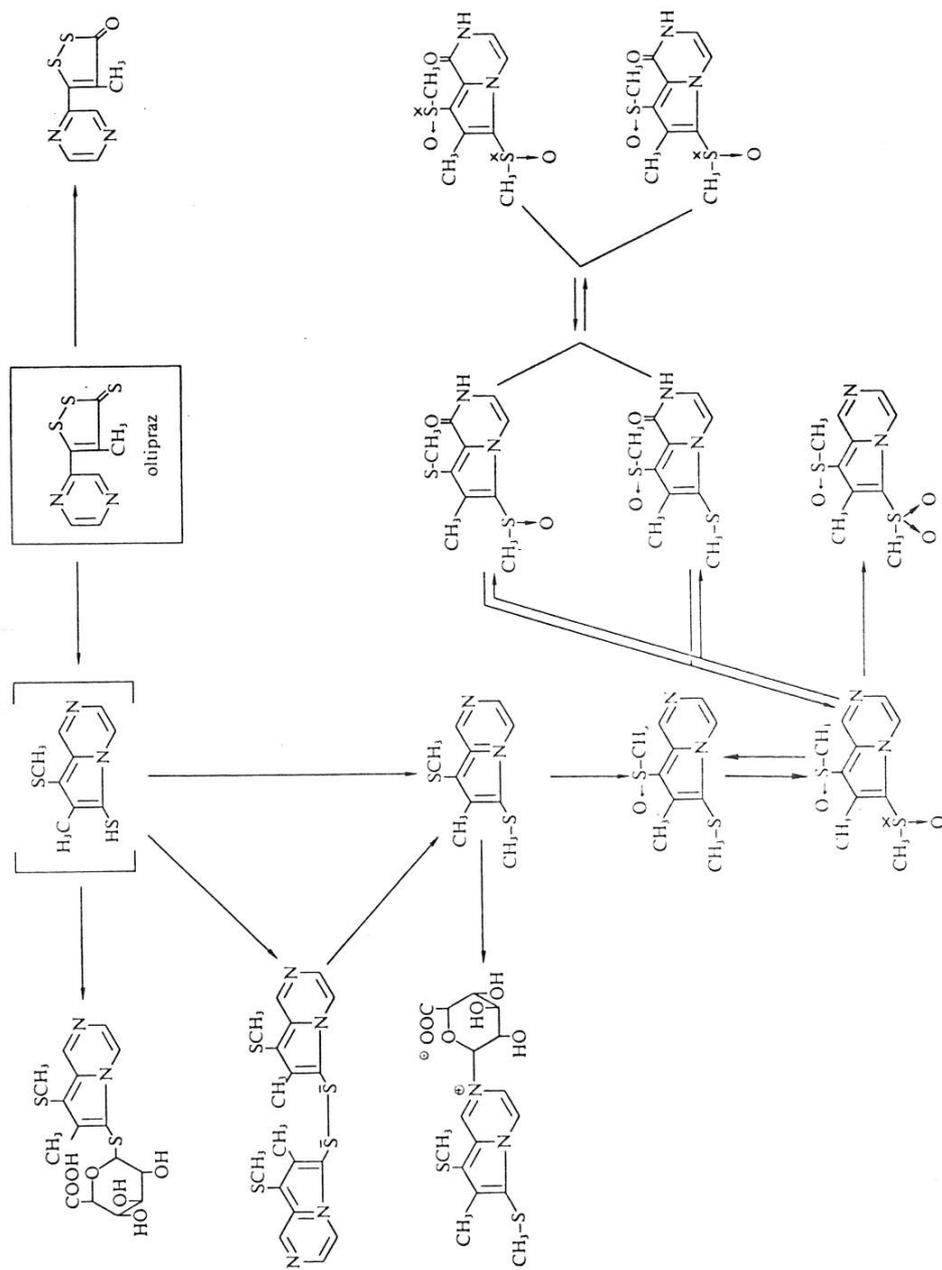


Figure 27 : Métabolisme de l'Oltipraz selon la référence (3).

L'ADO et le dmADO sont présents dans les urines de rats à l'état de traces, ce sont donc des intermédiaires métaboliques de l'ADT, lui-même non détecté dans tous les échantillons urinaires analysés.

L'ADO est presque aussi hydrophobe que l'ADT lui-même, ce qui rend son élimination rénale très difficile ; il est possible que dès sa formation, il subisse une déméthylation qui aboutisse au dmADO facilement éliminable après conjugaison.

II-2-6-2 Comparaison du métabolisme de l'Oltipraz et de l'ADT

La molécule d'Oltipraz (Chapitre I-1) renferme comme l'ADT dans sa structure le cycle original dithia-1,2-cyclopentèthione-3 et possède des propriétés antiparasitaires. Le métabolisme de cette molécule a été étudié en détail (3) chez l'homme, le rat et la souris. La Figure 27 représente les différentes transformations métaboliques que la molécule d'Oltipraz subit avant son élimination urinaire.

Tout comme l'ADT, l'Oltipraz inchangé est présent en très faibles quantités dans les urines (moins de 1 % de la dose administrée)(3) ; il subit aussi comme l'ADT une désulfuration oxydative de sa fonction thione, mais le métabolite correspondant est minoritaire alors qu'il est quantitativement le deuxième métabolite dans le cas de l'ADT.

A part cette réaction de désulfuration oxydative commune au métabolisme de l'ADT et de l'Oltipraz, le reste du métabolisme de ces deux molécules est complètement différent. Le métabolisme de l'Oltipraz est caractérisé par une participation du cycle dithiolthione et une modification profonde de la molécule qui aboutit à des métabolites ne contenant plus la structure dithia-1,2-cyclopentène (Figure 27). Ces métabolites représentent plus de 90 % de la totalité des métabolites de l'Oltipraz présents dans les urines de rats.

Dans le cas de l'ADT, environ 68 % des métabolites présents dans les urines de rats renferment la structure dithio-1,2-cyclopentène avec la fonction thione inchangée sur le carbone n° 3 (dmADT libre ou conjugué) ou oxydée en fonction cétone (dmADO libre ou conjugué). Dans le cas où le cycle dithia-1,2-cyclopentène s'ouvre au cours du métabolisme de l'ADT, on n'observe aucun réarrangement de la molécule comme dans le cas de l'Oltipraz, mais tout simplement une perte complète de la structure $\begin{array}{c} \text{C} - \text{S} - \text{S} \\ || \\ \text{S} \end{array}$ avec une formation de molécules de structure plus simple comme la parahydroxyacétophénone par exemple.

En conclusion, on constate qu'alors que le métabolisme de l'Oltipraz est caractérisé par une ouverture d'emblée du cycle dithiolthione suivie par un réarrangement en une molécule qui a perdu complètement la structure $\begin{array}{c} \text{C} = \text{S} \\ || \\ \text{S} - \text{S} \end{array}$, le métabolisme de l'ADT touche plutôt le cycle dithio-1,2-cyclopentène thione-3. Ce cycle est surtout oxydé et secondairement ouvert.

II-2-6-3 Discussion de l'effet de l'administration répétée de l'ADT aux rats sur son métabolisme

L'administration répétée d'ADT aux rats n'engendre ni une accélération de son élimination urinaire ni l'apparition de métabolites nouveaux dans les urines. Exactement les mêmes métabolites déjà identifiés dans les urines de rats non prétraités à l'ADT sont retrouvés et aucun changement significatif dans les rapports relatifs de ces métabolites n'a été observé.

Les rats prétraités pendant 4 jours avec une dose journalière d'ADT i.p. de 50 mg/kg puis au 5ème jour avec 24 mg/kg de $^{14}\text{C}_5$ -ADT ont été sacrifiés 24 h après l'injection de l'ADT radioactif et leurs foies ont été utilisés pour préparer des microsomes. Aucune augmentation de la concentration des cyt.P-450 dans ces microsomes n'a été observée par rapport à des microsomes de foies de rats n'ayant reçu aucun traitement. Ce résultat montre que l'ADT n'est pas inducteur des cyt.P-450 et explique en partie pourquoi il n'a aucune influence qualitative ou quantitative sur son propre métabolisme.

C'est un inducteur moyen de l'E.H. (2-3x) comme l'Oltipraz et d'autres antioxydants (cf).

II-2-6-4 Discussion des différences entre le métabolisme in vitro et in vivo de l'ADT

La comparaison des métabolites d'ADT identifiés dans les urines de rat à ceux obtenus après incubation avec des microsomes hépatiques de rat traité au PB montre qu'in vivo, le dmADT et le dmADO sont éliminés rapidement dans les urines après conjugaison. Cette conjugaison évite l'ouverture métabolique du cycle dithia-1,2-cyclopentène ce qui explique que la parahydroxyacétophénone est retrouvée uniquement en faibles quantités dans les urines de rats par rapport aux dmADO et dmADT conjugués.

Par contre, en absence ~~des~~ cofacteurs des enzymes de conjugaison dans les microsomes hépatiques de rat, le dmADO et le dmADT sont métabolisés en même temps qu'ils se forment et ne s'accumulent pas dans le milieu réactionnel. Ce métabolisme intéresse le cycle dithia-1,2-cyclopentène provoquant son ouverture et la perte de la structure $\text{C}^{\text{S}}-\text{S}-\text{S}$ ou $\text{C}^{\text{O}}-\text{S}-\text{S}$ et la formation d'un métabolite qui s'accumule dans le milieu réactionnel : la parahydroxyacétophénone

II-3 Etude de l'élimination urinaire de l'ADT et de ses métabolites chez l'homme et la souris en utilisant de l'ADT non radioactif

L'utilisation de l'ADT radioactif nous a facilité la mise au point d'une méthode CLHP qui permet de séparer tous les métabolites de l'ADT obtenus après incubation, in vitro, en présence de microsomes de foie de rats traités au PB. D'autre part, l'étude, in vivo, de l'élimination urinaire du $^{14}\text{C}_5$ -ADT et de ses métabolites chez le rat, montre qu'après déconjugaison, on a les mêmes métabolites que ceux obtenus, in vitro, avec une distribution quantitative différente. Tous ces métabolites détectés au départ par radioactivité présentent une absorption UV à 310 nm. Il a donc été possible de mettre au point un dosage UV des métabolites de l'ADT après séparation CLHP. Ce dosage peut s'appliquer à tous les liquides bio-

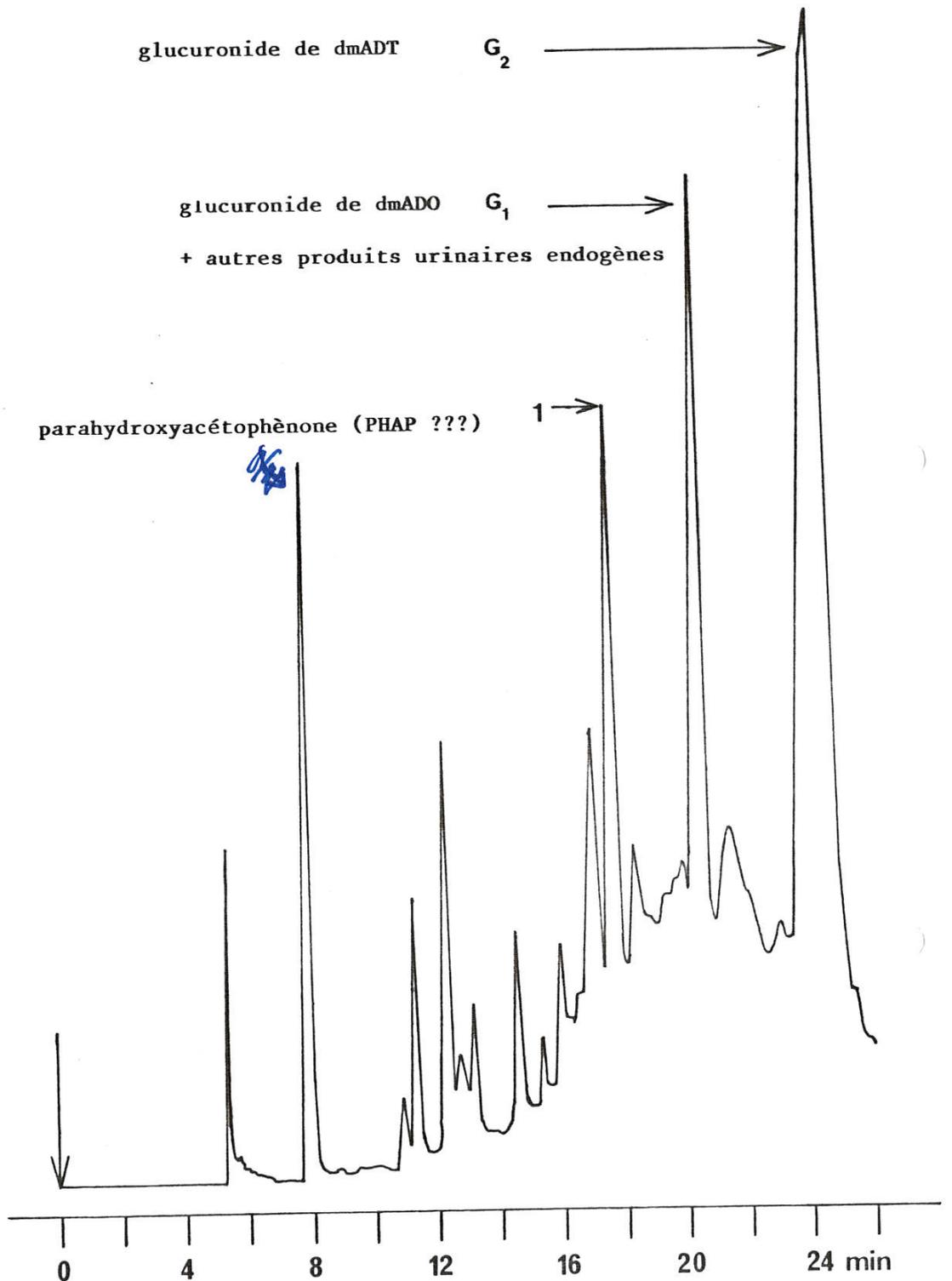


FIGURE 28 : Profil en CLHP semi-préparative, en gradient de solvant et en détection UV à 310 nm d'un échantillon d'urine humaine avant traitement aux enzymes de déconjugaison. Les urines sont recueillies 24 heures après une prise orale d'une dose unique d'ADT de 125 mg.

logiques et plus particulièrement au sang et aux urines. Il ne nécessite pas d'ADT marqué et a l'avantage d'être sensible et rapide. Il permet de doser facilement la totalité des métabolites présents dans le sang en une seule injection en CLHP. Dans les urines, il permet également le dosage de tous les métabolites à l'exception de la parahydroxyacétophénone, produit hydrophile, élué au front du solvant avec une multitude d'autres produits endogènes et qui rendent tout dosage UV de ce produit impossible dans nos conditions.

II-3-1 Analyse qualitative en CLHP des métabolites urinaires de l'ADT chez l'homme

Les échantillons d'urine humaine recueillis 48 heures après une prise orale d'ADT de 125 mg ont été analysés en CLHP semi-préparative avant et après traitement à la glucuronidase ou à la sulfatase.

Les analyses en CLHP se font en gradient de solvant comme au paragraphe II-2-2.

- La Figure 29 représente le profil CLHP d'un échantillon urinaire traité à la glucuronidase pure.

- La Figure 28 représente le profil CLHP d'un échantillon urinaire non traité à la glucuronidase ou à la sulfatase.

- Le profil CLHP d'un échantillon urinaire traité à la sulfatase en présence d'inhibiteur de la glucuronidase est identique au profil de la Figure 28, ce qui signifie qu'il n'y a pas de métabolites éliminés sous forme de sulfate dans les urines humaines.

En comparant les Figures 28 et 29, on remarque que le traitement à la glucuronidase fait apparaître dans l'urine le produit correspondant au pic n° 5 de la Figure 29 et fait disparaître le produit correspondant au pic G_1 de la Figure 28.

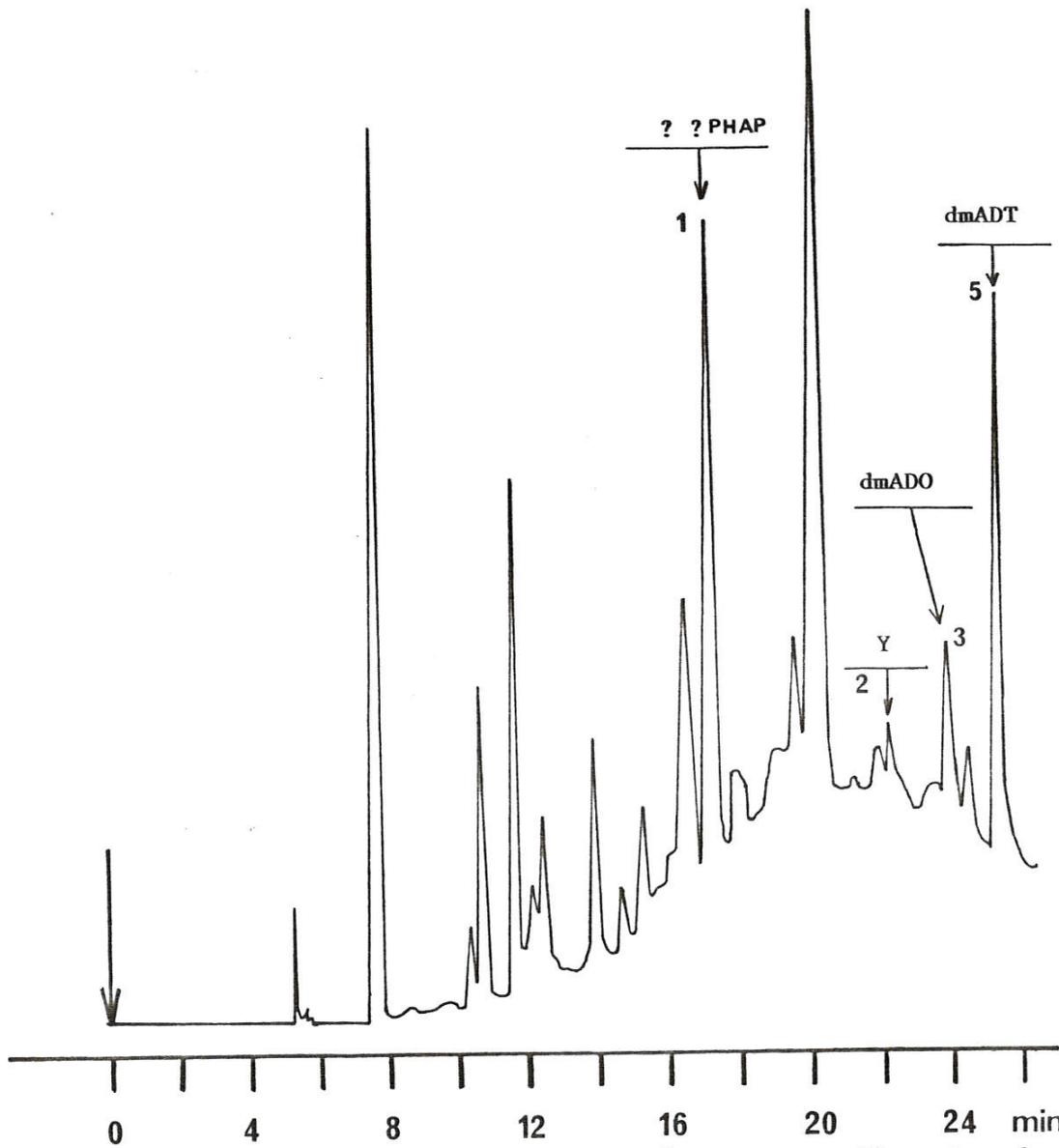


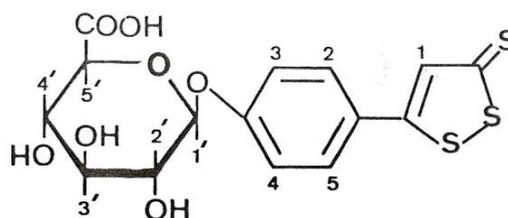
FIGURE 29 : Profil en CPLH semi-préparative et en gradient de solvant d'un échantillon d'urine humaine après traitement à la glucuronidase. Les métabolites d'ADT sont détectés en UV à 310 nm.

Le produit G_1 (Figure 28) est donc un glucuronide. Le produit déconjugué qu'il donne après traitement à la glucuronidase a un temps de rétention en CLHP identique au dmADT. Ce produit a été par la suite isolé et identifié par spectrométrie de masse et RMN comme étant le glucuronide du dmADT (Paragraphe II-3-3).

D'autres métabolites de l'ADT difficiles à détecter dans les urines non traitées à la glucuronidase sont visibles sur le profil CLHP quand ils sont déconjugués. C'est le cas du dmADO et Y (pics n° 3 et 2, Figure 29). Ces métabolites ont été isolés des urines humaines seulement après incubation avec un mélange de glucuronidase et de sulfatase et leur structure a été étudiée en spectrométrie de masse et en RMN.

II-3-2 Caractérisation de la structure chimique des métabolites de l'ADT éliminés dans les urines humaines

a - Glucuronide du dmADT



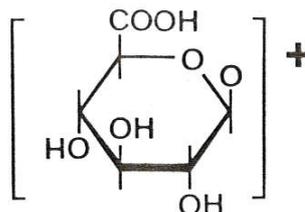
a-1 Caractéristiques RMN¹H

Proton n°	1	2 et 5	3 et 4	1'	2', 3' et 4'	5'
Signal	s	d	d	d	multiplet	d
Déplacement chimique (ppm)	7,45 (1 H)	7,13 (2 H)	7,76 (2 H)	5,17 (1 H)	3,26 à 3,65 ppm (3 H)	4,06 (1 H)

s = singulet ; d = doublet

a-2 Caractéristiques en spectrométrie de masse

Le pic moléculaire du glucuronide de dmADT n'existe pas sur le spectre de masse obtenu en impact électronique, par contre, on observe un pic d'intensité relative 3 % à $m/e = 193$ et qui peut correspondre au fragment glucuronique.



b - Les métabolites Y et dmADO ont été isolés après traitement des urines par un mélange de glucuronidase et de sulfatase. La structure de Y ne sera pas donnée pour des raisons de confidentialité. Par contre, les caractéristiques du dmADO en spectrométrie de masse et en RMN¹H sont déjà mentionnées dans les Tableaux 8 et 9.

II-3-3 Dosage UV des métabolites de l'ADT dans les urines humaines

Le dosage des métabolites urinaires de l'ADT chez l'homme est réalisé par CLHP phase inverse sur une colonne analytique. On travaille dans des conditions isocratiques avec un solvant constitué d'un mélange d'eau, d'acide acétique et de méthanol.

Les métabolites sont dosés sur des échantillons d'urine incubée avec un mélange de glucuronidase et de sulfatase si bien que tous les métabolites que l'on dose sont sous forme déconjuguée..

L'ADT pris oralement sous sa forme galénique est éliminé dans les urines humaines exclusivement sous forme de métabolites. Dans les fractions urinaires collectées, 6 h, 24 h et 48 h après la prise du médicament, l'ADT lui-même n'a pu être détecté.

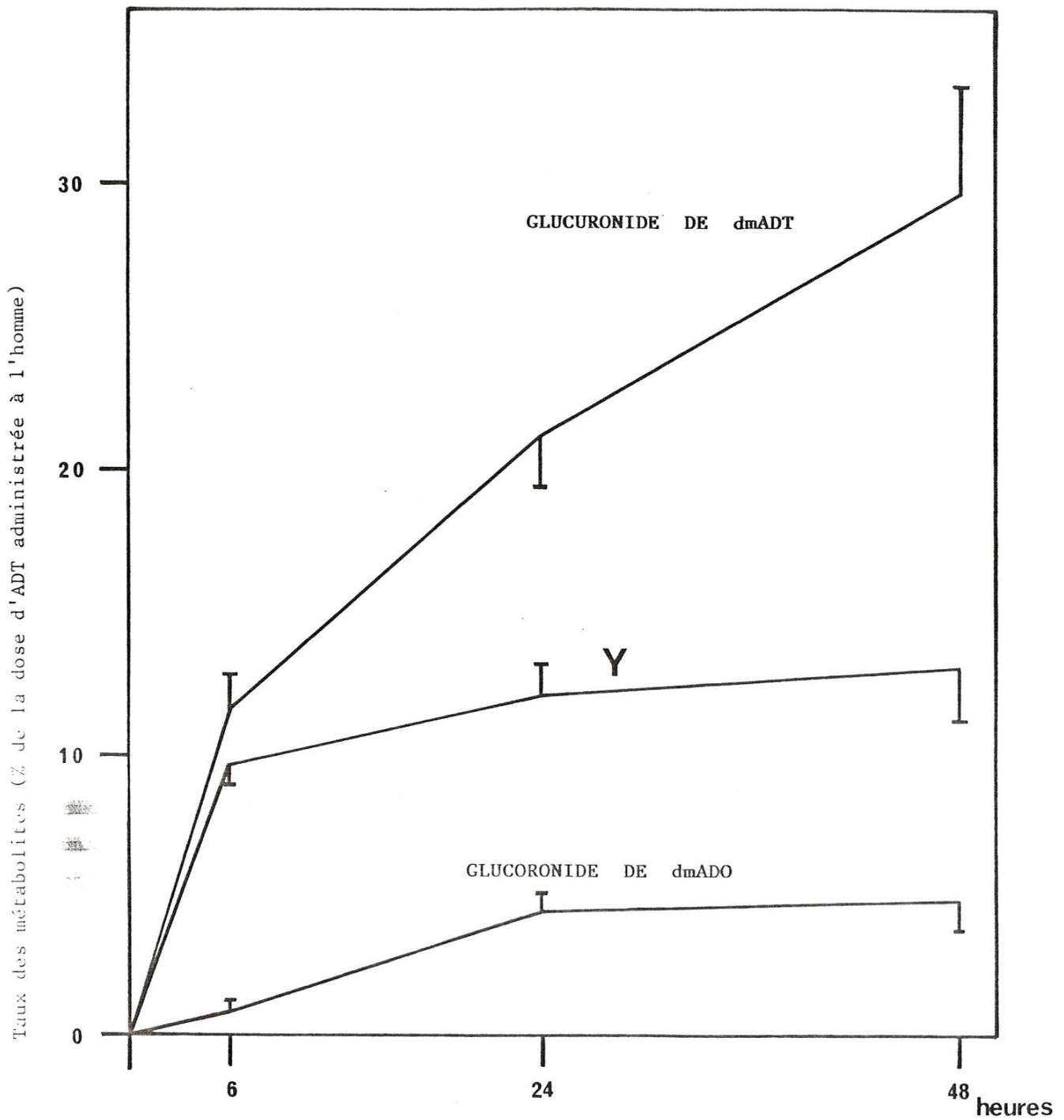


FIGURE 30 : Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT éliminés dans les urines humaines après une prise orale de 125 mg d'ADT. Chaque détermination est le résultat \pm ESM de trois dosages sur chaque échantillon urinaire humain.

Les métabolites majoritaires dans les urines humaines sont les glucuronides du dmADT et du dmADO et le produit Y. Dans les urines collectées 48 heures après la prise du médicament, la somme de ces trois métabolites représente 45 % de la dose d'ADT administrée. Le glucuronide de dmADT représente à lui-seul 29 % de cette dose alors que Y et le glucuronide de dmADO ne représentent respectivement que 12,5 et 4,8 % de la dose.

L'évolution de l'élimination de chacun de ces métabolites dans les urines en fonction du temps retient l'attention. En effet, on remarque sur la Figure 30 que dans la fraction urinaire 0-6 h il y a presque autant de métabolite Y que de glucuronide de dmADT . A partir de 6 h, la quantité de métabolite Y éliminé dans les urines devient très faible, et est pratiquement négligeable au delà de 24 h alors que le glucuronide de dmADT continue à être éliminé en quantités beaucoup plus importantes et pratiquement constantes en fonction du temps jusqu'à 48 h après la prise du médicament.

La plupart du glucuronide de dmADO retrouvé dans les urines est éliminé entre 0 et 24 h. Au-delà de 24 h, la quantité de ce métabolite devient négligeable dans les urines humaines.

A partir de 24 heures après la prise du médicament, l'ADT n'est donc plus métabolisé qu'en dmADT qui est glucuronidé puis éliminé dans les urines, les autres métabolites ne sont plus formés probablement à cause de la baisse de concentration de l'ADT dans les hépatocytes, ce qui favorise sa déméthylation et sa rapide élimination après conjugaison sans que le cycle dithiolthione ne soit métabolisé.

II-3-4 Dosage UV des métabolites éliminés dans les urines de souris

Les métabolites d'ADT éliminés dans les urines de souris ont été

dosés seulement dans la fraction urinaire collectée 24 h après injection intrapéritonéale de l'ADT.

La méthode CLHP utilisée est la même que celle décrite pour le dosage des métabolites urinaires chez l'homme. Une injection en CLHP d'un échantillon urinaire non traité avec les enzymes de déconjugaison nous a montré que le dmADO et le dmADT qui sont les métabolites majoritaires dans les urines de souris ne sont pas éliminés sous forme nonconjuguée, mais nous ne nous sommes pas intéressés à déterminer la nature de la conjugaison. Les métabolites sont dosés uniquement après traitement de l'urine avec un mélange de sulfatase et de glucuronidase.

Une étude très succincte sur les urines de souris traitées par l'ADT, montre que 20 % de la dose administrée (12.5 μmol /souris) sont éliminés sous forme de dmADT sulfo- ou glucuroconjugué (2 μmol) et de dmADO sulfo- ou glucuroconjugué (0.5 μmol) dans les premières 24 heures. Il faut tenir compte dans l'étude des métabolites urinaires aussi bien chez l'homme que chez le rat ou la souris que la parahydroxyacétophénone est très difficile à doser en UV dans les conditions utilisées.

II-3-5 Discussion de l'élimination urinaire de l'ADT chez l'homme, le rat et la souris

L'étude des métabolites de l'ADT dans les urines d'homme, de souris et de rat montre que :

1 - après incubation des urines avec un mélange de glucuronidase et de sulfatase, deux métabolites majoritaires sont retrouvés dans les urines des trois espèces étudiées, ce sont le dmADT et le dmADO. La parahydroxyacétophénone a été dosée par radioactivité dans les urines de rats traités par l'ADT radioactif, mais chez l'homme et la souris, l'étude a été faite en utilisant de l'ADT non radioactif. L'analyse de l'urine humaine en CLHP selon la méthode décrite au paragraphe II-3-1 donne un pic UV qui

a le même temps de rétention que le pic correspondant à la parahydroxyacétophénone (Figures 28 et 29, pic n° 1). Mais le produit n'a pu être isolé pur et par conséquent, les preuves de sa structure n'ont pu être établies. Le même problème s'est posé lors de l'étude des urines de souris.

2 - En plus de ces trois métabolites, on retrouve dans les urines humaines le métabolite Y en quantités importantes surtout dans la fraction urinaire collectée 6 h après prise du médicament. Ce métabolite n'a pas été détecté dans les urines de souris ou de rats, ce qui indique qu'il y a une légère différence dans le métabolisme de l'ADT chez l'homme et chez le rat et la souris.

3 - La nature de la conjugaison diffère selon les espèces. En effet, alors que le dmADT et dmADO sont éliminés dans les urines de rat sous forme sulfoconjuguée, ils sont exclusivement glucuroconjugués chez l'homme. Chez la souris, la nature de la conjugaison de ces deux métabolites n'a pas été étudiée, mais l'analyse CLHP des urines avant et après traitement avec un mélange de sulfatase et de glucuronidase montre qu'il s'agit de métabolites conjugués.

Enfin, la parahydroxyacétophénone est assez hydrophile et s'élimine non conjuguée dans les urines de rat. Chez l'homme, le pic n° 1 (Figures 28 et 29) dont le temps de rétention correspond à celui de la parahydroxyacétophénone ne disparaît pas après traitement de l'urine à la glucuronidase et à la sulfatase, c'est donc un produit non sulfo ou glucuroconjugué.

II-4 Etude succincte de la pharmacocinétique de l'ADT chez l'homme la souris et le rat

L'ADT et ses métabolites ont été dosés dans le sang d'homme, de souris et de rat après traitement du plasma ou du sang total par un mélange de glucuronidase et de sulfatase suivi d'une concentration des métabolites

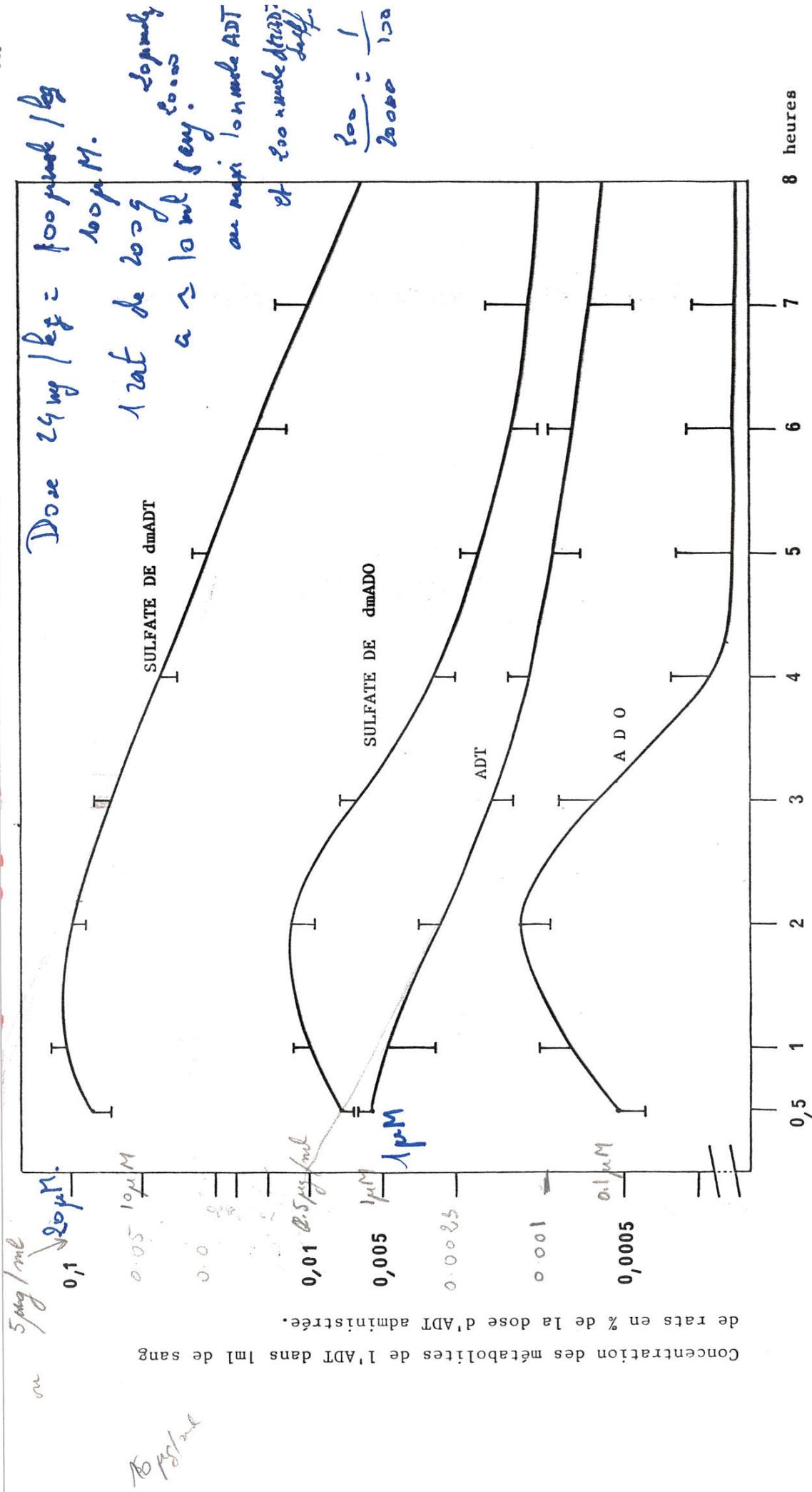


FIGURE 31 : Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang de rats traités i.p. par 24 mg/kg d'ADT. Chaque détermination est le résultat - ESM de trois dosages effectués sur des échantillons sanguins de trois rats différents.

Avec sous la courbe

$$AUC = \frac{C_0}{k} \quad \text{conc init } t=0$$

pour courbe semi-log.

$C_0 =$

$$Cl = \frac{\text{dose}}{AUC}$$

$$Cl_0 = \frac{\text{dose rate}}{AUC \text{ rate.}} = \frac{\text{dose}}{C_0} \times k$$

dosage de la parahydroxyacétophénone si bien que nous pouvons affirmer que ces trois métabolites, même s'ils sont présents dans le sang de rats, le sont en quantités négligeables par rapport aux quatre métabolites déjà mentionnés.

$$V_i = \frac{\text{Dose}}{C_0}$$

$$Cl = \frac{V_i}{k}$$

II-4-1-2 Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang de rats

Le premier prélèvement sanguin a été effectué 30 min après injection intrapéritonéale du médicament. Déjà à 30 minutes, on remarque sur la Figure 31 que le sulfate de dmADT est le métabolite prépondérant dans le sang, suivi par ordre d'importance par le sulfate de dmADO et enfin par l'ADT et l'ADO.

*5 µg/ml
20 µM*

La concentration du sulfate de dmADT dans le sang atteint très tôt après l'injection du médicament un maximum (0,1 % de la dose injectée/ml); reste presque constante entre 30 min et 3 h, puis commence à décroître linéairement et atteint environ 0,007 % de la dose injectée/ml 8 heures après, sa demi-vie plasmatique est de 2 h 20 min.

$$C_0 = 20 \mu\text{g/ml} \quad AUC = \frac{10}{0.3} = 30 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml} \quad k = \frac{0.69}{2.2} = 0.3$$

La concentration du sulfate de dmADO dans le sang de rat est presque toujours 10 fois plus faible que celle du sulfate de dmADT, sa concentration maximale sanguine est atteinte 2 heures après l'injection du médicament au rat et sa demi-vie est de 1 h 15 min.

La concentration de l'ADT dans le sang de rat est maximale 30 min après l'injection du médicament, elle n'excède guère 1 nmol/ml de sang (0,005 % de la dose/ml) et décroît rapidement pour devenir très faible après 8 heures (0.1 nmol/ml de sang), sa demi-vie plasmatique est de 1 h 50 min.

A 3h la conc de sulfate d'ADT = 20 µM dans le plasma pour une dose initiale de 20 µg/kg qui persiste totalement de persévérer par Cl₀.

La concentration sanguine d'ADO chez le rat est la plus faible des quatre métabolites ; un maximum de 0,001 % de la dose/ml de sang est atteint à 2 heures et sa demi-vie plasmatique est la plus courte (environ 1 heure).

$$t_{1/2} = 2h \quad k_{ADT} = \frac{0.69}{2} = 0.35 \text{ h}^{-1}$$

$$C_0 = 0.5 \mu\text{g/ml} \Rightarrow AUC = \frac{C_0}{k} = \frac{0.5}{0.35} = 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}^{-1}$$

$$\text{dose} = 5 \text{ mg} = 5000 \mu\text{g} \quad Cl = \frac{\text{dose}}{AUC} = \frac{5000}{1.5} = 3000 \text{ ml/h}$$

fluoride

100 mg / kg. dose = 2 mg

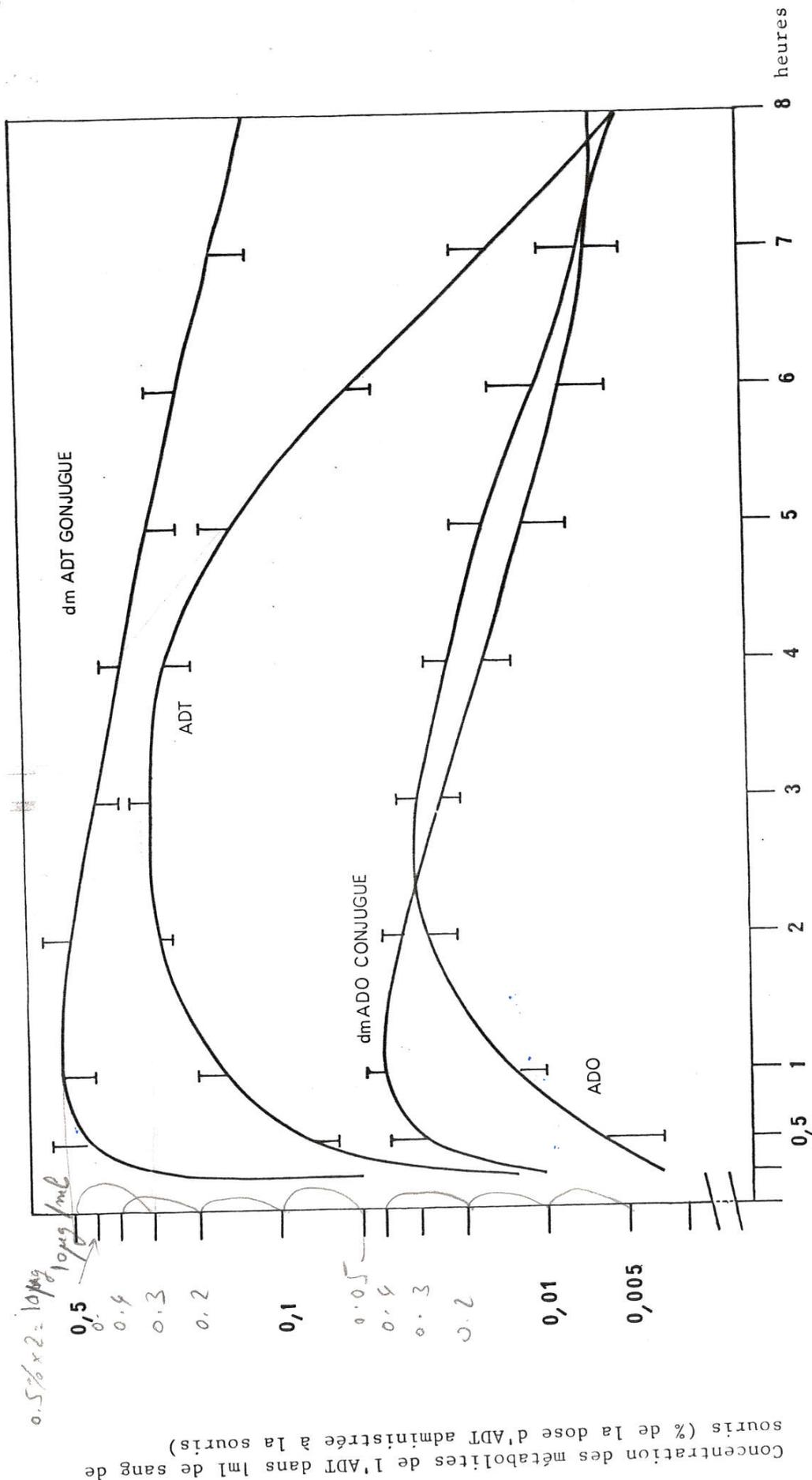


FIGURE 32 : Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang de souris traitées par 100mg/kg d'ADT i.p.. Chaque détermination est le résultat + ESM de trois dosages effectués sur des échantillons sanguins de trois souris différentes.

100 mg/kg
52/100 mg/kg

200 mg/kg

25 mg/kg

II-4-2 Etude effectuée chez la souris

II-4-2-1 Nature des dérivés de l'ADT présents dans le sang de souris

Les métabolites d'ADT présents dans le sang de souris traitées i.p. avec 100 mg/kg d'ADT ont été étudiés avant et après traitement des échantillons sanguins avec un mélange de glucuronidase et de sulfatase.

Comme chez le rat, l'ADT et l'ADO sont présents sous forme libre dans le sang de souris, alors que le dmADT et le dmADO sont présents exclusivement sous forme conjuguée mais la nature de la conjugaison n'a pas été étudiée. Nous nous sommes contentés tout simplement de les déconjuguer puis de les doser.

Les métabolites X, Y et la parahydroxyacétophénone n'ont pas non plus été détectés dans le sang de souris non pas à cause d'un défaut de la méthode mais parce qu'ils sont inexistantes ou présents à très faibles concentrations dans le sang.

II-4-2-2 Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang de souris

Le métabolite le plus important dans le sang de souris est aussi le dmADT sulfo ou glucuroconjugué. Une heure après injection intrapéritonéale de l'ADT, il atteint une concentration maximale dans le sang (0,5 % de la dose injectée/ml) puis cette concentration décroît linéairement en fonction du temps, la demi-vie plasmatique de ce métabolite étant de 4 heures.

Contrairement à ce qu'on a trouvé chez le rat, le deuxième métabolite le plus important quantitativement dans le sang de souris n'est pas le dmADO conjugué, mais l'ADT lui-même dont la concentration sanguine atteint

*Prm une dose de 100mg/kg
A 3h conc dmADT sang + ADT = 16pg/ml + 6 = 84 µM.
Prm dose de 200mg/kg ADT = 16pg/ml = 64 µM.
on avait ~ 16pg/ml
soit tout à fait
suffisamment
pour éliminer
la toxicité et pour
le voir comme libre.*

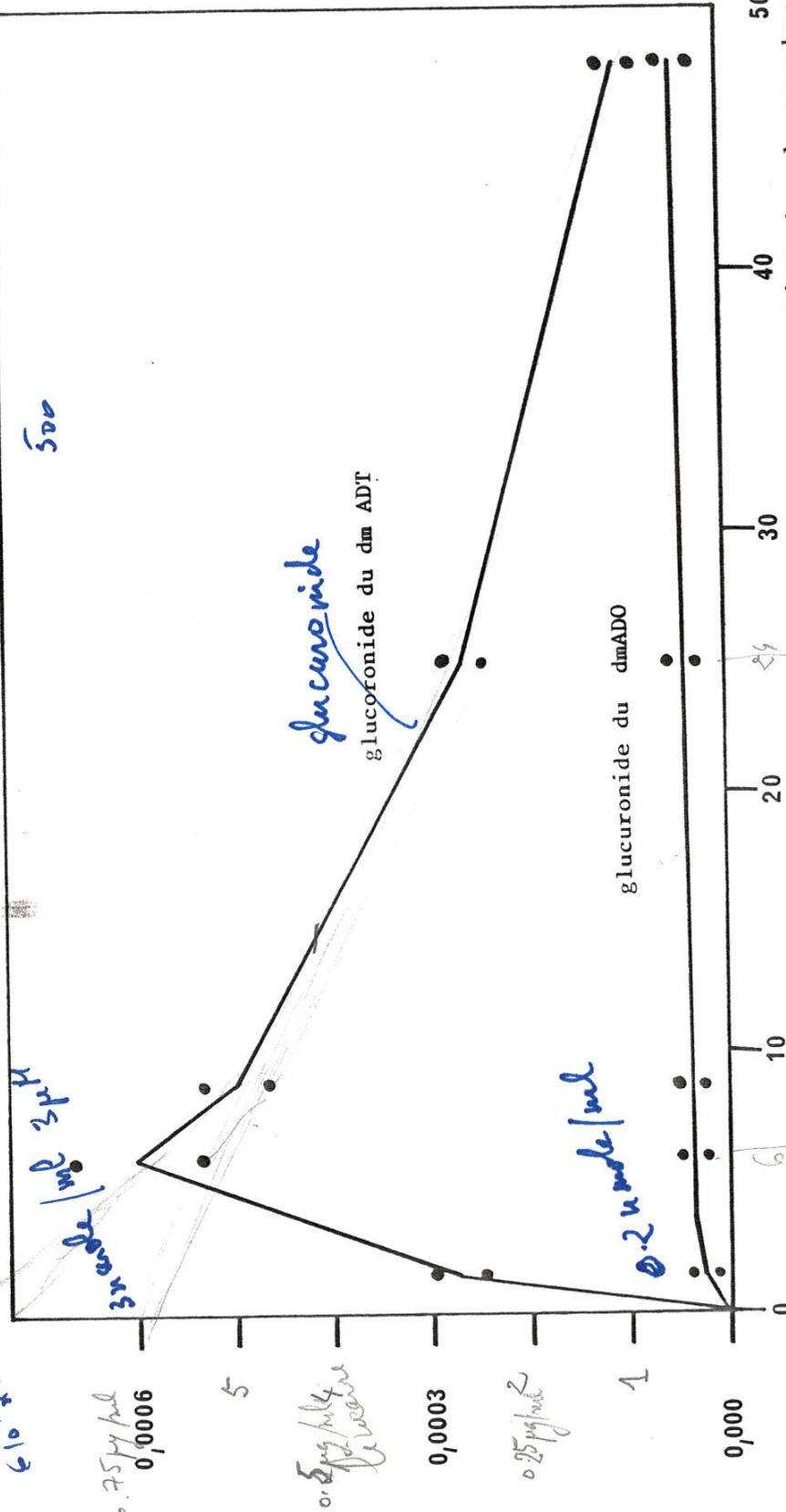
diminuer la

la plus importante

*4h
200 mg/kg = 2103 mg/m³*

Homme 50 de sang. 125 mg = 500 μ mol / SE
 100 μ M.

$3000 - 4 \times 500 = 3100$ μ mol



Concentration des métabolites de l'ADT dans 1ml de sang humain (% de la dose d'ADT administrée)

FIGURE 33 : Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang humain. Chaque détermination est le résultat \pm ESM de deux dosages effectués sur deux échantillons sanguins de deux volontaires ayant pris 125 mg d'ADT oralement.

$t_{1/2}$

$10^{-5} \times 125 \text{ mg} = 1,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$
 ou $5 \text{ } \mu\text{M}$
 $6 \cdot 10^{-6} \times 10,5 \text{ min} = 3 \text{ min}$

$t_{1/2} \approx 15 \text{ h} \pm 2$

$C = 1,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$
 $T_{1/2} = 15 \text{ h} \quad k = \frac{0,69}{15} = 0,046$

$AUC = \frac{1}{0,046} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$
 $CL = \frac{125 \cdot 1000}{20} = 6250 \text{ ml/h}$

un maximum environ 2 heures après l'injection du médicament, reste stable puis décroît linéairement en fonction du temps à partir de 5 heures. La concentration maximale de l'ADT atteinte dans le sang de souris est de 0,25 % de la dose injectée/ml de sang et sa demi-vie plasmatique est d'environ 2 h 40 min.

Le dmADO conjugué et l'ADO atteignent respectivement 1 heure et 2 h 30 après l'injection de l'ADT des taux sanguins de 0,032 % et 0,024 % de la dose injectée/ml. Leurs demi-vies plasmatiques respectives sont d'environ 2 h 30 et 2 h 45 min (Figure 32). *, en fait on pourrait estimer que "in vivo" ce sont eux les produits actifs.*

II-4-3 Etude effectuée chez l'homme

II-4-3-1 Nature des dérivés de l'ADT présents dans le sang humain

La méthode CLHP utilisée pour l'étude des métabolites sanguins de l'ADT chez l'homme est la même que celle utilisée pour l'étude des métabolites sanguins de l'ADT chez le rat et chez la souris, mais le mode d'administration du médicament est oral chez l'homme (10 comprimés dosés à 12,5 mg d'ADT, soit 1,8 et 2,2 mg/kg).

L'analyse comparative d'extraits d'échantillons sanguins humains en CLHP avant et après traitement du sang total par de la glucuronidase pure ou de la sulfatase en présence d'un inhibiteur de la glucuronidase montre que les seuls métabolites détectables dans le sang humain sont le dmADT et le dmADO présents sous forme glucuroconjuguée.

Le métabolite Y présent dans les urines humaines n'a pas été détecté dans le sang, de même que l'ADT, l'ADO, le métabolite X et la parahydroxyacétophénone. S'ils sont présents dans le sang humain, ces métabolites doivent l'être en quantités trop faibles qui sont en dessous du seuil de la sensibilité de notre méthode de détection UV.

II-4-3-2 Evolution en fonction du temps de la concentration des métabolites de l'ADT dans le sang humain

La concentration du glucuronide de dmADT dans le sang humain atteint un maximum 6 heures après la prise orale de 125 mg d'ADT. Ce maximum correspond à 0,0006 % de la dose injectée/ml de sang. La demi-vie plasmatique de ce métabolite est de 15 heures, et il est encore détectable dans le sang humain 48 heures après la prise orale du médicament.

La concentration sanguine du glucuronide de dmADO ne présente pas un pic plasmatique, ce métabolite apparaît lentement dans le sang humain et atteint vers 10 heures après la prise orale de l'ADT une concentration équivalente à 0,00004 % de la dose injectée/ml de sang. Cette concentration reste presque constante jusqu'à 48 heures.

II-4-4 Discussion des résultats de l'étude pharmacocinétique chez l'homme, la souris et le rat

1 - dmADT

- Les figures 31, 32 et 33 montrent que le dmADT conjugué est le métabolite le plus important dans le sang des trois espèces étudiées
- Sa concentration sanguine est toujours, au moins 10 fois plus importante que celle des autres métabolites
- Il est presque le seul métabolite détecté dans le sang humain

2 - ADT

- L'ADT est présent à des concentrations très faibles dans le sang de rat

- Il est non détecté dans le sang humain
- Il subsiste en concentrations importantes dans le sang de souris

3 - ADO

- L'ADO est présent dans le sang de souris et de rat à faibles concentrations
- Il n'a pas été détecté dans le sang humain

4 - dmADO

Ce métabolite a été détecté, toujours sous forme conjuguée, dans le sang des trois espèces étudiées, sa concentration sanguine est en général très faible (toujours au moins 10 fois moins importante que celle du dmADT conjugué).

5 - La parahydroxyacétophénone

C'est un métabolite assez hydrophile pour pouvoir s'éliminer dans les urines très vite après sa formation, ce qui explique qu'il n'a jamais été détecté dans le sang d'aucune des espèces étudiées.

6 - Différences de métabolisme chez l'homme et l'animal

- L'étude des métabolites sanguins fait apparaître les deux différences suivantes :
 - Dans le sang humain , seuls le dmADT et le dmADO conjugués ont été détectés, alors que dans le sang de souris et de rats, sont présents en plus de ces deux métabolites l'ADO l'ADT lui-même

- Le dmADO et le dmADT sont exclusivement glucuro-conjugués chez l'homme alors que chez le rat, ils sont sulfatés.

- La comparaison des résultats des études faites sur le sang et les urines montrent que :
 - L'ADT et l'ADO sont, selon l'espèce, soit non détectés soit présents à l'état de traces dans les urines. Leur présence dans le sang de certaines espèces, mais pas dans les urines, peut s'expliquer par le fait qu'ils sont très hydrophobes, ils sont donc métabolisés avant leur élimination.

 - Le métabolite Y présent dans les urines humaines n'a été détecté ni dans le sang humain ni dans les urines ou le sang de souris et de rat. Il y a donc une légère différence entre le métabolisme de l'ADT chez l'homme et son métabolisme chez le rat et la souris. Notons à cette occasion que la voie d'administration chez l'homme était orale alors qu'elle était i.p. chez la souris et le rat.

III - EFFETS DE L'ADT ET DE SES DERIVES SUR LA PEROXYDATION DES LIPIDES
IN VITRO ET IN VIVO : ORIGINE DE SES EFFETS HEPATOPROTECTEURS

III-1 Etat du problème au début de l'étude

Les propriétés biochimiques de l'ADT ont été très peu étudiées. Dans l'unique publication parue dans la littérature concernant ce produit (2), Bueding et Coll. n'ont fait que montrer certaines de ses propriétés protectrices bien précises contre quelques unes des nombreuses manifestations de l'hépatotoxicité du paracétamol et du CCl_4 . Aucune explication biochimique de ces effets n'a été proposée.

Bueding et Coll. ont constaté simplement que l'administration orale de 500 mg/kg d'ADT à des souris 4 et 2 jours avant intoxication par de fortes doses de paracétamol ou de CCl_4 , les protège contre :

- 1 - La mortalité
- 2 - L'élévation des taux des transaminases glutamate-pyruvate et glutamate-oxaloacétate et de sorbitol déshydrogénase dans le sang
- 3 - La chute du taux de glutathion hépatique

Dans la même publication, Bueding rapporte que le traitement de souris témoins par l'ADT augmente de 4 à 6 fois l'activité de la glutathion-S-transférase hépatique, enzyme responsable de la conjugaison et de la détoxification des métabolites électrophiles des xénobiotiques.

Avant que ces résultats n'apparaissent, nous avons évoqué au laboratoire l'hypothèse selon laquelle l'ADT exerçait ses propriétés hépatoprotectrices par le biais d'une inhibition de la peroxydation des lipides. Nous avons donc étudié la capacité de l'ADT d'inhiber la peroxydation des

lipides induite in vitro ou in vivo de différentes manières.

III-2 Choix des modèles expérimentaux et arguments qui justifient ce choix

III-2-1 In vitro

A Plusieurs techniques d'induction de la peroxydation des lipides in vitro, existent dans la littérature. Dans l'introduction ont été mentionnés deux systèmes enzymatiques ; la NADPH cyt. P-450 réductase et la xanthine oxydase qui, in vitro, additionnées à un milieu contenant des lipides induisent leur peroxydation. Cette peroxydation a comme point de départ la production d' O_2^- par ces enzymes au cours de leur cycle catalytique (90, 92).

D'autres systèmes, utilisant les lipides des microsomes hépatiques de rat peuvent être utilisés pour l'étude de la peroxydation des lipides. La production de radicaux responsables de l'initiation de la peroxydation des lipides microsomaux peut être réalisée de deux façons :

a - Par voie chimique, en présence de sulfate ferreux et d'un réducteur (cystéine ou ascorbate) :

Dans ces systèmes, le Fe^{II} en s'oxydant en Fe^{III} est responsable de la réduction monoélectronique de l'oxygène en O_2^- , alors que le réducteur, incapable de réduire l'oxygène en Fe^{II} , sert uniquement à réduire le Fe^{III} (161).

b - Par voie enzymatique

Dans ce cas, c'est la réduction métabolique de CCl_4 par les cytochromes P-450 Fe^{II} des microsomes hépatiques en présence de NADPH qui produit les radicaux $\cdot CCl_3$ responsables de l'initiation de la peroxydation des lipides.

Pour l'étude in vitro de l'effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides, nous avons utilisé ces deux derniers systèmes.

III-2-1-1 Avantages et inconvénients du système
CCl₄ + NADPH + microsomes de foie de rat

Les expériences, utilisant ce système, sont faciles à réaliser et permettent une reproductibilité des résultats satisfaisante. En contrepartie, ce système est le même que celui utilisé pour l'étude, in vitro, du métabolisme de l'ADT, il contient tous les enzymes de la phase I avec leur cofacteur. L'ADT va donc être métabolisé et il est très difficile de savoir si c'est l'ADT ou l'un de ses métabolites qui est responsable de l'inhibition de la peroxydation des lipides observée.

III-2-1-2 Avantages et inconvénients des systèmes
composés de fer ferreux, d'un réducteur et de microsomes

Dans ces systèmes, les produits inhibiteurs de la peroxydation des lipides étudiés ne subissent aucun métabolisme faute de NADPH. L'inhibition observée est donc attribuée spécifiquement au produit utilisé et non à ses métabolites. Grâce à ces systèmes on a pu étudier la relation structure-activité de toute une famille de composés dérivés ou métabolites de l'ADT, ce qui nous a permis de déterminer les facteurs structuraux de la molécule d'ADT responsables de l'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides.

III-2-2 In vivo

Pour l'étude des molécules qui protègent contre la peroxydation des lipides, il est très important de pouvoir maintenir l'animal en vie au cours de l'expérience tout en mesurant le taux de peroxydation lipidique. Une telle possibilité permet de corréliser l'inhibition de la peroxydation des lipides à certaines manifestations physiologiques et à la mortalité. La découverte en 1974 (97) que les animaux chez lesquels on induit une peroxydation des lipides expirent certains hydrocarbures volatils tels que

l'éthane, le pentane, l'éthylène etc... (chapitre I-3-4-4-3), permet l'étude de la peroxydation des lipides induite in vivo chez l'animal sans obligation de le sacrifier à la fin de l'expérience.

Pour toutes les études réalisées sur l'animal in vivo, la mesure du taux d'éthane expiré a servi comme indice d'évaluation de la peroxydation des lipides. Le choix de la mesure de l'éthane plutôt que celle du pentane ou de l'éthylène a été dicté par des considérations métaboliques et d'élimination pulmonaire. En effet, alors que l'éthane est peu métabolisé avant son élimination pulmonaire, le pentane et l'éthylène subissent un métabolisme beaucoup plus important (162) et sont, de ce fait, éliminés par les poumons en quantités difficiles à détecter en chromatographie en phase gazeuse.

Pour induire une peroxydation des lipides expérimentale chez le rat ou la souris, quatre produits ont été utilisés : le CCl₄, le paracétamol, le paraquat et la bléomycine. Ces produits ont été choisis dans le souci d'étudier à la fois l'effet de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides hépatiques (CCl₄ ou paracétamol) et vis-à-vis de la peroxydation des lipides pulmonaires (paraquat ou bléomycine).

III-2-2-1 Toxicité induite par le tétrachlorure de carbone

Après introduction dans l'organisme, le tétrachlorure de carbone passe dans le sang, une partie s'élimine par voie pulmonaire et le reste se distribue dans les organes riches en lipides (système nerveux, foie, reins, moëlle osseuse, coeur ...). Au niveau de ces organes et en présence de cyt.P-450 Fe^{II}, le CCl₄ est réduit en radical [•]CCl₃ responsable d'une toxicité directe par liaison aux macromolécules cellulaires et d'une toxicité indirecte par induction de peroxydation des lipides.

Dans l'organisme, les hépatocytes sont les cellules les plus riches en structures réticuloendothéliales contenant à la fois beaucoup

de phospholipides du type phosphatidylcholine et les monooxygénases à cyt,P-450 responsables de l'activation des produits susceptibles d'être métabolisés en intermédiaires réactifs. Toutes ces raisons font que le foie est le premier organe où la toxicité due à l'activation de produits exogènes en intermédiaires réactifs se manifeste. Ce n'est que plus tard que la néphro ou la cardiotoxicité se manifeste. Nous avons donc utilisé le CCl_4 pour créer une hépatotoxicité expérimentale aiguë chez l'animal de laboratoire et nous avons essayé de protéger contre cette hépatotoxicité par une série de molécules contenant un cycle dithiolthione en mesurant l'éthane expiré par les animaux comme indice de peroxydation des lipides.

III-2-2-2 Toxicité induite par le paracétamol

Nous avons déjà mentionné (paragraphe I-3-7-3) qu'aussi bien chez l'homme que chez l'animal, environ 4 % seulement de la dose de paracétamol sont transformés en métabolite électrophile éliminé dans les urines après conjugaison avec le glutathion. La toxicité de ce métabolite ne se manifeste que s'il est formé en quantités importantes qui diminuent de 70 % ou plus la concentration de glutathion hépatique (4 mM) (140, 145).

Utilisant ces données, Mitchell et Coll. (163) ont fait un calcul qui leur a permis de conclure que chez l'homme le paracétamol n'est hépatotoxique qu'à des doses supérieures à 15 g. Ce calcul est le suivant :

- a) Quantité de métabolite, exprimée en mmol, nécessaire pour diminuer de 70 % la concentration de GSH hépatique

$$Q = 70 \% \times 1,5 \times 4 = 4,2 \text{ mmol.}$$

Poids moyen du foie
humain (kg)

Concentration de GSH
dans le foie (mM)

b) $Q = 4 \%$ de la dose de paracétamol (D)

$$D = \frac{Q}{4} \times 100 = 105 \text{ mmol.} = 0.105 \text{ mol}$$

$$D = 0,105 \times 161 = 16,9 \text{ g}$$

↑
Poids moléculaire du paracétamol

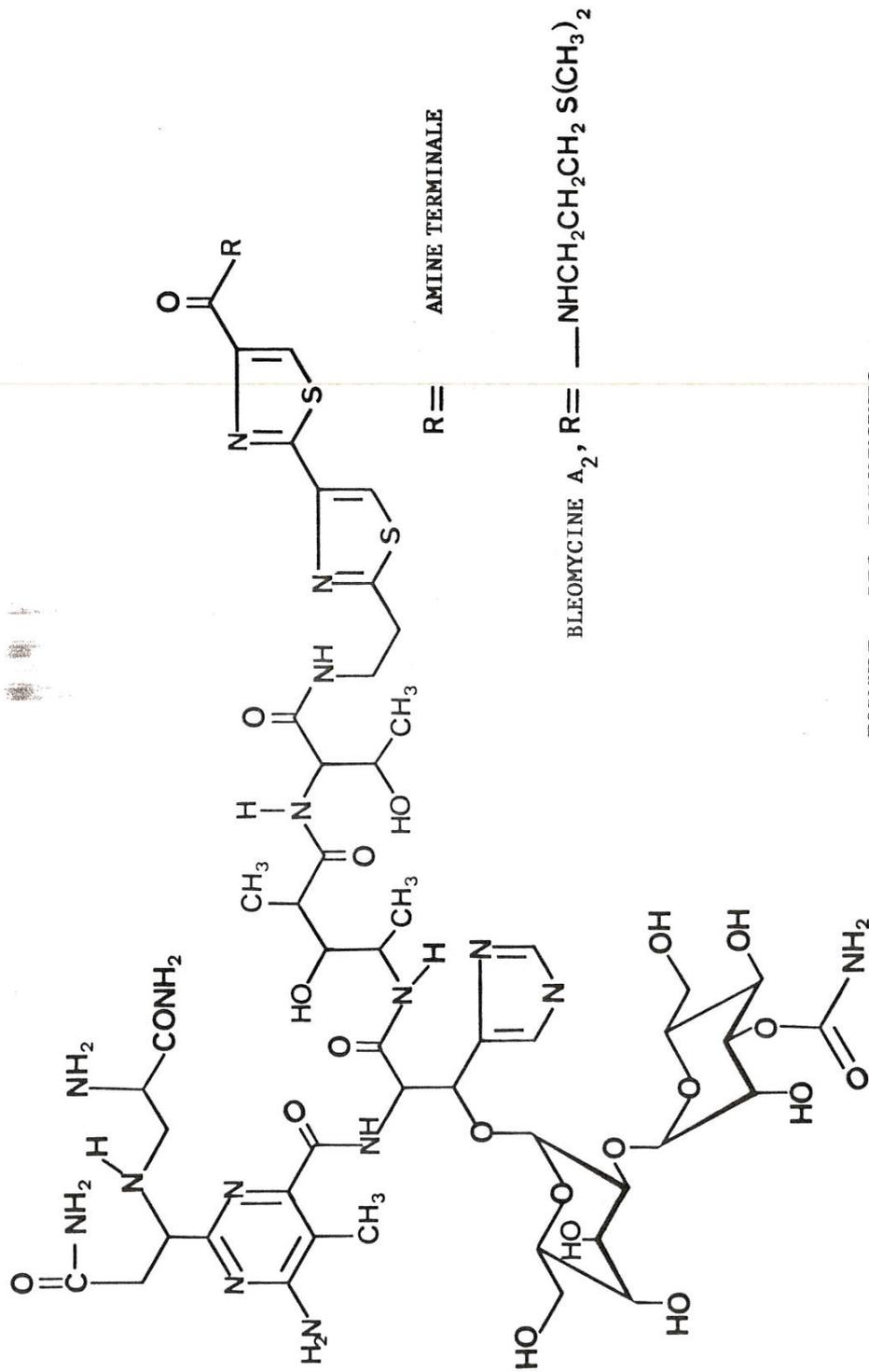
Ce même calcul appliqué à des souris dont le poids est de 25 g et celui de leur foie est d'environ 500 mg montre que la quantité de métabolite réactif nécessaire pour créer une nécrose hépatique expérimentale due au paracétamol chez la souris doit être au moins de 14×10^{-4} mmol (70% $\times 5 \times 10^{-4}$ kg de foie $\times 4$ mM) soit une dose de paracétamol de 5,6 mg par souris ($\simeq 250$ mg/kg). Or à cette dose et même à la dose de 500 mg/kg, aucune augmentation du taux d'éthane expiré par les souris n'est détectée, bien que l'augmentation du taux des transaminases dans le sang témoigne d'une lyse des cellules hépatiques et que le taux de GSH hépatique chute de plus de 50 % (140, 145).

En 1983, Wendel (140) a montré que l'injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol à des souris dont le taux de glutathion a été diminué artificiellement en les faisant jeûner pendant 24 ou 48 heures, provoque en plus de la nécrose hépatique une expiration très importante d'éthane, signe d'une peroxydation des lipides induite chez ces souris.

Au laboratoire, des souris à jeun pendant 72 heures ont été utilisées pour étudier l'effet de certaines dithiolthiones vis-à-vis de la peroxydation des lipides comparativement à des antioxydants connus.

III-2-2-3 Toxicité induite par le paraquat

Chez la souris, l'injection i.p. de paraquat augmente le taux d'éthane expiré comparativement au taux expiré par des souris témoins. Cette augmentation est beaucoup plus importante si la souris est traitée



FORMULE DES BLEOMYCINES

en même temps par du sulfate ferreux et du paraquat et serait due à une peroxydation des lipides pulmonaires provoquée par une augmentation de la production des dérivés de réduction de l'oxygène (chapitre I-3-7-1-1).

Au laboratoire, la coadministration de FeSO_4 et de paraquat à des souris nous a permis d'induire une peroxydation de lipides expérimentale, l'effet de l'ADT sur cette peroxydation a été étudié.

III-2-2-4 Toxicité induite par la bléomycine

La bléomycine est un antinéoplasique utilisé en thérapeutique humaine. Le mécanisme par lequel il exerce sa toxicité vis-à-vis des cellules tumorales n'est pas bien connu. Cette toxicité serait due à une activation par la bléomycine de la réduction de l'oxygène moléculaire en O_2^- (91).

Cette activation de l'oxygène, occasionne à côté de l'effet thérapeutique une toxicité pulmonaire attribuée à une peroxydation de lipides. Chez la souris, cette peroxydation est augmentée en présence de sulfate ferreux et serait due à la formation de complexe bléomycine- Fe^{II} capable de déclencher par lui-même une peroxydation de lipides (91) ou de réduire l'oxygène moléculaire en O_2^- responsable des réactions de peroxydation (Chapitre I). L'association (Fe^{II} -bléomycine) nous a permis en effet de déclencher une peroxydation lipidique chez la souris.

III-3 Etude des effets de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite in vitro

L'inhibition de la peroxydation des lipides induite in vitro, en présence de microsomes de foies de rats prétraités au phénobarbital, a été étudiée. La peroxydation des lipides microsomaux est induite soit par la cystéine ou l'acide ascorbique en présence de FeSO_4 (systèmes chimiques) soit par du CCl_4 en présence de NADPH (système enzymatique) et le taux de

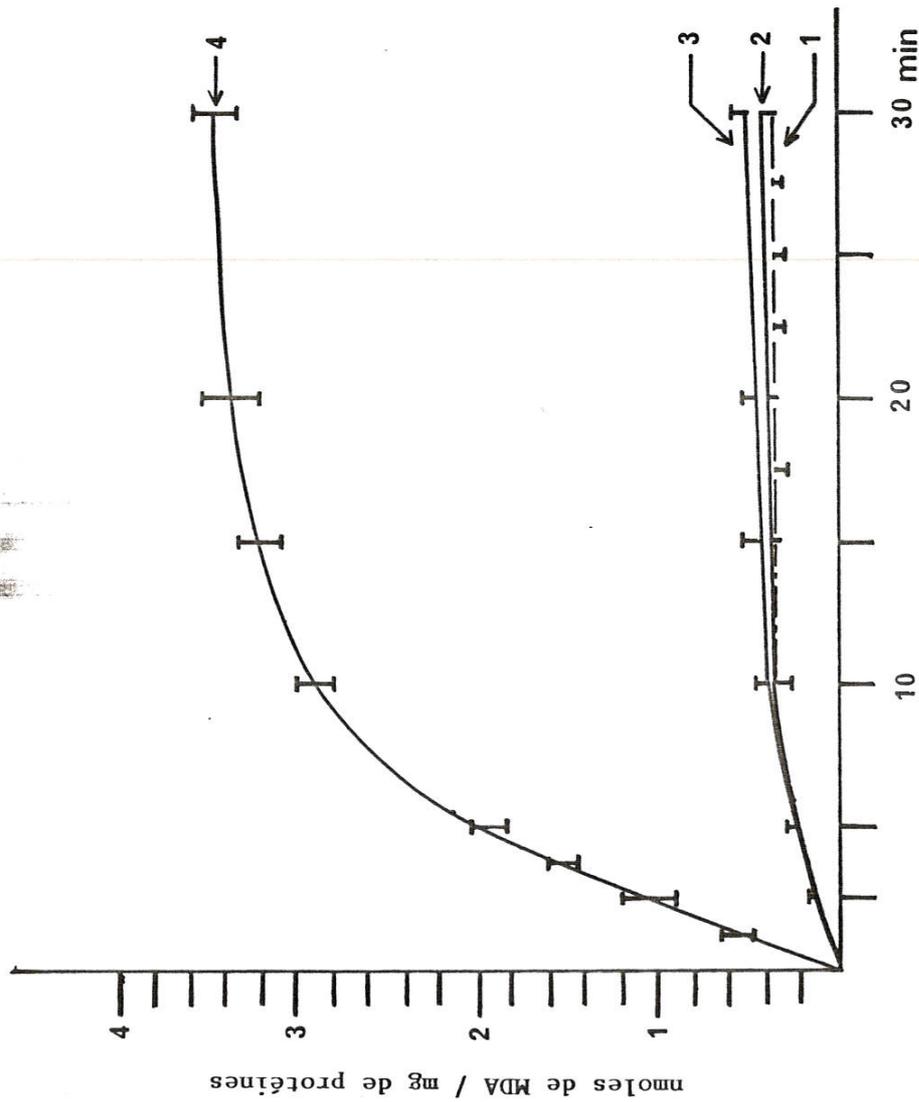


FIGURE 34 : Cinétique de production de malondialdéhyde par des microsomes de foie de rats traités par du phénobarbital. 1 mg de protéines sont incubés à 37°C dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.

- 1 ► seules
- 2 ► en présence de NADPH (1mM) de CCl_4 (5mM) et d'ADT (10^{-5}M),
- 3 ► en présence de NADPH seul
- 4 ► en présence de NADPH + CCl_4 .

Les valeurs de MDA indiquées sur la figure sont les moyennes \pm ESM de trois déterminations indépendantes.

malondialdéhyde ou d'éthane formé après incubation des microsomes à 37°C en présence ou en absence d'inhibiteurs sert d'indice d'évaluation de la peroxydation des lipides.

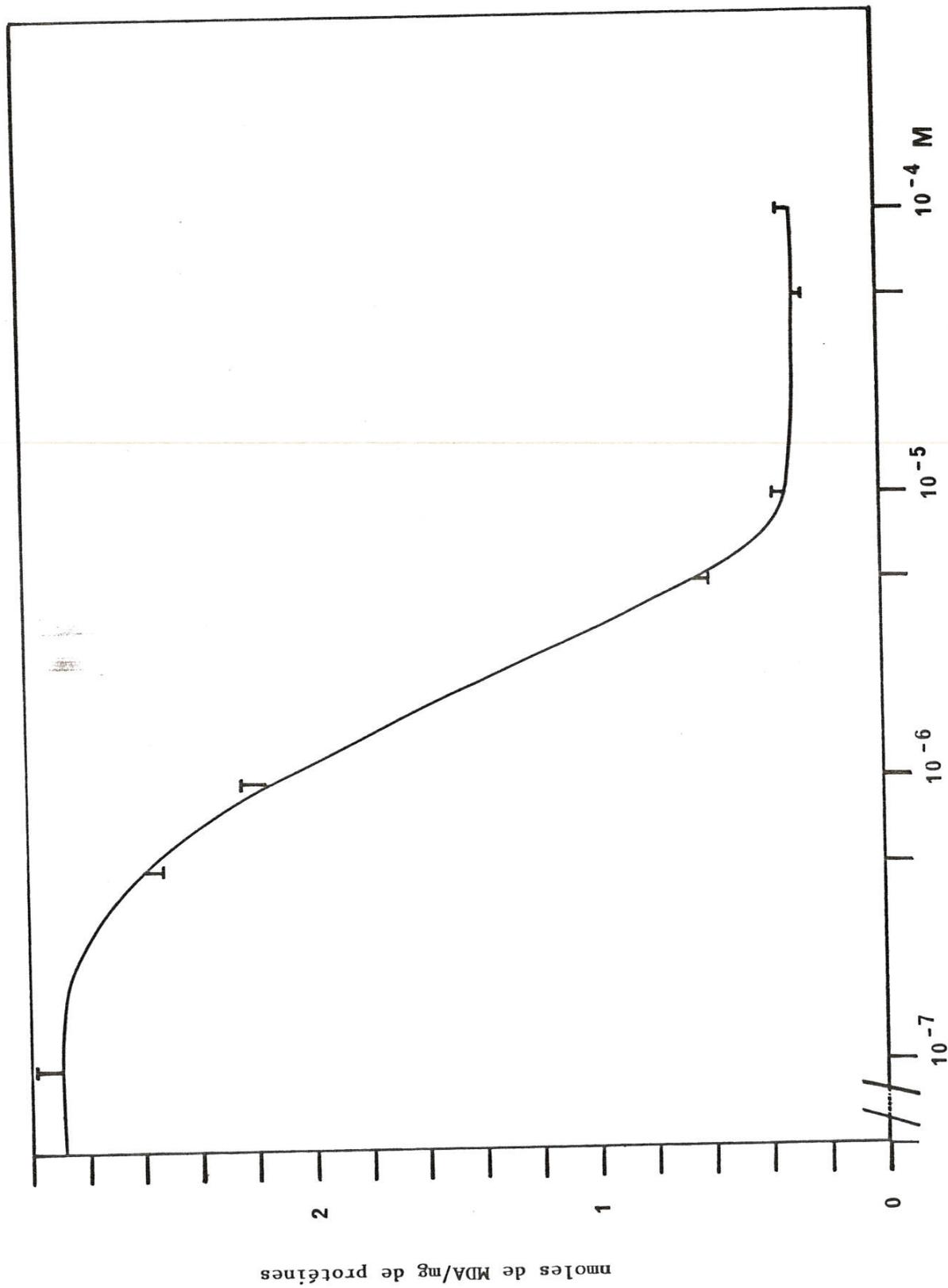
III-3-1 Effet de l'ADT sur la production de malondialdéhyde (MDA) due à une peroxydation de lipides induite par la réduction enzymatique de CCl_4 dans des microsomes hépatiques de rats

III-3-1-1 Cinétique de formation de malondialdéhyde par ce système

La formation de malondialdéhyde par des microsomes hépatiques (de rats traités au phénobarbital) incubés en présence de NADPH (1 mM) et de CCl_4 (5 mM) à 37°C est linéaire entre 0 et 5 minutes après le début de l'incubation puis diminue progressivement. Après 10 minutes d'incubation, le MDA atteint dans le milieu réactionnel un taux qui varie faiblement en fonction du temps. Ce taux correspond à environ 8 fois le taux de MDA présent dans un milieu réactionnel ne contenant pas de CCl_4 (Figure 34). La même figure montre que l'ADT 10^{-5}M , inhibe complètement la production de MDA induite par la réduction enzymatique de CCl_4 en CCl_3 .

Cet essai préliminaire montre que l'ADT est un inhibiteur de la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques induite in vitro, enzymatiquement après réduction de CCl_4 par les cyt.P-450 microsomaux en présence de NADPH. Pour déterminer la relation entre la dose d'ADT et son effet sur la peroxydation des lipides, les microsomes hépatiques de rats ont été incubés pendant 10 minutes en présence de NADPH, de CCl_4 et de différentes concentrations d'ADT; après quoi, la concentration de MDA dans le milieu réactionnel a été mesurée puis corrélée à la concentration d'ADT.

Le choix de 10 minutes comme temps d'incubation est justifié par les faibles variations de la concentration de MDA à partir de ce temps



Concentrations de l'ADT

FIGURE 35 : Inhibition en fonction de la concentration d'ADT de la peroxydation des lipides induite par CCl₄ (5mM) en présence de NADPH (1mM) dans des microsomes hépatiques (1mg de protéines / ml) de rats traités par du phénobarbital. Les valeurs indiquées sur la figure sont les moyennes ± ESM de trois déterminations indépendantes.

dans le milieu réactionnel ce qui permet d'obtenir des résultats avec un domaine d'erreur faible.

III-3-1-2 Détermination de la relation dose d'ADT-
Inhibition de la production de MDA par des microsomes
hépatiques en présence de NADPH et de tétrachlorure
de carbone

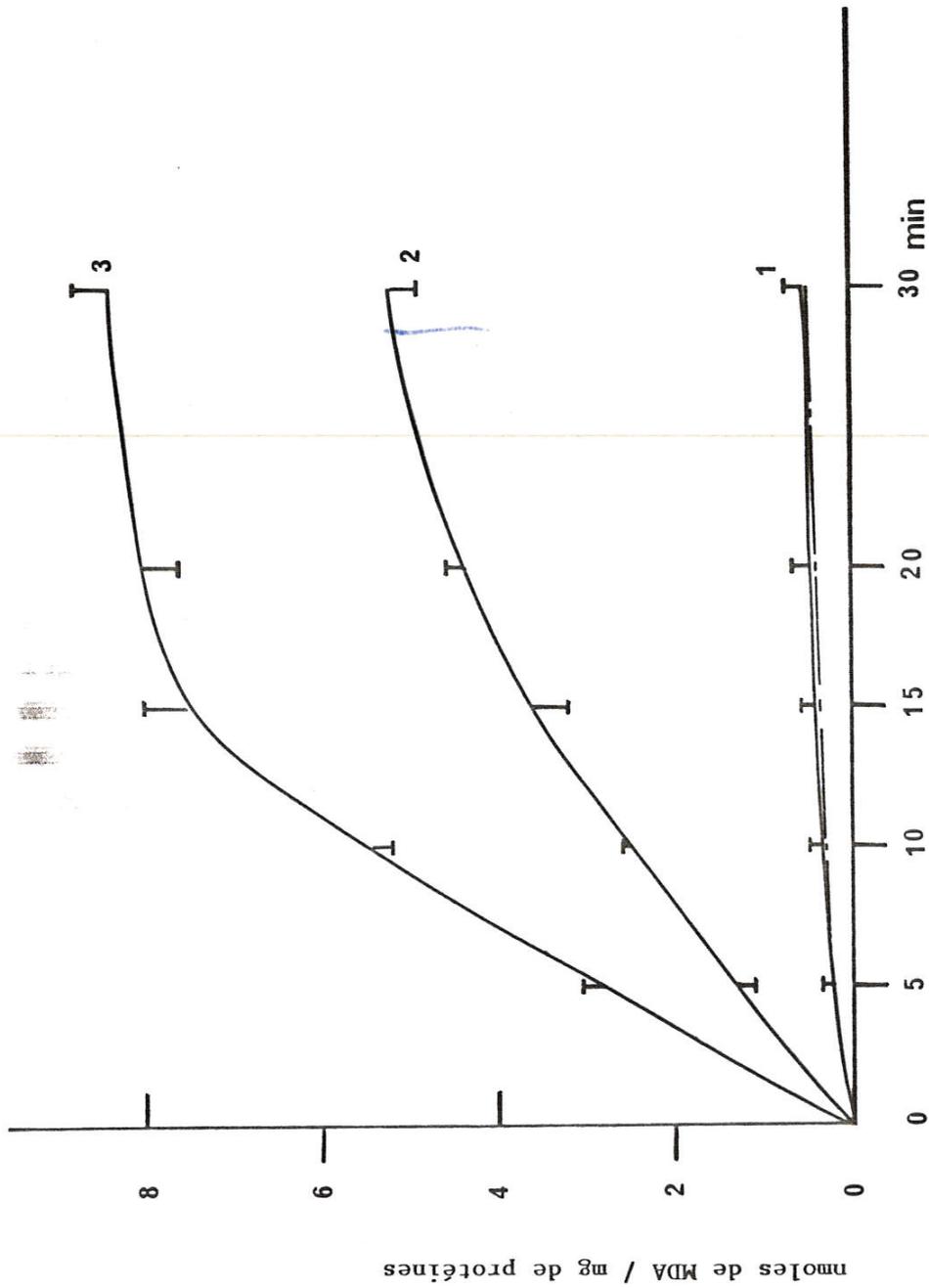
L'ADT s'est révélé un puissant inhibiteur de la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques induite in vitro, par $\cdot\text{CCl}_3$ provenant de la réduction enzymatique de CCl_4 par les cytochromes P-450 en présence de NADPH. Son effet inhibiteur commence à être visible à la concentration de $0,5 \mu\text{M}$. A $10 \mu\text{M}$, il inhibe complètement la production de malondialdéhyde provenant de la peroxydation des lipides microsomaux induite par $\cdot\text{CCl}_3$ puis leur fragmentation (Figure 35).

La même figure montre que la CI_{50} de l'ADT, concentration qui réduit de 50 % la production de malondialdéhyde par comparaison au taux observé en absence d'inhibiteur est de $2 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

III-3-2 Inhibition par l'ADT de la production de MDA au
cours de la peroxydation de lipides induite chimique-
ment par FeSO_4 et un réducteur dans des microsomes
hépatiques de rats

III-3-2-1 Cinétique de formation de MDA par ces
systèmes

Dans le cas où le réducteur utilisé est l'acide ascorbique, la formation de malondialdéhyde par les microsomes hépatiques incubés à 37°C est linéaire entre 0 et 10 minutes après le début de l'incubation. A partir de 15 minutes, le taux de malondialdéhyde varie très faiblement dans le milieu réactionnel et se stabilise au bout de 30 minutes à un taux qui



OK

FIGURE 36 : Cinétique de production de MDA par des microsomes de foie de rats traités par du phénobarbital. 1 mg de protéines /ml sont incubés à 37°C (—) en présence de cystéine ou d'ascorbate (0,5 mM), (1) en présence de cystéine ou d'ascorbate (0,5mM), de FeSO₄ (5μM) et d'ADT (10 μM), (2) en présence de FeSO₄ (5 μM) et de cystéine (0,5mM) (3) en présence de FeSO₄ (5 μM) et d'ascorbate (0,5mM). Les valeurs de MDA indiquées sur la figure sont les moyennes + ESM de trois expériences différentes.

correspond à environ 20 fois le taux de MDA produit par des microsomes incubés en absence de FeSO_4 .

Quand le réducteur utilisé est la cystéine, la formation de MDA en fonction du temps est moins rapide. Au bout de 30 minutes, le taux de MDA dans le milieu réactionnel atteint une concentration qui correspond à environ 9 fois le taux de MDA produit par des microsomes incubés en absence de FeSO_4 (Figure 36).

Cette même figure montre que la cinétique de formation de MDA par les microsomes incubés en présence d'ADT 10 μM en plus de FeSO_4 et du réducteur est identique à celle obtenue avec des microsomes incubés uniquement en présence de réducteur incapable d'induire à lui seul la peroxydation des lipides. Donc, à cette concentration d'ADT, l'inhibition de la peroxydation des lipides est totale.

Dans le but de déterminer la CI_{50} de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides induite par ces systèmes chimiques, des incubations ont été réalisées avec différentes concentrations d'ADT dans le milieu réactionnel et arrêtées au bout de 15 minutes si le réducteur utilisé est l'acide ascorbique ou 30 minutes si c'est la cystéine.

III-3-2-2 Détermination de la relation entre la dose d'ADT et l'inhibition de la production de MDA par des microsomes hépatiques en présence de FeSO_4 et d'un réducteur

L'ADT inhibe aussi efficacement la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques induite in vitro, chimiquement par une association soit de FeSO_4 et d'ascorbate, soit de FeSO_4 et de cystéine. L'inhibition de la formation de MDA commence à une concentration d'ADT dans le milieu réactionnel de l'ordre de 0,5 μM et est totale à la concentration de 10 μM , la CI_{50} étant de $3 \pm 0,1$ μM comme le montrent la figure 37 (réducteur = cystéine) et les tableaux 11 et 12.

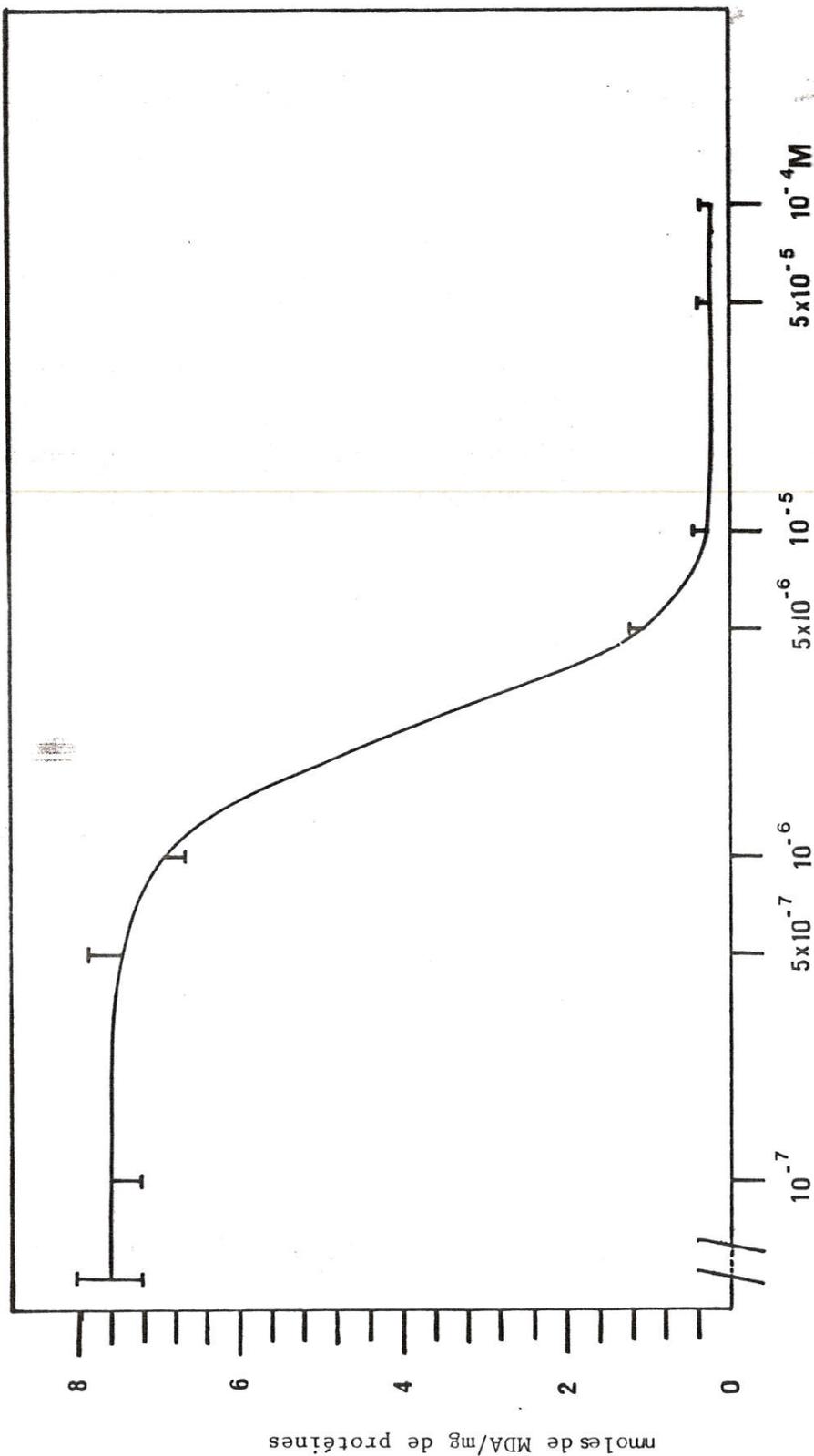


FIGURE 37 : Inhibition, en fonction de la concentration d'ADT, de la peroxydation des lipides induite par FeSO_4 ($5\mu\text{M}$) et l'ascorbate (0.5 mM) dans des microsomes hépatiques (1 mg de protéines / ml) de rats traités par du phénobarbital. Les quantités de MDA indiquées sur la figure sont la moyenne - ESM de trois expériences différentes.

III-3-3 Comparaison de la capacité de l'ADT d'inhiber la peroxydation des lipides à celles d'antioxydants connus

Les antioxydants testés comparativement à l'ADT vis-à-vis de l'inhibition de la peroxydation des lipides sont : la prométhazine (PZ), le propylgallate (PG), le lévamisole, le diéthylthiocarbamate (DDC) et la vitamine E.

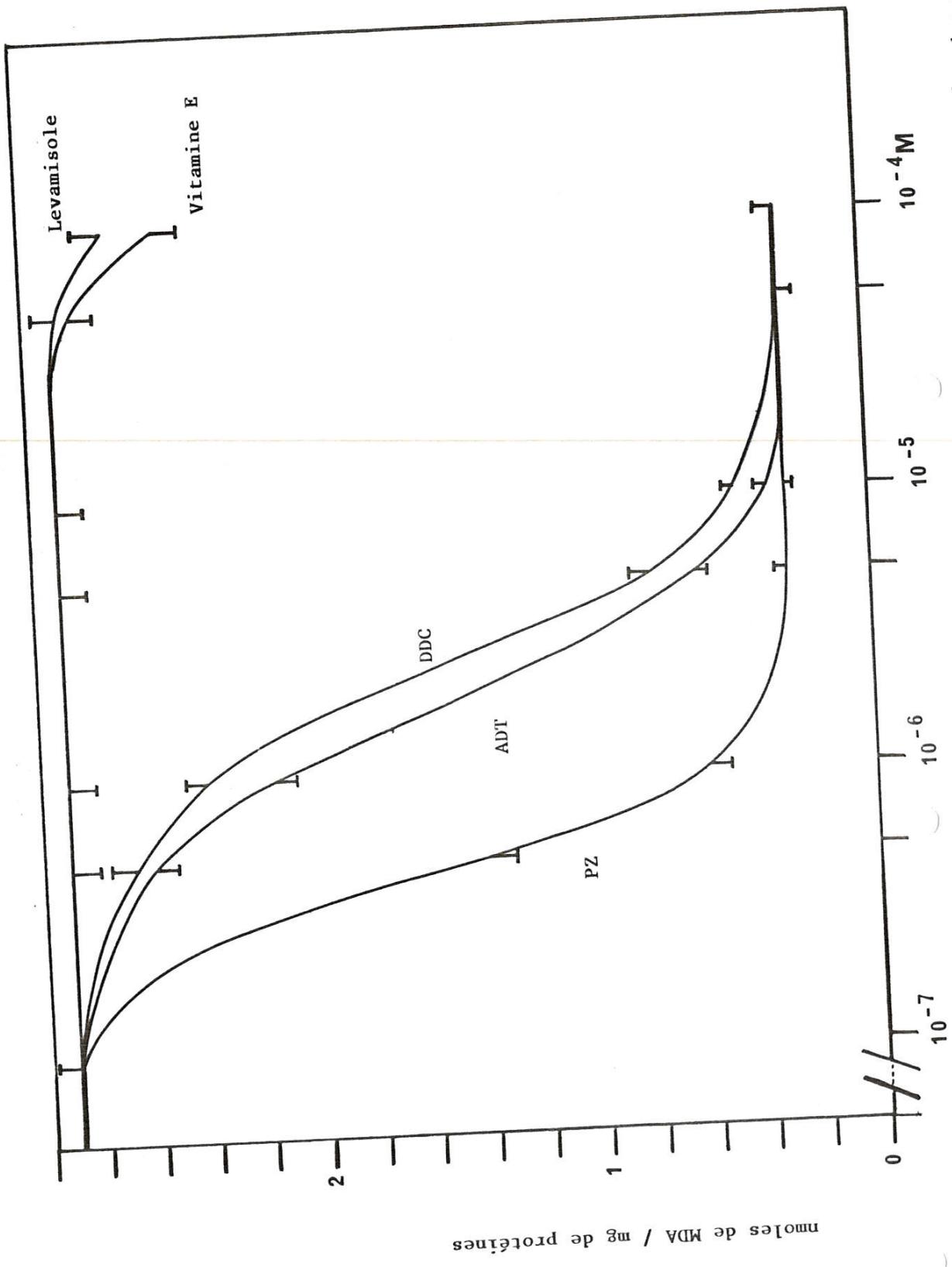
Pour chaque antioxydant utilisé, une courbe schématisant la relation entre la concentration d'antioxydant dans le milieu réactionnel et l'inhibition de la peroxydation des lipides microsomaux, induite aussi bien chimiquement qu'enzymatiquement, a été établie, en mesurant le taux de MDA produit en fonction de la concentration d'inhibiteur utilisée. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles utilisées pour les expériences avec l'ADT et les CI_{50} obtenues et ont été regroupées dans le tableau 11.

III-3-3-1 Résultats obtenus avec le système enzymatique

La Figure 38 représente à titre d'exemple l'effet de différentes concentrations d'ADT, de DDC, de lévamisole, de vitamine E et de PZ sur la peroxydation des lipides induite enzymatiquement dans des microsomes hépatiques de rats par réduction de CCl_4 en $\cdot CCl_3$ par les cyt.P-450 en présence de NADPH. On remarque que la vitamine E qui est l'antioxydant biologique le plus puissant (91) n'inhibe pas la peroxydation des lipides dans ce système même à la concentration de 100 μM , il en est de même du lévamisole qui inhibe in vivo la peroxydation des lipides induite par le tétrachlorure de carbone chez le rat (164) mais qui est complètement inefficace dans ce système à une concentration aussi forte que 100 μM .

La courbe représentant l'inhibition par le propylgallate de la peroxydation des lipides en fonction de la concentration n'est pas représentée sur cette figure, mais elle se situe entre celles de l'ADT et du DDC.

Figure 38



Levamisole de la peroxydation des lipides

Ces trois produits inhibent d'une façon similaire la peroxydation des lipides induite par le CCl_4 dans les microsomes hépatiques. Leur CI_{50} est identique aux erreurs près et varie de $2,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ pour l'ADT à $2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et $3,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ respectivement pour le diéthylthiocarbamate et le propylgallate (Tableau 12).

Le meilleur inhibiteur de la peroxydation des lipides dans ce système est la prométhazine avec une CI_{50} de $0,4 \pm 0,05 \mu\text{M}$ et une inhibition totale à la concentration de $2 \mu\text{M}$ (Figure 38 et Tableau 11).

III-3-3-2 Résultats obtenus avec les systèmes chimiques d'induction de la peroxydation des lipides

Le Tableau 11 montre les concentrations d'ADT et des cinq anti-oxydants testés qui inhibent de 50 % la production de malondialdéhyde par des microsomes hépatiques de rats incubés en présence de FeSO_4 et d'un réducteur responsables de l'induction de la peroxydation des lipides microsomaux.

On remarque que quel que soit le réducteur utilisé, cystéine ou ascorbate, les CI_{50} de l'ADT, du DDC et du PG sont similaires et sont de l'ordre de 1 à $4 \mu\text{M}$ dans les deux systèmes. La prométhazine et la vitamine E sont beaucoup moins efficaces avec des CI_{50} variant respectivement selon que le réducteur utilisé est la cystéine ou l'ascorbate, de $8,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ à $12,5 \pm 0,5$ pour la prométhazine et de $50 \pm 25 \mu\text{M}$ à $35 \pm 16 \mu\text{M}$ pour la vitamine E. Quant au lévamisole, il est complètement inefficace à une concentration aussi forte que $100 \mu\text{M}$ quel que soit le réducteur utilisé.

III-3-4 Comparaison de la capacité de l'ADT d'inhiber la peroxydation des lipides à celle de certains de ses dérivés et de l'Oltipraz

Les dérivés d'ADT testés vis-à-vis de l'inhibition de la peroxydation des lipides induite in vitro sont les métabolites d'ADT (Chapitre II)

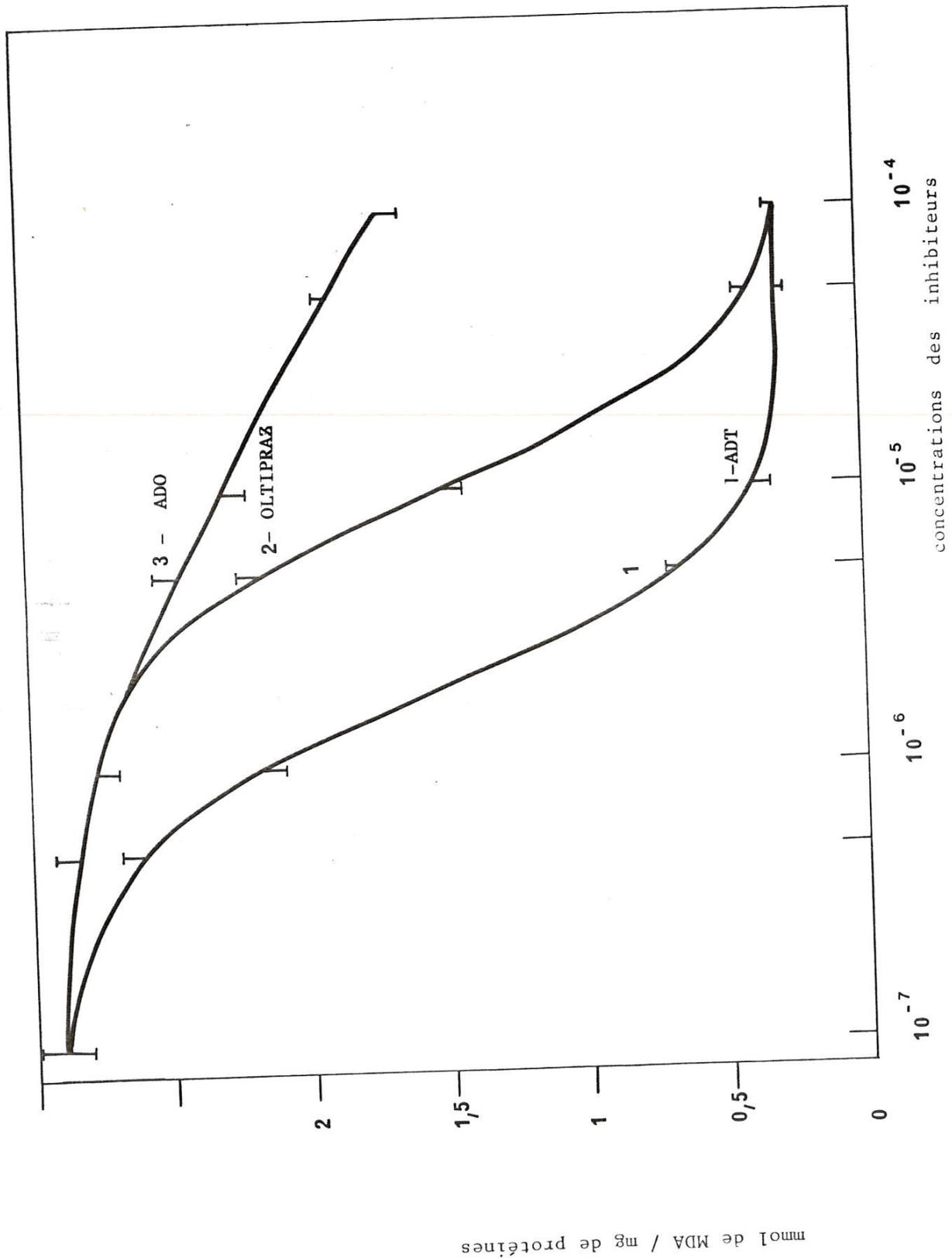


FIGURE 39 : Inhibition par l'ADT (1), l'oltipraz (2) et l'ADO (3) de la peroxydation des lipides induite enzymatiquement dans des microsomes hépatiques (1mg de protéines/ml d'incubation) par le CCl₄ (5mM) et le NADPH (1mM). Les valeurs de MDA indiquées sont les moyennes ± ESM de trois expériences

et des molécules renfermant comme l'ADT le cycle dithia-1,2-cyclopentène thione-3 substitué en position 4 ou 5 par un phényl lui-même différemment substitué selon la molécule (Tableau 12).

L'Oltipraz déjà introduit au chapitre I, paragraphe I-1, renferme le même cycle dithiolthione que l'ADT substitué par une pyrazine en position 5 et par un méthyl en position 4, c'est une molécule dont le métabolisme est complètement différent de celui de l'ADT (Chapitre II-3-7-2), et il était très intéressant du point de vue structural de comparer son activité antioxydante à celle de l'ADT.

III-3-4-1 Comparaison par rapport aux dérivés de l'ADT

Sur le Tableau 12, sont représentées les CI_{50} des dérivés de l'ADT testés vis-à-vis de l'inhibition de la peroxydation des lipides ; on remarque que, quel que soit le système utilisé pour induire la peroxydation de lipides présents dans les microsomes hépatiques, les CI_{50} pour un produit donné dépendent très peu des systèmes utilisés (enzymatiques ou chimiques).

Il est à noter que le dmADT (ADT déméthylé) qui est le métabolite majoritaire, in vivo, chez l'homme, la souris et le rat est, dans les trois systèmes d'induction de peroxydation des lipides microsomaux utilisés, aussi inhibiteur de cette peroxydation que l'ADT lui-même avec une CI_{50} variant d'un système à l'autre entre 1,5 et 3 μM . Par contre, l'anisyldithiol-one (ADO) et le dmADO eux-aussi métabolites de l'ADT, in vivo n'ont pratiquement aucun effet.

Les molécules dont le cycle dithia-1,2-cyclopentène thione-3 est substitué par un phényl en position 4 (Ph-4) ou en position 5 (Ph-5) ainsi que le TTE (ADT hydroxylé en ortho du méthoxy) se sont aussi révélés de bons inhibiteurs de la peroxydation des lipides induite dans les microsomes hépatiques de rats par les différents systèmes utilisés. Ils ont un pouvoir inhibiteur presque identique entre eux qui est similaire à celui de l'ADT

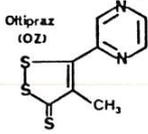
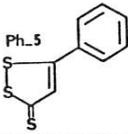
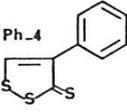
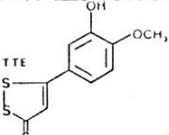
Systèmes utilisés pour induire la peroxydation des lipides			
	FeSO ₄ + Cystéine	FeSO ₄ + Ascorbate	CCl ₄ + NADPH
INHIBITEURS	CI ₅₀		
ADT	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1
dmADT	2.0 ± 0.5	1.5 ± 0.4	3.0 ± 0.4
ADO et dmADO	>100	>100	>100
 Oltipraz (OZ)	2.5 ± 0.5	3.2 ± 0.3	11 ± 1
 Ph-5	2.3 ± 0.1	2.8 ± 0.3	5.0 ± 1.0
 Ph-4	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.5	3.4 ± 0.2
 TTE	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	3.4 ± 0.2

Tableau 12 Comparaison de l'inhibition par l'ADT, par certains de ces dérivés et par l'Oltipraz, de la peroxydation des lipides induite chimiquement par FeSO₄ (5 μM) et l'ascorbate ou la cystéine (500 μM) ou enzymatiquement par CCl₄ (5 mM) et NADPH (1 mM), en présence de microsomes hépatiques de rats traités par du phénobarbital (1 mg de protéines/ml de milieu réactionnel). Les CI₅₀ indiquées sur le tableau sont les résultats ± ESM de 4 expériences indépendantes dupliquées.

mettre ici tableau 11

lipides. Signalons à l'occasion que la comparaison des résultats de notre étude du métabolisme de l'ADT à ceux du métabolisme de l'Oltipraz montre des différences très importantes entre le métabolisme de ces deux molécules. En effet, l'Oltipraz est presque totalement métabolisé en dérivés qui ne renferment plus la structure $S = C - S - S$ ou $O = C - S - S$. A l'opposé, l'ADT subit secondairement une désulfuration oxydative qui aboutit à la structure $O = C - S - S$ et principalement une O-déméthylation ; c'est la réaction la plus importante ; dans ce cas, la structure $S = C - S - S$ n'est pas touchée.

III-3-5 Effet de l'ADT sur la production de C_2H_6 in vitro par des microsomes hépatiques de rats incubés en présence de NADPH et de CCl_4

III-3-5-1 Cinétique de formation de C_2H_6

La Figure 40 représente la formation d'éthane, in vitro, par des microsomes obtenus à partir de foie de rats prétraités par du phénobarbital et incubés à $37^\circ C$ en présence de CCl_4 (20 mM) et de NADPH (4 mM). La quantité d'éthane produit par les microsomes est linéaire entre 0 et 30 min après le début de l'incubation. A partir de 30 minutes, cette quantité reste stable à un taux maximum 20 fois plus important que l'éthane produit par des microsomes incubés dans les mêmes conditions mais sans CCl_4 (taux témoin). Cette même figure montre qu'aux concentrations de $160 \mu M$, le propylgallate inhibe complètement la production d'éthane alors que l'ADT inhibe cette production de 85 % seulement .

III-3-5-2 Détermination de la relation entre la concentration de l'inhibiteur et l'effet sur la production d'éthane

Différentes concentrations d'ADT, de dmADT et de PG ont été incubées avec des microsomes hépatiques en présence de NADPH (4 mM) et de CCl_4 (20 mM).

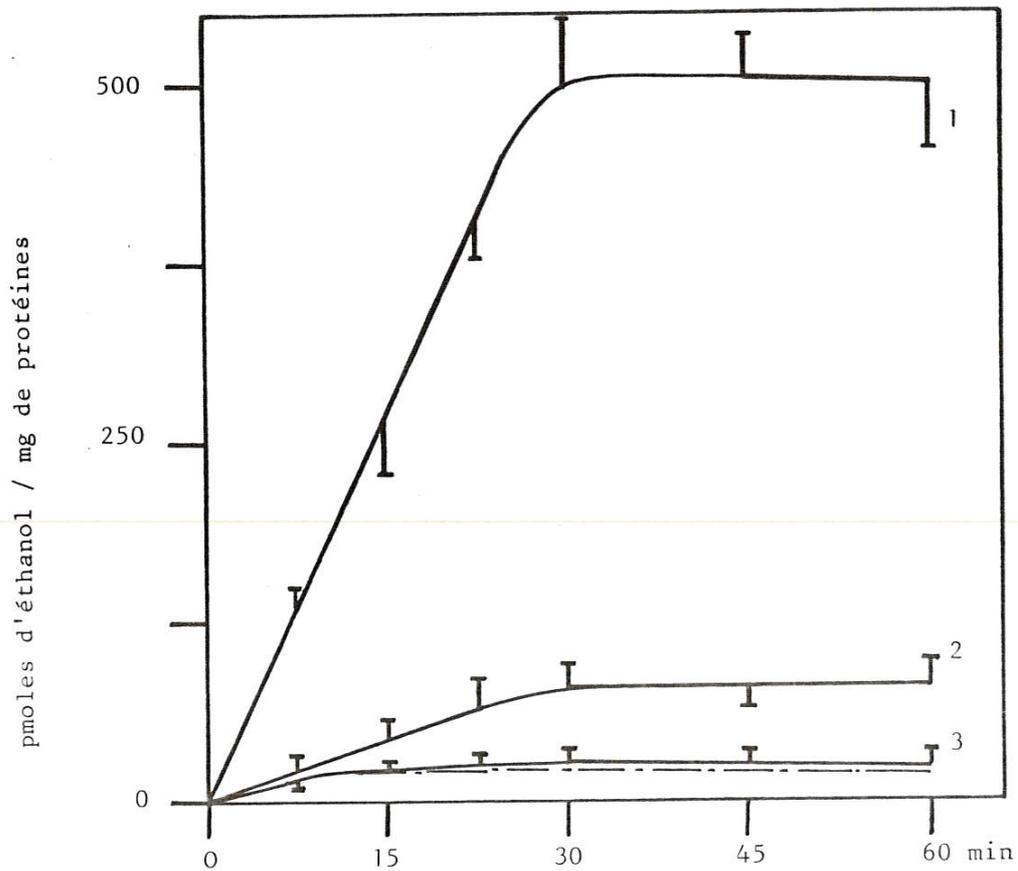


Figure 40 : Cinétique de production d'éthane par des microsomes (4mg de protéines/ml) de foie de rats traités par du phénobarbital, incubés à 37°C en présence :

- ▶ 1 - de CCl_4 (20mM) et de NADPH (4mM)
- ▶ 2 - de CCl_4 , de NADPH et d'ADT (160 μM)
- ▶ 3 - de NADPH, de CCl_4 et de PG (160 μM)
- ▶ (---) microsomes incubés seuls dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4

Résultats \pm ESM (4 expériences)

lui-même, avec une CI_{50} qui varie peu selon les systèmes pour un même produit (Tableau 12).

La Figure 39 représente à titre d'exemple l'inhibition de la peroxydation des lipides induite enzymatiquement en fonction des doses d'ADT, d'ADO et d'Oltipraz.

III-3-4-2 Comparaison des pouvoirs inhibiteurs de l'ADT et de l'Oltipraz vis-à-vis de la peroxydation des lipides

Contrairement à l'ADT qui dans le système enzymatique inhibe de moitié la peroxydation des lipides à la concentration de $2 \mu M$, l'Oltipraz n'exerce aucune inhibition à cette concentration (Figure 39).

L'Oltipraz exerce cependant à partir de $5 \mu M$ une inhibition partielle sur la peroxydation des lipides microsomaux induite par la réduction enzymatique de CCl_4 . Cette inhibition n'est totale qu'aux concentrations supérieures à $50 \mu M$ alors que l'ADT exerce déjà une inhibition totale à partir de $10 \mu M$. Avec une CI_{50} de $11 \pm 1 \mu M$, l'Oltipraz est environ 6 fois moins inhibiteur que l'ADT de la peroxydation de lipides induite in vitro par le CCl_4 .

Dans les systèmes chimiques, l'Oltipraz est aussi efficace que l'ADT avec une CI_{50} de l'ordre de $3 \mu M$ indépendamment du réducteur (cystéine ou ascorbate) (Tableau 12).

Rappelons que le système enzymatique d'induction de la peroxydation des lipides contient du NADPH. De ce fait, les inhibiteurs sont métabolisés par les cytochromes P-450 alors que dans les systèmes chimiques, ce métabolisme n'a pas lieu. Il paraît donc, que dans ce système, l'Oltipraz est plus vite métabolisé que l'ADT. Ce métabolisme donnerait dans le cas de l'Oltipraz des molécules qui n'auraient pas d'effet inhibiteur sur la peroxydation des

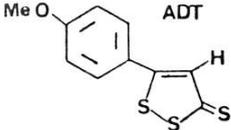
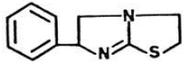
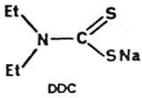
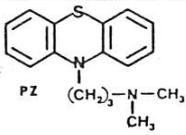
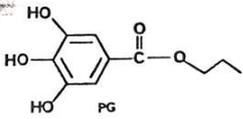
Systèmes utilisés pour induire la peroxydation des lipides microsomaux			
	FeSO ₄ + Cystéine	FeSO ₄ + Ascorbate	CCl ₄ + NADPH
INHIBITEURS	CI ₅₀ = Concentrations inhibant de 50 % la production de malondialdéhyde (μM)		
 ADT	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1
VITAMINE E	50 ± 25	35 ± 16	>100
 Levamisole	>100	>100	>100
 DDC	2.0 ± 0.3	2.5 ± 0.5	2.4 ± 0.4
 PZ	8.5 ± 0.2	12.5 ± 0.5	0.4 ± 0.05
 PG	4 ± 0.1	1.3 ± 0.3	3.0 ± 0.2

Tableau 11

Comparaison de l'inhibition par l'ADT et par certains anti-oxydants de la peroxydation des lipides induite chimiquement par FeSO₄ (5 μM) + ascorbate ou cystéine (500 μM) ou enzymatiquement par CCl₄ (5 mM) + NADPH (1 mM) en présence de microsomes de foie de rats traités par du phénobarbital (1mg de protéines/ml). Les CI₅₀ mentionnées dans le tableau sont les résultats de 4 expériences indépendantes dupliquées.

mettre ici tableau (12)

Les réactions sont arrêtées au bout de 30 minutes d'incubation et le taux d'éthane mesuré est corrélé à la concentration d'inhibiteur dans le milieu réactionnel (Figure 41).

On constate d'après cette figure et le Tableau 12, que le propylgallate est un aussi bon inhibiteur de la production de C_2H_6 que celle de MDA, puisque sa CI_{50} est identique dans les deux tests, alors que l'ADT et le dmADT inhibent moins bien la production d'éthane que celle de MDA. Leurs CI_{50} déterminées par le test à l'éthane sont respectivement d'environ 20 et 10 fois plus fortes que celles mesurées par le test de MDA. En effet, l'ADT a une CI_{50} de $40 \mu M$ au lieu de $2 \mu M$, alors que le dmADT a une CI_{50} de $25 \mu M$ au lieu de $3 \mu M$ (Tableau 12 et Figure 41).

Le fait que les CI_{50} de l'ADT et du dmADT déterminées par le test à l'éthane sont supérieures à celles déterminées par le test au MDA, n'est pas étonnant. En effet, il faut noter que la mesure d'éthane par chromatographie en phase gazeuse (CPG) est un test moins sensible que la mesure du malondialdéhyde par colorimétrie après condensation avec l'acide thiobarbiturique. De ce fait, la quantité d'éthane produit en travaillant dans les conditions du test au MDA est difficilement mesurable par CPG. Nous avons alors été obligés d'utiliser dans le test à l'éthane 4 fois plus de protéines microsomales, de NADPH et de CCl_4 que dans le test au MDA. Dans ces conditions, les quantités d'éthane produit sont facilement mesurables par CPG. En contrepartie, l'ADT et le dmADT sont métabolisés plus vite que dans le test au MDA. Ce métabolisme produit des dérivés qui n'inhibent pas la peroxydation des lipides (ADO et dmADO) (Tableau 12 et paragraphe III-4-1) ; il en résulte une diminution de l'inhibition de cette peroxydation par rapport à celle obtenue en utilisant le test au MDA.

Le propylgallate est probablement peu ou pas métabolisé par les microsomes hépatiques ce qui fait qu'il inhibe aussi efficacement la production d'éthane que celle du malondialdéhyde.

III-3-6 Discussion des résultats concernant les effets de
de l'ADT et de ses dérivés sur la peroxydation des
lipides in vitro

1 - Le tableau 11 montre que l'ADT est un aussi bon inhibiteur que le PG et le DDC de la peroxydation des lipides induite in vitro dans des microsomes hépatiques de rats.

Que cette peroxydation de lipides soit induite chimiquement ou enzymatiquement, l'ADT, le PG et le DDC l'inhibent aussi bien tous les trois avec des CI_{50} très proches ($CI_{50} \simeq 10^{-6}M$).

Dans les systèmes chimiques, la prométhazine est 4 à 6 fois moins efficace que l'ADT. Dans le système enzymatique, elle inhibe un peu mieux que l'ADT la peroxydation des lipides, ce qui suggèrerait qu'en présence de cytochromes P-450 et de NADPH, elle est métabolisée en dérivé beaucoup plus inhibiteur de la peroxydation des lipides que la molécule mère. Dans les systèmes chimiques, ce métabolisme n'a pas lieu.

La vitamine E inhibe légèrement la peroxydation des lipides dans les systèmes chimiques, mais elle est de 17 à 25 fois moins efficace que l'ADT, et elle est totalement inefficace dans le système enzymatique. Enfin, le lévamisole bien qu'inhibant in vivo la peroxydation des lipides induite chez le rat par le CCl_4 (160), est complètement démunie d'activité "antioxydante" dans les trois systèmes.

2 - Le Tableau 12 montre que parmi les dérivés de l'ADT testés, tous ceux qui renferment le motif structural S = C - S - S sont de bons inhibiteurs de la peroxydation des lipides des microsomes hépatiques induite chimiquement ou enzymatiquement. Leurs CI_{50} sont similaires à celles de l'ADT, du PG et du DDC et supérieures à celles de la vitamine E et du lévamisole.

Les dérivés de l'ADT qui renferment le motif structural $O = C - S - S$

Figure U2 derriere -

ne sont pratiquement pas inhibiteurs. La fonction C = S semble donc importante pour les effets inhibiteurs de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides in vitro.

3 - Le fait que l'ADT inhibe la peroxydation des lipides induite chimiquement dans des microsomes hépatiques par une association de FeSO_4 et d'un réducteur (cystéine ou ascorbate) suggère que cette inhibition est due à un piégeage de radicaux.

Dans le système enzymatique où la peroxydation des lipides est induite par le radical $\cdot\text{CCl}_3$, il est plus difficile de conclure. En effet, dans ce système, l'ADT pourrait agir par :

- a - un piégeage des radicaux $\cdot\text{CCl}_3$
- b - un piégeage des radicaux lipidiques formés au cours des réactions en chaîne ($\text{L}\cdot$, $\text{LO}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$...)
- c - un blocage du métabolisme du CCl_4

Nous n'avons pas de preuves formelles prouvant que l'ADT n'inhibe pas le métabolisme du CCl_4 , mais les résultats obtenus avec les systèmes chimiques, plaident en faveur d'une inhibition de la peroxydation des lipides due à un piégeage de radicaux et non simplement à un blocage du métabolisme du CCl_4 .

4 - Le fait que l'Oltipraz soit un aussi bon inhibiteur que l'ADT de la peroxydation des lipides induite chimiquement ($\text{CI}_{50} \approx 10^{-6}\text{M}$), mais un moins bon inhibiteur de celle induite enzymatiquement, suggère qu'en présence de cyt.P-450, il est métabolisé plus vite que l'ADT en dérivés non inhibiteurs de la peroxydation des lipides. Le substituant pyrazinyl sur le carbone 5 du cycle dithia-1,2-cyclopentène-3-thione de l'Oltipraz semble jouer un rôle dans ce métabolisme (Paragraphe II-2-6-2). Il en découle que sur ce carbone, il vaut mieux avoir un phényl qu'une pyrazine. Par contre, que le phényl soit en posi-

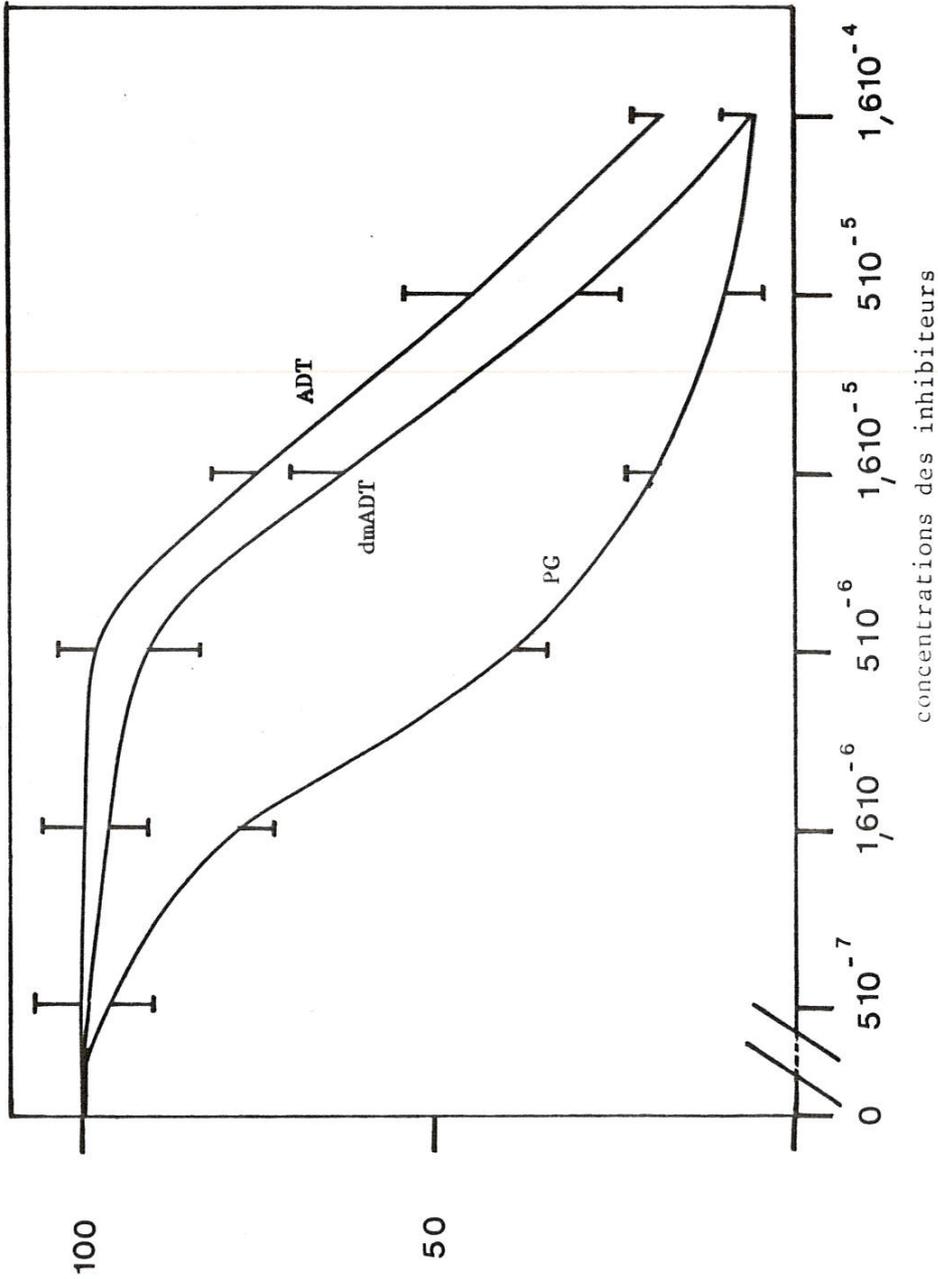


FIGURE 41 : Inhibition par l'ADT, le dmADT et le PG de la production d'éthane par des microsomes de foie de rat traités par le phénobarbital. 4mg de protéines sont incubés dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 mM pH 7,4 en présence de NADPH (4 mM), de CCl₄ (20mM) et de l'inhibiteur. L'éthane est mesuré après 30 min. d'incubation. Chaque détermination est le résultat - ESM de quatre expériences.

Quantité d'éthane formé (% de la quantité formée en absence d'inhibiteur)

tion 4 ou 5 du cycle dithiolthione, le pouvoir "antioxydant" rest le même (Ph-4 aussi bon inhibiteur que Ph-5 et ADT) (Tableau 12). La présence de substituants méthoxy ou hydroxy ou les deux sur le phényl n'affecte pas l'activité antioxydante de la molécule (TTE et dmADT sont aussi bons inhibiteurs que l'ADT).

III-4 Effets de l'ADT et de ses dérivés sur la peroxydation des lipides induite, in vivo, par le tétrachlorure de carbone chez le rat

III-4-1 Cinétique de production d'éthane par le rat intoxiqué par le CCl_4 comparativement à celle d'un rat témoin

le taux d'éthane expiré par un rat et accumulé dans un dessiccateur a été mesuré 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h après injection i.p. soit de CCl_4 (1 ml/kg) dissous dans l'huile de maïs (0,8 ml), soit uniquement de l'huile (contrôle) (Figure 42).

On remarque que les taux d'éthane mesurés à différents temps après injection au rat de CCl_4 sont environ 3 fois plus importants que les taux produits pendant les mêmes temps par des rats témoins n'ayant subi aucun traitement ou traités uniquement par l'huile.

Pendant les trois premières heures de l'expérience, le taux d'éthane produit par des rats témoins ou des rats traités au CCl_4 varie linéairement en fonction du temps. Au bout de 3 heures, le taux d'éthane produit par des rats traités par le CCl_4 est de $37,5 \pm 4,5$ nmol/kg alors que le taux produit par des rats témoins n'est que de $12,5 \pm 1,5$ nmol/kg.

Entre 3 et 5 heures après l'injection du CCl_4 , la quantité d'éthane expiré varie très peu. C'est pour cette raison que dans les expériences d'inhibition de la peroxydation des lipides, l'éthane mesuré est toujours celui accumulé dans le dessiccateur pendant 3 heures après intoxication du rat par le CCl_4 .

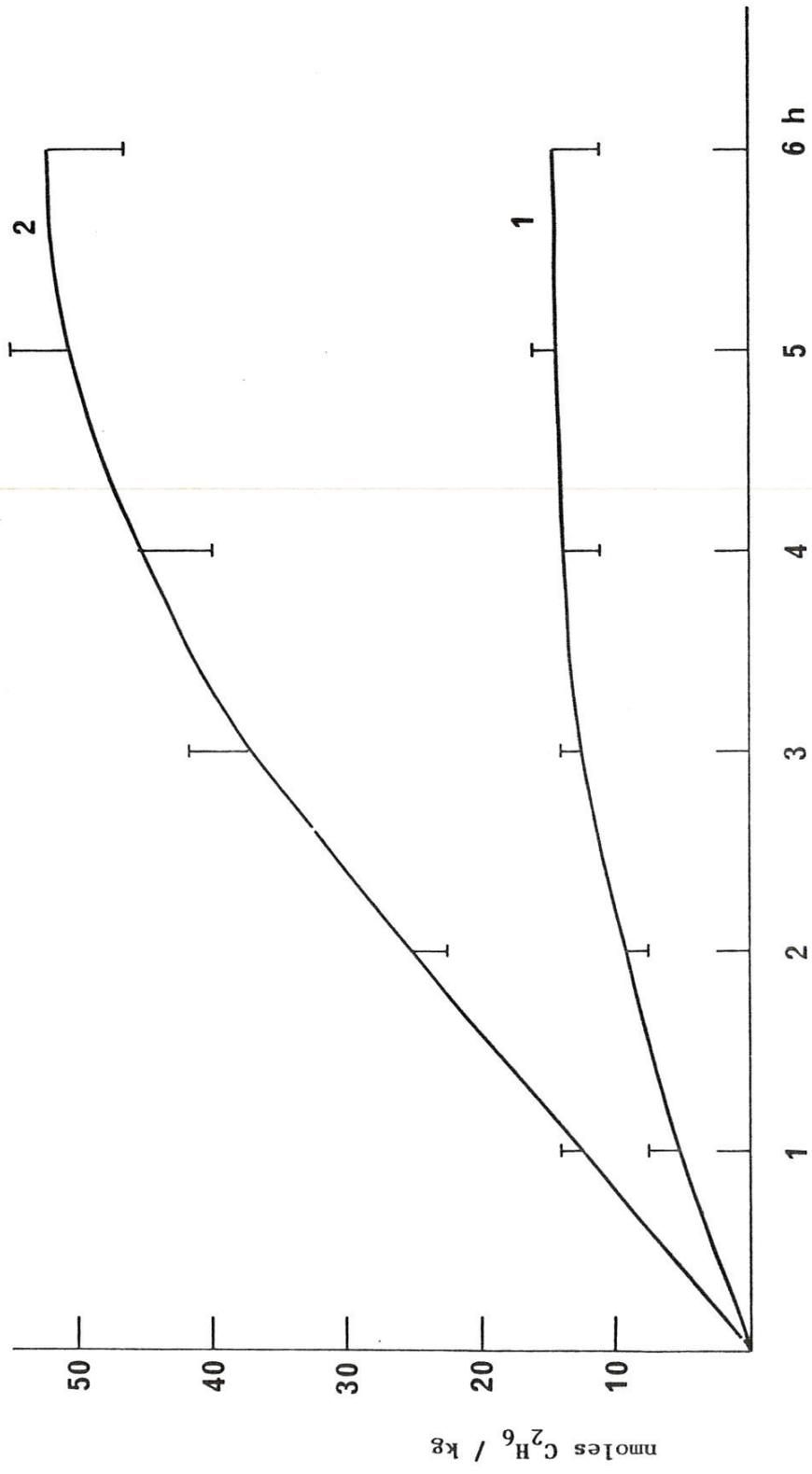


FIGURE 42 : Cinétiques de production d'éthane :

- 1 ► rats témoins traités i.p. par 1ml d'huile de maïs
- 2 ► rats traités i.p. par 1 ml / Kg de CCl₄ en solution dans l'huile

Les taux d'éthane indiqués sur la Figure sont les moyennes + ESM de sept expériences indépendantes (7 rats).

III-4-2 Effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite par le CCl₄ chez le rat

L'ADT inhibe la peroxydation des lipides induite chez le rat par le CCl₄. A en juger par la Figure 43, cette inhibition est exercée directement par l'ADT ou l'un de ses métabolites encore actifs, puisque si l'on traite l'animal par 100 mg/kg d'ADT i.p. chaque jour pendant une semaine, puis si on lui administre du CCl₄ 48 heures après la dernière injection d'ADT, aucune inhibition de la production d'éthane n'est observée. Or, 48 heures après son injection i.p. au rat, l'ADT est presque totalement éliminé dans les urines ou les fèces (voir métabolisme chez le rat, Chapitre II-2-5). Par contre, si on injecte au rat la même dose d'ADT (100 mg/kg i.p.), 6 à 3 heures avant le CCl₄, le taux d'éthane total produit par le rat 3 heures après injection de CCl₄ est équivalent au taux basal produit pendant le même temps par un rat témoin (Figure 43).

Injecté i.p. à la dose de 100 mg/kg chez le rat, l'ADT exerce donc une inhibition directe sur la peroxydation des lipides induite par le CCl₄. Cette inhibition dépend du délai entre les injections de l'ADT et du CCl₄ ; c'est pourquoi, dans le souci de reproductibilité des résultats, pour toutes les expériences suivantes, l'ADT a été injecté aux rats trois heures avant intoxication par le CCl₄.

III-4-3 Détermination de la relation entre la dose d'ADT et l'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides induite par le CCl₄ chez le rat

Comme le montre la Figure 44, l'ADT commence à exercer une inhibition sur l'expiration d'éthane à la dose de 5 mg/kg. Cette inhibition est totale à 25 mg/kg et la DI₅₀, dose d'ADT qui administrée à un rat trois heures avant le CCl₄, lui permet d'expirer un taux d'éthane 50 % moins important que celui expiré par un rat traité uniquement par le CCl₄ est de 10 mg/kg.

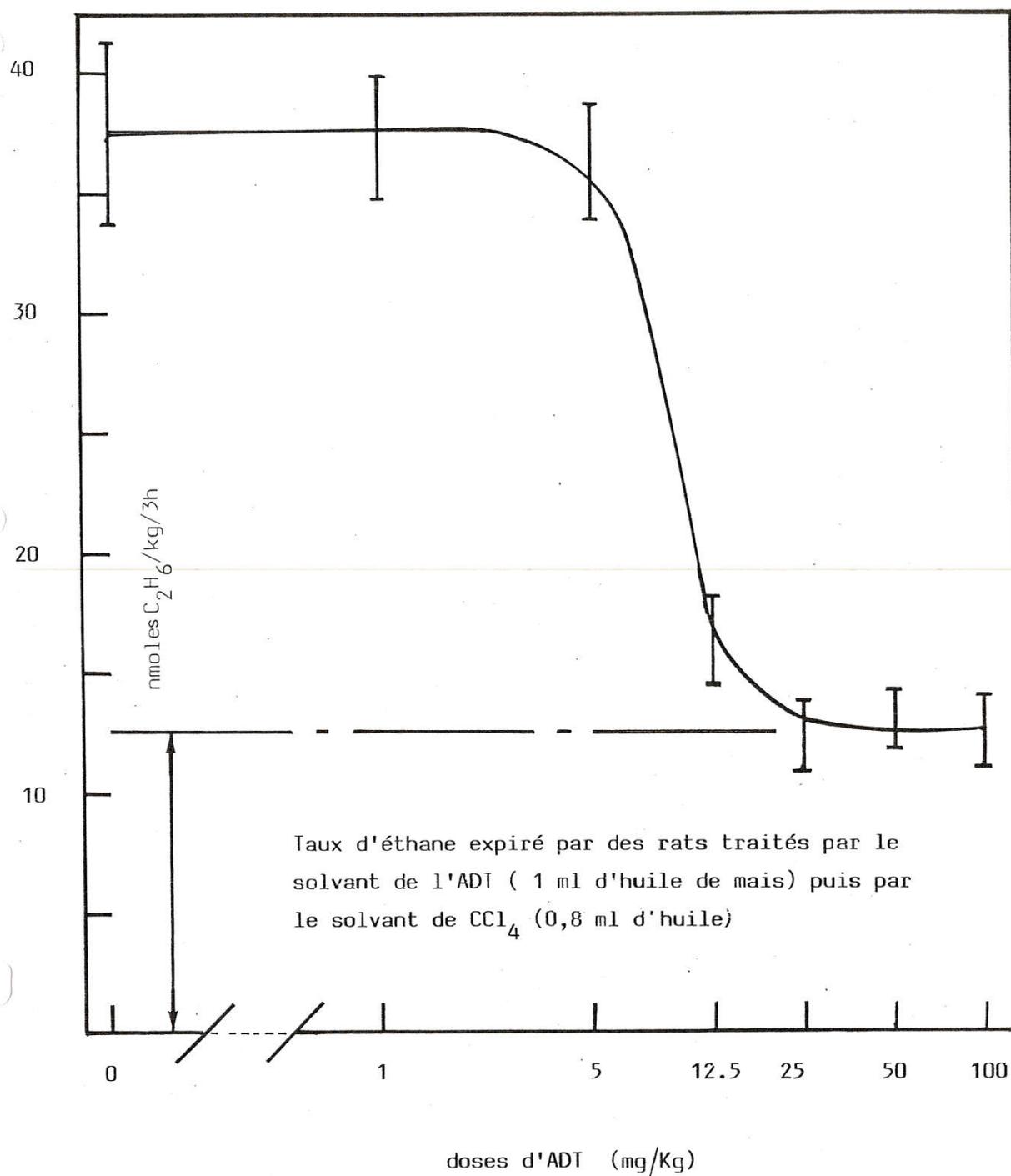


FIGURE 44 : Relation entre la dose d'ADT et l'inhibition de l'expiration d'éthane par des rats traités par du CCl_4 (1ml/kg) i.p., 3 heures après l'injection i.p. de différentes doses d'ADT : on mesure le taux d'éthane expiré par les rats pendant les 3 heures qui suivent l'injection de CCl_4 .

Résultats \pm ESM (3 rats)

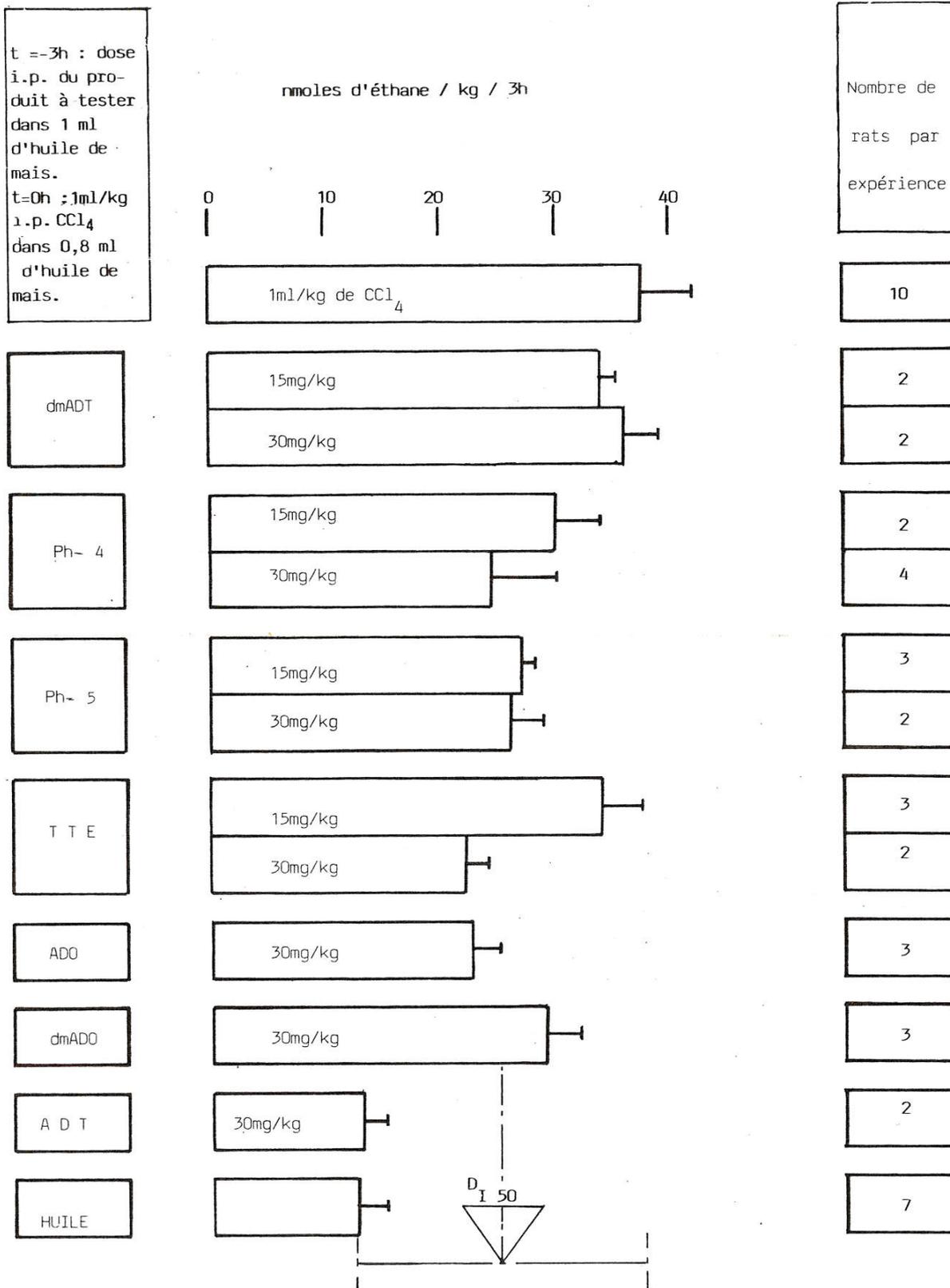


Figure 45 : Inhibition par l'ADT et par quelques uns de ses dérivés de la peroxydation des lipides induite chez le rat par du CCl₄ : nmoles d'éthane produit pendant 3 h après injection du CCl₄.

III-4-4 Comparaison des capacités de l'ADT d'inhiber la peroxydation des lipides induite chez le rat par le CCl₄ à celles de certains de ses dérivés

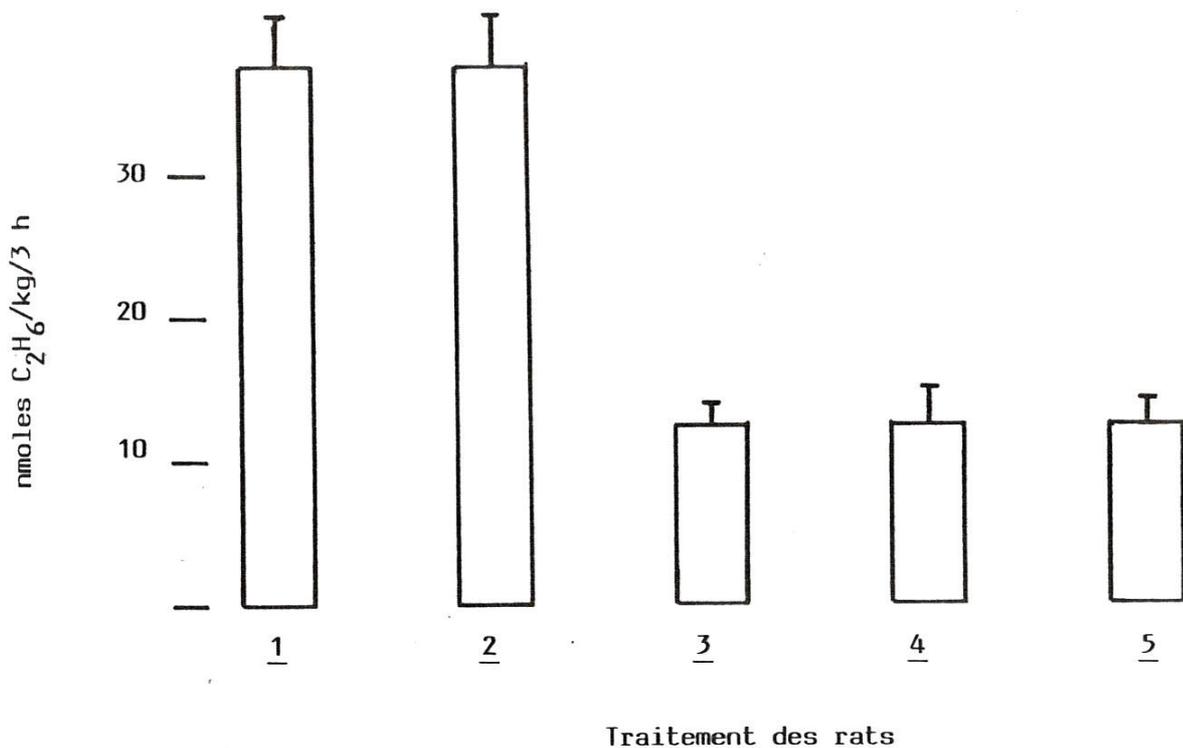
Chaque produit a été testé en administration i.p. à l'animal, dissous dans 1 ml d'huile de maïs et injecté trois heures avant le CCl₄ aux doses de 15 et 30 mg/kg. Ces doses ont été choisies car 30 mg/kg est la dose limite d'ADT qui inhibe complètement la production d'éthane par un rat traité par 1 ml/kg de CCl₄ alors qu'à des doses plus faibles, cette inhibition est importante mais partielle ; elle est de 90 % à 15 mg/kg d'ADT. L'avantage d'utiliser ces doses réside dans le fait qu'elles permettent de déterminer en deux expériences si les dérivés de l'ADT sont meilleurs ou moins bons inhibiteurs de la peroxydation des lipides que l'ADT, sans être obligé de déterminer pour chaque produit la relation dose-effet.

Parmi les produits testés figurent des dérivés du cycle dithia-1,2-cyclopentène-3-thione substitués en position 4 ou 5 par un phényl lui-même substitué ou non et des dérivés du cycle dithia-1,2-cyclopentène-3-one (ADO et dmADO) renfermant le motif structural $\text{C} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S} - \text{S}$ au lieu de $\text{C} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{S} \end{array} \text{S} - \text{S}$ (formules dans le Tableau 12) (Figure 45).

On remarque qu'aucun des produits testés n'est aussi bon inhibiteur que l'ADT.

Le dmADT et le dmADO n'ont aucun effet net et le Ph-4, le Ph-5, le TTE et l'ADO exercent aux doses de 15 et 30 mg/kg des effets intermédiaires peu clairs sur la peroxydation des lipides induite par le CCl₄ chez le rat.

III-5 Effets de l'ADT sur la mortalité et la peroxydation des lipides provoquées chez la souris par injection i.p. d'une dose toxique de paracétamol



- Traitement des rats
- 1- t = 0 h : 1 ml/kg CCl₄ (dans 0,8 ml d'huile de maïs) i.p.
 - 2- 100 mg/kg d'ADT (dans 1 ml d'huile de maïs) i.p. tous les jours pendant une semaine; arrêt du traitement à l'ADT et injection de 1 ml/kg i.p. de CCl₄ 48 h après.
 - 3- t = -6 h : 100 mg/kg ADT i.p.
t = 0 h : 1 ml/kg CCl₄ i.p.
 - 4- t = -3 h : 100 mg/kg d'ADT i.p.
t = 0 h : 1 ml/kg CCl₄
 - 5- rats témoins traités par 1 ml d'huile de maïs à t = -3 h et par 0,8 ml d'huile de maïs à t = 0 h.

Figure 43

Inhibition par l'ADT de la peroxydation des lipides induite in vivo chez le rat par le CCl₄ : importance du délai entre les administrations de l'ADT et du CCl₄. Les rats sont traités par l'ADT et le CCl₄ comme indiqué ci-dessus et le taux d'éthane qu'ils expirent est mesuré 3 h après l'injection du CCl₄.

Résultats \pm ESM (3 rats)

III-5-1 Cinétique de production d'éthane par la souris
intoxiquée par le paracétamol comparativement à celle
d'une souris témoin

L'induction de la peroxydation des lipides chez la souris est provoquée par injection intrapéritonéale de 500 mg/kg de paracétamol. Avant l'expérience, les souris subissent un jeûne de 72 heures qui les rendent plus sensibles à la toxicité du paracétamol (140). Le paracétamol est ensuite injecté aux souris dissous dans une solution de NaCl 0,9% contenant 5 % de dextran. Le taux d'éthane expiré par chaque souris ainsi traitée et accumulé dans un dessiccateur est mesuré à différents temps après l'injection du paracétamol.

La Figure 46 représente les cinétiques de production d'éthane par des souris témoins traitées uniquement par le solvant, par des souris intoxiquées par le paracétamol et par des souris traitées i.p. par 1 mg/kg d'ADT trois heures avant l'injection du paracétamol.

Les souris intoxiquées par le paracétamol commencent à expirer une quantité d'éthane mesurable une heure après injection du paracétamol, cette production apparaît linéaire entre 3 h et 5 h, et s'arrête au-delà de 6 h après le début de l'expérience.

La quantité d'éthane produit par des souris traitées 3 h avant l'injection de paracétamol, par 1 mg/kg d'ADT i.p. est supérieure à celle produite par des souris témoins, mais reste inférieure de 75 % à la quantité produite par des souris traitées uniquement par le paracétamol, montrant ainsi qu'à cette dose, l'ADT inhibe la peroxydation des lipides dépendante du paracétamol.

La quantité d'éthane produit par une souris témoin traitée uniquement par le solvant est très faible ; à 3 h et à 6 h, elle est respectivement 25 et 36 fois plus faible que celle produite par une souris traitée au paracétamol.

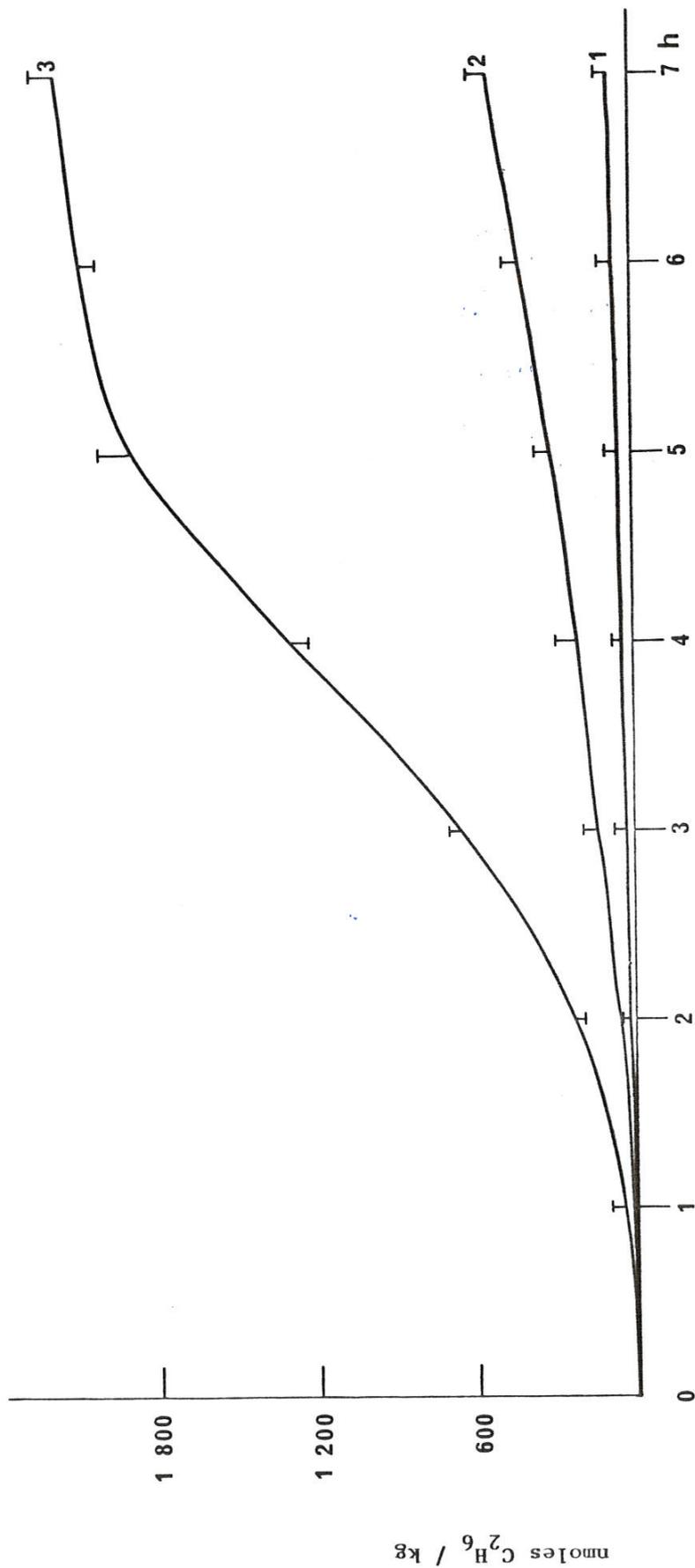


FIGURE 46 : Cinétique de production d'éthane :

- 1 ▲ souris témoins traitées i.p. par 0,5 ml de sérum physiologique contenant 5% de dextran
- 2 ▶ souris traitées i.p. par 1mg/kg d'ADT dans 0,2 ml d'huile de maïs) 3 h. avant le paracétamol (500 mg/kg)
- 3 ▸ souris traitées uniquement par 500mg/kg de paracétamol i.p. (dans 0,5 ml de serum physiologique contenant 5% de dextran)

† Résultats - ESM (8 souris)

Trois heures après l'injection du paracétamol, certaines souris commencent à mourir. De ce fait, dans les expériences d'inhibition de la peroxydation des lipides induite par le paracétamol chez la souris, la mesure de l'éthane a été faite entre 0 et 3 h après l'injection du paracétamol.

III-5-2 Effets de l'ADT, injecté i.p. à la souris 3 h avant le paracétamol, sur l'hépatotoxicité et la peroxydation des lipides

III-5-2-1 Etude de l'inhibition de l'expiration d'éthane en fonction de la dose d'ADT (Figure 47)

L'ADT inhibe complètement cette formation d'éthane aux doses supérieures ou égales à 5 mg/kg (20 μ mol/kg). Mieux encore, à une dose aussi faible que 0,7 mg/kg, l'expiration d'éthane est réduite de moitié par comparaison au taux d'éthane expiré par une souris traitée uniquement par le paracétamol. Cette inhibition passe de 20 à 75 % en augmentant la dose d'ADT de 0,5 mg/kg à 1 mg/kg.

III-5-2-2 Corrélation entre les doses d'ADT administrées aux souris, l'inhibition de la peroxydation des lipides et la protection vis-à-vis de la mortalité induite par le paracétamol (Tableau 13a)

L'effet protecteur de l'ADT contre la peroxydation des lipides induite chez les souris par le paracétamol, s'accompagne d'une diminution ou d'une protection complète contre l'hépatotoxicité à en juger par la diminution du taux de mortalité chez les souris prétraitées par l'ADT. En effet, la mortalité parmi les souris traitées uniquement par 500 mg/kg de paracétamol, commence à être importante 10 heures après l'injection du paracétamol ; elle est totale 24 heures après cette injection.

A l'opposé, nous avons constaté que les souris qui reçoivent, 3 h

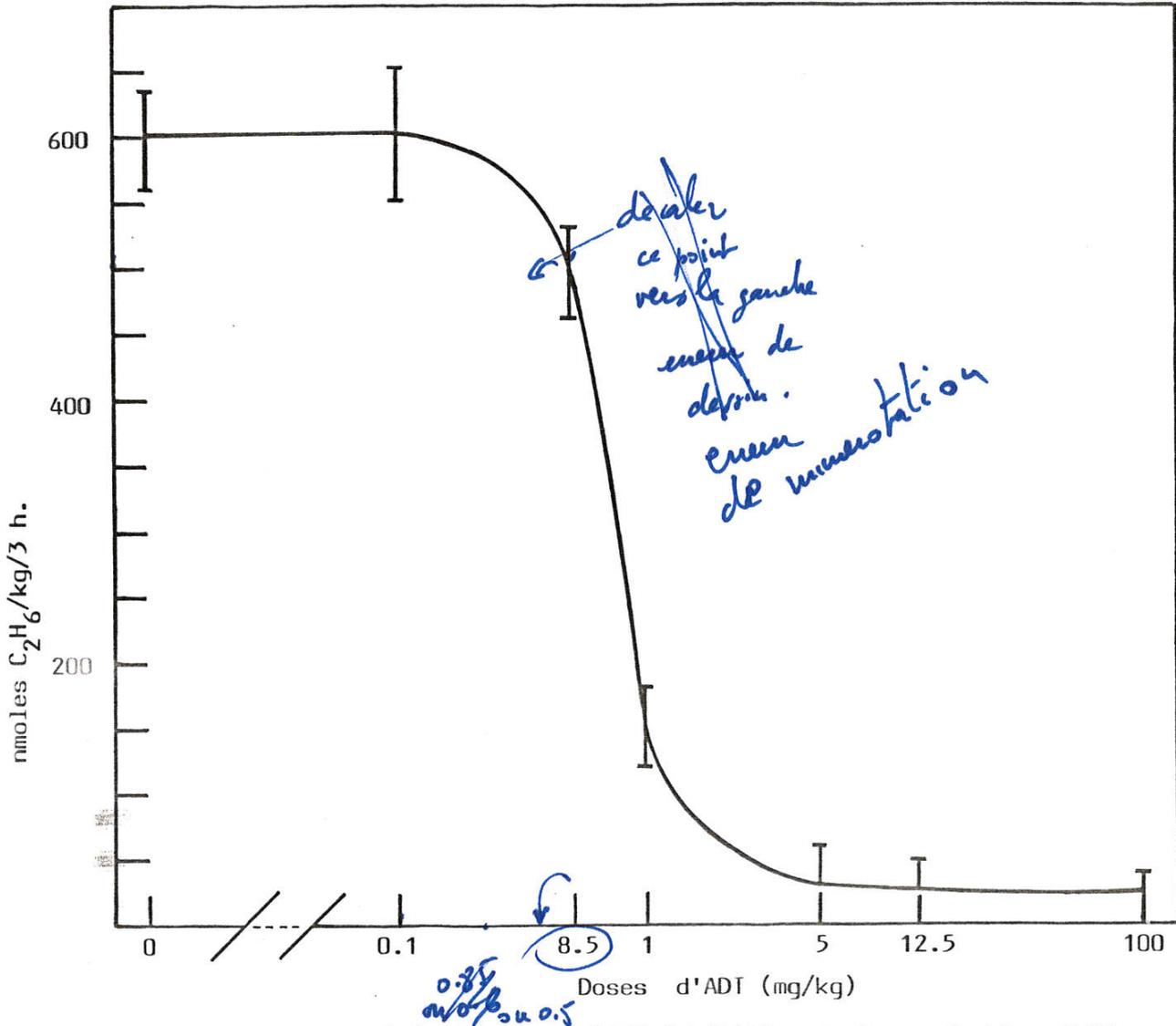


FIGURE 47 : Relation dose d'ADT-inhibition de la production d'éthane pour des souris traitées par 500 mg/kg de paracétamol i.p. 3 h. après injection i.p. de différentes doses d'ADT : On mesure le taux d'éthane exhalé par les souris pendant les 3 h qui suivent l'injection du paracetamol. Résultats \pm ESM (8 souris)

avant l'injection du paracétamol, des doses d'ADT supérieures ou égales à 5 mg/kg ($\approx 20 \mu\text{mol/kg}$) survivent généralement au-delà de 10 heures.

Toutes celles qui reçoivent des doses d'ADT supérieures ou égales à 50 mg/kg survivent au-delà d'une semaine et ne présentent plus de signes d'intoxication.

A 5 mg/kg, la plus faible dose d'ADT qui inhibe complètement la peroxydation des lipides induite chez la souris par le paracétamol, 70 % des souris sont protégées contre la mortalité, alors qu'à 1 mg d'ADT/kg, la protection contre la mortalité est nulle bien que l'inhibition de la peroxydation des lipides soit de 75 %. Donc, pour que l'ADT protège contre la mortalité des souris, il faut qu'il soit administré à des doses qui inhibent complètement la peroxydation des lipides.

t = 0 h : Injection i.p. de l'ADT dissous dans 0,2 ml d'huile de maïs
 t = 3 h : Injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol dissous dans 0,5 ml de sérum physiologique contenant 5 % de dextran

Dose d'ADT injectée (mg/kg)	0 (200 μl huile)	0,1	0,5	1	5	≥ 50
Taux d'éthane expiré pendant 3 heures	100 %	100%	80%	25%	4 % = taux basal	
% de survie	0 % (0/12)*	0 % (0/12)*		70%(7/10)*		100%(16/16)*

Tableau 13a Corrélation entre les doses d'ADT administrées aux souris, l'inhibition de la peroxydation des lipides et la protection vis-à-vis de la mortalité induite par le paracétamol

* nombre de souris par expérience.

t = 0 h, injection i.p. à des souris de 20 µmol/kg des produits ci-dessous									
	Témoin (1) *	Témoin (2) *	ADT	NAC	Vit E	PG	PZ	DDC	Lévamisole
	t = 3 h, injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol								
Taux d'éthane produit en 3 h (% de 2)	4 %	100 %	4 % (4) **	9 %	55 %	61 %	35 %	54 %	65 %
Nombre de souris utilisées	10	12	10 (8) **	4	4	5	4	6	5
% de survie pendant 24 h	100 %	0 %	70 % (100) ***	50 %	25 %	0 %	25 %	0 %	0 %

Tableau 13b Protection, par l'ADT et par certains antioxydants connus vis-à-vis de la peroxydation des lipides in vivo et de la mortalité provoquées par le paracétamol

témoin (1) * : souris traitées seulement par l'huile de maïs (0,2 ml)

témoin (2) * : souris traitées i.p. par 500 mg/kg de paracétamol dans 0,5 ml de serum physiologique content 5 % de dextrans

*** : souris traitées par 200 µmol d'ADT au lieu de 20.

Retour de 180

III-5-3 Comparaison des effets hépatoprotecteurs et inhibiteurs de la peroxydation des lipides de l'ADT à ceux d'hépatoprotecteurs connus

Les hépatoprotecteurs testés sont la N-acétylcystéine, le propylgallate, la prométhazine, le diéthylthiocarbamate, la vitamine E et le lévamisole. Ces produits sont tous injectés aux souris trois heures avant le paracétamol à la dose unique de 20 $\mu\text{mol/kg}$. Cette dose a été choisie car elle correspond à la plus faible dose d'ADT (5 mg/kg) qui inhibe complètement la peroxydation des lipides induite par le paracétamol chez la souris (Tableau 13b).

Parmi tous ces produits, aucun n'est aussi efficace que l'ADT tant au niveau de l'inhibition de la peroxydation des lipides qu'au niveau de la protection contre la mortalité.

Alors que l'ADT, à la dose de 20 $\mu\text{mol/kg}$ inhibe complètement la peroxydation des lipides induite chez la souris par le paracétamol, à la même dose, le lévamisole, le DDC, la PZ, le PG et la vit E ne l'inhibent respectivement que de 35, 46, 65, 39 et 45 %.

Il n'y a que la N-acétylcystéine qui possède un pouvoir inhibiteur de cette peroxydation lipidique comparable à l'ADT.

En ce qui concerne la protection contre la mortalité, la N-acétylcystéine protège 50 % des souris utilisées contre 70 % pour l'ADT.

La prométhazine et la vitamine E sont moins bons protecteurs que la N-acétylcystéine puisque ces deux produits ne protègent que 25 % des souris utilisées.

Le PG, le DDC et le lévamisole ne sont pas du tout protecteurs contre la mortalité des souris et n'inhibent que légèrement la peroxydation des lipides chez ces mêmes souris.

III-5-4 Comparaison des effets hépatoprotecteurs et inhibiteurs de la peroxydation des lipides, de l'ADT à ceux de ses dérivés et de l'oltipraz (OZ)

Les dérivés de l'ADT ont été testés à l'unique dose de 20 $\mu\text{mol/kg}$ injectée i.p. à la souris trois heures avant intoxication par le paracétamol, seul l'oltipraz a été testé à différentes doses dans le but de déterminer la relation entre les doses administrées et l'inhibition de la peroxydation des lipides. On remarque que la dose d'oltipraz nécessaire pour inhiber de 50 % la peroxydation des lipides dépendante du paracétamol chez la souris (DI_{50}) est de 10 $\mu\text{mol/kg}$ soit trois fois la DI_{50} de l'ADT (Figure 48).

Le Tableau 14 montre qu'il y a une bonne corrélation entre l'inhibition de la peroxydation des lipides et la protection contre la mortalité.

Du point de vue protection contre la mortalité, le phényl-5-dithia-1,2-cyclopentène-3-thione (Ph-5, ADT sans substituant méthoxy sur le groupe phényl) est plus efficace que l'ADT à la dose de 20 $\mu\text{mol/kg}$ avec une protection de 100 % contre 70 % seulement pour l'ADT. A la même dose, le TTE (ADT hydroxylé en ortho du méthoxy phénolique), le dmADT et l'ADO sont dans cet ordre moins efficaces que l'ADT et le Ph-5 avec des pourcentages respectifs de protection contre la mortalité de 60 %, 50 % et 40 %. Enfin, l'oltipraz, le Ph-4 et le dmADO ne protègent pas du tout les souris vis-à-vis de la mortalité.

Classement en fonction de la protection vis-à-vis de la mortalité

Ph-5 > ADT > TTE > dmADT > ADO > Ph-4, OZ, dmADO

Remarquons que l'inhibition par ces produits de l'expiration d'éthane donne globalement ce même classement (Tableau 14). En effet, le Ph-5, l'ADT et le TTE injectés i.p. à des souris à la dose de 20 $\mu\text{mol/kg}$ inhibent complètement la production d'éthane induite par le paracétamol.

t = 0 h, injection i.p. à des souris de 20 µmol/kg des produits ci-dessous (dans 0,2 ml d'huile de maïs)											
	Témoin *	Témoin *	ADT	dmADT	ADO	dmADO	Ph-5	Ph-4	TTE	Oltipraz	ADT
	(1)	(2)									200 µmol/kg
	t = 3 h injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol (dans 0,5 ml de sérum physiologique, dextran 5 %)										
Taux d'éthane produit en 3 h (% de 2)	4 %	100 %	4 %	49 %	10 %	100 %	4 %	100 %	4 %	10 %	4 %
Nombre de souris utilisées	10	12	10	6	5	5	6	6	5	12	8
Pourcentage de survie pendant 24 h	100 %	0 %	70 %	50 %	40 %	0 %	100 %	0 %	60 %	0 %	100 %

Tableau 14

Protection par l'ADT et par certains de ses dérivés vis-à-vis de la peroxydation des lipides et de la mortalité provoquées par le paracétamol chez la souris. Le nombre de souris utilisées et le déroulement des manipulations sont indiqués sur le tableau.

témoin (1)* : souris traitées i.p. par 0,2 ml d'huile de maïs

témoin (2)* : souris traitées i.p. par 500 mg/kg de paracétamol dans 0,5 ml de serum physiologique

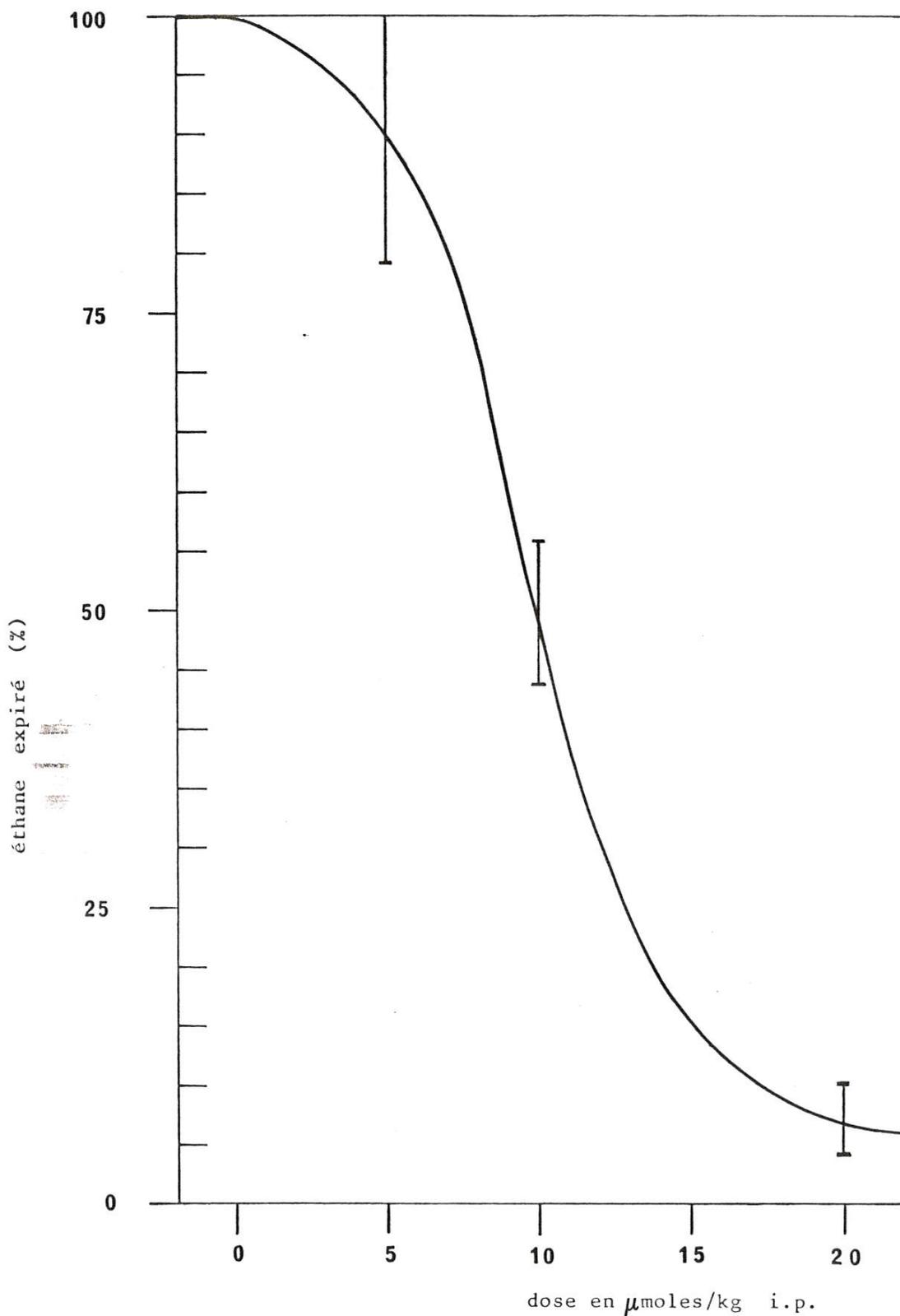


FIGURE 48 : Protection par l'oltipraz contre la peroxydation des lipides induite chez la souris par injection de 500 mg/kg de paracétamol i.p.. L'oltipraz est injecté i.p. (dissout dans 0,2ml d'huile de maïs) 3 heures avant l'injection du paracétamol et l'éthane est mesuré 3 heures après l'injection du paracétamol. Résultat \pm ESM (4 souris).

A cette même dose, l'ADO, l'Oltipraz et le dmADT sont moins bons inhibiteurs alors que Ph-4 et dmADO qui ne protègent pas contre la mortalité, sont de même totalement inefficaces dans ce test.

Classement en fonction de l'inhibition de la production d'éthane

Ph-5, ADT, TTE > ADO, OZ, dmADT > Ph-4, dmADO

III-5-5 Effets de l'ADT administré per os à des souris trois heures avant le paracétamol sur l'hépatotoxicité et la peroxydation des lipides

La forme galénique de l'ADT se prend oralement ; il était donc intéressant de voir si cette voie d'administration permettait d'obtenir une inhibition de la peroxydation des lipides. Pour cela, différentes doses d'ADT dissoutes dans 0,2 ml d'huile de maïs ont été administrées par gavage à des souris. Trois heures après, 500 mg/kg de paracétamol leur sont injectés i.p. puis le taux d'éthane accumulé trois heures dans le dessiccateur est mesuré (Tableau 15).

Nous remarquons que l'ADT administré par voie orale est aussi efficace contre la peroxydation des lipides induite par le paracétamol chez la souris que lorsqu'il est injecté i.p. Une protection totale contre la peroxydation des lipides et la mortalité est obtenue aux doses supérieures ou égales à 25 mg/kg, alors que les doses de 10 et 5 mg/kg qui inhibent de 80 et 85 % la peroxydation des lipides due au paracétamol ne protègent pas du tout les souris contre la mortalité. Ce sont des résultats qui concordent avec ceux obtenus après injection i.p. de l'ADT trois heures avant le paracétamol, dans les deux cas, l'ADT ne protège contre la mortalité que s'il inhibe complètement la peroxydation des lipides.

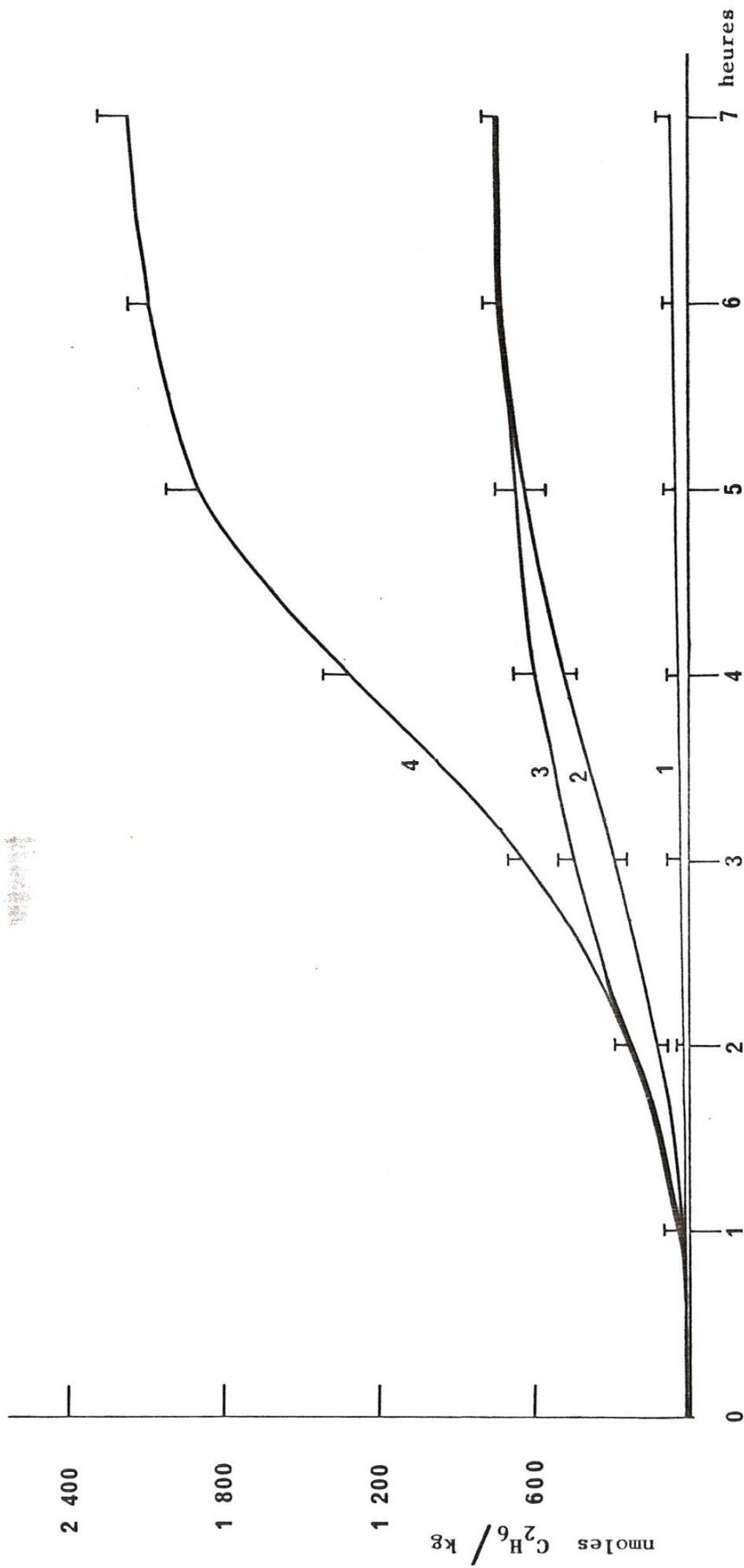


FIGURE 49 : Cinétiques de production d'éthane par des souris traitées i.p. par de l'ADT en même temps que par du paracétamol : 500 mg / kg

- 1 ▲ 200 μmoles/kg de DDC ou d'ADT (cinétique des souris témoins)
- 2 ▲ 40 μmoles/kg d'ADT
- 3 ▲ 20 μmoles/kg d'ADT
- 4 ▲ 200 μmoles/kg de N-acétyl cystéine (≈ cinétique de souris intoxiquées uniquement par le paracétamol)

t ₀ h : dose d'ADT orale	0	100 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg
t ₃ h :	500 mg/kg de paracétamol i.p.					
Taux d'éthane accumulé en trois heures	100 %	4 % (taux basal)	4 %	4 %	20 %	25 %
Nombre de souris qui survivent 24 heures	0 %	2/2	2/2	2/2	0/4	0/4

Tableau 15 Protection par l'ADT administré per os à des souris, contre la mortalité et la peroxydation des lipides dues à une administration i.p. de paracétamol trois heures avant l'ADT

III-5-6 Effets de l'ADT vis-à-vis de la mortalité et de la peroxydation des lipides induites par le paracétamol chez la souris en fonction du temps d'administration de l'ADT par rapport au paracétamol

III-5-6-1 Effets de la coadministration des deux produits

Différentes doses d'ADT (20, 40 et 200 $\mu\text{mol/kg}$) sont injectées i.p. à des souris en même temps que 500 mg/kg de paracétamol. Les souris sont ensuite placées dans différents dessiccateurs et on suit le taux d'éthane accumulé en fonction du temps (Figure 49). Comme le montre cette figure, l'expiration d'éthane entre 0 et 7 h est complètement bloquée par une dose d'ADT de 200 $\mu\text{mol/kg}$ et la protection contre la mortalité est de 75 % (Tableau 16). A des doses d'ADT plus faibles, 20 ou 40 $\mu\text{mol/kg}$, l'expiration d'éthane est partiellement freinée entre 0 et 4 h, puis le taux reste stable dans le dessiccateur à partir de la 5ème heure.

~~50 mg/kg~~ → ~~100 mg/kg~~

La mortalité varie d'une façon parallèle à la peroxydation des lipides puisque le pourcentage de protection est de 25 % pour 20 $\mu\text{mol/kg}$ d'ADT (4,8 mg/kg) et de 50 % pour la dose de 40 $\mu\text{mol/kg}$ (9,6 mg/kg).

La N-acétylcystéine testée dans les mêmes conditions à la dose de 200 $\mu\text{mol/kg}$ ne donne aucune protection contre la mortalité et la peroxydation des lipides. A cette même dose, le diéthylthiocarbamate inhibe complètement la peroxydation des lipides, mais ne protège pas les animaux contre la mortalité (Figure 49 et Tableau 16).

Dans ces expériences de coadministration des composés et du paracétamol, on constate comme précédemment l'effet supérieur de l'ADT à la fois vis-à-vis de la peroxydation des lipides et de la protection contre la mortalité.

t : 0 h, injection i.p. à la souris de 500 mg/kg de paracétamol et des différents inhibiteurs de la peroxydation des lipides

Inhibiteurs	NAC	DDC	ADT		
Doses	0,2 mmol/kg	0,2 mmol/kg	20 $\mu\text{mol/kg}$	40 $\mu\text{mol/kg}$	0,2 mmol/kg
Nombre de souris	4	4	4	4	4
Survie (%)	0 %	0 %	25 %	50 %	75 %

Tableau 16 Comparaison des effets protecteurs de l'ADT, de la NAC et du DDC vis-à-vis de la mortalité des souris provoquée par le paracétamol. Les temps et la voie d'administration des produits sont mentionnés dans le tableau et les pourcentages de survie sont observés 24 heures après l'injection du paracétamol

t : 0 h, injection à la souris de 500 mg/kg de paracétamol i.p.						
	t : 3 h, injection i.p. d'ADT		t : 2 h, injection i.p. d'ADT		t : 1 h, injection i.p. d'ADT	
	Dose d'ADT injecté	0 mg	100 mg/kg	200 mg/kg	0 mg	200 mg/kg
Taux d'éthane produit en 2 h (%)	100 %	75 %	58 %	100 %	15 %	5 %
Nombre de souris utilisées	4			4		4
Pourcentage de survie pendant 24 h	0 %			0 %		0 %

Tableau 17

Protection par l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides et de l'hépatotoxicité induites in vivo chez la souris par injection de paracétamol i.p. 3,2 et 1 h avant l'ADT. Les souris sont placées dans des dessiccateurs juste après injection de l'ADT et l'éthane mesuré est celui accumulé pendant deux heures.

III-5-6-2 Effets d'une administration de l'ADT postérieure à celle du paracétamol

Dans ce cas, l'ADT est administré i.p. différents temps après intoxication des souris par le paracétamol. Juste après l'injection de l'ADT en solution dans 0,2 ml d'huile (ou uniquement de l'huile aux témoins), les souris sont placées dans des dessiccateurs et le taux d'éthane expiré et accumulé pendant deux heures est mesuré.

Les effets de l'ADT injecté aux souris 3 h, 2 h et 1 h après le paracétamol sont indiqués sur le Tableau 17.

- 1 - A t = 3 h, l'inhibition de la peroxydation des lipides est faible, même à 100 et 200 mg/kg d'ADT (respectivement 25 et 42 %)
- 2 - A t = 2 h, et à 200 mg/kg, seule dose d'ADT testée, l'inhibition est nette, mais non totale (85 %)
- 3 - A t = 1 h, et à 200 mg/kg d'ADT, l'inhibition de la peroxydation des lipides est totale puisque le taux d'éthane expiré par les souris est identique à celui expiré par des souris témoins.
- 4 - Dans les trois cas, aucune souris ne survit au-delà de 24 heures.

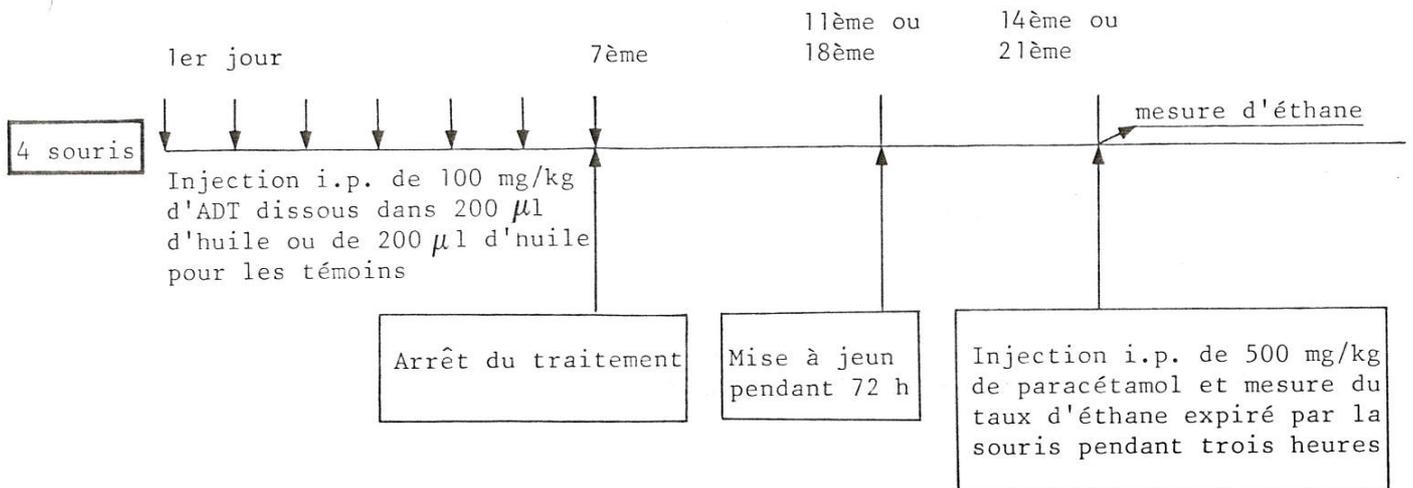
III-5-6-3 Effets d'une administration prolongée de l'ADT mais longtemps avant le paracétamol

Il est connu que certains immunostimulants tels que le BCG ou le lévamisole inhibent la peroxydation des lipides induite in vivo chez le rat traité par le CCl_4 (164) .

Cette inhibition se manifeste chez l'animal même quand le produit

est complètement éliminé de l'organisme. Pour tester l'effet de ce genre de produit vis-à-vis de la peroxydation des lipides, on traite en général les animaux pendant plusieurs jours par l'immunostimulant puis on injecte le toxique 24, 48 h ou une semaine après l'arrêt du traitement.

L'effet d'un traitement journalier par 100 mg/kg d'ADT i.p. pendant une semaine a été testé sur la peroxydation des lipides induite par injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol à des souris une ou deux semaines après l'arrêt du traitement par l'ADT. Les différentes manipulations sont effectuées comme suit :



Dans les deux cas (arrêt du traitement par l'ADT deux ou une semaine avant injection de paracétamol) l'effet sur la peroxydation des lipides est nul et la mortalité est totale dans les 24 heures qui suivent l'injection de paracétamol. L'ADT n'a donc pas d'effet analogue aux immunostimulants vis-à-vis de la peroxydation des lipides. L'inhibition qu'il exerce sur cette peroxydation est directe, et elle est liée à sa présence dans les tissus au moment du déclenchement de l'agression "oxydante".

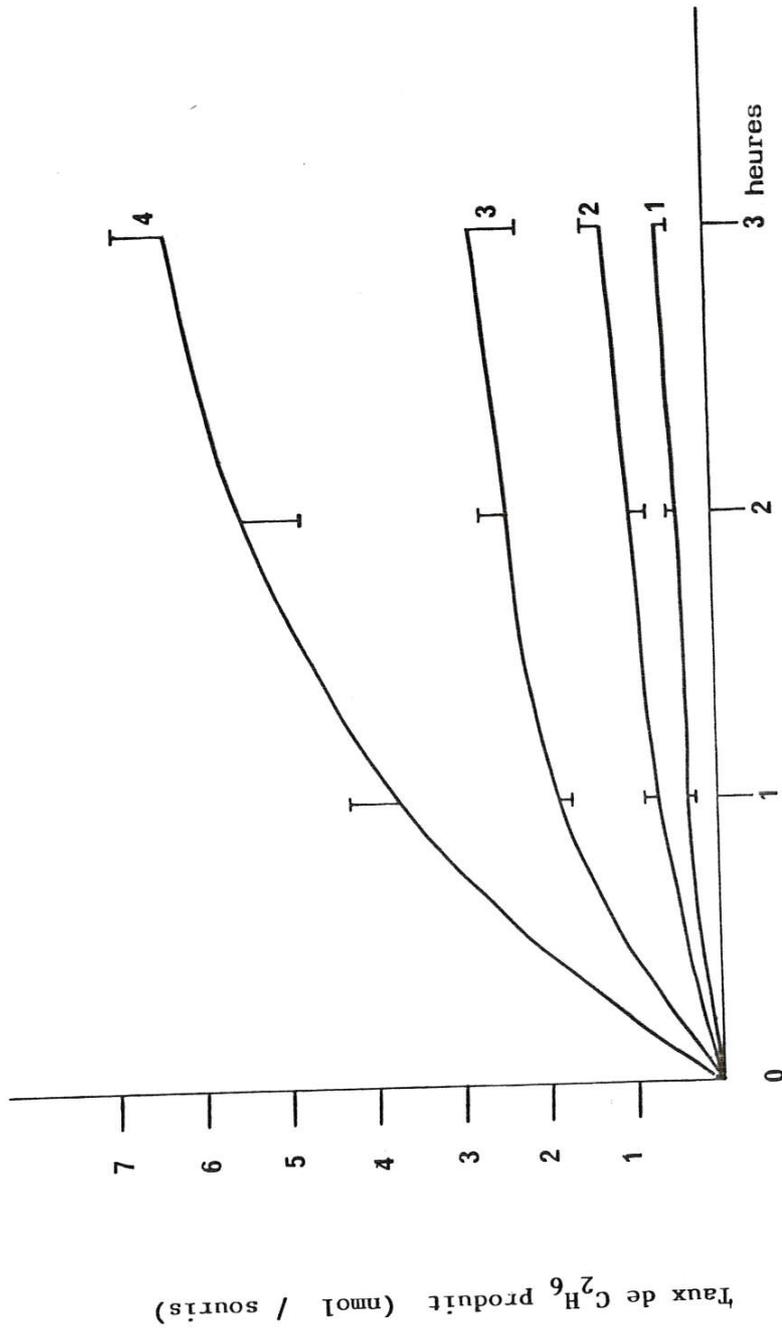


FIGURE 50 : Cinétique des productions d'éthane :

- 1 ► souris témoins
 - 2 ► souris traitées i.p. par 200 mg/kg de paraquat
 - 3 ► souris traitées i.p. par 200 mg/kg de FeSO₄
 - 4 ► souris traitées i.p. en même temps par 200 mg/Kg FeSO₄ et 200 mg/kg de paraquat.
- Le paraquat et le FeSO₄ sont injectés dans 0,2 ml de serum physiologique.

III-6 Effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite chez la souris par la paraquat

III-6-1 Cinétique de production d'éthane par des souris intoxiquées ou non par le paraquat

La Figure 50 montre les cinétiques de production d'éthane par des souris témoins comparativement à celles de souris traitées par le paraquat uniquement, le FeSO_4 uniquement ou les deux en même temps.

1 - Une souris traitée i.p. par 200 mg/kg de paraquat expire, quel que soit le temps de mesure entre 0 et 3 h, deux fois plus d'éthane qu'une souris témoin.

2 - Le traitement d'une souris par 200 mg/kg de FeSO_4 i.p. augmente beaucoup plus que le paraquat le taux d'éthane expiré.

3 - Enfin, le traitement i.p. d'une souris en même temps par 200 mg/kg de paraquat et 200 mg/kg de FeSO_4 augmente encore plus le taux d'éthane expiré qu'un traitement par FeSO_4 ou le paraquat seuls.

III-6-2 Inhibition par l'ADT de la peroxydation des lipides induite chez la souris par injection de paraquat seul et de paraquat + FeSO_4

Pour ces expériences, le taux d'éthane a été mesuré une heure après l'intoxication de la souris par la paraquat ou par FeSO_4 et le paraquat. Ce temps de mesure a été choisi car au-delà d'une heure, les souris, surtout celles intoxiquées par le paraquat et FeSO_4 , commencent à mourir pendant l'expérience.

Le tableau 18 montre l'effet de l'injection i.p. de 5 mg/kg d'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides induite par l'injection i.p. à des souris de 200 mg/kg de paraquat 3 heures après l'ADT. Une souris traitée unique-

ment par le paraquat, expire pendant une heure, $0,66 \pm 0,15$ nmol d'éthane, soit deux fois le taux expiré par une souris témoin pendant le même temps, alors qu'une souris traitée par 5 mg/kg d'ADT et ensuite par le paraquat expire $0,26 \pm 0,1$ nmol d'éthane, taux équivalent aux erreurs près au taux produit par une souris témoin ($0,3 \pm 0,08$ nmol). Malgré cette inhibition de la peroxydation des lipides induite par le paraquat, l'ADT ne protège pas les souris contre la mortalité puisque toutes les souris traitées ou non par l'ADT avant l'injection de paraquat meurent dans les cinq heures suivantes.

	Traitement des souris*		
	—	t_0 h : 200 mg/kg de paraquat i.p.	t_{-3} h : ADT i.p. 5 mg/kg t_0 h : paraquat 200 mg/kg i.p.
Taux d'éthane exhalé par souris pendant une heure après in- jection du paraquat (nmol/souris)	$0,3 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,15$	$0,26 \pm 0,1$

Tableau 18 Effet de l'injection i.p. de 5 mg/kg d'ADT sur la production d'éthane par des souris intoxiquées par le paraquat

* 4 souris par expérience

Le Tableau 19 montre les effets de l'injection i.p. de 5 ou 50 mg/kg d'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides et de la mortalité provoquées par l'injection i.p. en même temps à des souris de 200 mg/kg de FeSO_4 et 200 mg/kg de paraquat. Une souris traitée par le paraquat et FeSO_4

NATURE DU TRAITEMENT	
t = 0 h	200 mg/kg Fe ^{II} (I.p.) 200 mg/kg Fe ^{II} + 200 mg/kg paraquat* (i.p.)
t = - 3 h	- 50 mg/kg ADT (i.p.) 5 mg/kg ADT (i.p.)
t = 0 h, mesure de C ₂ H ₆ exhalé en 1 h nmol/souris	0.3 ± 0.08 1.65 ± 0.25 3.50 ± 0.5 1.49 ± 0.40 2.62 ± 0.35
Nombre de souris qui survivent au-delà de 6 h	0/4

Tableau 19

Effets de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides et de la mortalité provoquées chez la souris par une association de FeSO₄ et de paraquat : Le temps d'injection i.p. des produits à la souris et les doses administrées sont mentionnées sur le tableau. On mesure le taux d'éthane expiré pendant 1 h après injection soit du Fe^{II} tout seul soit du Fe^{II} + paraquat

Résultats - ESM (4 souris)

* Le FeSO₄ et le paraquat sont injectés dans 0,2 ml de sérum physiologique

expire pendant une heure $3,50 \pm 0,5$ nmol d'éthane soit deux fois plus que le taux expiré par une souris traitée uniquement par FeSO_4 ($1,65 \pm 0,25$ nmol) et 11 fois plus que le taux expiré par une souris témoin ($0,3 \pm 0,08$ nmol). Pendant le même temps, une souris traitée trois heures avant l'injection de paraquat et de FeSO_4 par 5 mg/kg d'ADT i.p. n'expire que $2,62 \pm 0,35$ nmol d'éthane, ce qui correspond à une inhibition de l'ordre de 20 % de la peroxydation des lipides induite par le mélange de FeSO_4 et de paraquat. Les souris traitées par 50 mg/kg d'ADT n'expirent que $1,49 \pm 0,40$ nmol d'éthane soit un taux équivalent à 42 % de celui expiré par des souris traitées par FeSO_4 et le paraquat.

En ce qui concerne la protection vis-à-vis de la mortalité provoquée par FeSO_4 et le paraquat, elle est nulle pour les deux doses d'ADT testées.

III-6-5 Discussion par rapport aux résultats obtenus avec le paracétamol

Alors que l'ADT injecté i.p. à des souris trois heures avant leur intoxication par 500 mg/kg de paracétamol les protège totalement à la dose de 50 mg/kg vis-à-vis de la mortalité et de la peroxydation des lipides, à cette même dose et en travaillant dans les mêmes conditions expérimentales que pour le paracétamol, l'ADT n'inhibe que partiellement la peroxydation des lipides induite chez des souris par un mélange de paraquat et de FeSO_4 mais ne les protège pas du tout contre la mortalité.

Sachant que le paraquat est un toxique pulmonaire et que le paracétamol est un hépatotoxique, la conclusion qui s'impose est que l'ADT protège mieux le foie que les poumons contre la toxicité de ces deux produits, ayant un site d'action toxique différent mais présumés exercer tous les deux leur toxicité par un déclenchement de peroxydation des lipides.

La meilleure protection vis-à-vis de la toxicité du paracétamol que vis-à-vis de celle du paraquat pourrait être due à ce que l'ADT lui-même s'accumule plutôt au niveau hépatique, et a une faible concentration tissulaire au niveau pulmonaire.

III-7 Effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides induite chez la souris par la bléomycine

Les résultats dont on dispose pour le moment, concernant la capacité de la bléomycine de déclencher, in vivo, chez l'animal de laboratoire une peroxydation des lipides et l'inhibition de celle-ci par l'ADT, sont préliminaires. Néanmoins, les expériences déjà réalisées montrent que la bléomycine, injectée i.p. à la dose de 100 mg/kg n'induit pas une augmentation de l'expiration d'éthane chez la souris. Par contre, la coinjection i.p. de 200 mg de FeSO_4 /kg et de 100 mg/kg de bléomycine augmente considérablement le taux d'éthane expiré par les souris (15 ± 1 nmol/souris/2 h contre un témoin de $0,55 \pm 0,1$ nmol).

L'ADT injecté i.p. aux souris trois heures avant la bléomycine et FeSO_4 inhibe partiellement à la dose de 20 mg/kg la peroxydation des lipides (pourcentage d'inhibition 50 %) mais ne protège pas les souris contre la mortalité.

IV - CONCLUSION GENERALE

L'ADT s'est révélé un bon inhibiteur de la peroxydation des lipides induite in vitro dans des microsomes hépatiques de rats et in vivo chez le rat ou la souris. Ces effets sont d'autant plus intéressants que l'ADT a été utilisé pendant près de 40 ans en Médecine Humaine sans engendrer le moindre cas de toxicité.

In vitro, l'ADT inhibe la peroxydation des lipides aussi efficacement que des molécules telles que le propylgallate et le diéthylthiocarbamate, deux des meilleurs antioxydants connus à ce jour. Nous avons démontré qu'il est meilleur "antioxydant" que la N-acétylcystéine et la vitamine E.

In vivo, il s'est avéré qu'il inhibe non seulement la peroxydation des lipides induite par le paracétamol chez la souris, mais qu'il protège aussi contre l'hépatotoxicité de ce produit. Cette hépatoprotection se traduit par une survie des souris traitées par des doses aussi fortes que 500 mg/kg de paracétamol.

La protection par l'ADT contre l'hépatotoxicité du paracétamol a été déjà constatée (O. Foussard-Blanpin et M.O. Christen, résultats non publiés (LTM) et Bueding et Coll. référence 3). En effet, ces auteurs ont montré que l'injection i.p. de deux doses d'ADT de 500 mg/kg à des souris 48 et 24 heures avant de leur injecter 500 mg/kg de paracétamol les protège contre la mortalité, mais nous constatons que les doses d'ADT utilisées sont très supérieures à la posologie indiquée pour l'homme.

L'originalité de nos résultats est d'avoir montré qu'à des doses utilisables en thérapeutique humaine, l'ADT protège contre l'hépatotoxicité et la peroxydation des lipides. En effet à des doses de l'ordre de 1 mg/kg, il inhibe complètement la peroxydation des lipides induite chez la souris par 500 mg/kg de paracétamol. Cette inhibition s'accompagne d'une protection

importante contre la mortalité (70 % de protection à 5 mg/kg) ou totale à des doses supérieures ou égales à 25 mg/kg. Encore une fois, nous constatons que les effets hépatoprotecteurs de l'ADT sont supérieurs à ceux de la N-acétylcystéine, de la vitamine E et du diéthylthiocarbamate.

IV-1 Origine des effets hépatoprotecteurs de l'ADT

Pour savoir par quels mécanismes biochimiques l'ADT exerce ces effets hépatoprotecteurs, il est important de rappeler comment le CCl_4 et le paracétamol exercent leur toxicité.

Le CCl_4 subit dans le foie une réduction métabolique en $\cdot\text{CCl}_3$ responsable d'une toxicité directe par liaison aux macromolécules cellulaires et d'une toxicité indirecte par une induction de la peroxydation des lipides qui produit des radicaux libres toxiques.

Le paracétamol subit dans le foie une biotransformation en dérivé électrophile qui réagit très vite avec le glutathion. De ce fait, la toxicité de ce dérivé ne se manifeste que s'il est formé en quantités qui diminuent de 70 % ou plus la concentration du glutathion hépatique. Il a été montré que c'est dans ce cas seulement que la liaison aux macromolécules cellulaires est importante et que la peroxydation des lipides se déclenche.

En tenant compte de ces données, plusieurs mécanismes pouvant être à l'origine des effets hépatoprotecteurs de l'ADT sont envisageables.

- a - une inhibition du métabolisme du CCl_4 et de l'activation oxydante du paracétamol (inhibition des cytochromes P-450)
- b - un piégeage des intermédiaires radicalaires toxiques formés au cours du métabolisme des xénobiotiques ($\cdot\text{CCl}_3$, N-acétyl-p-benzoquinonimine)

l'effet antioxydant (c) est très important. In vivo, l'effet inhibiteur de l'ADT vis-à-vis de la peroxydation des lipides est dû au moins en partie à sa capacité de piéger les radicaux libres et non tout simplement à une inhibition du métabolisme des xénobiotiques qui subissent une activation oxydante par les cytochromes P-450 (CCl_4 , paracétamol). L'effet du type (c) est clair dans les cas de l'induction de la peroxydation des lipides chez la souris par la bléomycine et secondairement par le paraquat. En effet, la bléomycine ne subit aucune activation enzymatique. C'est le complexe Fe^{II} -bléomycine qu'on injecte à la souris qui est directement responsable de la réduction d' O_2 en O_2^- et $\cdot\text{OH}$ responsables de la formation des radicaux L^\cdot , LOO^\cdot et LO^\cdot . Dans ce cas, l'inhibition que l'ADT exerce sur la peroxydation des lipides ne peut s'expliquer que par un effet du type (c) (piégeage des radicaux).

Dans les cas d'inhibition de la peroxydation des lipides induite in vivo par le CCl_4 ou par le paracétamol, il est plus difficile de conclure. En effet, nous n'avons pas de preuves formelles que l'ADT n'inhibe pas le métabolisme du CCl_4 et l'activation oxydante du paracétamol (effet a), mais d'un autre côté, nous disposons de résultats obtenus in vivo avec la bléomycine et in vitro avec les systèmes chimiques montrant clairement que l'ADT est un piégeur de radicaux libres et qui plaident en faveur des effets du type b et c.

IV-2 Optimisation de l'effet protecteur de l'ADT

La protection que l'ADT exerce vis-à-vis de l'hépatotoxicité du paracétamol et du CCl_4 est optimale quand il est injecté aux animaux quelques heures avant le toxique. Les souris traitées par 50 mg/kg d'ADT trois heures avant 500 mg/kg de paracétamol, semblent être totalement protégées vis-à-vis de ce toxique.

Si l'ADT est administré simultanément avec le paracétamol, la pro-

- c - un piégeage des radicaux formés au cours des différentes phases de la peroxydation des lipides ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, L^{\cdot} , LOO^{\cdot} , LO^{\cdot}) :
Effet antioxydant
- d - des effets sur le cycle du glutathion et sur les GSH-transférases :
L'ADT pourrait catalyser la régénération du GSH à partir de GS-SG ou stimuler l'activité des GSH transférases (3).
- e - l'ADT pourrait agir par un effet biologique induit du type immunostimulation.

Nos résultats excluent l'éventualité d'un effet du type(e) dans la mesure où l'administration répétée de l'ADT à des animaux pendant plusieurs jours avant leur intoxication par le CCl_4 ou par le paracétamol ne les protège pas contre la toxicité. Au contraire, son administration quelques heures avant les protège efficacement vis-à-vis de la peroxydation des lipides et de la mortalité suggérant ainsi qu'il agit par lui-même et non par un phénomène biologique induit.

N'ayant pas d'éléments sur un éventuel effet du type(d) nous ne pouvons l'exclure d'autant plus que les résultats de Bueding (résumés au paragraphe III-1) bien qu'il ait utilisé des conditions différentes des nôtres, montrent que l'activité de la GSH-transférase est augmentée par l'ADT et que le taux de GSH hépatique ne diminue pas chez des souris d'abord traitées par l'ADT puis par du paracétamol ou du CCl_4 .

Pour pouvoir départager entre les effets a, b et c, il faut tenir compte à la fois des résultats in vivo et in vitro.

L'étude de l'effet de l'ADT sur la peroxydation des lipides (des microsomes hépatiques de rat) induite par des systèmes chimiques montre que

tection vis-à-vis de la mortalité et de la peroxydation des lipides est moins bonne (50 mg/kg d'ADT ne protègent que 75 % des souris contre la mortalité). Si l'administration est postérieure à celle du paracétamol, la protection contre la peroxydation des lipides est moins bonne et celle contre la mortalité est nulle.

Ces résultats montrent :

- a - que l'effet hépatoprotecteur de l'ADT dépend directement de sa concentration intrahépatique au moment du déclenchement de l'agression oxydante
- b - que dans nos conditions de travail, l'ADT administrée après une agression oxydante n'exerce pas d'effet réparateur suffisant sur le foie.

IV-3 Facteurs structuraux responsables de l'hépatoprotection

- L'étude in vitro des effets antioxydants de l'ADT et de certains de ses dérivés montre que la structure dithiolthione (S = C - S - S) est très importante. Tous les dérivés du cycle dithia-1,2-cyclopentène-3-thione testés ont indépendamment des substituants sur les carbones 4 et 5 de ce cycle des pouvoirs antioxydants identiques (voir l'inhibition de la peroxydation des lipides induite chimiquement par FeSO_4 et l'ascorbate ou la cystéine). Par contre, les dérivés renfermant la structure $\text{O} = \text{C} - \text{S} - \text{S}$ testés n'ont aucun effet.

Classement des dérivés à structure S = C - S - S et O = C - S - S étudiés en fonction des effets antioxydants observés in vitro

ADT > dmADT > Ph-5, Ph-4 > TTE > OZ > ADO, dmADO

- In vivo, le classement de ces produits en fonction de leur pouvoir protecteur vis-à-vis de l'hépatotoxicité du paracétamol est le suivant :

Ph-5 > ADT > TTE > dmADT > ADO > Ph-4, OZ, dmADO

L'interprétation de ces résultats est plus délicate que ceux obtenus in vitro. En effet, il faut tenir compte de certains facteurs qui ne se posent pas in vitro. En particulier, il est connu que la pharmacocinétique et la distribution dans les organes ainsi que la vitesse de métabolisation et d'élimination des produits conditionnent leur activité pharmacologique. Ainsi, bien que ces résultats confirment ceux déjà obtenus in vitro dans le sens où la structure S = C - S - S joue aussi un rôle très important dans la protection contre la toxicité, nous constatons quelques différences par rapport aux résultats in vitro.

Les molécules testées, renfermant la structure S = C - S - S bien qu'ayant un pouvoir antioxydant analogue in vitro, n'ont pas le même pouvoir hépatoprotecteur in vivo. C'est ainsi que Ph-5, ADT, TTE et dmADT sont dans cet ordre de classement des meilleurs hépatoprotecteurs que Ph-4 et l'Oltipraz.

L'efficacité de Ph-5 pourrait s'expliquer par un métabolisme moins rapide que celui de l'ADT et du TTE et donc par une présence prolongée du composé actif au niveau des structures lipidiques sensibles à la peroxydation. Le TTE et l'ADT seraient au contraire métabolisés plus vite et éliminés après conjugaison. Le dmADT devrait être rapidement sulfo ou glucuroconjugué par sa fonction phénolique libre et éliminé encore plus vite que ces deux produits.

L'Oltipraz serait, comme le suggèrent les résultats de son métabo-

lisme, transformé en métabolites ne contenant plus la structure $S = C - S - S$.

Le Ph-4 est le moins efficace de tous les produits renfermant la structure $S = C - S - S$ qui ont été testés. Ceci peut s'expliquer par des problèmes de pharmacocinétique, par une distribution dans les organes différente de celle de l'ADT ou encore par un métabolisme qui touche beaucoup plus que dans le cas de l'ADT le cycle dithiolthione et qui inactive de ce fait rapidement la molécule.

L'autre différence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* concerne l'ADO qui renferme la structure $O = C - S - S$. Celui-ci est complètement inefficace à 100 μM vis-à-vis de la peroxydation des lipides *in vitro*, mais il est inhibiteur de cette peroxydation, *in vivo*, chez la souris intoxiquée par le paracétamol. *In vivo*, ce produit agirait par un mécanisme non observé *in vitro* à propos duquel nous ne disposons d'aucun élément explicatif pour le moment, peut-être comme inhibiteur du métabolisme du paracétamol.

Enfin, le dmADO renfermant la structure $O = C - S - S$ est dépourvu de tout effet hépatoprotecteur *in vivo*. Cette absence d'activité n'est pas étonnante étant donné que les molécules contenant la structure $O = C - S - S$ n'ont pas d'effet antioxydant *in vitro*. De plus, cette molécule contient une fonction phénolique libre qui faciliterait l'élimination du produit après une rapide conjugaison.

IV-4 Sélectivité de l'ADT vis-à-vis des organes

Deux observations nous amènent à penser que l'ADT se concentre beaucoup plus dans le foie que dans les poumons.

- a - Les doses d'ADT nécessaires pour inhiber la peroxydation des lipides induite par la bléomycine et le paraquat (toxiques pulmonaires) sont supérieures aux doses qui inhibent la peroxydation des lipides induite par le paracétamol (hépatotoxique)

b - A 25 mg/kg, l'ADT semble totalement protéger les souris vis-à-vis de la mortalité induite par le paracétamol, mais non vis-à-vis de celle induite par la bléomycine et le paraquat.

Ces résultats, bien que montrant que l'ADT a des effets beaucoup plus nets sur le foie que sur les poumons confirment qu'il joue un rôle d'antioxydant en piégeant les radicaux libres. En effet, il est connu que la toxicité de la bléomycine est due à sa capacité de catalyser la production d' O_2^{\cdot} et non à une activation métabolique.

IV-5 Spéculations et perspectives

Notre étude a permis de révéler les propriétés antioxydantes que l'ADT possède et qui sont restées inconnues malgré son utilisation depuis près de 40 ans en Médecine Humaine. Elle explique au moins en partie pourquoi l'ADT prévient les insuffisances salivaires consécutives au traitement des cancers de la sphère ORL par les rayonnements ionisants. En effet, ce genre de rayonnements provoque une production de radicaux libres que l'ADT piégerait.

L'ADT, du fait de son tropisme hépatique, est surtout hépatoprotecteur. Il pourrait être utilisé sous sa forme galénique actuelle pour diminuer la toxicité hépatique de divers produits qui agissent par une peroxydation des lipides hépatiques. Parmi les produits qui provoquent ce genre de toxicité chez l'homme figurent :

- Le paracétamol : Médicament qui provoque dans les cas d'intoxication volontaire ou involontaire une peroxydation des lipides souvent mortelle si la dose est trop forte.

- Le tétrachlorure de carbone : Très utilisé comme solvant de laboratoire et en Médecine Vétérinaire et dont l'implication dans l'initiation de la peroxydation des lipides est prouvée.

Au-delà de ces possibilités d'utilisation de l'ADT, les résultats que nous avons obtenus ouvrent de nouvelles perspectives vers la recherche de produits encore plus hépatoprotecteurs ou protecteurs vis-à-vis de la toxicité exercée sur d'autres organes. En effet, il serait très intéressant du point de vue clinique de modifier la structure de l'ADT de façon à obtenir de nouvelles molécules :

- non toxiques, pour pouvoir les utiliser in vivo
- possédant des propriétés antioxydantes
- capables de se concentrer dans des organes autres que le foie

Ainsi, les produits qui se concentrent dans les poumons pourraient être utilisés pour diminuer la toxicité de certains produits qui provoquent une agression oxydante pulmonaire ; c'est le cas par exemple :

- du paraquat : un herbicide qui provoque en cas d'intoxication une peroxydation des lipides par une catalyse de la réduction d' O_2 en O_2^{\cdot}
- la bléomycine : un antinéoplasique qui provoque à côté de l'effet thérapeutique désiré une agression oxydante pulmonaire

De même, les produits qui se concentrent dans le coeur pourraient être utilisés en association avec certains médicaments qui provoquent, à côté de leur effet thérapeutique, une agression oxydante cardiaque. C'est le cas de l'adriamycine par exemple qui est un anticancéreux efficace, mais qui provoque une agression oxydante cardiaque qui oblige les cliniciens à arrêter le traitement.

V - PARTIE EXPERIMENTALE

V-1 Préparation des microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital

Des rats mâles de souche Sprague-Dawley, fournis par la Société d'élevage IFFA-CREDO (France), sont acclimatés durant 8 jours au laboratoire. Ils disposent librement d'eau de robinet et d'alimentation standard, fournie par la Société UAR (France). Ces rats sont traités i.p. pendant trois jours par du phénobarbital sodique dissous dans une solution isotonique de chlorure de sodium (80 mg/kg/j). Parallèlement, leur eau de boisson contient 0,1 % de phénobarbital. Au 6ème jour, ils sont mis à jeun pendant 24 heures, puis tués par dislocation cervicale et saignés par section de la carotide. Le foie est alors perfusé par la veine porte par du NaCl 0.154 M jusqu'à décoloration complète et ensuite prélevé. Les microsomes sont préparés suivant les méthodes usuelles résumées sur la Figure 50, et le dosage des protéines et des cyt P-450 est fait selon les techniques de Lowry et d'Omura et Sato (165, 11).

V-2 Métabolisme de l'ADT in vitro

V-2-1 Conditions opératoires

Le $^{14}\text{C}_5$ -ADT a été incubé à 37°C dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 en présence de 4 nmol de cytochromes P-450 soit environ 2 mg de protéines microsomales hépatiques. Le NADPH, cofacteur des monooxygénases à cyt P-450 est généré dans le milieu d'incubation à partir du NADP (2 mM) en présence de glucose-6-phosphate (20 mM) et de 4 unités de glucose-6-phosphate deshydrogénase. Le $^{14}\text{C}_5$ -ADT, 1 mCi/mmol, dissous dans le méthanol (20 mM), est ajouté à la concentration de 0,1 mM. Après des incubations de 1 à 30 minutes, les réactions sont arrêtées et le milieu d'incubation est extrait

Figure 50

PREPARATION DES MICROSOMES DE FOIE DE RAT

Foie perfusé par NaCl 0.154 M jusqu'à décoloration
(élimination de l'hémoglobine)

↓ 1

découpé en petits dés dans du tampon sucrose 0.2 M, TRIS ~~0.1~~ M, EDTA 1 mM

10mM

pH 7,4

↓ 2

homogénéisé dans un appareil de Potter-Elvehjem (40 g de foie pour
100 ml de tampon

↓ 3

surnageant centrifugé 20 min à 13 500 g
(précipitation des mitochondries)

↓ 4

surnageant centrifugé 1 h à 105 000 g
(précipitation du glycogène et des microsomes. Le surnageant contient le cytosol)

↓ 5

culot homogénéisé dans un tampon pyrophosphate de sodium 100 mM
pH 7.5 puis centrifugé 30 min à 100 000 g
(élimination de l'hémoglobine qui cosédimentait)

↓ 6

culot homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 100 mM,
glycérol 20 g pour 100 ml, pH 7.4

Microsomes

congelés dans l'azote liquide et conservés à - 80°C

Toutes les manipulations sont effectuées à + 4°C

5 fois par 1 ml d'acétate d'éthyle. Ces extraits sont regroupés et évaporés à sec sous azote ou à l'aide d'un évaporateur rotatif puis repris par 0,2 ml de méthanol qui serviront pour les analyses en CLHP.

V-2-2 Conditions d'analyse des métabolites en CLHP

Les analyses en CLHP ont été réalisées à l'aide d'un appareil équipé de deux pompes Altex, Modèle 110A, d'un programmateur de solvant Altex, Modèle 420, d'un appareil de détection UV Pye-Unicam et d'un collecteur de fraction de la firme LKB, Modèle 2112 Rédirac.

La séparation des métabolites se fait sur une colonne Ultrasphère ODS 0,46 x 25 cm à l'aide d'une phase mobile constituée d'un mélange de 70 % de méthanol et de 30 % d'eau Millipore contenant 0,3 % d'acide acétique 13 N. Le débit est de 1,3 ml/min et la longueur d'onde de détection est de 310 nm.

V-2-3 Dosage radioactif des métabolites du $^{14}\text{C}_5\text{-ADT}$

20 μl de l'extrait méthanolique (paragraphe IV-2-1) sont injectés en CLHP. Les métabolites sont récupérés à la sortie du détecteur UV en collectant des fractions toutes les 0,2 min. La radioactivité contenue dans chaque fraction est mesurée, après addition de 2 ml de liquide scintillant (Picofluor, Packard), à l'aide d'un compteur de radioactivité à scintillation liquide Modèle Tricarb 300 de la firme Packard. Les comptages donnés par l'appareil en coups par minute sont convertis par comparaison à un standard externe en désintégrations par minute (dpm). Le profil CLHP des métabolites du $^{14}\text{C}_5\text{-ADT}$ est ainsi établi et comparé à celui obtenu par détection UV à 310 nm, ce qui a permis de corrélérer chaque pic radioactif au pic UV correspondant.

La proportion de chaque métabolite est obtenue en comparant la quantité de radioactivité correspondante à celle de l'échantillon injecté.

V-2-4 Isolement des métabolites de l'ADT et détermination de leur structure par spectrométrie de masse, UV visible et RMN¹H

4,8 mg d'ADT non radioactif ont été incubés en présence de microsomes hépatiques dans les conditions décrites au paragraphe IV-2-1. La réaction est arrêtée au bout de 10 minutes et les métabolites sont extraits 5 fois par 100 ml d'acétate d'éthyle puis récupérés après évaporation à sec dans 1 ml de méthanol.

La totalité de l'extrait est analysé en CLHP et les métabolites sont isolés et analysés après évaporation à sec du solvant en spectrométrie de masse, RMN¹H et UV-visible.

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre Riber R 1010B, après impact électronique. Les spectres RMN¹H sont obtenus sur un appareil Brücker à 250 MHz et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS. Les mesures en spectrophotométrie UV-visible ont été effectuées sur un spectrophotomètre Kontron 820.

V-2-5 Synthèse des métabolites de l'ADT

V-2-5-1 Synthèse du p-méthoxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène one-3 (Anisyldithiol-one, ADO)

L'ADO a été synthétisé selon la Référence 159. 500 mg d'ADT et 1,25 g d'acétate de mercure sont dissous dans 10 ml de chloroforme et 25 ml d'acide acétique 13 N puis portés à 37°C. Dès les premières heures, un précipité jaune se forme. Au bout de deux jours, ce précipité est filtré, le surnageant est extrait trois fois par 50 ml d'acétate d'éthyle ou de chloroforme, et la phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec.

L'ADO est purifié des traces d'ADT qui n'a pas réagi par c

graphie sur plaque de silice avec du chlorure de méthylène comme solvant.
Rendement 90 % ; Point de fusion (PF) : 116 (littérature : 114-117)
données spectrales de masse (S M) : voir Tableau 9
données RMN¹H et UV-visible : Tableau 8.

V-2-5-2 Synthèse du p-hydroxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène thione-3 (dmADT) et du p-hydroxyphényl-5-dithia-1,2-cyclopentène one-3 (dmADO)

Le dmADT et le dmADO ont été synthétisés à partir de l'ADT et de l'ADO selon le mode opératoire décrit dans la référence 160. 500 mg d'ADT ou d'ADO sont chauffés 5 heures à 200°C en présence de trois équivalents de chlorure de pyridinium. Après refroidissement à température ambiante, 500 ml d'eau sont ajoutés et le pH de la solution est ajusté à 1 par du HCl 12 N. L'ADT et l'ADO qui n'ont pas réagi restent en solution alors que le dmADT et le dmADO qui précipitent sont recueillis, après filtration, et dissous dans 100 ml d'acétate d'éthyle. Ces solutions après lavage trois fois par un litre d'eau pH 1, séchage sur sulfate de sodium et évaporation à sec donnent soit du dmADT, soit du dmADO purs avec un rendement de 85 %.

PF : dmADT : 190 ; dmADO : 164

Données RMN¹H, UV-visible et SM : voir Tableaux 8 et 9

V-3 Etude de la pharmacocinétique et de l'élimination urinaire de l'ADT chez le rat, l'homme et la souris

V-3-1 Administration de l'ADT et recueil des échantillons sanguins et urinaires

V-3-1-1 Che le rat

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant 250 g en moyenne et ayant libre

accès à l'eau et à la nourriture reçoivent par injection i.p. 1 ml d'une solution de $^{14}\text{C}_5$ -ADT 25 mM dans l'huile de maïs, soit une dose de 24 mg d'ADT 0,2 mCi/mmol par kg de poids corporel. Ces rats sont placés dans des cages de métabolisme juste après l'injection de l'ADT et les urines sont recueillies 6, 24, 48, 72, 96 et 120 h après. Le volume de chaque échantillon urinaire est mesuré et la quantité de radioactivité éliminée est déterminée en comptant 5, 10, 15 et 20 μl d'urine ce qui a permis d'établir le bilan de l'élimination urinaire. Ces urines sont ensuite conservées à -20°C ou étudiées immédiatement.

Pour le dosage des métabolites sanguins, des rats reçoivent i.p. 24 mg/kg d'ADT non radioactif ($\approx 0,1$ mmol/kg). A un temps précis, ces rats sont endormis à l'ether, décapités et 5 ml de sang sont recueillis sur 1 mg de citrate.

V-3-1-2 Chez la souris

Des souris swiss NMRI pesant 30 ± 1 g reçoivent i.p. 3 mg d'ADT non radioactif, soit 12,5 μmol dissoutes dans 200 μl d'huile de maïs. Aux temps voulus, elles sont décapitées et environ 700 μl de sang sont recueillis sur 0,2 mg de citrate.

Les urines sont également recueillies 24 heures après l'administration de l'ADT.

V-3-1-3 Chez l'homme

Deux volontaires ont pris une dose orale de 125 mg d'ADT (0,52 mmol) soit 10 comprimés de sulfarlem dosés à 12,5 mg d'ADT. Des prélèvements sanguins sur héparine ou citrate sont effectués à partir de 1 h et jusqu'à 52 h après la prise du médicament et gardés à -20°C . Les urines humaines 0-6 h, 6-24 h et 24-48 h sont de même recueillies et le volume a été mesuré avant de les congeler.

V-3-2 Traitement des échantillons sanguins et urinaires

V-3-2-1 Incubation avec la sulfatase

1 ml de sang total ou d'urine est dilué par 1 ml de tampon acétate 0,1 M pH 5,2 et incubé à 37°C en présence de 9 unités d'arylsulfatase et de β -saccharolactone 15 mM. Après 12 heures, le milieu d'incubation est dilué par son équivalent en volume d'eau puis passé sur Sep-Pack. L'ADT et ses métabolites sont accrochés sur celui-ci alors que l'hémoglobine et les produits plasmatiques ou urinaires hydrophiles sont complètement éliminés par lavage avec 20 ml d'eau Millipore. Les métabolites de l'ADT sont ensuite récupérés par élution avec 5 ml de méthanol puis redissous après évaporation à sec dans un volume de méthanol correspondant à la moitié du volume sanguin ou urinaire utilisé (500 μ l de méthanol pour 1 ml de sang ou d'urine).

V-3-2-2 Incubation avec la glucuronidase

Le déroulement des opérations est le même qu'avec la sulfatase excepté que 1 ml d'urine est incubé avec 420 unités de glucuronidase commerciale (Sigma).

V-3-3 Analyse en CLHP des urines avant et après traitement par la glucuronidase ou par la sulfatase

100 μ l d'urine d'homme, de souris ou de rat incubés ou non avec de la glucuronidase ou de la sulfatase sont injectés en CLHP. La colonne utilisée est une Dupont Zorbax C₈ 9.4 mm x 25 cm. La phase mobile est constituée d'eau Millipore contenant 0,3 % d'acide acétique 13 N et de méthanol et la séparation des métabolites est obtenue grâce à un gradient linéaire de solvant allant de 0 à 100 % de méthanol en 30 minutes avec un débit constant de 4 ml/min. La sortie de la colonne est reliée à un détecteur UV réglé à 310 nm et à un collecteur de fraction. Quand l'ADT utilisé n'est pas radio-

actif, les métabolites sont détectés en UV. Quand il est radioactif, des fractions de 0,8 ml sont collectées toutes les 0,2 min à la sortie de la colonne, et les métabolites sont dosés avant et après déconjugaison en analysant les fractions à l'aide d'un compteur à scintillation liquide après addition de 2 ml de liquide scintillant (Paragraphe IV-2-3).

V-3-4 Dosage UV des métabolites sanguins ou urinaires après déconjugaison

20 ou 10 μ l de l'extrait méthanolique préparé selon le paragraphe IV-3-2 sont injectés en CLHP dans les conditions décrites au paragraphe IV-1-3 ou en utilisant une colonne MOS hypersil C₈ 4,6 mm x 25 cm et une phase mobile constituée de 60 % de méthanol, 40 % d'eau Millipore contenant 0,3 % d'acide acétique 13 N et 10 % d'acétonitrile. Le débit est de 1 ml/min, la longueur d'onde de détection est de 310 nm et la sensibilité est de 0 à 0,2 de densité optique. Les métabolites de l'ADT sont dosés en UV grâce à un intégrateur calibré par injection en CLHP de 10 μ l d'une solution méthanolique contenant les authentiques de synthèse à la concentration de 10^{-4} M.

100 nmole/ml
 = 10 μ l x 10⁻⁴ g/g
 1 nmole

V-4 Inhibition de la peroxydation des lipides induite in vitro

V-4-1 Conditions opératoires

V-4-1-1 Inhibition de la production de MDA par des microsomes hépatiques de rats incubés en présence de FeSO₄ et de cystéine ou d'ascorbate (Test au MDA)

0,5 ml d'une suspension de protéines microsomales (2 mg/ml) dans du tampon Tris HCl 35 mM, pH 7,4 contenant du KCl 0,1 M sont maintenus à 0°C dans un bac de glace. Les inhibiteurs de la peroxydation des lipides y sont ajoutés, aux concentrations voulues, dissous dans 5 μ l de solvant (éthanol ou méthanol pour l'ADT et ses dérivés). 0,25 ml d'une solution de

FeSO₄ 20 μM et d'une solution de cystéine ou d'ascorbate 2 mM dans du tampon, sont additionnés à la suspension microsomale. Le mélange ainsi obtenu (volume final 1 ml contenant 1 mg de protéines, l'inhibiteur, le FeSO₄ 5 μM et l'ascorbate ou la cystéine 0,5 mM) est incubé à 37°C. La durée d'incubation est de 30 minutes quand le réducteur utilisé est la cystéine et 15 minutes si c'est l'ascorbate. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml d'une solution aqueuse contenant de l'acide trichloracétique 1 M, de l'acide thiobarbiturique 3,25 mM et HCl 0,25 M. L'échantillon est alors chauffé pendant 25 minutes à 100°C puis centrifugé 15 minutes à 3 200 g et la concentration de MDA présente dans le surnageant est mesurée.

V-4-1-2 Inhibition de la peroxydation des lipides microsomaux hépatiques induite par la réduction métabolique de CCl₄ en présence de NADPH et de cyt P 450

V-4-1-2-1 Inhibition de la production de MDA (Test au MDA)

Les incubations ont été faites dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 contenant de l'EDTA 0,1 mM. 1 ml de tampon contenant 1 mg de protéines microsomales (≈ 2 nmol de cyt.P-450), du CCl₄ 5 mM et un système générateur composé de NADP 1 mM, de G-6-P 10 mM et de 2 unités de G-6-P deshydrogénase est maintenu à 0°C dans un bac de glace. Après addition d'un inhibiteur de la peroxydation des lipides et incubation pendant 10 minutes à 37°C, l'échantillon est traité de la façon indiquée au paragraphe IV-4-1-1, et la concentration de MDA dans le surnageant est mesurée.

V-4-1-2-2 Inhibition de la production de C₂H₆ (Test à l'éthane)

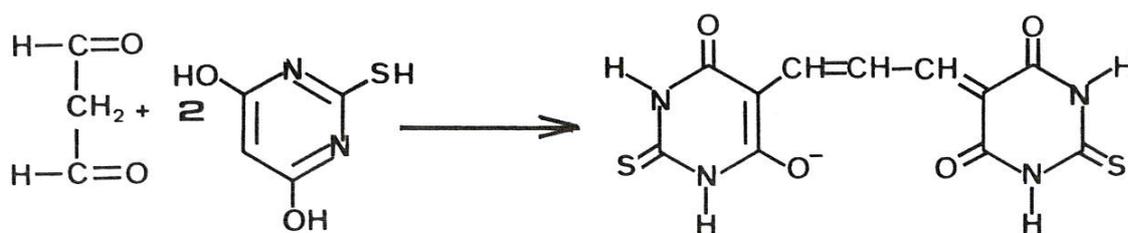
Les incubations ont été faites dans des tubes à hémolyse de 6 ml en présence de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 saturé en oxygène.

Le milieu d'incubation est de 1 ml contenant 4 mg de protéines, du CCl_4 20 mM et un système générateur composé de NADP, de G-6-P et de G-6-P deshydrogénase 4 fois plus concentrés que dans le test au MDA. L'échantillon est maintenu dans la glace jusqu'à addition de l'inhibiteur à la concentration voulue puis bouché par un septum en plastique et incubé à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée en injectant à travers le septum 100 μl d'acide trichloracétique 1 M et le taux d'éthane produit est mesuré dans l'atmosphère du tube par chromatographie phase gazeuse.

V-4-2 Evaluation quantitative de la peroxydation des lipides microsomaux

V-4-2-1 Mesure de la concentration de MDA

Une molécule de malondialdéhyde réagit à chaud et en milieu acide avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (ATB) et donne un composé d'addition rose qui absorbe à 535 nm ($\epsilon = 125.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).



Le composé d'addition est dosé dans le surnageant (paragraphe IV-4-1-1 et IV-4-1-2-1) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La concentration de MDA est considérée identique à celle de ce composé.

V-4-2-2 Mesure du taux d'éthane

Un échantillon de 3 ml de l'atmosphère du tube (paragraphe IV-4-1-2-2)

est prélevé à travers le septum par une seringue à gaz. Cet échantillon est analysé en chromatographie gazeuse à l'aide d'un appareil Packard Modèle 427 en l'injectant dans une boucle de 2,5 ml de contenance, connectée à une colonne de 2 m/2 mm de diamètre remplie de carbosieve G 60/80 mesh (Chrompack). Le four est à 150°C et l'hélium (25 ml/min) est utilisé comme gaz vecteur. L'éthane est dosé comparativement à un échantillon d'éthane standard de la firme Air Liquide (France) grâce à un détecteur à ionisation de flamme.

V-5 Inhibition de la peroxydation des lipides induite in vivo

V-5-1 Inhibition de la peroxydation des lipides chez le rat traité par le CCl_4

Différentes étapes d'une expérience type

Les rats de souche Sprague-Dawley pesant environ 200 g sont utilisés.

a - Rats prétraités par un inhibiteur de la peroxydation des lipides (ADT ou un de ses dérivés)

$t = X^*$: Injection i.p. d'une dose d'un inhibiteur de la peroxydation des lipides en solution dans 1 ml d'huile de maïs

$t = 0$ h : Injection i.p. de 1 ml/kg de CCl_4 en solution dans l'huile de maïs (200 μl de CCl_4 pur dans 800 μl d'huile sont injectés à un rat de 200 g)

b - Rats traités uniquement par le CCl_4

$t = X^*$: Injection i.p. d'un ml d'huile de maïs

t = 0 h : Injection i.p. de 1 ml/kg de CCl_4 en solution dans l'huile de maïs

c - Rats témoins

t = X^* : Injection i.p. de 1 ml d'huile de maïs

t = 0 h : Injection i.p. de 800 μl d'huile de maïs

t = X^* , est le temps d'injection de l'inhibiteur par rapport au CCl_4 , généralement trois heures avant

V-5-2 Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par le paracétamol

Les souris femelles swiss NMRI pesant 20 ± 1 g après un jeûne de 72 heures sont utilisées.

Experience type

a - Souris traitées par le paracétamol et un inhibiteur de la peroxydation des lipides (ADT, dérivés de l'ADT, oltipraz, antioxydants)

t = $X^{(3)}$: administration⁽¹⁾ à la souris d'une dose d'un inhibiteur de la peroxydation des lipides, en solution dans 200 μl d'un solvant adéquat⁽²⁾

t = 0 h : Injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol en solution à 20 mg/ml dans l'eau contenant 0.9 % de NaCl et 5 % de dextran (500 μl sont injectés à une souris de 20 g)

b - Souris traitées uniquement par le paracétamol

t = X⁽³⁾ : Administration⁽¹⁾ de 200 μ l de solvant de l'inhibiteur

t = 0 h : Injection i.p. de 500 mg/kg de paracétamol

c - Souris témoins

t = X⁽³⁾ : Administration⁽¹⁾ de 200 μ l de solvant de l'inhibiteur

t = 0 h : Injection i.p. de 500 μ l de solvant du paracétamol

1 - L'ADT a été administré par voie intrapéritonéale et orale à la souris.

Les dérivés de l'ADT, l'Oltipraz et les antioxydants testés ont été administrés uniquement par voie intrapéritonéale.

2 - Le solvant est :

- L'huile de maïs pour : l'ADT, tous ses dérivés, l'Oltipraz et la vitamine E

- L'eau contenant 9g/l de NaCl pour : le DDC, la PZ, le PG et le lévamisole

3 - Temps d'administration de l'inhibiteur de la peroxydation des lipides par rapport au temps d'injection du paracétamol

- l'ADT a été testé :

- En administration orale et en injection i.p. à X = - 3 h

t = 0 h : Injection i.p. de 200 mg/kg de FeSO_4 dans
200 μl d'eau physiologique

d - Souris témoins

t = - 3 h : Injection i.p. de 200 μl d'huile

t = 0 h : Injection i.p. de 200 μl de sérum physiologique

V-5-4 Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris
traitée par le paraquat seul

Expérience type

a - Souris traitées par le paraquat et par l'ADT

t = - 3 h : Administration i.p. de l'ADT dans 200 μl d'huile
de maïs

t = 0 h : Injection i.p. de 200 mg/kg de paraquat dissous
dans 200 μl de sérum physiologique

b - Souris témoins traitées uniquement par le paraquat

t = - 3 h : Administration i.p. de 200 μl d'huile

t = 0 h : Injection i.p. de 200 mg/kg de paraquat

c - Souris témoins non traitées par le paraquat et l'ADT

t = - 3 h : Injection i.p. de 200 μl d'huile

t = 0 h : Injection i.p. de 200 μl de sérum physiologique

- En administration i.p. à X = 0 h
 - X = + 3, + 2 et + 1 h
 - X = - 24 h et - 48 h

- Les dérivés de l'ADT, l'Oltipraz et les antioxydants ont été testés :

- En administration i.p. à X = - 3 h

V-5-3 Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par le paraquat et FeSO₄

Les souris utilisées ne sont pas à jeûn et pèsent 25 ± 1 g.

Expérience type

a - Souris traitées par le paraquat + FeSO₄ et par l'ADT

t = - 3 h : Administration i.p. de l'ADT dans 200 μ l d'huile

t = 0 h : Injection i.p. de 200 mg/kg de paraquat et de 200 mg/kg de FeSO₄ dissous ensemble dans 200 μ l d'eau contenant 0,9 % de NaCl

b - Souris traitées par le paraquat + FeSO₄

t = - 3 h : Injection i.p. de 200 μ l d'huile

t = 0 h : Injection du paraquat + FeSO₄

c - Souris traitées uniquement par FeSO₄

t = - 3 h : Injection i.p. de 200 μ l d'huile

V-5-5 Inhibition de la peroxydation des lipides chez la souris traitée par la bléomycine et FeSO₄

Les expériences se font comme au paragraphe IV-5-3. Au lieu d'injecter du paraquat, 100 mg/kg de bléomycine sont injectés.

V-5-6 Dispositif permettant l'accumulation de l'éthane expiré par l'animal au cours du temps

Les souris ou les rats sont mis juste après l'injection de l'agent toxique dans un dessiccateur d'un diamètre de 100 mm pour les souris et 150 mm pour les rats. Les dessiccateurs à rats ne contiennent qu'un seul animal par expérience, tandis que les dessiccateurs à souris peuvent contenir 1, 2, 3 ou 4 souris par expérience.

Les dessiccateurs à souris contiennent 50 g de chaux sodée et les dessiccateurs à rats en contiennent 200 g. La chaux sodée sert à neutraliser le CO₂ au fur et à mesure qu'il se forme au cours de la respiration et évite qu'il ne s'accumule dans le dessiccateur et cause la mort de l'animal par asphyxie.

Chaque dessiccateur est relié par l'intermédiaire d'un bulleur à huile à un ballon d'oxygène pur équilibré à la pression atmosphérique. Au moment où on met l'animal dans le dessiccateur, on connecte celui-ci au bulleur à huile, à ce moment, la constitution de l'air du dessiccateur est identique à celle de l'air ambiant et la pression correspond à la pression atmosphérique. Au cours de l'expérience, ni la constitution de l'air dans le dessiccateur, ni la pression ne changent puisque l'oxygène consommé est expiré sous forme de CO₂ qui est absorbé par la chaux sodée et est remplacé par son équivalent d'oxygène pur. Les animaux sont ainsi maintenus constamment dans une atmosphère et une pression normales au cours de l'expérience.

Au moment du prélèvement des échantillons d'air du dessiccateur,

on stoppe l'arrivée de l'oxygène à l'aide d'un robinet à trois voies situé au-dessus du dessicateur de façon à ce que celui-ci soit en contact avec la seringue de prélèvement mais non avec le réservoir d'oxygène. Chaque échantillon prélevé crée une dépression dans le dessicateur qui provoque une aspiration d'un volume d'air ambiant équivalent au volume prélevé, juste au moment de la déconnection de la seringue et du dessicateur. Celui-ci est connecté tout de suite après au réservoir d'oxygène pour continuer l'expérience. L'échantillon d'air ainsi prélevé (10 ml) est analysé en chromatographie phase gazeuse.

V-5-7 Dosage de l'éthane en chromatographie gazeuse (CPG)

L'éthane est dosé dans les conditions marquées au paragraphe V-4-2-2, à ceci près que la boucle d'injection dans le cas présent est de 6 ml et que la calibration se fait en injectant dans le dessicateur contenant un animal mort, une quantité d'éthane connue. L'injection d'un échantillon de l'air de ce dessicateur (6 ml) en CPG permet de corréler l'intégration du pic de l'éthane à la quantité présente dans le dessicateur.

R E F E R E N C E S

1. Vidal français, 1985
2. S.S. ANSHER, P. DOLAN, E. BUEDING, *Hepatology* 3 (1983) 932.
3. A. BIEDER, B. DECOUVELAERE, C. GAILLARD, H. DEPAIRE, D. HEUSSE, C. LEDOUX, M. LEMAR, J.P. LE ROY, C. SNOZZI, J. GREGOIRE, *Arzneim. Forsh.* 33 (1983) 1289.
4. J.J. VALLNER, *J. Pharmac. Sciences* 66 (1977) 447.

5. A. FOLIOT, dans "Mises au Point de Biochimie Pharmacologiques" (G. SIEST, C. HENSGHEM) Masson, éditeur (1977) 81.
6. J. CALDWELL, dans "Concepts in Drug Metabolism" (P. JENNER, B. TESTA) Marcel Dekker, editeur (1980) 221, chap. 4.
7. The significance of phase II (conjugation) reactions in drug disposition and toxicity, *Lif. Sciences* 24 (1979) 571.
8. P.G. WISLOCKI, G.T. MIWA, A.Y.H. LU, dans "Enzymatic Basis of Detoxication" (W.B. JAKOBY) Academic Press, editeur (1980) 135, Chap. 7.
9. G.J. DUTTON, dans "Drug Metabolism in Man" (J.W. GORROD, A.M. BECKET) Taylor et Francis, Editeur (1978) 81, Chap. 4.
10. H.G. MANDEL, dans "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition", B.N. LA DU, H.G. MANDEL, E.L. WAY, editeur, Baltimore USA (1971) 149.
11. T. OMURA, R. SATO, *J. Biol. Chem.* 239 (1970) 1073.

12. S. JAKOBSON, H. THOR, S. ORRENIUS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39 (1970) 1073.
13. J.R. BEND, G.E.R. HOOK, T.E. GRAM, *Drug. Metab. Disp.* 1, n° 1 (1973) 358.
14. S.J. STOHS, R.C. GRAFSTROM, M.D. BURKE, P.W. MOLDEUS, S.G. ORRENIUS, *Arch. Biochem. Biophys.* 117 (1976) 105.
15. R.W. ESTABROOK, D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL, *Biochem. J.* 338 (1963) 741.
16. B.G. LAKE, R. HOPKINS, J. CHAKRABORTY, J.W. BRIDGES, D.V.W. PARKE, *Drug. Metab. Disp.* 1, n° 1 (1973) 342.
17. H. MUKTHAR, R.M. PHILPOT, J.R. BEND, *Drug. Metab. Disp.* 6, n° 5 (1978) 577.
18. W.P. NORRED, F.J. AKIN, *Biochem. Pharmacol.* 25 (1976) 732.
19. H.A. SASAME, M.M. AMES, S.D. NELSON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, n° 3 (1977) 919.
20. D.Y. COOPER, S.S. LEVIN, S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL, R.W. ESTABROOK, *Science* 147 (1965) 400.
21. R. GRAY, I. BOYLE, H.F. DE LUCA, *Science* 172 (1971) 1232.
22. M.D. BRUKE, S. ORRENIUS, *Pharmac. Ther.* 7 (1979) 549.
23. H. VAINIO, E. HIETANEN, dans "Concepts in Drug Metabolism" (P. JENNER, B. TESTA), Marcel Dekker, editeur (1980) 251, Chap. 5.
24. F.P. GUENGERICH, G.A. DANNAN, S.T. WRIGHT, R.A. MARTIN, L.S. KAMINSKY, *Biochemistry* 21 (1982) 6019.

25. D. LARREY, L.M. DISTLERATH, G.A. DANNAN, G.R. WILKINSON, F.P. GUENGERICH, *Biochemistry* 23 (1984) 2787.
26. T. OHYAMA, D.W. NEBERT, M. NEGISHI, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 2675.
27. A.H. CONNEY, A.G. GILMAN, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 3682.
28. H.W. GELBOIN, N.B. BLACKBURN, *Biochem. Biophys. Acta* 72 (1963) 657.
29. A.P. ALVARES, A. KAPPAS, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 6373.
30. Th. CRESTEIL, J.L. MAHU, P.M. DANSETTE, J.P. LEROUX, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 1127.
31. V. ULLRICH, P. WEBER, P. WOLLENBERG, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64 (1979) 808.
32. M. KLINGENBERG, *Arch. Biochem. Biophys.* 75 (1958) 376.
33. D. GRAFINKEL, *Arch. Biochem. Biophys.* 77 (1958) 493.
34. L.K. HANSON, W.A. EATON, S.G. SLIGAR, I.C. GUNSALUS, M. GOUTERMAN, C.R. CONNELL, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2672.
35. H.W. STROBEL, J.D. DIGNAM, "Methods in Enzymology" 52 (1978) 89.
36. I.D. DIGMAN, H.W. STROBEL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63 (1975) 845.
37. A.Y.H. LU, K.W. JUNK, M.J. COON, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 3714.
38. A.Y.H. LU, H.W. STROBEL, M.J. COON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36 (1969) 545.

39. H.W. STROBEL, A.Y.H. LU, J. HEIDEMA, M.J. COON, J. Biol. Chem. 245 (1970) 4851.
40. A.Y.H. LU, S.B. WEST, Pharmac. Ther A, 2 (1978) 337.
41. M.J. COON, D.A. HAUGEN, F.P. GUENGERICH, J.L. VERMILLON, W.L. DEAN "The Structural Basis of Membrane Function" (1976) 409, Y. HATEFY, L. DJAVADIDHANIANLE (Eds), Academic Press, N.Y.
42. W.J. MARSHALL, A.E.M. Mac LEAN, Biochem. J. 122 (1971) 569.
43. P. STRITTMATTER, "Methods in Enzymology" Vol. X (1967) 553.
44. A.Y.H. LU, W. LEVIN, Biochem. Biophys. Acta 344 (1974) 206.
45. D. MANSUY, J.C. CHOTTARD, M. LANGE, J.P. BATTIONI, J. Mol. Catal. 7 (1980) 215.
46. G.R. SCHONBAUM, S. LO, J. Biol. Chem. 247 (1972) 3353.
47. F. LICHTENBERGER, W. NASTAINCZYK, V. ULLRICH, Biochem. Biophys. Res. Commun. 70 (1976) 939.
48. a) E.G. HRYCAY, P.J. O'BRIEN, Arch. Biochem. Biophys. 153 (1972) 480.
b) A.D. RAHIMTULA, P.J. O'BRIEN, Biochem. Biophys. Res. Commun. 60 (1974) 440.
49. G.D. NORDBLOM, R.E. WHITE, M.J. COON, Arch. Biochem. Biophys. 175 (1976) 524.
50. E.G. HRYCAY, J.A. GUSTAFSSON, M.I. SUNDBERG, L. ERNSTER, Biochem. Biophys. Res. Commun. 66 (1975) 209.

Manque papier de médailles

51. A.L. LEHNINGER, "Biochemistry" The Molecular Basis of Cell Structure and Function, Seconde Edition 1970-1&975 by Worth Publishers inc. p. 503.
52. H.J. FORMAN, A. BOVERIS, dans "Free Radicals in Biology" Vol. V (1982) 65, edited by W.A. PRYOR, Academic Press, N.Y.
53. B. CHANCE, H. SIES, A. BOVERIS, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 527.
54. B. CHANCE, C. SARONIO, J.S. LEIGH, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 1635.
-
55. A. BOVERIS, N. OSHINO, B. CHANCE, *Biochem. J.* 128 (1972) 617.
56. A. BOVERIS, B. CHANCE, *Biochem. J.* 134 (1973) 707.
57. a) J.M. Mc CORD, I. FRIDOVICH, *Photochem. Photobiol.* 17 (1973) 115.
- b) D. BEHAR, G. CZAPSKI, J. RABANI, L.M. DORFMAN., HA. SCHWARZ, *J. Phys. Chem.* 74 (1970) 3209.
- c) H.P. MISTRA, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170 et 6960.
58. a) I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4053.
- b) K.V. RAJAGOPALAN, I. FRIDOVICH, P. HANDLER, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 922 et 239 (1964) 2022.
- c) V. ALLEMAN, P. HANDLER, *J. Biol. Chem.* 242 (1967), 4087.
59. a) L. ANDREWS, *J. Phys. Chem.* 73 (1969) 3922.
- b) R.C. BRAY, R.M. PICK, D. SAMUEL, *Eur. J. Biochem.* 15 (1970) 352.
- c) S.N. FONER, R.L. HUDSON, *Advan. Chem. Ser.* 36 (1962) 34.

60. a) E.J. LAND, A.J. SWALLOW, Arch. Biochem. Biophys. 145 (1971) 365.
b) J. RABANI, A. MULAC, M.S. MATHESON, J. Phys. Chem. 69 (1965) 53.
c) J.M. Mc CORD, I. FRIDOVICH, J. Biol. Chem. 244 (1969) 6049.
61. a) I. FRIDOVICH, dans "Free Radicals in Biology" Vol. I (1976) 239
(W.A. PRYOR, ed.) Academic Press, N.Y.
b) I. FRIDOVICH, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23 (1983) 239.
62. F. HABER, J. WEISS, Proc. R. Soc. London, Ser A 147 (1934) 332.
63. a) J.M.C. GUETTERIDGE, Febs Letters 150 (1982) 454.
b) J.M.C. GUETTERIDGE, D.A. ROWLEY, Biochem. J. 206 (1982) 605.
c) B. HALLIWELL, TIBS 3 (1982) 270.
64. a) D.A. BATES, C.C. WITERBOURN, Febs Letters 145 (1982) 137.
b) J.M.C. GUETTERIDGE, D. TOEG, Febs Letters 149 (1982) 228.
c) R. RICHMOND, B. HALLIWELL, J. INorg. Biochem. 17 (1982) 95.
d) H. NOHL, W. JORDAN, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114 (1983) 197.
65. a) B.H.J. BIELSKI, R.L. ARUDI, M.W. SUTHERLAND, J. Biol. Chem. 258
(1983) 4759.
b) J.M. GEBICKI, B.H.J. BIELSKI, J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 7020.
66. W.A. PRYOR, In "Free Radicals in Biology" Vol. I (1976) pp. 1-43.
(W.A. PRYOR, Ed) Academic Press, N.Y.

67. T.G. GABIG, J. Biol. Chem. 258 (1962) 6352.
68. N. SUTTROP, L.M. SIMON, J. Clin. Invest. 70 (1982) 342.
69. D.P. JONES, In "Oxidative Stress" (1985) p. 151, edited by H. SIES, Academic Press, London.
70. B.L. HORECKER, L.A. HEPPEL, J. Biol. Chem. 178 (1949) 683-690.
71. J.M. Mc CORD, I. FRIDOVICH, J. Biol. Chem. 243 (1968) 5753.
72. B. HALLIWEL, Febs Letters 92 (1978) 321.
-
73. I.R. GILLETTE, B.B. BRODIE, B.N. LA DU, J. Pharmacol. Exp. Ther. 119 (1957) 532.
74. G.M. BARTOLI, T. GAELFOTTI, G. PALOMBINI, G. PARISI, A. AZZI, Arch. Biochem. Biophys. 184 (1977) 276.
75. B. BOSTERLING, I.R. TRUDELL, Biochem. Biophys. Res. Commun. 98 (1981) 569.
76. T.A. GOVER, L.H. PIETTE, Arch. Biochem. Biophys. 212 (1981) 105.
77. J. BLANCK, G. SMETTAN, S. GRESCHNER, In "Cytochrome P 450" (1984) p. 11, edited by K. RUCKPAUL, H. REIN, Akademie-Verlag, Berlin.
78. a) H.P. MISTRA, I. FRIDOVICH, J. Biol. Chem. 247 (1972) 6960.
- b) R. WEVER, B. OUDEGA, B.F. VANGELDER, Biochim. Biophys. Acta 302 (1973) 475.
- c) M. BRUNORI, G. SALCIONI, E. FIORETTI, B. GIARDINA, G. ROTILLO, Eur. J. Biochem. 53 (1975) 99.

- d) B. GOLDBERG, A. STERN, I. PEISACH, J. Biol. Chem. 251 (1976) 3045.
79. M.C. BERMAN, C.M. ADNAMS, K.M. IVANETICH, J.E. KENCH, Biochem. J. 157 (1976) 237.
80. a) A. BOVERIS, E. CADENAS, A.O.M. STOPANI, Biochem. J. 156 (1976) 435.
b) I.F. TURRENS, B.A. FREEMAN, J.G. LEVITT, J.D. CRAPO, Arch. Biochem. Biophys. 217 (1982) 401.
81. D. CHIU, B. LUBIN, S.B. SHOHET, In "Free Radicals in Biology" Vol. V (1982) 115 (W.A. PRYOR, ed.) N.Y.
82. R.W. CARREL, C.C. WINTERBOURNE, E.A. RACHMILEWITZ, Br. J. Haematol. 30 (1975) 259.
83. A. BOVERIS, B. CHANCE, Biochem. J. 134 (1973) 707.
84. G. LOSCHEN, A. AZZI, C. RICHTER, L. FLOHE, Febs Letters 42 (1974) 68.
85. E. CADENAS, A. BOVERIS, Biochem. J. 188 (1980) 31.
86. A.L. TAPPEL, Fed. Proc. 32 (1973) 1870.
87. a) W.A. PRYOR, Fed. Proc. 32 (1973) 1862.
b) W.A. PRYOR, In "Free Radicals in Biology" Vol. I. (1976) pp. 1-43 (W.A. PRYOR, Ed.) N.Y.
88. a) A.J. PAINE, Biochem. Pharmacol. 27 (1978) 1805.
b) H. SIES, In "Oxidative Stress" 1985, p. 1, edited by H. SIES, Academic Press, N.Y.

89. a) V.L. KUBIC, M.W. ANDERS, Chem. Biol. Interact. 34 (1981) 201.
b) R.O. RECKNAGEL, E.A. GLENDE, C.R.C. Critical Reviews in Toxicology 2 (1973) 263.
90. K. FONG, P.B. Mc CAY, J.L. POYER, B.B. KEELE, H.P. MISTRA, J. Biol. Chem. 248 (1973) 7792.
91. H. KAPPUS, In "Oxidative Stress" (1985) pp. 273-303 (H. SIES, Ed.) N.Y.
92. J.M. Mc CORD, I. FRIDOVICH, J. Biol. Chem., 244 (1969) 6049.
93. J.R. BUCHER, M. TIEN, S.D. AUST, Biochem. Biophys. Res. Commun. 111 (1983) 777.
94. K.L. FONG, P.B. Mc CAY, J.L. POYER, H.P. MISTRA, B.B. KEELE, Chem. Biol. Interact. 15 (1976) 77.
95. H. KAPPUS, H. SIES, Experientia 18 (1981) 1233.
96. a) J.J. HJELLE, D.R. PETERSON, Toxicol. Appl. Pharmacol. 70 (1983) 57.
b) J.M. SIU, H.H. DRAPER, Lipids 17 (1982) 349.
97. C.A. RIELY, G. COHEN, M. LIEBERMAN, Science 183 (1974) 208.
98. U. KÖSTER, D. ALBRECHT, H. KAPPUS, Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, (1977) 656.
99. K.A. REDDY, R.E. LITOV, S.T. OMAJE, Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 17 (1977) 87.

100. J.S. BUS, S.D. AUST, J.E. GIBSON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58 (1975) 749.
101. L. FLOHE, IN "Free Radicals in Biology" (W.A. PRYOR, Ed.) Vol. V, pp. 223-253, Academic Press, N.Y.
102. A. GROSSMANN, A. WENDEL, *Eur. J. Biochem.* 135 (1983) 549.
103. a) R.F. BURK, *Biochim. Biophys. Acta* 757 (1983) 21.
b) F. URSINI, M. MAIORINO, M. VALENTE, L. FERRI, C. GREGOLIN, *Biochim. Biophys. Acta* 710 (1982) 197.
104. a) A. SEVANI, R.A. STEIN, J.F. MEAD, *Lipids* 16 (1981) 781.
b) A. SEVANI, S.F. MUAKKASSAH-KELLY, S. MONTESTRUQUE, *Arch. Biochem. Biophys.* 223 (1983) 441.
105. A. GROSSMANN, A. WENDEL, *Eur. J. Biochem.* 135 (1983) 549.
106. L. FLOHE, W.A. GÜNZLER, In "Glutathione : Metabolism and Function" Vol. 6 (1975) 17, edited by I. M. MARIAS, W.B. JAKOBY, Raven Press, N.Y.
107. C.S. FOOTE, R.W. DENNY, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 6233.
108. M. MATTHEWS, *Nature* 203 (1964) 1092.
109. a) T.F. SLATER, *Biochem. Soc. Trans.* 10 (1982) 70.
b) A.L. TAPPEL, In "Free Radicals in Biology" Vol. IV (1980) 1-45, W.A. PRYOR, ed, N.Y.

110. a) H.W. LEUNG, M.J. VANG, R.D. MAVIS, *Biochim. Biophys. Acta* 664 (1981) 266.
- b) J.E. PACKER, T.F. SLATER, R.L. WILLSON, *Nature* 278 (1979) 737.
111. C.C. REDDY, R.W. SCHOLZ, C.E. THOMAS, E.J. MASSARO, *Life Sci.* 31 (1982) 571.
112. a) N.S. KOSOWER, E.W. KOSOWER, *Int. Rev. Cytol.* 54 (1978) 109.
- b) P.C. JOCELYN "Biochemistry of the SH group" (1972) Academic Press, N.Y.
-
113. T.G. FORNI, R.L. WILLSON, In "Protective Agents in Cancer" (1983) 159-173, D.C.H. Mc BRIEN, T.F. SLATER, eds, Academic Press, N.Y. London.
114. H. WEFERS, H. SIES, *Eur. J. Biochem.* 137 (1983) 29.
115. G.R.M.M. HAENEN, A. BAST, *Febs Letters* 159 (1983) 24.
116. G.G. ROUSER, J. NELSON, S. FLEISER, G. SIMON, In "Biological Membranes" (1968) p. 5 Academic Press, N.Y.
117. S. YAMASHOJI, G. KAJIMOTO, *Febs Letters*, 152 (1983) 168.
118. L. FLOHE, W.A. GÜNZLER, R. LADENSTEIN, In "Glutathione, Metabolism and Function" Vol. 6 (1975) p. 115, edited by I.M. ARIAS, W.B. JAKOBY, Raven Press, N.Y.
119. L. MICHAELIS, E.S. HILL, *J. Am. Chem. Soc.* 55 (1933) 1481.
120. R.F. HOMER, G.C. MEES, T.E. TOMLINSON, *J. Sci. Food. Agric.* 11 (1960) 309.

121. G.C. MEES, *Ann. Appl. Biol.* 48 (1960) 601.
122. a) J.A. FARRINGTON, M. EBERT, E.J. LAND, K. FLETCHER, *Biochim. Biophys. Acta* 314 (1973) 372.
- b) J.R. HARBOUR, J.R. BOLTON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64 (1975) 803.
123. M.S. ROSE, L.L. SMITH, I. WYATT, *Nature* 252 (1974) 314.
124. A.P. AUTOR, *Life Sci.* 14 (1974) 1309.
-
125. a) C. BULLIVANT, *Br. Med. J.* 1 (1966) 1272.
- b) P. SMITH, D. HEATH, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 4 (1976) 411.
126. R.P. MASON, J.L. HOLTZMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67 (1975) 1267.
127. a) P.B. Mc CAY, J.L. POYER, In "The Enzymes of Biological Membranes" (A. and R.M. PHILPOT, eds) p. 151, Elsevier/North-Holland, N.Y. 1979.
- b) T.F. SLATER, "Free Radical Mechanisms in Tissue Injury". Pion, London, 1972.
128. R. DOCAMPO, S.N.I. MORENO, In "Free Radicals in Biology" Vol. VI (1984) p. 243 (W.A. PRYOR, ed) N.Y.
129. a) G. POWIS, P.L. APPEL, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 2567.
- b) G. POWIS, B.A. SINGEN, P. APPEL, *Mol. Pharmacol.* 20 (1981) 387.
- c) H. THOR, M.T. SMITH, P. HARTZELL, G. BELLOMO, S.A. JEWELL, S. ORRENIUS, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12419.

130. R.G. YOUNG, R.F. OZOLS, C.E. MEYERS, *New. Engl. J. Med.* 305 (1981) 139.
131. A. AZZI, C. MONTECUCCO, C. RICHTER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56 (1975) 392.
132. a) I. YAMAZAKI, H.S. MASON, L. PIETTE, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2444.
b) R.P. MASON, In "Free Radicals in Biology" Vol. V (1982), 161, edited by W.A. PRYOR, Academic Press, N.Y.
133. a) M.W. ANDERS (1982). In "Metabolic Basis of Detoxication", edited by W.B. JAKOBY, J.R. BEND, J. CALDWELL (New York, Academic Press).
b) M.W. ANDERS (1984). In "Drug Metabolism and Drug Toxicity", edited by J.R. MITCHELL, M.G. HORNING, Raven Press, N.Y.
134. A. BINI, G. VECCHI, G. VIVOLI, V. VANNINI, C. CESSI, *Pharmacol. Res. Commun.* 7 (1975) 143.
135. P.B. Mc CAY, E.K. LAI, J.L. POYER, C.M. DUBOSE, E.G. JANZEN, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 2135.
136. a) J.R. TRUDELL, B. BÖSTERLING, A.J. TREVOR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2678.
b) J.R. TRUDELL, B. BÖSTERLING, A.J. TREVOR, *Molec. Pharmacol.* 21 (1982) 710.
137. L.G. FORNI, J.E. PACKER, T.F. SLATER, R.L. WILLSON, *Chem. Biol. Interac.* 45 (1983) 171.
138. M.W. ANDERS, J.C. ENGLISH, In "Microsomes and Drug Oxidations" 1984, p. 274, edited by A.R. BOOBIS, J. CALDWELL, F. DE MATTEIS and G.R. ELCOMBE, London.

139. a) D.G.D. DAVIDSON, W.N. EASTMAN, Br. Med. J. 2 (1966) 497.
b) E.M. BOYED, G.M. BERECZKY, Br. J. Pharmac. Chem. Ther. 26 (1966) 606.
140. A. WENDEL, S. FEUERSTEIN, V.H. KONG, Biochem. Pharmacol. 28 (1979) 2051.
141. a) J.R. MITCHELL, D.J. JOLLOW, J.R. GILLETTE, B.B. BRODIE, Drug. Metab. Dispos. 1 (1973) 418.
b) J.R. MITCHELL, D.J. JOLLOW, W.Z. POTTER, D.C. DAVIS, J.R. GILLETTE, B.B. BRODIE, J. Pharmac. Exp. Ther. 187 (1973) 185.
142. J.A. HINSON, T.J. MONKS, M. HONG, R.J. HIGHET, L.R. PHOL, Drug. Metab. Dispos. 10 (1982) 47.
143. W.Z. POTTER, S.S. THORGEIRSSON, D.J. JOLLOW, J.R. MITCHELL, Pharmacology 12 (1974) 129.
144. a) J.R. MITCHELL, S.S. THORGEIRSSON, W.Z. POTTER, D.J. JOLLOW, H. KEISER, Clin. Pharmacol. Ther. 16 (1974) 676.
b) J.E. MROCHECK, S. KATZ, W.H. CHRISTIE, S.R. DINSMORE, Clin. Chem. 20 (1974) 1086.
c) R. JAGENBURG, A. NAGY, S. RÖDJER, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22 (1968) 11.
145. a) J.R. MITCHELL, D.J. JOLLOW, W.Z. POTTER, J.R. GILLETTE, B.B. BRODIE, J. Pharmacol. Exp. Ther. 187 (1973) 211.
146. P. MOLDEUS, B. JERNSTROM, In "Functions of Glutathione : Biochemical, Physiological and Clinical Aspects" Edited by A. Larson et al. Raven Press, N.Y. (1983) p. 99.

147. G.M. ROSEN, W.V. SINGLETARY, Jr., E.J. RAUCKMAN, P.G. KILLENBERG, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2053.
148. a) M.T.O. GEMBORYS, G.W. GRIBBLE, G.H. MUDJE, *J. Med. Chem.* 21 (1978) 649.
- b) K. HEALEY, I.C. CALDER, A.C. YONG, C.A. CROWE, C.C. FUNDER, K.N. HAM, J.D. TANG, *Xenobiotica* 8 (1978) 403.
149. A. WENDEL, S. HEIDINGER, *Res. Commun. Chem. Pathol.* 28 (1980) 473.
150. D.C. DAH LIN, S.D. NELSON, *J. Med. Chem.* 25 (1982) 885.
151. a) D.J. MINER, P.T. KISSINGER, *Biochem. Pharmacol.* 28 (1979) 3285.
- b) J.A. HOLME, D.C. DAHLIN, S.D. NELSON, E. DYBING, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 401.
- c) G. POWIS, B.A. SVINGEN, D.C. DAHLIN, S.D. NELSON, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 2367.
152. H.B. DEMOPOULOS, *The Basis of Free Radicals Pathology*, *Fed. Proc.* 32 (1973) 1859.
153. A.L. TAPPEL, *Fed. Proc.* 24 (1965) 73.
154. K.S. CHIO, A.L. TAPPEL, *Biochemistry* 8 (1969) 2827.
155. G.G. ROUSER, J. NELSON, S. FLEISHER, G. SIMON, In "Biological Membranes" (1968) p. 5, D. CHAPMAN (ed), Academic Press, N.Y.
156. a) K. FONG, P.B. Mc CAY, J.L. POYER, B.B. KEELE, H. MISTRA, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 1792.

- b) E.D. WILLS, A.E. WILKINSON, *Biochem. J.* 99 (1966) 657.
157. R.J. SHAMBERGER, T.L. ANDERONE, C.E. WILLIS, *J. Natl. Canc. Inst.* 53 (1974) 1771.
158. F.H. MUKAI, B.D. GOLDSTEIN, *Science*, 191 (1976) 868.
159. B. BOTTCHEER, *Chem. Ber.* 81 (1948) 376.
160. L.F. FIESER, M. FIESER, dans "Reagents for Organic Synthesis" Vol. 1 (1967) 964, edited by J. WILEY and SONS, Inc, N.Y.
161. C. MALVY, C. PAOLETTI, A.J.F. SEARLE, R.L. WILLSON, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 734.
162. J.G. FILSER, H.M. BLOT, H. MULIWAN, H. KAPPUS, *Arch. Toxicol.* 52 (1983) 135.
163. I.R. MITCHELL, J.A. HINSON, S.D. NELSON, In "Glutathione : Metabolism and Function" Vol. VI (1975) 357, edited by I.M. ARIAS, W.S. JAKOBY Raven Press, N.Y.
164. T. YOSHIKAWA, Y. FURUKAWA, Y. WAKAMATS, M. KONDO, *Biomedicine* 35 (1981) 208.
165. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R. RANDALL, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.

)

)

)

)

RESUME

Le but des travaux exposés dans cette thèse était, d'une part, l'étude du métabolisme de l'Anisyldithiolthione, d'autre part, l'étude de la corrélation entre les effets antioxydants, les effets vis à vis de la peroxydation des lipides et les effets hépatoprotecteurs des dérivés de l'Anisyldithiolthione.

MOTS CLES

Anisyldithiolthione ; Métabolisme ; Cytochromes P-450 ; Peroxydation des lipides ; Ethane ; Malondialdéhydes ; Effets antioxydants ; Effets hépatoprotecteurs ; Radicaux libres .

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT :

Laboratoire de Biochimie, Centre Pharmaceutique de Chatenay.