



**HAL**  
open science

# Oxydation hépatique des dérivés du thiophene : enzymes impliquées et réactions biomimétiques

Elisabeth Neau

## ► To cite this version:

Elisabeth Neau. Oxydation hépatique des dérivés du thiophene : enzymes impliquées et réactions biomimétiques. Chimie. Université René Descartes - Paris V, 1989. Français. NNT: . tel-01529447v2

**HAL Id: tel-01529447**

**<https://hal.science/tel-01529447v2>**

Submitted on 18 Jul 2017

**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.



# Oxydation hépatique des dérivés du thiophene : enzymes impliquées et réactions biomimétiques

Elisabeth Neau

► **To cite this version:**

Elisabeth Neau. Oxydation hépatique des dérivés du thiophene : enzymes impliquées et réactions biomimétiques. Chimie. Université René Descartes - Paris V, 1989. Français.

**HAL Id: tel-01529447**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01529447>**

Submitted on 30 May 2017

**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 RENE DESCARTES  
UNITE D'ENSEIGNEMENT & DE RECHERCHE  
EN BIOLOGIE HUMAINE & EXPERIMENTALE

Année : 1989

Pharmacie : Série n°

**THESE DE DOCTORAT**  
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

SPECIALITE : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

PRESENTEE PAR

Elizabeth NEAU

OXYDATION HEPATIQUE DES DERIVES DU THIOPHENE :  
ENZYMES IMPLIQUEES ET REACTIONS BIOMIMETIQUES

Soutenu le 7 Septembre 1989.

Jury : Mr. Bernard-Pierre ROQUES  
Mlle. Andrée MARQUET  
Mr. Jean-Paul LEROUX  
Mr. Daniel MANSUY  
Mr. Roland WOLF

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Membre invité

## RESUME

Une technique simple de détection et de suivi cinétique de l'hydroxylation en position 5 des aryl-2 thiophènes par les microsomes hépatiques de rats et d'hommes a été mise au point. Elle a permis de montrer la généralité de cette voie d'oxydation métabolique des dérivés du thiophène comportant un substituant COAr en position 2. L'oxydation de 4 composés de ce type, dont 2 médicaments, l'acide tiénilique (AT) et le suprofen (SU) par des microsomes hépatiques de rats différemment traités a été étudiée. Plus particulièrement dans le cas de l'hydroxylation en 5 de l'AT, la participation majoritaire des monooxygénases à cytochromes P-450 a été démontrée. Puis la nature des cytochromes P-450 impliqués a été étudiée : en comparant diverses inductions, en utilisant des anticorps spécifiques et en reconstituant l'activité à partir de cytochromes P-450 purifiés. Cette activité est majoritairement dépendante du P-450 PB 2a (P-450 UTA) dans les microsomes de foie de rats témoins, d'au moins 2 cytochromes P-450 dans les microsomes de foie induits par le phénobarbital. Cette activité est très fortement augmentée dans les microsomes de rats induits par le clofibrate et dépend d'une forme qui n'a pu être caractérisée. L'utilisation de systèmes modèles des P-450 utilisant les métalloporphyrines de Mn a permis de reproduire les hydroxylation de l'AT et du SU.

*Pour la partie biomimétique de cette thèse, je tiens à remercier Madame Pierrette BATTIONI, Directeur de Recherche au CNRS, pour l'attention constante qu'elle a portée à ce travail ainsi que pour l'accueil qui a été réservé à mes multiples requêtes par toute son équipe.*

*Que tous mes compagnons de l'UA 400 qui m'ont aidée et ont contribué à établir le climat chaleureux qui a entouré ce travail en soient remerciés. En particulier : Isabelle ARTHAUD , Jean-Paul BATTIONI, Jean-Pierre LALLIER et pour le 142 : Claudine AMAR, Marcel DELAFORGE, Marie-Elise JAQUEN, Eric SARTORI et Amor SASSI.*

*Je veux terminer en remerciant Marie-France BOUCHER pour avoir mené à bien la dactylographie du manuscrit. Sa patience et ses encouragements ont constitué un appui inestimable pour la réalisation de la dernière étape de ce travail.*

*Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de l'Université René Descartes (UA 400 CNRS) sous la direction de Monsieur D. MANSUY.*

*Que Monsieur D. MANSUY veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour l'attention qu'il a portée à ces recherches et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ce travail.*

*Je remercie Mademoiselle A. MARQUET, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Messieurs B.P. ROQUES et J.P. LEROUX, Professeurs à l'Université René Descartes, pour avoir bien voulu faire partie du jury de cette thèse.*

*Je remercie vivement Monsieur le Professeur R. WOLF, Directeur du Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et de Métabolisme des Xénobiotiques d'Edimbourg pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour les précieux échantillons qu'il a bien voulu mettre à ma disposition, et pour sa participation au jury de cette thèse. Sans sa cordiale collaboration, ce travail n'aurait pas connu les mêmes développements.*

*Je tiens à remercier Monsieur P. DANSETTE, Directeur de Recherche au CNRS, qui m'a guidée avec une constante gentillesse et disponibilité au cours de ces années. Ses compétences dans les domaines les plus variés et son enthousiasme à les faire partager ont été pour moi une grande source d'enrichissement.*

*Je remercie Evelyne ROUER, Maître de Recherches CNRS, Jean Luc BOUCHER, Maître de Recherches CNRS et Catherine PONS pour leur contribution à ce travail. Je souhaite dire ici tout le plaisir et l'intérêt que j'ai eu à travailler avec eux.*

# SOMMAIRE

## CHAPITRE I : INTRODUCTION

<b>I-A Présentation générale des cytochromes P-450</b>	4
I-A-1 Historique	4
I-A-2 Définition	5
I-A-3 Structure	8
I-A-4 Cycle catalytique	8
I-A-5 Réactions catalysées	11
I-A-6 Localisation	11
<b>I-B Induction des cytochromes P-450</b>	12
I-B-1 Inducteurs et isoenzymes des cytochromes P-450 chez l'animal	14
I-B-2 Induction des cytochromes P-450 responsables du métabolisme des xénobiotiques chez l'homme	19
<b>I-C Phénomènes toxiques dus à l'action des cytochromes P-450</b>	24
I-C-1 Hépatotoxicité	24
I-C-2 Cas de l'acide tiénilique (AT)	26
I-C-2-1 Métabolisme <i>in vivo</i>	26
I-C-2-2 Métabolisme <i>in vitro</i>	27
I-C-2-3 Les étapes du mécanisme de toxicité à l'AT	29
<b>I-D Métabolismes de dérivés thiophéniques</b>	33
I-D-1 Le thiophène	33
I-D-2 Le suprofen	34
I-D-3 Thiophènes substitués	36
<b>I-E Motivations et objectifs du travail</b>	40

<b>II-B Hydroxylation des aroyl-2 thiophènes par les microsomes hépatiques de rats</b>	71
II-B-1 Propriétés physicochimiques comparées des hydroxy-5 aroyl-2 thiophènes	71
II-B-1-a Principales méthodes de synthèse des hydroxythiophènes	72
II-B-1-b Synthèse du 50HCBT et du 50HMBT	76
II-B-1-c Principales caractéristiques physicochimiques des différents aroyl-2 thiophènes et de leurs dérivés hydroxylés en 5	78
II-B-2 Hydroxylation du suprofen et d'autres aroyl-2 thiophènes par les microsomes hépatiques de rats	81
II-B-2-a Détermination des $k_m$ et $V_m$ apparentes de l'hydroxylation en 5 de ces composés par les microsomes de rats traités par le phénobarbital	81
II-B-2-b Effet de l'induction sur l'hydroxylation en 5 des aroyl-2 thiophènes étudiés	82
II-B-3 Etude qualitative de l'hydroxylation d'autres dérivés thiophéniques par les microsomes hépatiques de rats (PB)	88
II-B-3-a Cas des aroyl-2 thiophènes	88
II-B-3-b Cas d'autres dérivés thiophéniques.	88

### **CHAPITRE III CARACTERISATION DES ISOENZYMES HEPATIQUES DE RATS IMPLIQUEES DANS L'HYDROXYLATION DE L'ACIDE TIENILIQUE**

<b>III-A Introduction</b>	94
III-A-1 Caractérisation du ou des cytochromes P-450 induits par le clofibrate	94
III-A-2 Les inducteurs type clofibrate	96
III-A-3 Les modalités de l'induction	97
<b>III-B Effet des inducteurs type clofibrate sur l'hydroxylation de l'AT par les microsomes de foies de rats</b>	100
III-B-1 Paramètres cinétiques ( $K_m$ $V_m$ ) comparés de l'hydroxylation de l'AT par des microsomes de foies de rats témoins et traités par le clofibrate	100
III-B-2 Effet du mode d'administration du clofibrate sur l'effet inducteur de l'hydroxylation de l'AT	104

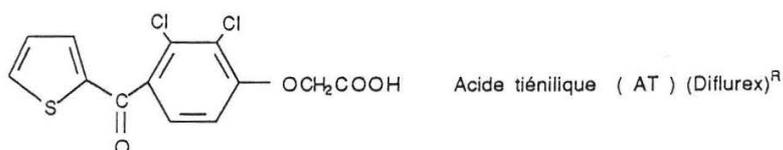
microsomes hépatiques humains par les anti-LKM <sub>2</sub>	143
III-C-5-b Effet des sérums humains contenant des anti-LKM <sub>2</sub> sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats.	143

## **CHAPITRE IV : OXYDATION BIOMIMETIQUE DE DIVERS THIOPHENES PAR DES SYSTEMES METALLOPORPHYRINIQUES MODELES DES CYTOCHROMES P-450**

<b>IV-A INTRODUCTION</b>	150
IV-A-1 Oxydation des noyaux aromatiques par le cytochrome P-450	150
IV-A-2 Modélisation des monooxygénases à cytochromes P-450 en utilisant des métalloporphyrines	151
IV-A-2-a Systèmes modèles métalloporphyrine P(M)/réducteur/O <sub>2</sub>	153
IV-A-2-b Systèmes modélisant le cycle court : métalloporphyrine P(M)/donneur d'atome d'oxygène (AO)	153
IV-A-2-b-1 AO = PhIO	154
IV-A-2-b-2 AO = NaOCl	155
IV-A-2-b-3 AO = ROOH	157
IV-A-2-b-4 AO = H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	157
IV-A-3 Oxydation du noyau aromatique par les métalloporphyrines	158
<b>IV-B Oxydation de l'acide tiénilique catalysée par les métalloporphyrines</b>	160
IV-B-1 Etude par CLHP de l'oxydation de AT par C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> IO catalysée par les métalloporphyrines	161
IV-B-1-a Conditions expérimentales	161
IV-B-1-b Détection	161
IV-B-1-c Quantification	161

<b>V-D Méthode d'études de l'oxydation métabolique des dérivés thiophéniques</b>	192
V-D-1 Origine des dérivés utilisés comme substrat	
V-D-2 Méthode de suivi cinétique en UV de la formation des hydroxy-5 acyl-2 thiophènes au sein d'une solution microsomale ou d'une solution de système enzymatique purifié reconstitué	
V-D-3 Méthode de détection par CLHP de la formation du 5OHAT à partir d'AT marqué au <sup>14</sup> C, au sein d'une solution microsomale	
V-D-4 Méthode de détection par CLHP de l'hydroxylation en 11 et 12 de l'AL à partir d'AL marqué, au sein d'une solution microsomale	
<b>V-E Protocoles utilisés pour inhiber l'activité AT hydroxylase</b>	196
V-E-1 Effet des inhibiteurs	
V-E-1-a CO	
V-E-1-b Inhibiteurs classiques	
V-E-1-c Inhibition par l'AL	
V-E-2 Effet des anticorps	
V-E-2-a Anticorps anti-flavine monooxygénase	
V-E-2-b Anticorps anti-cytochrome P-450 réductase	
V-E-2-c Anticorps et sérums anti-cytochromes P-450 hépatiques de rats	
V-E-2-d Sérum humain contenant les anti-LKM <sub>2</sub>	
<b>V-F Reconstitution des systèmes enzymatiques purifiés</b>	198
V-F-1 Reconstitution du système des flavines monooxygénases	
V-F-2 Reconstitution du système des monooxygénases à cytochromes P-450	
<b>V-G Oxydation de divers thiophènes par les systèmes modèles des cytochromes P-450 à métalloporphyrines</b>	199
V-G-1 Les produits utilisés	
V-G-1-a les métalloporphyrines	
V-G-1-b l'oxydant	
V-G-1-c les substrats	
V-G-2 Etude par CLHP de l'oxydation de l'AT par C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> IO catalysée	

L'acide tiénilique (AT) (Diflurex)<sup>R</sup> est un composé diurétique et uricosurique mis sur le marché en 1976 par les laboratoires Anphar-Rolland et proposé dans le traitement de l'hypertension.



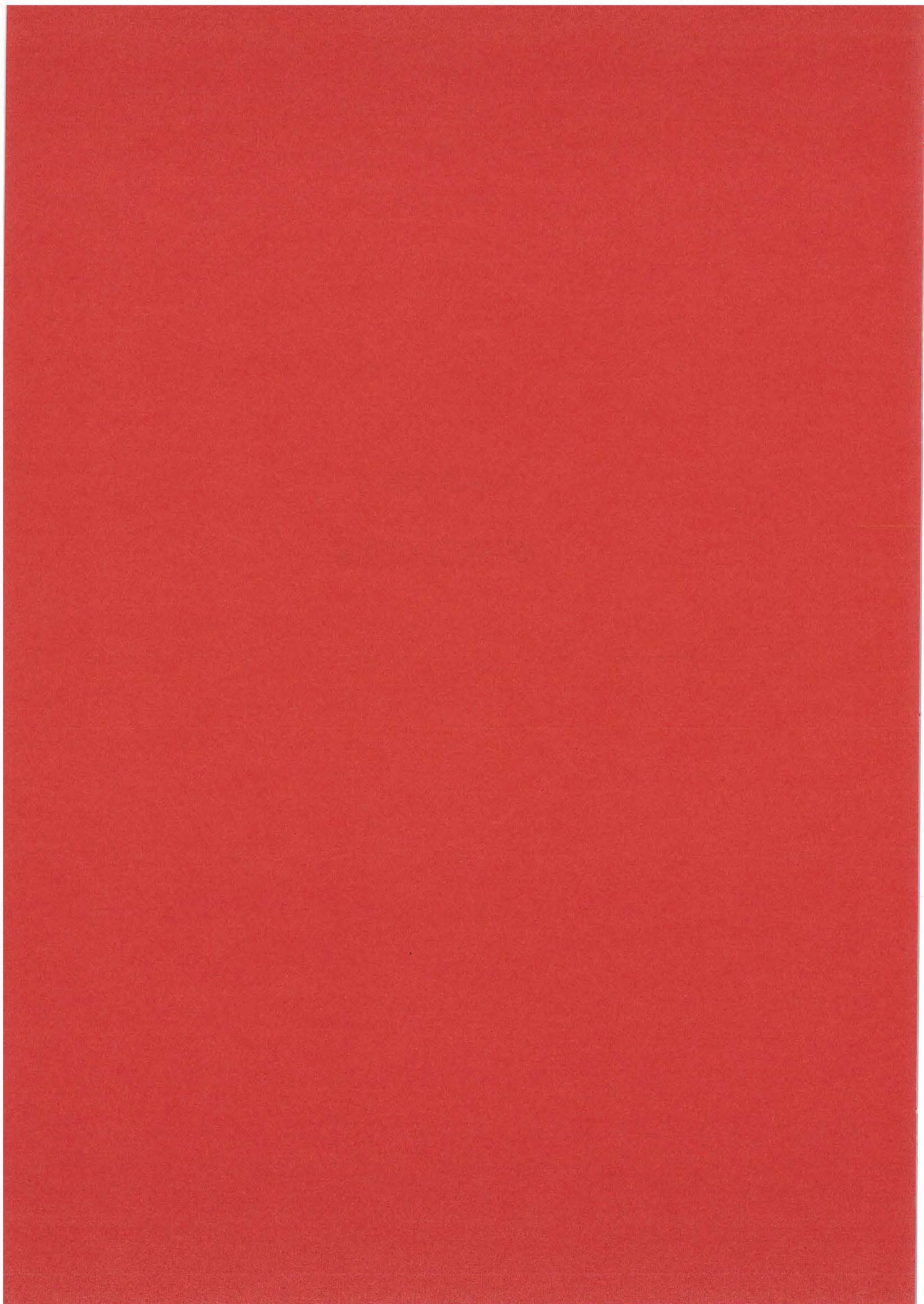
Ce dérivé thiophénique bien que n'ayant démontré aucune toxicité sur les différents modèles animaux utilisés classiquement pour l'établissement des dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché a conduit chez l'homme à certains effets secondaires d'hépatotoxicité.

Certains patients traités, (environ 1 cas sur 10000) ont développé des hépatites d'origines immuno-allergiques. Ces hépatites ont entraîné le retrait de l'AT du marché américain par la "Food and Drug Administration". En France, en raison de l'intérêt thérapeutique que présente l'acide tiénilique -il s'agit d'un des meilleurs uricosuriques- sa commercialisation a été maintenue mais placée en 1980 sous une étroite surveillance du système de pharmacovigilance. L'information pratiquée sur les précautions d'emploi indispensables a permis d'éliminer presque totalement les accidents graves consécutifs à la prise d'acide tiénilique.

Les différentes étapes qui conduisent à l'apparition d'hépatites de type auto-immunes avec certains composés sont très mal connues. De plus il n'existe pas de modèles animaux prédictifs. Un programme de recherche important pour comprendre les mécanismes de cette toxicité est en cours.

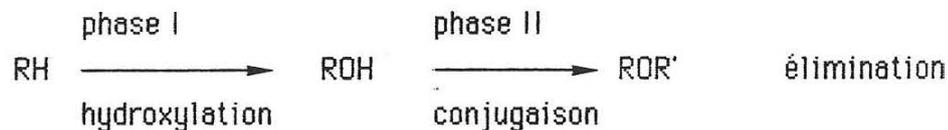
A l'origine, se trouve la mise en évidence par le Professeur Homberg (Hôpital St. Antoine), dans le sérum de patients traités à l'AT et ayant fait un accident hépatique, d'anticorps dirigés contre une structure de l'hépatocyte, le réticulum endoplasmique (1). En 1985, en collaboration avec l'équipe du Professeur Leroux (CHU Necker), il a été montré au laboratoire que ces anticorps étaient dirigés contre une enzyme hépatique, un **cytochrome P-450** (2).

CHAPITRE I  
INTRODUCTION



## I-A PRESENTATION GENERALE DES CYTOCHROMES P-450

De nombreuses substances de notre environnement (exogènes), en particulier la plupart des médicaments, sont trop hydrophobes pour être facilement éliminés par l'organisme. Pratiquement tous les êtres vivants disposent de systèmes enzymatiques de détoxification capables de transformer ces exogènes en métabolites plus hydrophiles, donc plus faciles à éliminer. Le processus global d'élimination peut être schématisé ainsi :



Lors de la phase I, des monooxygénases fonctionnalisent le composé à éliminer (généralement en l'hydroxylant). Dans la quasi-totalité des cas, la réaction est catalysée par des cytochromes P-450. Lors de la phase II, des enzymes dites de conjugaison rendent le métabolite encore plus hydrosoluble en le couplant à des radicaux hydrophiles (3).

De l'action de ces deux systèmes dépendent la métabolisation, la vitesse d'élimination et donc la durée de l'effet thérapeutique d'un médicament.

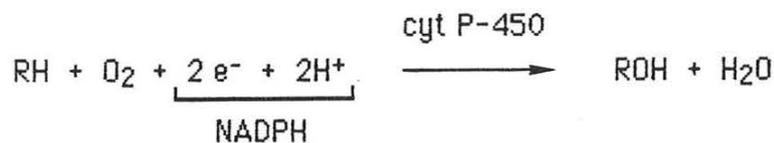
### I-A-1 Historique

Entre 1940 et 1950, Mueller et Miller étudient la déméthylation oxydative du diméthyl-azobenzène en présence d'homogénats de foie (4,5). En utilisant la même préparation Brodie et coll. (6) examinent quelques années plus tard le métabolisme oxydatif de différents médicaments. Ce n'est qu'en 1958 que Klingenberg (7) et Garfinkel (8) notent la présence d'un pigment fixant le monoxyde de carbone dans les microsomes de foies de mammifères. Ces microsomes réduits et traités par le CO absorbent aux environs de 450 nm, contrairement aux complexes formés entre le CO et d'autres hémoprotéines qui présentent une bande de Soret à 420 nm. En 1964, Omura et Sato (9) démontrent que ce pigment hépatique est effectivement une hémoprotéine qui est dénommée cytochrome P-450.

### 1-A-2 Définition

Les cytochromes P-450 sont les constituants majeurs des systèmes multienzymatiques, les monooxygénases qui, en activant l'oxygène moléculaire sont capables d'incorporer un seul des deux atomes d'oxygène au niveau d'un substrat.

Le bilan de l'oxydation d'un substrat RH catalysée par une monooxygénase est le suivant :



Les cytochromes P-450 sont présents au sein d'espèces variées, à différents stades de l'évolution : chez les microorganismes (bactéries et levures), les plantes, les animaux (poissons, oiseaux, mammifères....). Au sein de l'organisme des mammifères, les cytochromes P-450 remplissent de nombreuses fonctions endogènes et exogènes qui sont résumées dans la figure 1. Nous nous limiterons à l'étude des cytochromes P-450 impliqués dans le métabolisme oxydatif des xénobiotiques.

Pour fonctionner, ces monooxygénases nécessitent la présence de quatre éléments :

- un cytochrome P-450
- un donneur d'électrons, généralement le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH)
- une flavoprotéine, la NADPH-cytochrome P-450 réductase, qui assure le transfert au cytochrome P-450 des électrons provenant du NADPH. Elle contient une mole de flavine adénine dinucléotide (FAD) et une mole de flavine mononucléotide (FMN) par mole d'apoprotéine. La participation des cytochromes P-450 à une réaction enzymatique est fréquemment évaluée en utilisant des anticorps dirigés contre cette flavoprotéine qui par reconnaissance antigène anticorps, inhibent totalement ou en partie le fonctionnement de l'enzyme
- des lipides.

L'ensemble est présenté figure 2.

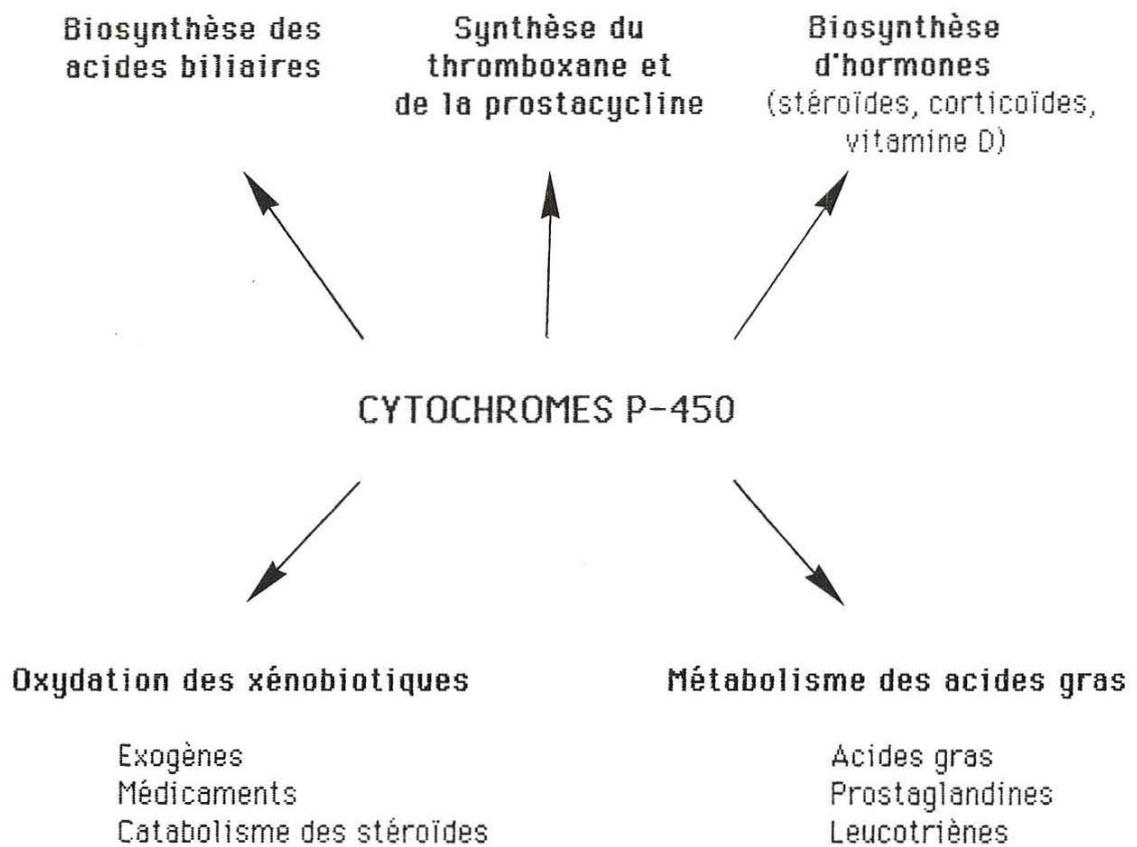


FIGURE 1. Fonctions des cytochromes P-450 de mammifères (d'après (10)).

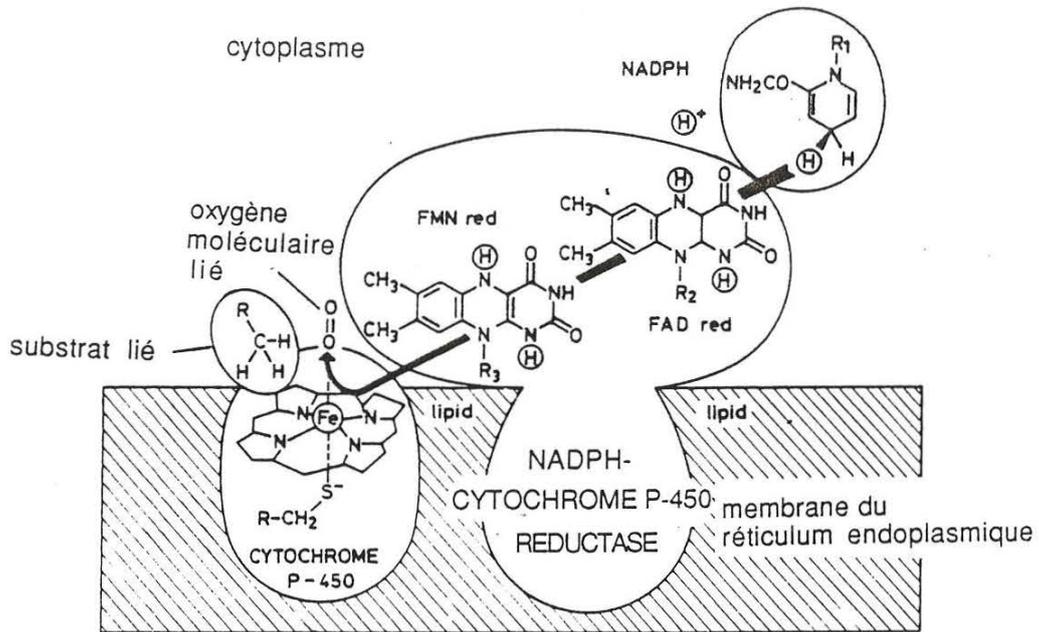


FIGURE 2. Transport d'électrons du NADPH au cytochrome P-450 (d'après (11)).

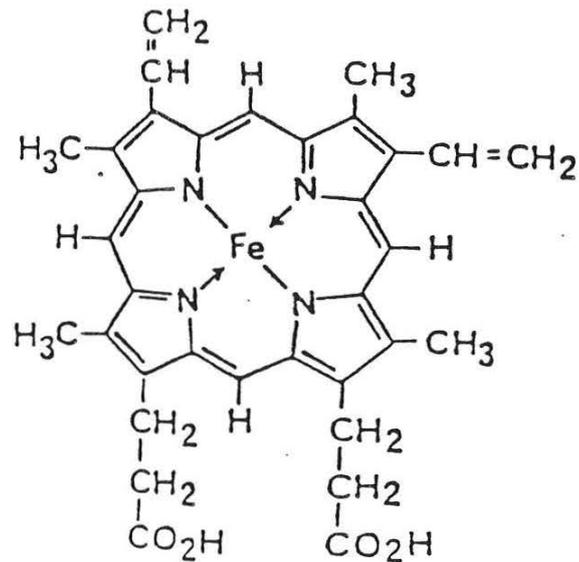


FIGURE 3. Structure de la protoporphyrine IX de fer (d'après (12)).

### 1-A-3 Structure

Il existe une très grande analogie structurale dans cette famille d'enzymes.

- L'hème des cytochromes P-450 est constitué d'une protoporphyrine IX de fer (fig.3) où le fer est coordiné :

- . aux quatre azotes pyrroliques de la protoporphyrine
- . à un cinquième ligand, cystéinate, assurant la liaison avec l'apoprotéine.

Un sixième ligand coordine le fer.

Dans le cas du cytochrome microbien extrait de *Pseudomonas Putida*, le cytochrome P-450 cam, la nature de ce ligand a pu être déterminée par cristallographie aux rayons X (RX) (13). Il s'agit d'une molécule d'eau (ou ROH). A ce jour, le cytochrome P-450 cam est le seul qui ait pu être étudié à l'état cristallisé aux RX, seul et en présence de son substrat, le camphre. Toutefois l'ensemble des techniques spectroscopiques montrent que le fer est coordiné de la même façon dans la plupart des autres cas.

- La partie protéique est constituée d'une chaîne polypeptidique unique de poids moléculaire compris entre 40 000 et 60 000 selon les cytochromes P-450. Dans le cas du cytochrome P-450 cam, deux régions se distinguent.

. Une première, relativement rigide, est constituée essentiellement d'hélices  $\alpha$ . Elle lie en particulier l'hème à travers le ligand cystéinate (cys 357). Les techniques prédictives de structure et d'alignement de séquences laissent prévoir une structure analogue avec d'autres cytochromes P-450.

. La deuxième région, beaucoup plus souple, comprend en particulier des feuillets  $\beta$ . Cette région assurerait la spécificité de chaque cytochrome P-450 (fig.4).

### 1-A-4 Cycle catalytique

La figure 5 présente une vue d'ensemble du cycle catalytique du cytochrome P-450 (12).

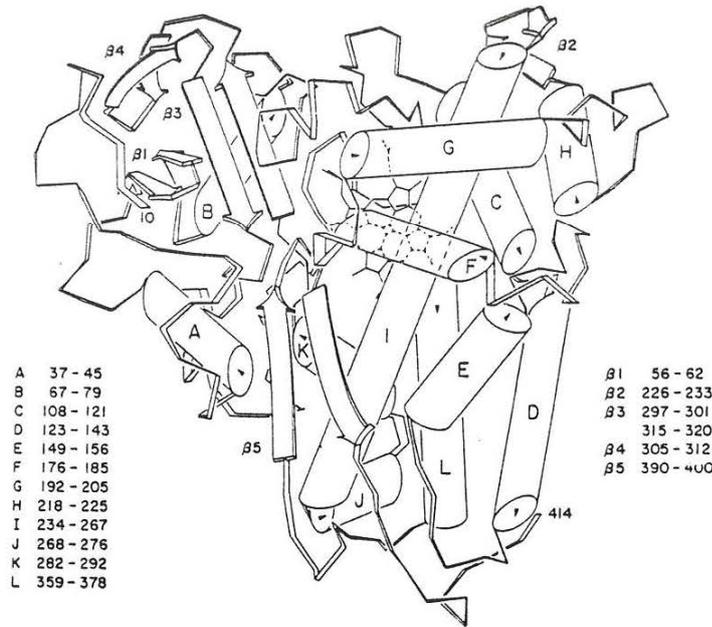


FIGURE 4. Représentation du P-450 cam d'après l'étude aux RX. Les hélices sont indiquées par des barres et les feuillets  $\beta$  par des flèches (d'après (14)).

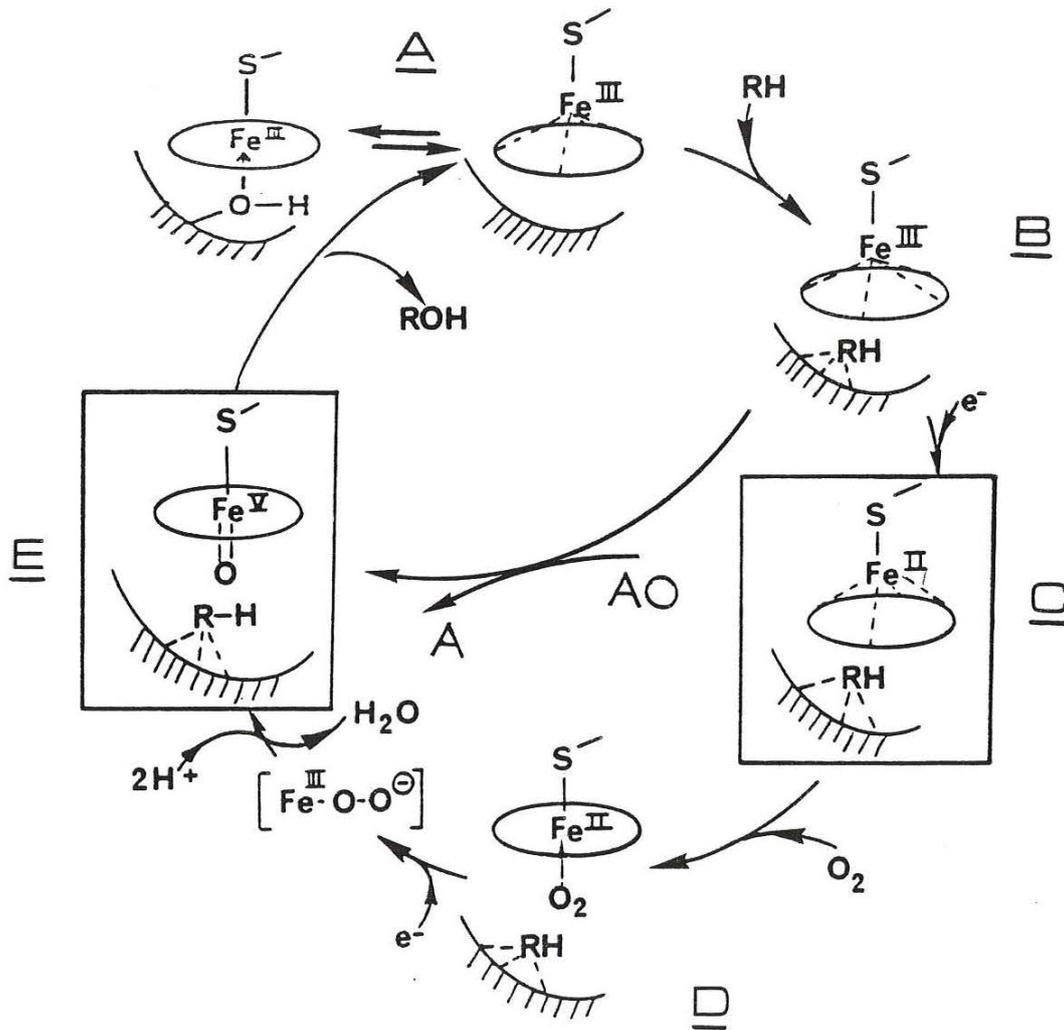


FIGURE 5 Cycle catalytique du cytochrome P-450 (d'après (12)).

Dans l'enzyme au repos, l'hème est un complexe hexacoordiné du fer au degré d'oxydation +III et à l'état de spin ( $S=1/2$ ) : c'est le complexe A.

Lors de la première étape du cycle catalytique, le substrat se fixe sur un site hydrophobe de la protéine. Il s'ensuit un changement conformationnel important de l'apoprotéine qui se répercute sur le complexe du fer qui passe à l'état complexé pentacoordiné B spin fort ( $S=5/2$ ). A ce niveau, les variations spectrales induites par le substrat RH permettent d'étudier par spectrophotométrie différentielle le type d'interaction du substrat avec le site actif du cytochrome P-450. Le potentiel redox du complexe B, supérieur d'environ 100 mV à celui du complexe A, permet l'arrivée du premier électron provenant du NADPH via la NADPH-cytochrome P-450 réductase. B est alors réduit au cours de cette deuxième étape du cycle catalytique en un complexe pentacoordiné du fer (II) ou complexe C.

La troisième étape est la fixation réversible de l'oxygène sur le site de coordination vacant du fer (II) formant ainsi un complexe oxygéné du fer D ou P-450 Fe<sup>II</sup> (O<sub>2</sub>).

L'arrivée d'un deuxième électron du NADPH conduit alors à l'entité active du cycle catalytique : un complexe oxo du fer à oxygène actif très instable E. Il semble actuellement admis que ce soit ce complexe à haut degré d'oxydation du fer qui transfère son atome d'oxygène sur le substrat. Le deuxième atome d'oxygène est éliminé sous forme d'H<sub>2</sub>O.

D'autre part, plusieurs travaux ont montré que les diverses oxydations catalysées par le cytochrome P-450 pouvaient être réalisées en remplaçant *in vitro* le système NADPH/O<sub>2</sub> par des agents oxydants "donneurs d'atome d'oxygène" (AO) comme par exemple des hydroperoxydes, ROOH, des peracides, RCOOH, des anions oxygénés (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, IO<sub>4</sub><sup>-</sup>) et des iodosoarènes ArIO (15).

Il existerait donc deux cycles catalytiques au cours duquel se forme la même entité active P-450 Fe<sup>V</sup> = O :

- l'un "court" utilisant *in vitro* un "donneur d'atome d'oxygène" en absence de NADPH/O<sub>2</sub>

- l'autre long, qui intervient *in vivo* (et également *in vitro*).

### **I-A-5 Réactions catalysées**

En raison de sa forte réactivité, le complexe à oxygène actif est l'un des oxydants les plus efficaces connus en chimie ou en biochimie. Il est ainsi capable d'hydroxyler toute une gamme de composés, y compris les plus inertes comme les alcanes, dans les conditions biologiques. Le complexe cyt P-450 FeII, très enrichi en électrons par le ligand thiolate lui confère par ailleurs une activité réductrice particulièrement vis-à-vis des dérivés halogénés.

Le tableau 1 met bien en évidence la grande variété des substrats que la famille des isoenzymes à cytochrome P-450 est capable de transformer (16).

### **I-A-6 Localisation**

Les cytochromes P-450 sont localisés, à différentes concentrations, dans une grande variété d'organes : le foie, les poumons, l'intestin, les reins, le cerveau, le placenta, la peau notamment. Ils s'y trouvent répartis à différents niveaux de la cellule : le réticulum endoplasmique lisse et rugueux, le noyau, la membrane cellulaire, les mitochondries.

Les cytochromes P-450 responsables de la détoxification des xénobiotiques sont principalement situés dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, mais également dans le réticulum endoplasmique des reins, des poumons ....

La couche phospholipidique de la membrane du réticulum endoplasmique contribue à l'organisation spatiale du complexe enzymatique à cytochrome P-450. Un modèle de l'organisation des cytochromes P-450 de vertébrés a été proposé récemment par Nelson et Strobel. Le site de fixation du substrat fait face à la membrane. L'hème est parallèle à la surface membranaire et deux segments N-terminaux traversent la membrane et assurent la fixation de la protéine à la couche phospholipidique (17).

Provenant du réticulum endoplasmique après homogénéisation et centrifugation de la cellule, de petites particules ont été obtenues pour la première fois par Claude en 1938 et nommées microsomes en raison de leurs petites tailles (200 nm en moyenne) (18). Les microsomes sont considérés

**Tableau I. Réactions catalysées par les cytochromes P-450 hépatiques.**

Type de réactions	Exemple de substrat	Produit
<u>Réactions d'oxydations</u>		
-Hydroxylation aliphatique	Cyclohexane Testostérone	Cyclohexanol Hydroxy-testostérone
- Hydroxylation acide gras	Acide laurique Prostaglandines	Acide hydroxylaurique Hydroxy-12, hydroxy-11 prostaglandines
- Oxygénation aromatique	Benzène Benzo[a]pyrène	Phénol Hydroxy-3 benzo[a] pyrène
- Epoxydation d'alcènes	Aniline Aflatoxine B <sub>1</sub>	Amino-4 phénol Epoxyde en 2-3
- N-désalkylation et désamination oxydative	Benzphétamine	N-desmethyl- benzphétamine
- O-désalkylation	Amphétamine Nitro-4 anisole Ethoxy-7 coumarine	Phényl acétone Nitro-4 phénol + formol Hydroxy-7 coumarine
- N-oxydation	Amphétamine	N-hydroxy amphétamine
- Désulfuration	Parathion	Paraoxon
- Déhalogénéation	Chloroforme	Phosgène
- Dénitrification	Nitro-2 propane	Acétone + nitrite
<u>Réactions de réductions</u>		
- Nitro réduction	Nitrobenzène	Aniline
- Azo réduction	Amaranthe	Naphtylamine
- Réduction des N-oxydes	Imipramine N-oxyde	Imipramine
- Réduction des époxydes d'arènes	Epoxy-4,5 benzopyrène	Benzo[a]pyrène
- Déhalogénéation réductive	CCl <sub>4</sub>	Chloroforme

comme des équivalents biochimiques du réticulum endoplasmique (19). Les cytochromes P-450, comme la plupart des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des médicaments, sont présents dans les microsomes hépatiques. Ils représentent 5 % du contenu protéique total des microsomes hépatiques de rats non traités et atteignent 15 % chez le rat traité avec du phénobarbital. Les composants du système des monooxygénases à cytochrome P-450 ont été purifiés jusqu'à homogénéité. Des systèmes reconstitués fonctionnels, et en particulier des liposomes ou vésicules membranaires artificielles ayant une excellente activité enzymatique ont ainsi pu être obtenus (20).

Les préparations microsomales demeurent néanmoins un système relativement facile à mettre en oeuvre pour étudier *in vitro* le métabolisme des xénobiotiques et certaines de ses variations.

## I-B INDUCTION DES CYTOCHROMES P-450

La plupart des xénobiotiques doivent être métabolisés avant l'excrétion. Le taux de biotransformation, son étendue et la nature des produits formés peuvent varier considérablement non seulement d'une espèce à l'autre, mais également parmi les individus d'une même espèce (21).

Quantitativement et qualitativement, les variations dans la biotransformation des médicaments sont en partie déterminées. Le patrimoine génétique définit l'étendue des enzymes du métabolisme qu'un individu est capable d'exprimer. Mais celles effectivement présentes chez un animal à n'importe quel moment, dépendent d'un grand nombre de facteurs (22).

Certains facteurs qui affectent la biotransformation des xénobiotiques sont intrinsèques à l'organisme. Citons par exemple l'âge, le sexe ou la maladie. Nous nous intéresserons ici aux facteurs exogènes (23). Par un phénomène commun à l'homme et à la bactérie, l'organisme s'adapte aux changements de son environnement en augmentant sélectivement le contenu cellulaire en une ou plusieurs protéines bien déterminées. Ce processus est connu sous le nom d'induction et le fait que le cytochrome P-450 des cellules de mammifère puisse être induit par l'exposition à un xénobiotique a été découvert il y a plus de vingt ans par Conney (24) et Remmer (25).

### I-B-1 Inducteurs et isoenzymes des cytochromes P-450 chez l'animal

L'administration à un animal de laboratoire de certaines substances inductrices provoque une augmentation spectaculaire de la biotransformation hépatique avec :

- une accélération du métabolisme *in vitro*
- une réponse différente aux toxiques
- une modification ultrastructurale du foie
- une augmentation de la concentration hépatique et une modification des propriétés spectrales et catalytiques des cytochromes P-450.

En fonction des caractéristiques structurales et des modifications apportées au système des cytochromes P-450, cinq grandes classes d'inducteurs des cytochromes P-450 ont été déterminées à ce jour (26) :

- la classe du phénobarbital. Elle comprend la plupart des barbituriques anticonvulsivants, la phénytoïne et la diéldrine. L'inducteur le plus utilisé de cette classe est le **phénobarbital** lui-même (PB).

- la classe des hydrocarbures polycycliques. Cette classe comprend des hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo[a]pyrène, benzo[a]anthracène) et des hydrocarbures aromatiques halogénés (dioxine (TCDD), tétrachloro-3,3',4,4' diphényle) et la  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$  NF). L'inducteur type utilisé est le **méthyl-3 cholanthrène** (3MC).

- la classe des dérivés de type stéroïde qui comprend des glucocorticoïdes comme la dexaméthasone. Le dérivé le plus utilisé de cette classe est la **cyano-16 $\alpha$  prégnénone** (PCN).

- le **clofibrate** et certains dérivés de structure apparentée.

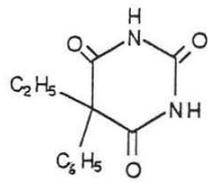
- l'**éthanol**.

Les structures chimiques de ces principaux composés sont présentées figure 6.

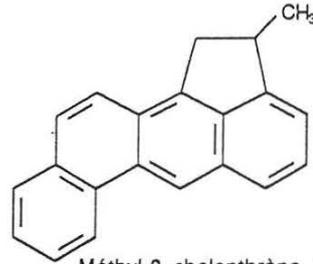
Les profondes modifications quantitatives, mais également qualitatives, produites par ces inducteurs ont conduit à postuler l'existence de plusieurs formes ou isoenzymes du cytochrome P-450, différentes par leur apoprotéine et donc leur sélectivité. Un inducteur donné augmente la concentration hépatique d'une ou plusieurs isoenzymes, la concentration des autres étant soit inchangée, soit même parfois diminuée. C'est le cas par exemple de la forme UT-A dont la concentration est diminuée après traitement des rats par la cyano-16 $\alpha$  prégénolone. L'influence des inducteurs classiques sur la répartition des diverses isoenzymes des cytochromes P-450 hépatiques de rats est présentée figure 7.

Sur la base de leurs séquences génétiques, environ une centaine de cytochromes P-450 différents ont été caractérisés chez les procaryotes et les eucaryotes. Récemment, une nomenclature internationale basée sur la séquence de l'ADNc et, ou de la protéine, a été proposée (29). Selon ces critères, 11 cytochromes P-450 hépatiques de rats sont répertoriés à ce jour et figurent dans le tableau 2 (colonne 1). Ces cytochromes P-450 sont encore actuellement plus connus sous le nom utilisé par les laboratoires où ils ont été purifiés. C'est pourquoi nous proposerons en regard de la nomenclature recommandée, les cinq principales nomenclatures utilisées : celles décrites par Wolf, Levin, Guengerich, Waxman et Schenkman. Enfin, de nouvelles formes de cytochromes P-450 sont purifiées régulièrement. Dans certains cas, la caractérisation génétique de certains cytochromes P-450 n'est pas suffisamment avancée pour établir la nomenclature recommandée. L'identification de ces formes est alors réalisée provisoirement en comparant les propriétés des préparations des cytochromes P-450 des différents laboratoires notamment :

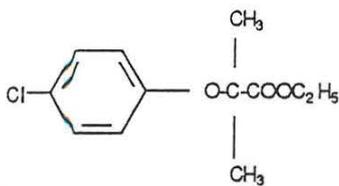
- la longueur d'onde du maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) du complexe cytochrome P-450-CO
- les activités catalytiques déterminées par reconstitution de l'activité des cytochromes P-450 en présence de lipides, de réductase, de NADPH et de substrats
  - les propriétés immunochimiques
  - la séquence N-terminale
  - la mobilité sur gel SDS relative à des cytochromes P-450 parfaitement caractérisés
- la réponse aux inducteurs.



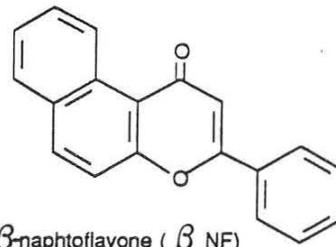
Phénobarbital ( PB )



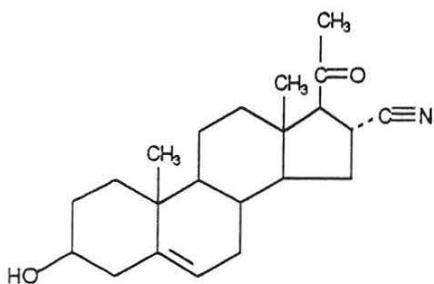
Méthyl-3 cholanthrène ( 3MC )



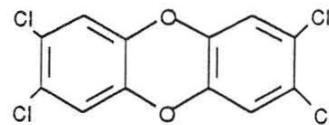
Clofibrate ( CLO )



β-naphtoflavone ( β NF)



Cyano-16 α prégnérolone ( PCN )



Dioxine ( TCDD )

FIGURE 6. Quelques inducteurs classiques des cytochromes P-450 chez l'animal de laboratoire.

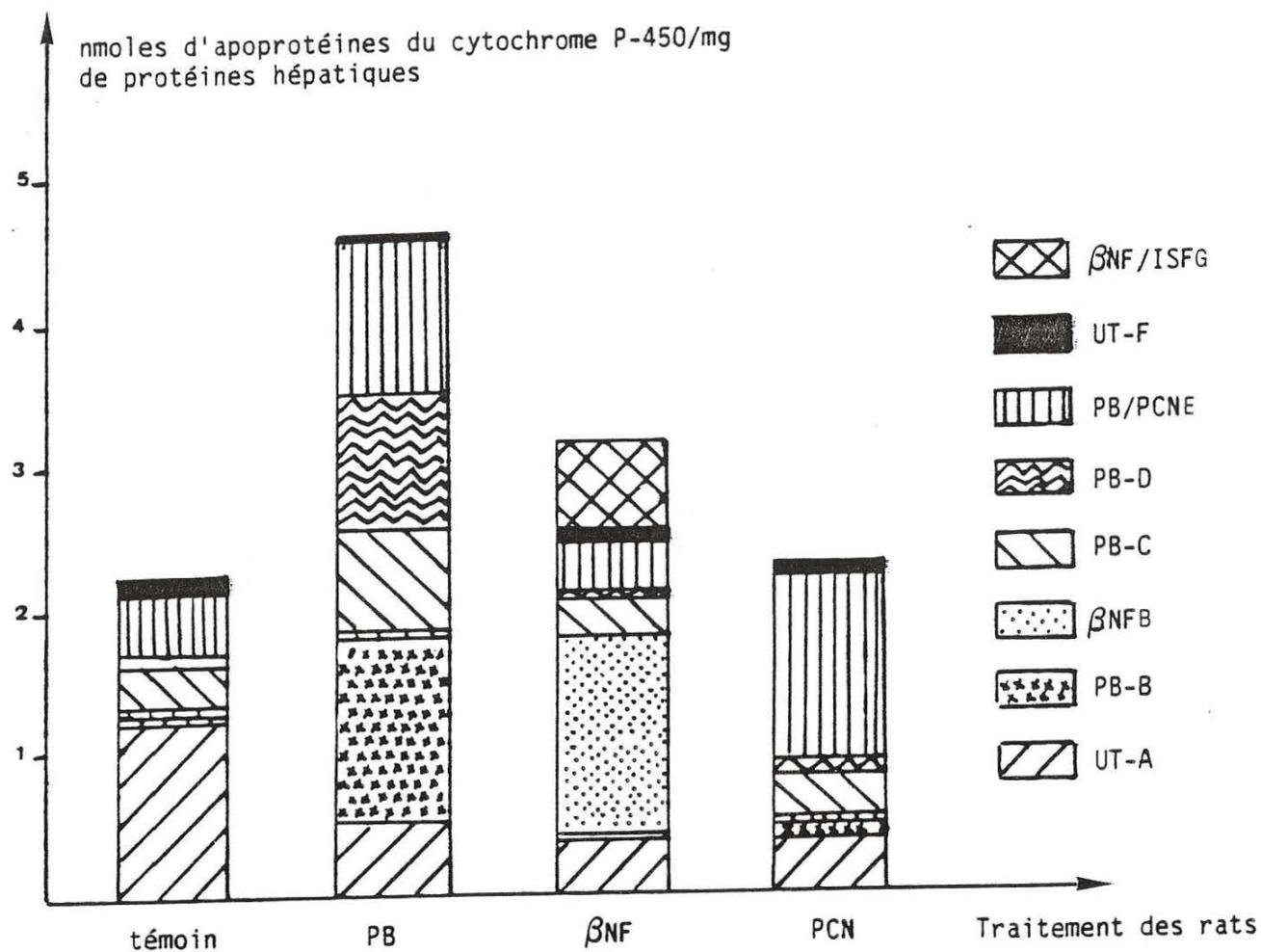


FIGURE 7. Quantification immunologique des diverses formes de cytochromes P-450 hépatiques chez le rat Sprague-Dawley traité par différents inducteurs (d'après (16)).

**Tableau 2. Cytochromes P-450 hépatiques de rats : terminologie employée par différents laboratoires pour des formes correspondantes (d'après 10,27,28,29).**

Nomenclature recommandée	Wolf	Levin	Guengerich	Waxman	Schenkman
-	-	-	-	-	RLM <sub>2</sub>
II A1	UT 1	a	UT-F	PB-3	RLM <sub>2b</sub>
-	-	g	-	-	RLM <sub>3</sub>
-	-	i	UT-I	2d	fRLM <sub>4</sub>
II C11	PB 2a	h	UT-A	PB-2c	RLM <sub>5</sub>
-	-	-	-	-	RLM <sub>5a</sub>
-	-	-	-	-	fRLM <sub>5a</sub>
II C6	PB 1b	k	PB-C	PB-1	PB RLM <sub>4</sub>
II C7	-	f	-	-	-
-	-	-	UT-H	-	-
-	PB 1a	-	-	-	-
-	PB 2b	-	-	-	-
-	PB 2c	-	-	-	-
II B1	PB 3a	b	PB-B	PB-4	-
II B2	PB 3b	e	PB-D	PB-5	-
I A2	MC 1a	d	ISFG	ISFG	-
I A1	MC 1b	c	BNFB	BNFB	-
IV A1	P-452	-	-	-	-
II E1	-	j	-	-	-
III A1	-	p	PCNE	PB-2a	-

Nous proposons dans le tableau 2 une liste de 20 cytochromes P-450 hépatiques de rats qui ont été à ce jour caractérisés.

Dans un grand nombre de cas, la détermination des activités catalytiques de formes purifiées met bien en évidence une double absence de spécificité : aucune des formes purifiées ne catalyse une seule des activités étudiées et aucune activité n'est catalysée par une seule forme de cytochrome P-450. La plupart des cytochromes P-450 possède une large spécificité de substrat, c'est à dire qu'ils sont capables de métaboliser une grande variété de composés. Mais il existe un petit nombre de cytochromes P-450 plus spécifiques, capables de prendre en charge sélectivement les substrats physiologiques indispensables à la vie de l'organisme.

Bien que les cytochromes P-450 soient collectivement capables de métaboliser des milliers de substrats différents, dans chaque organisme particulier, le nombre des différentes espèces de cytochromes P-450 varie d'une douzaine à une centaine (30). L'existence de multiples formes de cytochromes P-450 combinée à une plus ou moins large spécificité de substrat, contribuent à la capacité des organismes phylogénétiquement avancés à métaboliser les substances endogènes comme les molécules hydrophobes de leur environnement.

### **1-B-2 Induction des cytochromes P-450 responsables du métabolisme des xénobiotiques chez l'homme**

La plupart des connaissances sur les mécanismes d'induction proviennent des expériences sur l'animal de laboratoire. Chez l'homme, le phénomène d'induction existe mais son étude se heurte à la nécessité d'employer des méthodes peu invasives.

*In vivo* l'induction enzymatique a été reliée à la mesure de la demi-vie plasmatique de médicaments administrés avant ou pendant une exposition à un inducteur potentiel (31).

Plus récemment, une méthode non invasive a été mise au point, le test du CO<sub>2</sub> pulmonaire. Le médicament marqué (à l'isotope radioactif <sup>14</sup>C ou à l'isotope stable <sup>13</sup>C) est administré et le taux de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> expiré est mesuré par spectrométrie de scintillation ou par spectrométrie de masse dans le cas du

$^{13}\text{CO}_2$ . Il a ainsi été montré que l'exposition à différents exogènes (fumée de cigarettes, biphényles polychlorés et polybromés, glutéthimide....) augmente le métabolisme de l'aminopyrine et de la caféine (32).

L'induction enzymatique a enfin été étudiée indirectement par la mesure dans l'urine de marqueurs de l'activité des enzymes du métabolisme des médicaments. Par exemple le taux d'excrétion urinaire d'hydroxy-6 $\beta$  cortisol, métabolite normal des stéroïdes dans les conditions physiologiques, a été retenu comme reflétant l'activité des monooxygénases hépatiques. Le traitement de volontaires avec de l'antipyrine, du phénobarbital ou de la rifampicine augmente l'excrétion de l'hydroxy-6 $\beta$  cortisol (26).

Une démonstration directe de l'induction enzymatique chez l'homme requiert l'utilisation d'échantillons tissulaires prélevés avant et après induction (33). Pour des raisons éthiques ceci n'est que rarement effectué surtout chez l'individu sain. La culture de cellules constitue un outil particulièrement intéressant pour une étude tant des mécanismes que des facteurs de variations interindividuelles tout en permettant d'éliminer les influences dues à l'environnement qui interfèrent avec les études *in vivo*.

Le tableau 3 résume les principaux composés qui induisent le métabolisme des médicaments chez l'homme *in vivo* et/ou en culture cellulaire. Parmi les médicaments, les anticonvulsivants sont représentés de façon majoritaire. Parmi les agents non thérapeutiques, l'importance des dérivés du type méthyl-3 cholanthrène reflète l'effort de recherche concernant les produits toxiques et cancérigènes sur des cellules humaines.

L'ensemble des études décrites précédemment ont permis de mettre en évidence la variabilité de la biotransformation des médicaments chez l'homme. L'existence d'un polymorphisme génétique dans le métabolisme de certains médicaments, c'est à dire de différences contrôlées génétiquement dans l'activité d'un ou plusieurs cytochromes P-450, y contribue de façon significative (34). Ce phénomène qui a des conséquences importantes en pharmacologie clinique est à l'origine de la purification de certains cytochromes P-450. Les formes dont la caractérisation est la plus avancée sont les suivantes (35,36).

- **P-450 DB** (débrisoquine)

Environ 5 % de la population d'origine Caucasienne est incapable de métaboliser la débrisoquine, composé antihypertenseur sympatholytique,

**Tableau 3. Principaux composés inducteurs du métabolisme des médicaments chez l'homme (d'après 26).**

<b>Agents inducteurs</b>	
<b>Thérapeutiques</b>	<b>Non thérapeutiques</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Phénobarbital</li> <li>Pentobarbital et autres barbituriques</li> <li>* Phénytoïne</li> <li>* Carbamazépine</li> <li>* Phénylbutazone</li> <li>* Rifampicine</li>   <li>Aminopyrine</li> <li>Antipyrine</li> <li>Spironolactone</li> <li>Glutéthimide</li>   <li>Hydrate de chloral</li> <li>Méthaqualone</li> <li>Griséofulvine</li> <li>Méprobamate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fumée de cigarettes</li>   <li>Viande carbonisée</li> <li>Ethanol</li> <li>Hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo(a)pyrène, méthyl-3 cholanthrène)</li>   <li>Hydrocarbures aromatiques halogénés (biphényles polychlorés et polybromés, dioxine)</li> </ul>

\* Inducteurs les plus puissants chez l'homme.

comme environ 15 autres médicaments. Sur sa capacité à catalyser l'hydroxylation en position 4 de la débrisoquine, une forme de cytochrome P-450 a pu être isolée et entièrement caractérisée, le P-450 DB. Cette forme est équivalente à la forme P-450 Bufl qui transforme le bufuralol, un  $\beta$ -bloquant, en hydroxy-1' bufuralol (ou carbinol) (37).

**- P-450 MP-1 ou P-450 B (méphénytoïne)**

Le cytochrome P-450 MP-1 a été caractérisé à partir de microsomes de foies humains en raison de son rôle dans le polymorphisme génétique de l'hydroxylation en position 4 de la [S] méphénytoïne. Ce polymorphisme, observé chez 2 à 5 % de la population d'origine Caucasienne et plus de 20 % des Japonais, est indépendant du polymorphisme à la débrisoquine. Le P-450 MP est apparemment identique au cytochrome P-450 B isolé par Ph. Beaune. Les microsomes de foies foetaux ne contiennent pas de P-450 MP comme l'ont montrés les études immunochimiques réalisées sur 12 échantillons en utilisant des anti-P-450 B. Six de ces échantillons testés ont une activité [S]-méphénytoïne-4 hydroxylase inférieure ou égale à 10 % de l'activité moyenne des foies adultes.

L'analyse de la séquence N-terminale de la forme MP montre une homologie de séquence sur les 20 premiers acides aminés de 75 % avec la forme UT-A de foie de rat, de 70 % avec la forme UT-I de foie de rat, et supérieure à 55 % avec la forme PBC de foie de rat. Des anti-sérums dirigés contre 10 cytochromes P-450 de foie de rat purifiés par Guengerich, seul l'anti-P-450 UT-I réagit avec le P-450 MP en utilisant les techniques de transfert. L'anti-P-450 UT-I reconnaît la forme MP dans les microsomes hépatiques humains et est capable d'inhiber la quasi-totalité de l'activité catalytique. Toutefois, les anti-P-450 MP ne réagissent pas, par immuno-transfert avec le cytochrome purifié de rat P-450 UT-I. Le cytochrome P-450 PCNE de foie de rat qui catalyse le plus efficacement l'hydroxylation en 4 de la [S]-méphénytoïne ne réagit pas de façon croisée avec le P-450 MP. Le cytochrome P-450 UT-I de rat n'a d'ailleurs aucune activité méphénytoïne hydroxylase. Chez le rat, le P-450 PCNE est spécifique du mâle et le P-450 UT-I spécifique de la femelle. Aucune différence dans l'activité méphénytoïne hydroxylase n'a été détectée lors des études chimiques réalisées chez l'homme et chez la femme. Ceci illustre bien la complexité des relations immunologiques existant entre les cytochromes P-450 d'une espèce à l'autre dans l'état actuel de nos connaissances. De plus, cet exemple souligne

que l'existence de parentés immunologiques et d'homologies de séquences entre 2 cytochromes P-450 n'implique pas toujours le partage d'une même activité catalytique.

- **P-450 MP-2** (méphénytoïne)

Lors de l'étude sur l'hydroxylation de la méphénytoïne, une forme dénommée MP-2 a été observée chez un petit nombre d'individus alors que chez le plus grand nombre, les formes MP-1 et MP-2 étaient présentes. Cette forme est en cours de caractérisation. Uniquement distinctes par leurs masses moléculaires, P-450 MP-1 et P-450 MP-2 présentent les mêmes caractéristiques immunochimiques, possèdent les mêmes activités catalytiques et la même séquence N-terminale.

- **P-450 NF - P-450 5** (nifédipine)

Une partie de la population d'origine caucasienne (1/6) présente un taux de métabolisation de la nifédipine anormal. La distribution de cette caractéristique au sein de la population laissant suggérer l'existence d'une cause génétique, l'oxydation de cet antagoniste calcique utilisé comme antiangineux a été étudiée. Ainsi la forme P-450 NF a pu être isolée. L'ADMc a été cloné et séquencé.

D'autres formes ont été purifiées qui apparemment ne sont pas liées à un polymorphisme génétique.

- **P-450 9**

P-450 9 est une protéine relativement acide, isolée par P. Beaune à partir de foie humain. Aucune activité catalytique distincte n'a été mise en évidence pour cette forme qui semble relativement abondante dans le foie humain.

- **P-450 Buf II** (bufuralol)

Le P-450 Buf II a un poids moléculaire identique à celui de Buf I et les mêmes caractéristiques immunochimiques. La forme P-450 Buf I (P-450 DB) hydroxyle de façon préférentielle l'isomère (+) du bufuralol. La forme P-450 Buf II se distingue par son absence de spécificité.

- P-450 HFLa

Le P-450 HFLa représente une fraction importante du total des cytochromes P-450 hépatiques présent chez le foetus et une fraction mineure chez l'adulte. Cette forme de cytochrome P-450 métabolise divers substrats et présente la plus forte activité pour l'hydroxylation en 16 $\alpha$  du sulfate de déhydroépiandrostérone (38).

- P-450 ALC P-450 HLj (alcool)

Récemment, à partir de foie humain, une forme de cytochrome P-450 proche du cytochrome P-450 de rat inductible par l'alcool a été caractérisée par 2 équipes différentes (39,40). Cette forme présente une forte activité pour la déméthylation de la N-nitrosodiméthylamine.

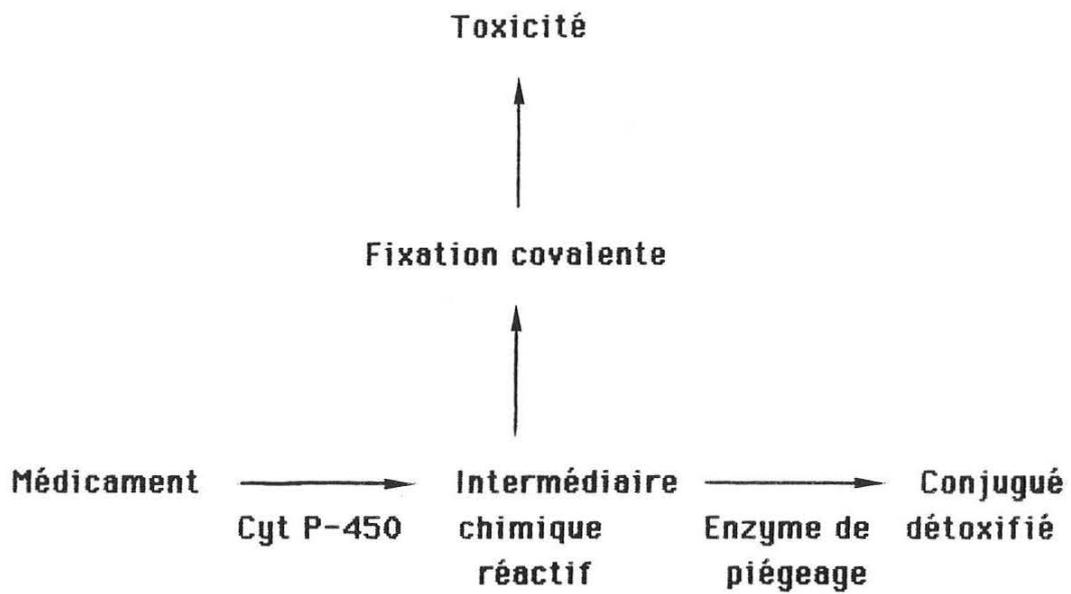
Paradoxalement le cytochrome P-450, principal agent de détoxification des xénobiotiques, peut se trouver impliqué dans des phénomènes de toxicité.

## I-C PHENOMENES TOXIQUES SECONDAIRES DUS A L'ACTION DES CYTOCHROMES P-450

### I-C-1 Hépatotoxicité

Les cytochromes P-450 sont capables d'engendrer, à partir de composés relativement stables, des intermédiaires réactifs au cours des diverses réactions qu'ils catalysent (41). Ceci est à l'origine notamment de phénomènes hépatotoxiques liés au métabolisme des médicaments. Deux types de toxicité peuvent résulter de la formation de ces intermédiaires :

- une toxicité directe du métabolite qui peut se former de façon transitoire. Ce métabolite instable ou métabolite réactif à caractère électrophile est normalement pris en charge par des enzymes de piègeage (figure 8). Mais dans certains cas, il peut contracter des liaisons covalentes irréversibles avec des constituants cellulaires : protéine, acide nucléique.



**FIGURE 8.** Principales voies de formation et d'évolution d'intermédiaires réactifs formés par les cytochromes P-450.

Un tel mécanisme peut être invoqué :

- . pour un toxique vrai : le  $\text{CCl}_4$
- . pour un médicament administré à une dose telle que le système de détoxication est saturé : le paracétamol. Le métabolite réactif formé est détoxiqué par le glutathion. En cas de surdosage ou de déplétion en glutathion, la toxicité apparaît. Dans ce cas, l'hépatotoxicité est susceptible d'apparaître chez tous les individus. Des réactions médicamenteuses de ce type peuvent en principe être reproduites expérimentalement chez l'animal et l'observation d'une relation effet-dose est en principe possible.

- une toxicité d'ordre immuno-allergique liée à la réaction individuelle du malade ou idiosyncrasie. Les mécanismes détaillés de ce type de toxicité, non dépendante de la dose et non reproductible expérimentalement, ne sont pas connus. Il est généralement admis que le médicament ou un de ses métabolites, en se couplant à une protéine, la rend antigénique et déclenche la réponse immune (42). Certains facteurs sont caractéristiques de l'accident hépatique immuno-allergique :

- \* fréquence faible
- \* période de sensibilisation
- \* association de fièvre, éruption cutanée et éosinophilie.
- \* réapparition du trouble à la réadministration

Dans certains cas, des anticorps circulants, dirigés contre des organites cellulaires ont été mis en évidence : anticorps anti-mitochondries (anti-M), anticorps anti-muscle lisse (anti-SM), anticorps dirigés contre une protéine inconnue du système microsomal du foie et du rein (anti-LKM) (43,44,45). Les médicaments les plus souvent associés à des réactions sérologiques sont la clométacine, l' $\alpha$ -méthyl dopa, le fénofibrate, la papavérine, l'iproniazide, la dihydralazine, l'amineptine, l'halothane et l'acide tiénilique (46,47).

## **I-C-2 Cas de l'acide tiénilique**

### **I-C-2-1 Métabolisme *in vivo***

Le métabolisme *in vivo* de l'A.T. chez l'homme, le rat et le chien a été étudié au laboratoire, en collaboration avec le centre de recherche Anphar-

Rolland (48). Le schéma métabolique est présenté figure 9. Selon les espèces, l'AT est retrouvé dans l'urine :

- inchangé
- réduit sur la fonction cétone pour donner le produit 1
- hydroxylé en position 5 sur le noyau thiophène (5OHAT)
- oxydé au niveau de la fonction cétone pour donner le diacide

correspondant (Acide carboxy-4-dichloro-2,3 phenoxyacétique) (ACPA).

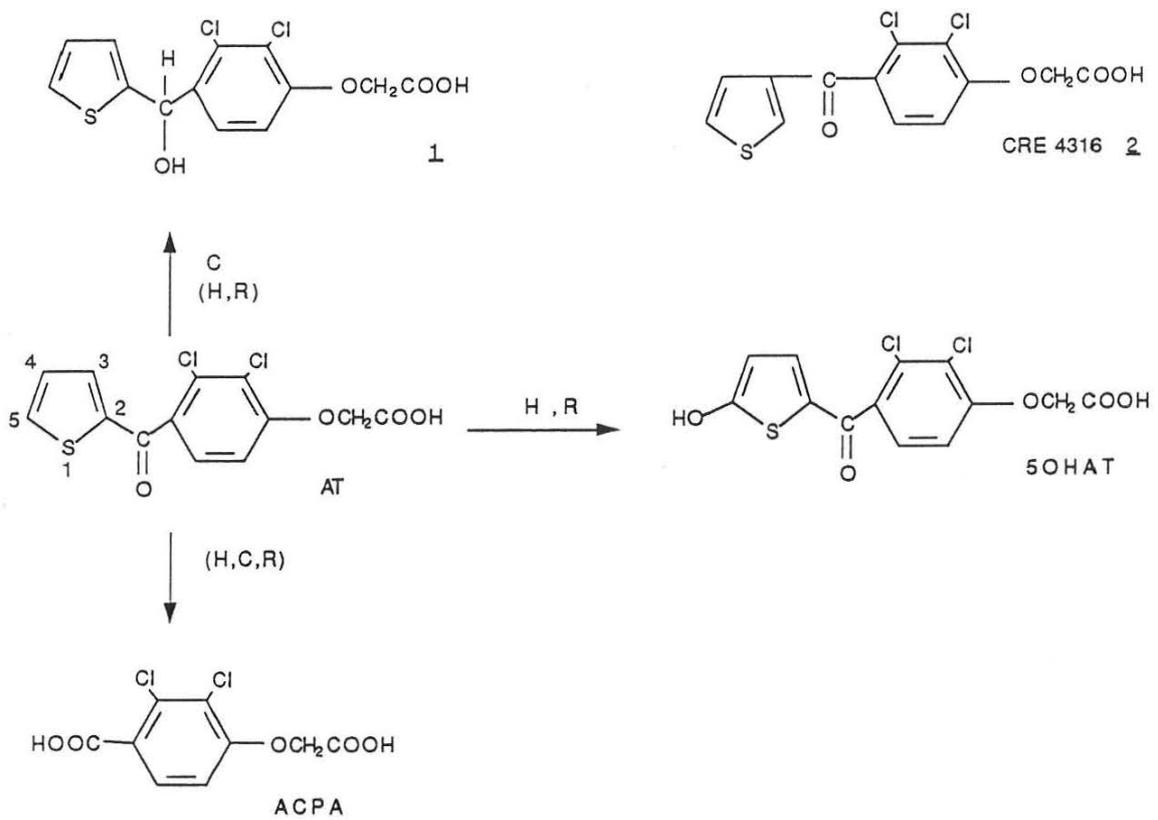
Jusqu'à 50 % de la dose administrée est excrétée chez l'homme et chez le rat sous la forme du dérivé hydroxylé en position 5. Ce dérivé n'est pas formé chez le chien où le produit réduit sur la fonction cétone est majoritaire. Chez l'homme, 20 % de l'AT est retrouvé inchangé et 8 % chez le rat. Le diacide est formé de façon minoritaire et représente moins de 1 % de la dose administrée chez l'homme.

D'autre part, les laboratoires Anphar-Rolland ont montré, qu' *in vivo*, une proportion faible de l'acide tiénilique ou de ses métabolites est liée de façon covalente aux protéines hépatiques de rat. Au contraire l'isomère en 3 de l'acide tiénilique, le CRE 4316, qui était présent comme impureté au début de la commercialisation de l'AT, donne dans les mêmes conditions un taux de fixation covalente 10 fois plus élevé que l'AT.

#### I-C-2-2 Métabolisme *in vitro*

Au laboratoire, l'étude du métabolisme de l'acide tiénilique marqué au  $^{14}\text{C}$  a permis de montrer la formation du dérivé hydroxylé en 5 de l'acide tiénilique par les microsomes hépatiques de rat et d'homme.

- L'acide hydroxy-5 tiénilique formé est quantifié par chromatographie en phase inverse. L'élution est réalisée par un gradient d'acétate d'ammonium pH 4,6 à 50 % de  $\text{CH}_3\text{CN}$  dans l'eau et est couplée à une détection UV à 310 nm. La radioactivité des fractions collectées est quantifiée par comptage en scintillation liquide. La quantité de 5OHAT formée est déterminée en additionnant la radioactivité présente sous les pics UV. Dans ces conditions, il se forme après une incubation de 20 min. de l'AT en présence de microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital :  $5,9 \pm 1,5$  nmoles 5OHAT/nmole P-450/20 min. soit  $10 \pm 3$  nmoles 5OHAT/mg protéine/20 min. En présence de microsomes hépatiques de foie humain (H 97), l'activité est de 3,4 nmoles 5OHAT/mg protéine/20 min.



**FIGURE 9.** Voies métaboliques de l'AT chez l'homme (H), le rat (R), le chien (C). Les voies minoritaires sont données entre parenthèses (d'après (48)).

- La métabolisation de l'AT par les microsomes hépatiques de rat et d'homme est responsable de la fixation covalente d'un métabolite différent du 5OHAT (mais qui pourrait dériver d'un précurseur commun) sur les protéines hépatiques (49). Le taux de fixation covalente est de 3,5 nmoles/mg protéine/20 min. en présence de microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital et de 1,8 nmoles/mg protéine/20 min en présence de microsomes humains.

- Des études parallèles de l'oxydation métabolique *in vitro* de l'isomère en 3 de l'acide tiénilique (2) ont montré que ce composé conduit à un taux beaucoup plus fort de fixation covalente aux protéines hépatiques de rat et d'homme.

#### 1-C-2-3 Les étapes du mécanisme de toxicité à l'AT

Plusieurs aspects de l'hépatotoxicité de l'AT sont évocateurs d'un phénomène de nature immuno-allergique (50) :

- la faible incidence des accidents dans la population traitée (1 cas sur 10 000 environ)

- la nécessité d'une période de traitement de un à plusieurs mois (en moyenne 5,5 mois)

- la survenue des hépatites intervenant à la réadministration de l'AT après que le traitement ait été arrêté en raison d'effets secondaires toxiques

- la diminution de la durée d'apparition de l'hépatite, et de la dose de médicament nécessaire, lors d'une réintroduction

- les signes systémiques de la phase prodromique

- l'absence de la reproductibilité expérimentale chez l'animal

- la non-relation par rapport à la dose.

De plus, venant renforcer la thèse immuno-allergique des anticorps LKM<sub>2</sub> (anti-Liver-Kidney microsomes de type 2) (1) ont été mis en évidence dans le sérum de patients traités à l'AT et ayant fait un accident hépatique.

#### - Mise en évidence des anti-LKM<sub>2</sub>

La détection de ces anticorps de type 2 dirigés contre le réticulum endoplasmique de foie et de rein a été réalisée par immunofluorescence sur certains organes d'animaux non traités par l'acide tiénilique. En particulier, il a été observé :

\* une localisation centrolobulaire de la fluorescence sur foie de souris mâle. Ceci permet de distinguer les anti-LKM<sub>1</sub> présents dans la plupart des cas d'hépatite chronique active et des cirrhoses cryptogéniques

\* une fixation sur les portions P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> du tube proximal de rein de rat mâle.

Les recherches d'anti-LKM<sub>2</sub> pratiquées sur les sérums de malades suspects d'hépatite à l'AT et sur les sérums de malades traités ne faisant pas d'hépatite laissent supposer que les anti-LKM<sub>2</sub> sont spécifiques de l'hépatite induite par l'AT.

#### - Détermination de l'antigène de foie humain des anti-LKM<sub>2</sub>

Les analyses par immuno-transfert des microsomes de foies humains et de certains cytochromes P-450 purifiés de foies (P-450 5, P-450 8 et P-450 9) en utilisant des sérums humains contenant des anti-LKM<sub>2</sub> ont permis de montrer que ces anticorps reconnaissent une seule protéine des microsomes de foies humains. Cette protéine est par électrophorèse et sur un plan immunologique identique au cytochrome P-450 8 (2). En effet, les sérums contenant des anti-LKM<sub>2</sub> conduisent à des reconnaissances en immuno-transfert identiques à celles obtenues avec les anti-cytochromes P-450 8 mais très différentes de celles obtenues avec l'anti-cytochrome P-450 5. De plus les sérums contenant des anti-LKM<sub>2</sub> ou des anti P-450 8 ne reconnaissent aucun composant des microsomes de foie humain provenant de fœtus (51).

Les résultats obtenus comparent près de 40 sérums. Parmi les 20 sérums de patients atteints d'hépatites et contenant des anti-LKM<sub>2</sub>, 12 sérums reconnaissent presque exclusivement le cytochrome P-450 8 dans les microsomes de foie humain. Les 20 sérums témoins étudiés et ne contenant pas d'anti-LKM<sub>2</sub> ne reconnaissent pas le cytochrome P-450 8.

Par conséquent, ces résultats montrent que les anti-LKM<sub>2</sub> sont dirigés spécifiquement contre une protéine de foie humain : le cytochrome P-450 8.

#### - Nature du cytochrome P-450 de foie humain responsable de l'hydroxylation de l'AT et de son activation métabolique

L'hydroxylation en 5 de l'AT par les microsomes de foie humain est inhibée de 80 à 100 % à la fois par les anticorps anti-cytochromes P-450 8 et par les sérums contenant des anti-LKM<sub>2</sub>. Les 20 sérums témoins utilisés qui ne

contiennent pas d'anti-LKM<sub>2</sub> ne donnent pas d'inhibition significative de l'hydroxylation de l'AT.

De plus, l'activation métabolique *in vitro* de l'AT et de son isomère catalysée par les microsomes hépatiques de foie humain est inhibée par les anti-cytochromes P-450<sub>8</sub> et par les sérums contenant des anti-LKM<sub>2</sub>. Pour 20 sérums contenant des anti-LKM<sub>2</sub> testés, il existe une bonne corrélation ( $r=0,96$ ) entre la dose inhibant 50 % de la fixation covalente de l'AT et la dose inhibant l'hydroxylation de l'AT (168).

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois l'existence chez l'homme d'anticorps circulants dirigés contre un cytochrome P-450, le cytochrome P-450<sub>8</sub>.

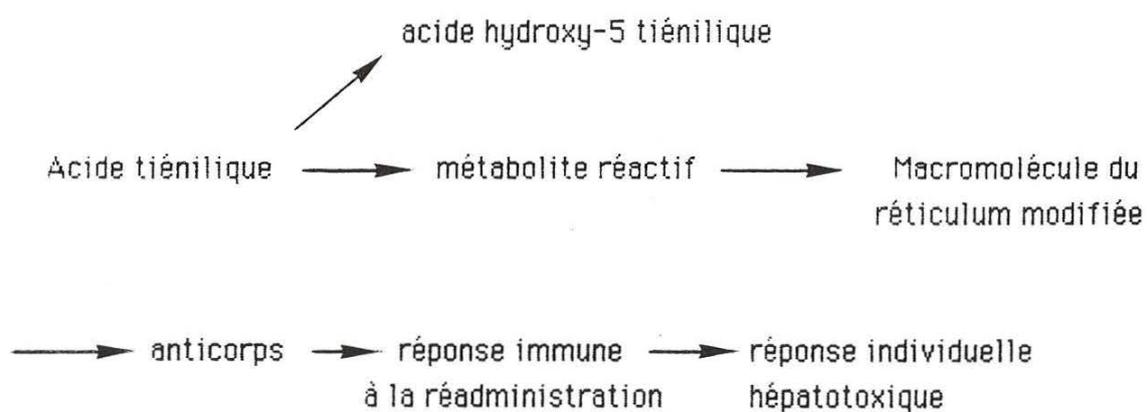
Ce cytochrome P-450 est responsable du métabolisme oxydatif de l'AT et de sa fixation covalente sur les protéines hépatiques.

Ces résultats nous conduisent à proposer le mécanisme suivant pour la production d'anti-LKM<sub>2</sub> après l'administration d'AT :

- 1) hydroxylation en 5 de l'AT par le cytochrome P-450<sub>8</sub>
- 2) formation de métabolite réactif pendant ce métabolisme et fixation covalente aux protéines hépatiques et particulièrement au cytochrome P-450<sub>8</sub>
- 3) réponse immunologique et production d'anticorps dirigés contre le cytochrome P-450<sub>8</sub> alkylé par un métabolite de l'AT.

Beaucoup reste à faire pour comprendre les étapes du mécanisme de la toxicité de l'AT ; en particulier pour expliquer la fréquence de survenue des hépatites. Toutefois les résultats obtenus dans le cas de l'AT notamment conduisent à proposer le mécanisme suivant pour les hépatites de type immuno-allergique étudiées (figure 10) :

- 1) activation du médicament lors de son métabolisme oxydatif par un cytochrome P-450
- 2) formation d'un métabolite réactif qui alkyle une macromolécule microsomale et en particulier le cytochrome P-450 qui catalyse cette oxydation.
- 3) reconnaissance par le système immunitaire du cytochrome P-450 modifié, éventuellement après son passage à l'extérieur de la membrane de l'hépatocyte



**FIGURE 10.** Mécanisme postulé de l'hépatotoxicité d'origine auto-immune de l'AT.

4) production d'anticorps (AC) circulant susceptible de reconnaître non seulement l'haptène dérivant du métabolite réactif mais aussi le cytochrome P-450 porteur

5) activation de l'hépatocyte portant le cytochrome P-450 alkylé antigénique après fixation de l'anti-LKM

6) destruction des hépatocytes par les lymphocytes.

C'est à la première étape de ce mécanisme, et particulièrement à la formation du dérivé hydroxylé, que nous nous sommes intéressés dans le cadre de cette thèse.

Plus largement, nous avons été amenés à considérer les données disponibles sur le métabolisme oxydatif du noyau thiophène.

## **I-D METABOLISME DE DERIVES THIOPHENIQUES**

Le rôle des dérivés du thiophène dans la conception et la synthèse de molécules d'importance pharmacologique a considérablement augmenté depuis 1960. Les dérivés du thiophène sont présents dans la quasi totalité des classes thérapeutiques (52). Nous porterons notre analyse sur certains dérivés, agents thérapeutiques ou non, dont le métabolisme a été étudié et chez lesquels une des positions en  $\alpha$  du soufre est libre.

### **I-D-1 Le thiophène**

Le métabolisme du thiophène a été étudié par H.G. Bray. Chez le rat, 30 % de la dose administrée est expirée inchangée par les poumons et 40 % de la dose est retrouvée dans les urines principalement sous la forme de l'acide mercapturique 5. Le dérivé 6 résultant d'une élimination d'eau est présent de façon minoritaire (53) (figure 11).

La formation du composé 5, hydroxylé en 3, peut s'expliquer par la voie classique d'oxydation des dérivés aromatiques catalysée par le cytochrome P-

450 qui passe par la formation d'un époxyde d'arène et ouverture par la cystéine selon la figure 11.

Le thiophène administré chez le rat à la dose de 250 mg/kg est d'ailleurs responsable de nécroses au niveau hépatique. Le prétraitement des rats par le phénobarbital augmente considérablement cette toxicité (54). Enfin le thiophène (thiophéol)<sup>R</sup> est un médicament proposé en France dans le traitement des inflammations des voies respiratoires et considéré jusqu'ici comme dénué de tout effet indésirable. Cependant, il a été décrit récemment un cas d'hépatite consécutive à la prise de ce médicament sous forme de suppositoire (100 mg/j) pendant 10 jours. La recherche d'anticorps anti-tissus s'est avérée négative. Après guérison, les symptômes ont récidivé à la réadministration du produit (55).

### **1-D-2 Le suprofen**

Le suprofen est un antiinflammatoire non stéroïdien apparenté au kétoprofen et par ailleurs isomère de l'acide tiaprofénique (Surgam)<sup>R</sup> (figure 12a).

Produit des laboratoires Janssen, le suprofen (Suprol)<sup>R</sup> est doué de propriétés analgésiques et antiinflammatoires remarquables qui pourraient être liées à l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines. (56,57). Ce dérivé possède des propriétés uricosuriques qui sont par ailleurs une caractéristique essentielle de l'acide tiénilique. Relativement bien toléré chez la plupart des patients lors des études cliniques, ce médicament déjà lancé dans certains pays européens a reçu l'approbation de la FDA en Décembre 1985.

#### **. Métabolisme**

Le métabolisme du suprofen (SU) a été étudié par Mori et coll. *in vivo* chez l'homme, chez le rat et le chien (58,59,60).

Le schéma métabolique proposé est présenté figure 12b.

Selon les espèces, on trouve dans les urines :

- des produits de conjugaison de la fonction acide avec l'acide glucuronique ou la taurine 11, 12

- le produit hydroxylé en position 5 sur le noyau thiophène (5OHSU)

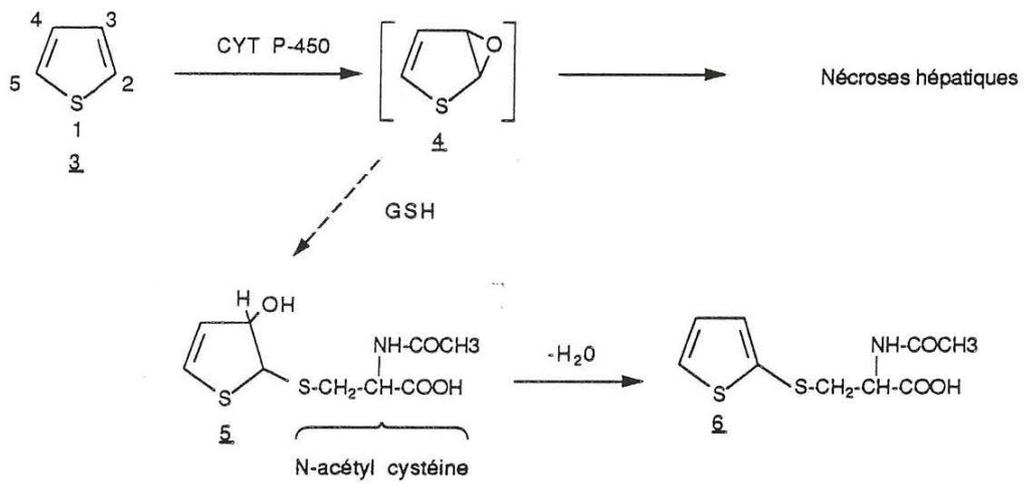


FIGURE 11. Métabolisme proposé du thiophène chez le rat (d'après (53)).

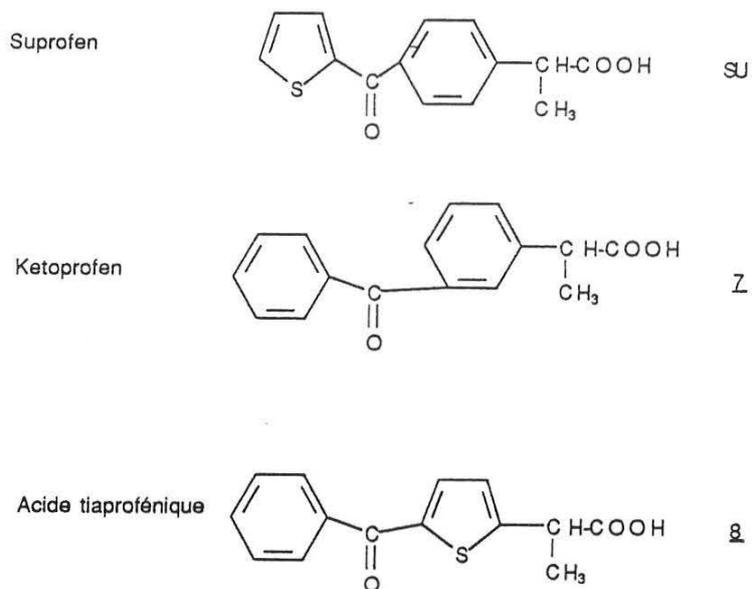


FIGURE 12a. Analogues structuraux du suprofen.

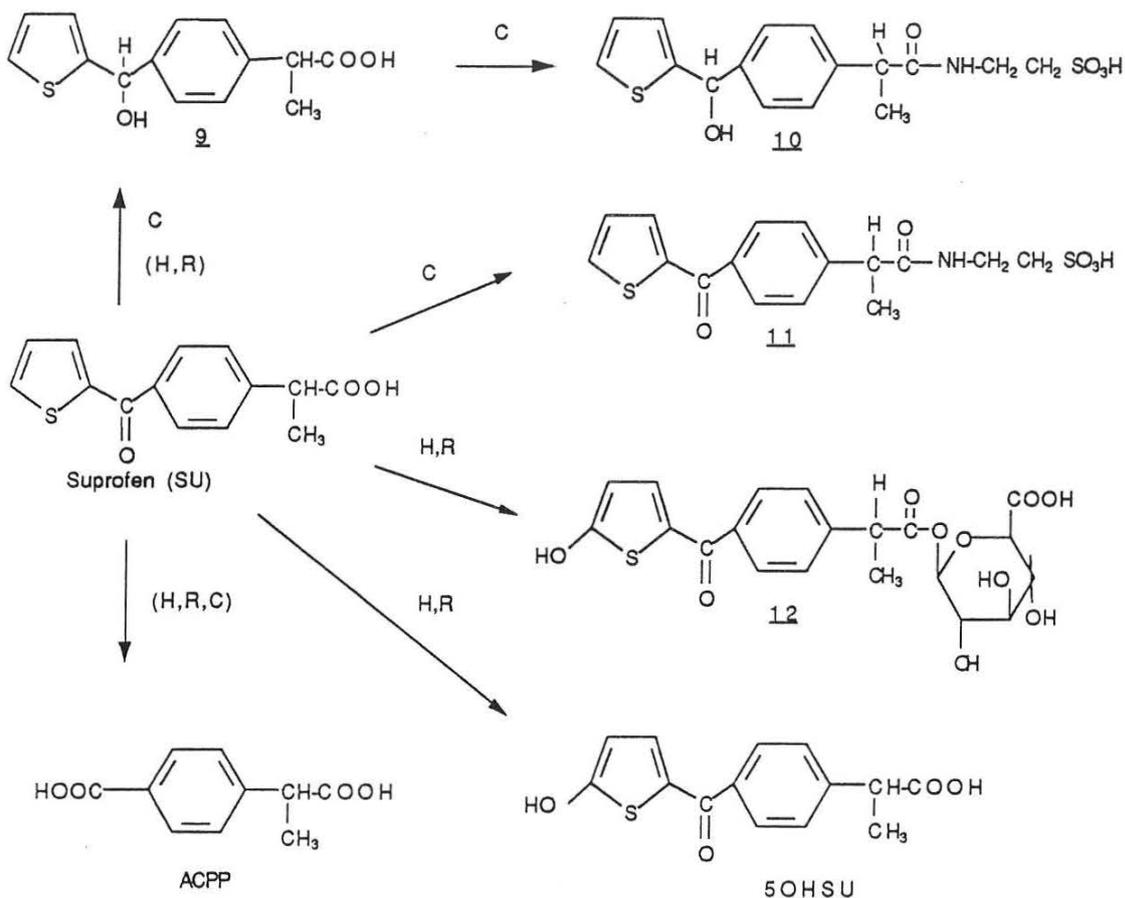


FIGURE 12b. Voies métaboliques du suprofen (SU) chez l'homme (H), le rat (R), le chien (C). Les voies minoritaires sont données entre parenthèses (d'après (60)).

- le produit de réduction de la fonction cétone en alcool 9 qui peut former un produit de conjugaison par sa fonction acide 10
- le dérivé diacide carboxylique résultant de la coupure oxydante de la liaison C<sub>2</sub> (thiophène)-CO : l'acide (carboxy-4 phényl)-2 propionique, ACPP.

La chaîne propionique du suprofen est conjuguée avec un amino acide chez le chien et glucuro conjuguée chez l'homme et le rat. Mis à part cette caractéristique commune aux dérivés aryl acétiques substitués par un méthyle sur le carbone en  $\alpha$  de l'acide, le métabolisme *in vivo* du suprofen est très proche de celui de l'acide tiénilique. Les variations entre les espèces sont similaires. Le dérivé hydroxylé en 5 est formé majoritairement chez l'homme et chez le rat mais il est pratiquement inexistant chez le chien.

En Mars 1987, le laboratoire Johnson et Johnson annonce la suspension de la vente de ce médicament aux USA. Cette décision fait suite à l'apparition d'effets secondaires graves (principalement des douleurs latérales associées à une néphrite transitoire) connus sous le nom de "Flank Pain Syndrome" (61,62). Le produit est suspendu dans les pays de la Communauté Européenne.

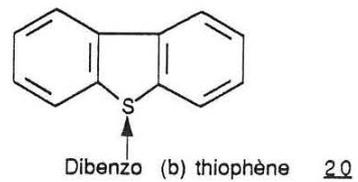
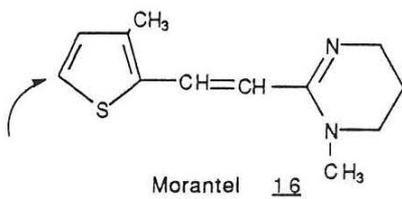
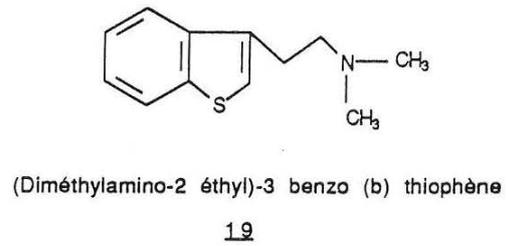
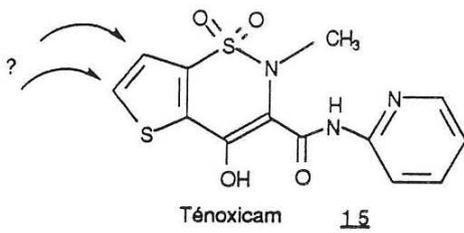
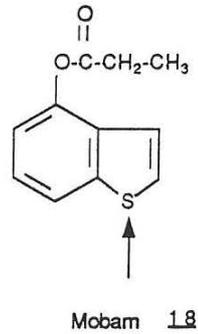
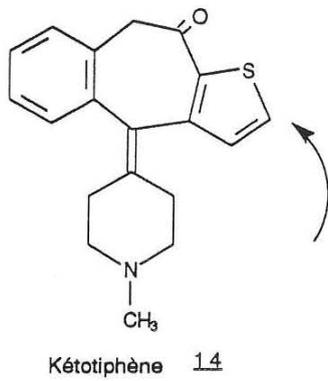
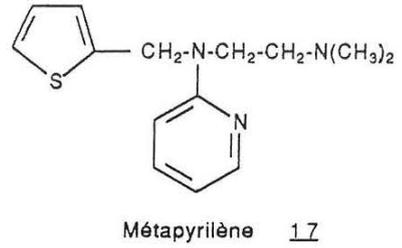
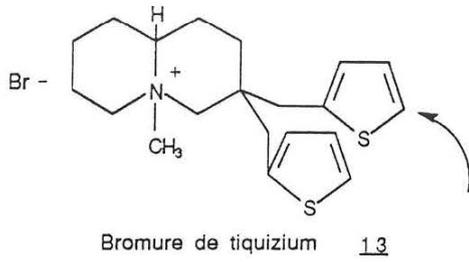
Cette toxicité semble entrer dans le cadre général des atteintes rénales aiguës provoquées par un grand nombre de dérivés analgésiques et antiinflammatoires non stéroïdiens. Elle est sans doute aggravée par la précipitation d'acide urique au niveau rénal (63).

### **1-D-3 Thiophènes substitués**

Le métabolisme des dérivés thiophéniques suivants a été étudié *in vivo*.

- le **bromure de tiquizium** est un agent anticholinergique (figure 13). Chez le rat et le chien, ce dérivé est hydroxylé en position 5 sur le noyau thiophène puis subit une O-glucuronidation (64).

- le **kétotiphène** est un dérivé aux propriétés antiinflammatoires (figure 13). Au cours de son métabolisme, ce dérivé est hydroxylé sur le noyau thiophène en  $\alpha$  du soufre (65).



**FIGURE 13.** Oxydation métabolique de divers thiophènes. Les positions oxydées sur le noyau thiophène sont indiquées par des flèches.

- le **tenoxicam** est un antiinflammatoire non stéroïdien (figure 13). Chez le rat une des voies métaboliques principales est l'oxydation du noyau thiophène suivie d'une O-glucuronidation. La position de l'oxydation n'a pas été déterminée (66).

- le **morantel** (Rumatel)<sup>R</sup> est une tétrahydropyrimidine utilisée pour traiter les infections gastrointestinales dues aux nématodes chez la vache (figure 13). Chez cet animal, ce dérivé est métabolisé par hydroxylation sur le noyau thiophène en position 5 (67).

- le métabolisme du **métapyrilène** (figure 13), antihistaminique largement utilisé il y a plus de 30 ans mais abandonné en raison de ses propriétés hépatocarcinogènes chez le rat, a été étudié récemment.

Chez le rat ce dérivé est métabolisé sur le noyau pyridine. La formation de dérivé hydroxylé sur le noyau thiophène pourtant recherchée n'a pas été détectée (68).

#### - Benzothiophènes

. Dans la série des benzo[b]thiophènes, le **mobam** est utilisé comme insecticide (figure 13).

L'administration de ce dérivé marqué au <sup>14</sup>C à la chèvre, a permis d'identifier deux produits majoritaires (90 % de la radioactivité administrée) : le premier formé par hydrolyse de la fonction carbamate, le second formé par oxydation du soufre (69).

. Par contre le métabolisme du **(diméthylamino-2 éthyl)-3 benzo[b]thiophène** (figure 13) a été étudié *in vivo* et *in vitro* chez le rat.

La formation de sulfoxyde n'a pas été mise en évidence. Le produit est majoritairement hydroxylé en position 6 (70).

. Enfin le **dibenzothiophène** (figure 13) est oxydé par les enzymes microsomaux de rat en sulfoxyde et en sulfone (71).

## I-E MOTIVATIONS ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

- Le tour d'horizon que nous venons de faire dans ce premier chapitre sur le métabolisme des composés thiophéniques montre que très peu d'études ont été réalisées sur l'oxydation métabolique des noyaux thiophènes. *In vivo*, selon les substituants portés par ce noyau, on observe la formation de composé dérivant :

de l'oxydation du soufre

de l'hydroxylation du thiophène en position 5

Mais l'oxydation *in vitro* d'aucun composé n'est connue.

- Rien n'est connu sur les enzymes impliquées dans ce métabolisme chez le rat, modèle animal le plus couramment utilisé en toxicologie et dans les études de métabolisme. Chez l'homme, les connaissances sont strictement limitées au cas de l'acide tiénilique.

- Les mécanismes d'oxydation soit enzymatique, soit chimique sont également ignorés. La connaissance de ces mécanismes serait très importante pour comprendre la formation de métabolites réactifs et à terme pour interpréter les toxicités observées, particulièrement dans le cas de l'acide tiénilique.

Le second chapitre de ce travail concerne l'hydroxylation *in vitro* des acyl-2 thiophènes. En présence de microsomes hépatiques de foies de rats traités par le phénobarbital, sont étudiées :

- l'hydroxylation de l'acide tiénilique

- l'hydroxylation des acyl-2 thiophènes.

Le troisième chapitre concerne l'hydroxylation métabolique *in vitro* de l'acide tiénilique en position 5. A ce niveau sont étudiés :

- l'effet du traitement des rats par le clofibrate sur la réaction catalysée par les microsomes hépatiques

- les enzymes impliquées dans cette réaction en utilisant des enzymes purifiées et des anticorps spécifiques.

Il existe actuellement des systèmes modèles métalloporphyriniques simples des monooxygénases à cytochrome P-450 qui miment partiellement leurs fonctions d'oxydation. Jusqu'à présent l'oxydation des noyaux hétérocycliques et donc thiophéniques par ces systèmes modèles n'a jamais été mise en évidence.

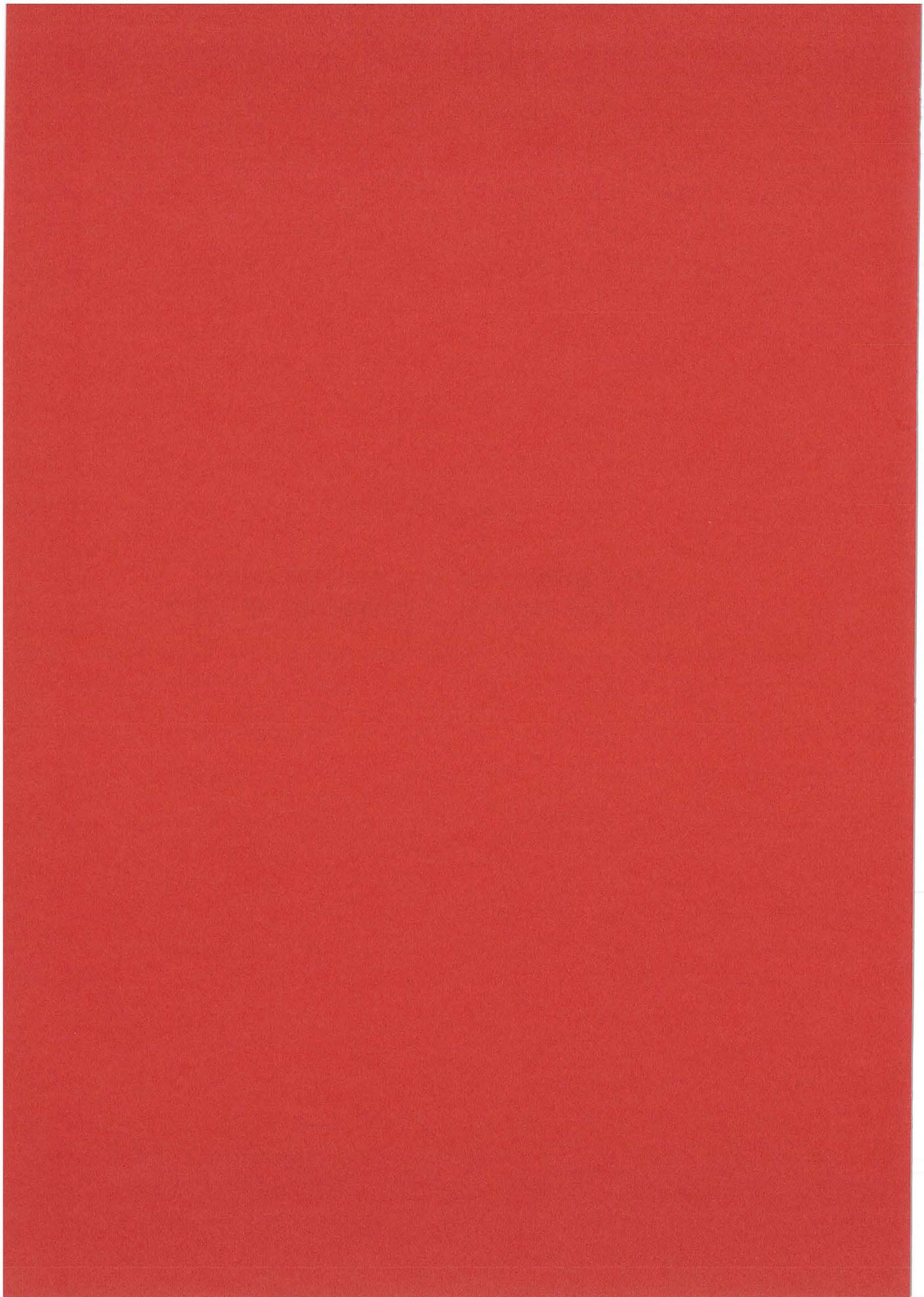
Le quatrième chapitre concerne l'oxydation de composés thiophéniques catalysée par les métalloporphyrines en présence de pentafluoroiodosobenzène.

A ce niveau nous étudions :

- l'efficacité de ces systèmes pour mimer l'oxydation métabolique de l'acide tiénilique et du suprofen
- l'oxydation de molécules thiophéniques diverses.

## CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE DE L'HYDROXYLATION  
HEPATIQUE DES ACYL-2 THIOPHENES *IN VITRO*



L'acide tiénilique est métabolisé *in vitro* chez l'homme en acide hydroxy-5 tiénilique (5OHAT).

L'AT et, plus largement, la série des acyl-2 thiophènes suivent-ils la même voie métabolique *in vitro* en présence des enzymes microsomales de rat?

Pour étudier cette réaction, et en définir les principaux paramètres, nous avons mis au point une nouvelle technique de suivi cinétique de la formation de l'acide hydroxy-5 tiénilique. Par la suite nous proposerons sa généralisation à l'ensemble des dérivés hydroxylés en position 5 des acyl-2 thiophènes.

## II-A HYDROXYLATION DE L'ACIDE TIENILIQUE

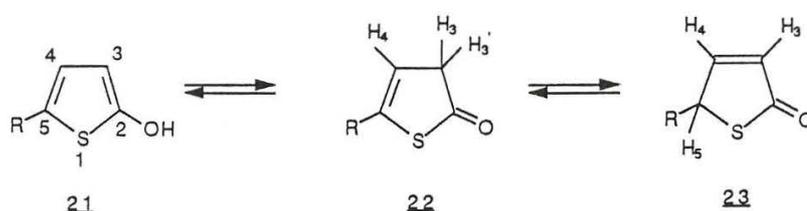
Au début de ce travail, l'hydroxylation *in vitro* de l'acide tiénilique par les enzymes hépatiques de rat et d'homme avait été mise en évidence au laboratoire en utilisant une technique employant la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). Les microsomes hépatiques de rats étaient alors incubés en présence d'acide tiénilique marqué au  $^{14}\text{C}$  en présence de NADPH. Après précipitation des protéines et centrifugation, le surnageant était concentré. Ce surnageant était conservé à 4°C au maximum 72 heures puis le 5OHAT séparé par CLHP en phase inverse (1 heure) et quantifié par comptage en scintillation liquide.

Cette méthode longue, délicate à mettre en oeuvre, donnait une mesure à point final et ne permettait pas un suivi cinétique de la réaction. En outre, l'étude de sa généralité nécessitait la synthèse de divers acyl-2 thiophènes marqués. Aussi avons-nous mis au point une méthode simple de suivi par spectroscopie UV-visible de cette réaction en utilisant les propriétés physicochimiques et spectroscopiques particulières que confère l'adjonction d'un groupement OH en position 5 sur la molécule d'acide tiénilique.

## II-A-1 Etude physicochimique de l'acide hydroxy-5-tiénylique

### II-A-1-a Tautomérie et pKa des hydroxy-2 thiophènes

Contrairement aux dérivés phénoliques, les hydroxy-2 thiophènes sont plus instables et plus difficiles d'accès. De plus, la répartition entre les trois formes tautomères est plus équilibrée que dans le cas des phénols pour lesquels, en général, la forme aromatique prédomine (72).



Dans le cas d'hydroxy-2 thiophènes substitués en position 5, la nature du substituant peut influencer l'équilibre. Celui-ci peut être étudié par RMN  $^1\text{H}$ . En effet, les trois formes possèdent un spectre caractéristique. La forme 21 se caractérise par deux doublets correspondant à un proton chacun ( $\text{H}_3+\text{H}_4$ ). Un doublet ( $\text{H}_3, \text{H}_3'$ ) et un triplet ( $\text{H}_4$ ) caractérisent la forme 22 et enfin, deux doublets ( $\text{H}_3, \text{H}_5$ ) et un doublet de doublet ( $\text{H}_4$ ) caractérisent la forme 23. Il est alors possible de quantifier la proportion des trois formes tautomères présentes en solution. Les résultats obtenus sont présentés tableau 4 (73).

Ainsi, les substituants hyperconjuguants ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ou conjuguants ( $\text{Ph}$ ) favorisent la formation de la cétone non conjuguée. Par contre, un substituant très électroattracteur ( $\text{CO}_2\text{Et}$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{COOH}$ ...) favorise la forme hydroxy (74,75). Le chlore, bien qu'électroattracteur, est par contre un mauvais groupement conjugué d'où la prédominance de la forme cétone conjuguée.

De plus, il semble que selon la structure les pK soient différents. Ainsi, le pKa de l'hydroxy-2 méthyl-5 thiophène est de 8,73 (76), c'est à dire du même ordre de grandeur que ceux trouvés pour les alkyl-phénols (77). Par contre, le dinitro-3,5 hydroxy-2 thiophène et le dinitro-2,4 phénol ont respectivement des valeurs de pKa égales à 1,52 (78) et 4,10 (79). Enfin dans les cas d'hydroxy-3 thiophènes substitués en 2 par une fonction carbonyle, on trouve des valeurs de pKa inférieures de plusieurs unités

Tableau 4. Tautomérie des hydroxy-2 thiophènes dans CCl<sub>4</sub> (d'après 73).

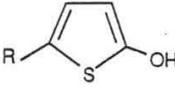
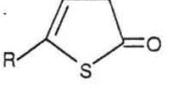
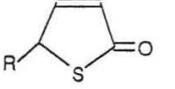
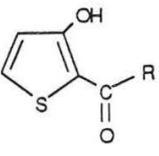
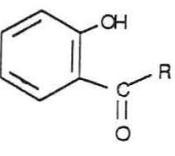
Substituant R		Proportion des formes tautomères (%)		
				
H	<u>24</u>	0	0	100
CH <sub>3</sub>	<u>25</u>	0	20	80
CH <sub>2</sub> Ph	<u>26</u>	0	30	70
Ph	<u>27</u>	0	100	0
CO <sub>2</sub> Et	<u>28</u>	85	15	0
Cl	<u>29</u>	0	2	98

Tableau 5. Valeurs des pKa de divers hydroxy-3 thiophènes et phénols (d'après 80).

Substituant R			
H	<u>30</u>	5,42	8,37
Me	<u>31</u>	6,78	10,06
NH <sub>2</sub>	<u>32</u>	6,93	8,24

à celles des phénols correspondants (80) (tableau 5). Or si pour l'hydroxy-2 méthyl-5 thiophène, la forme cétonique est majoritaire dans CCl<sub>4</sub>, pour le dinitro-3,5 hydroxy-2 thiophène (72) et les hydroxy-3 thiophènes (substitués en 2) (74), la forme énolique a été proposée comme forme majoritaire. Il semble donc que, en plus de l'effet direct des substituants, la modification de l'équilibre tautomère en faveur de la forme énolique s'accompagne d'une baisse supplémentaire du pKa.

### II-A-1-b Formes tautomères de l'acide hydroxy-5 thiénique. Etude par RMN <sup>1</sup>H.

#### **II-A-1-b-1** Equilibre thermodynamique.

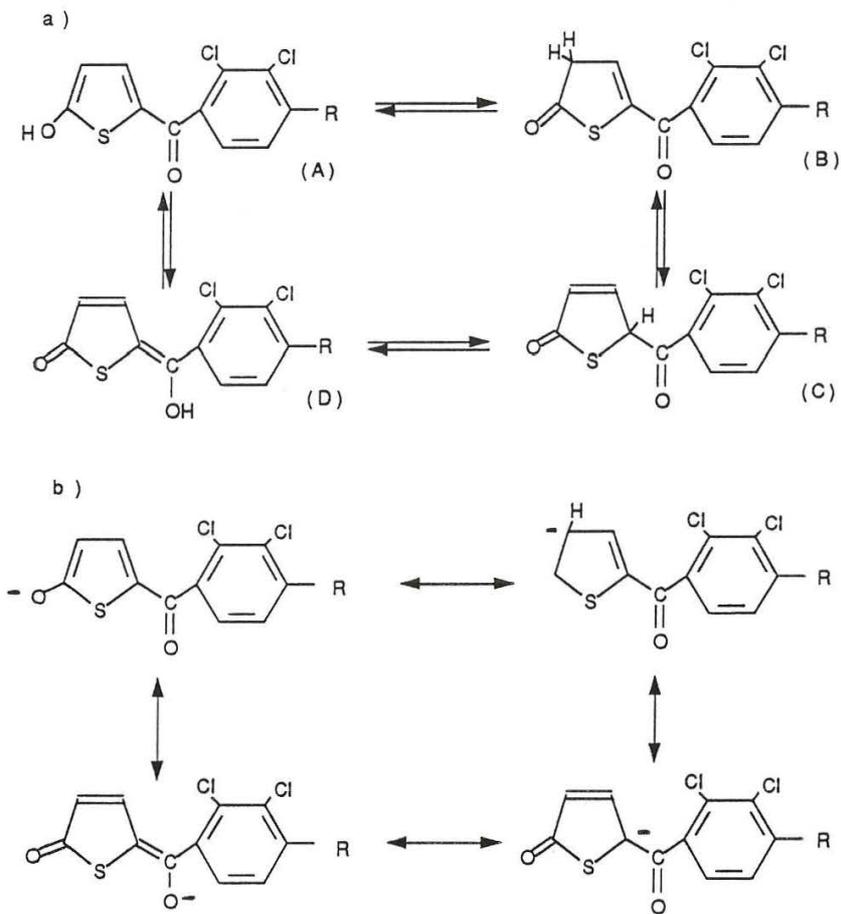
Ces remarques préliminaires vont nous permettre de comprendre le comportement tautomérique de l'acide hydroxy-5 thiénique. Sa structure conduit aux équilibres indiqués figure 14a en milieu acide et en milieu basique aux formes mésomères indiquées figure 14b.

Le tableau 6 donne les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage de quelques composés à structure thiophénique. Pour le composé 33, le chloro-2 hydroxy-5 thiophène, deux formes tautomères cétoniques ont pu être identifiées. La première, correspondant à (C), se caractérise par un ensemble de 3 doublets de doublets [H<sub>2</sub> (6,71ppm; J=2,90 et 1,80 Hz) ; H<sub>3</sub> (6,48ppm; J=2,90 et 5,95 Hz) ; H<sub>4</sub> (7,77ppm; J=1,80 et 5,95 Hz)]. Le composé 34, correspondant à B est constitué d'un doublet à 2,03 ppm (H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>) et d'un triplet à 6,02 ppm (1Hz).

A l'inverse, la forme tautomère énolique correspondant à A (figure 14a) a pu être bloquée par la formation des dérivés méthyl-éther (produits 35, 36) qui se caractérisent uniquement par 2 doublets vers 6 ppm (H<sub>4</sub>) et 7 ppm (H<sub>3</sub>). De même, la forme cétonique complètement conjuguée (produit 37), correspondant à D de la figure 14a, conduit aussi à 2 doublets vers 6 (H<sub>4</sub>) et 7 ppm (H<sub>3</sub>).

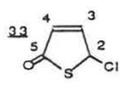
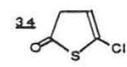
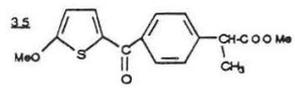
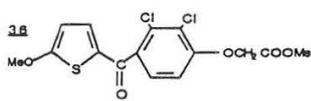
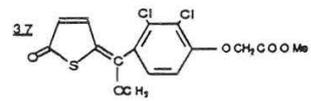
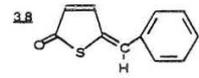
Dans le cas de 5OHAT, quelles que soient les conditions de solvant ou de pH, le spectre (figure 15) montre la présence de deux doublets, en ce qui concerne les protons thiophéniques, vers 6 et 7 ppm (tableau 6).

La première conclusion est donc que les seules structures majoritaires possibles sont la (A) et la (D).



**FIGURE 14.** Equilibre tautomère de l'acide hydroxy-5 thiénique : (a) en milieu acide ; (b) formes mésomères de l'anion de l'acide hydroxy-5 thiénique en milieu basique.

Tableau 6. Déplacements chimiques et constantes de couplage de divers hydroxy-2 thiophènes, dans différentes conditions (RMN  $^1\text{H}$ ).

Composé	Solvant	$\delta$ H <sub>3</sub> ppm	J <sub>H3-H4</sub> Hz	$\delta$ H <sub>4</sub> ppm	ref.
 (1)	Acétone	6,48	5,95	7,76	81
	Acétone	6,02	2,90	2,03	81
	$\text{CDCl}_3$	7,34	4,2	6,25	59
	$\text{CDCl}_3$	7,16	4,5	6,28	48
	$\text{CDCl}_3$	7,15	6,0	6,17	48
	$\text{CDCl}_3$	7,60	5,9	6,25	82
50HAT	DMSO	7,22	5,2	6,15	48
	$\text{CD}_3\text{CN}$	7,18	5,1	6,09	
50HSU	$\text{CD}_3\text{CN}$	7,42	5,0	6,16	
	$\text{D}_2\text{O}$ pH 1,8	7,19	4,8	5,86	
	$\text{D}_2\text{O}$ pH 4,0	7,57	4,8	5,90	
	$\text{D}_2\text{O}$ pH 11,8	7,59	4,8	5,89	

(1)  $\delta$  H<sub>2</sub> = 6,71 ppm ; J<sub>H2H3</sub> = 2;90 Hz ; J<sub>H2H4</sub> = 1,20 Hz.

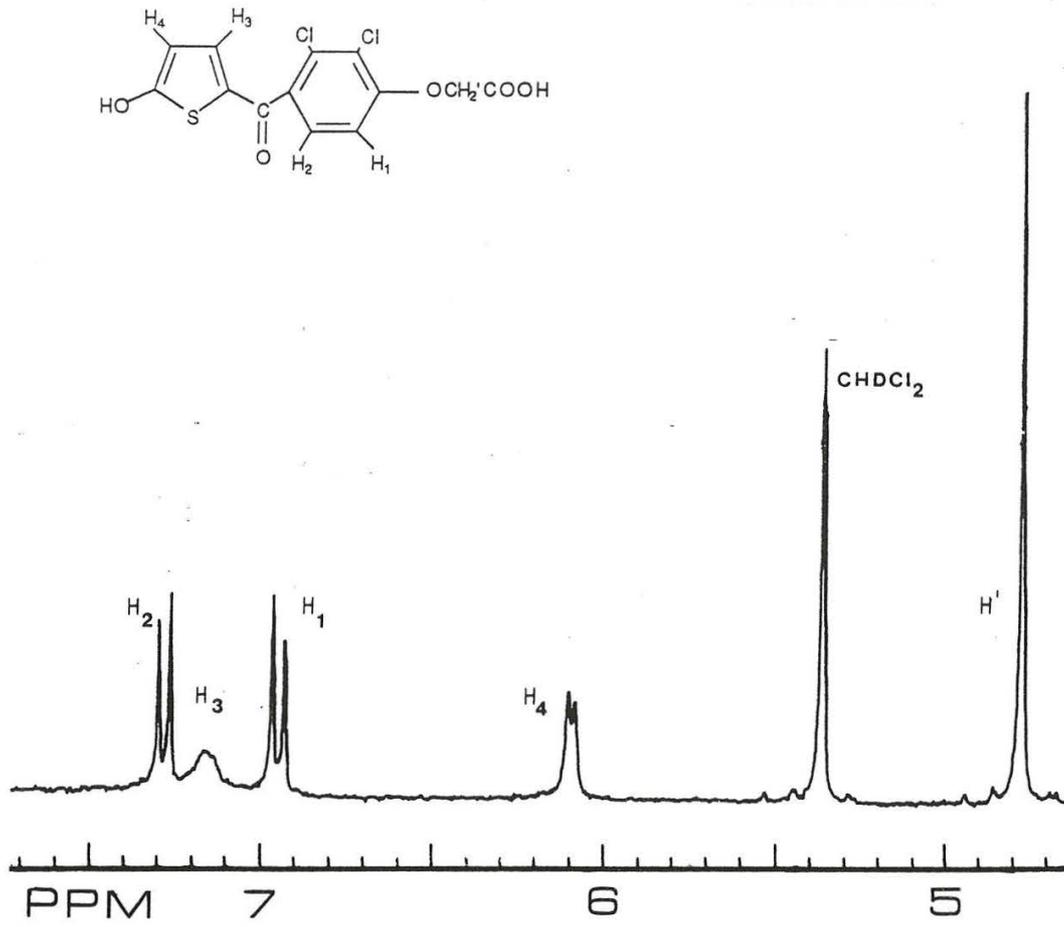


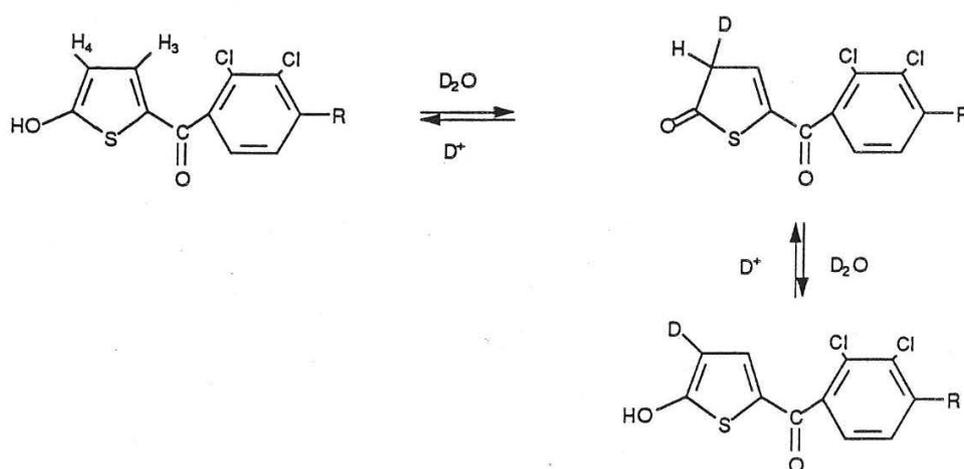
FIGURE 15. Spectre en RMN  $^1\text{H}$  du 5OHAT dans  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .référence TMS.

L'étude de la constante de couplage devrait permettre a priori de distinguer ces 2 formes. En effet, pour la forme A on peut s'attendre à une constante de couplage de l'ordre de 4,5 Hz (produits 35, 36). Par contre pour la forme D la valeur serait d'environ 6 Hz (produits 37, 38). L'effet de la charge (forme protonée ou non) a été étudiée sur le 5OHSU dans l'eau. Quelle que soit la valeur du PH (1,8 ; 4,0 ; 11,8) la constante de couplage reste inchangée. Il semble donc que la charge n'influence pas la valeur de  $J_{H_3-H_4}$ .

Dans le cas du 5OHAT, le spectre enregistré dans différents solvants donne toujours une valeur de  $J_{H_3-H_4}$  aux environs de 5 Hz. Une explication possible est la coexistence de 2 formes (A) et (D) qui sont en échange rapide, par rapport au temps RMN (une accumulation, soit de l'ordre de la seconde).

#### II-A-1-b-2 Echange du proton H<sub>4</sub> du 5OHAT

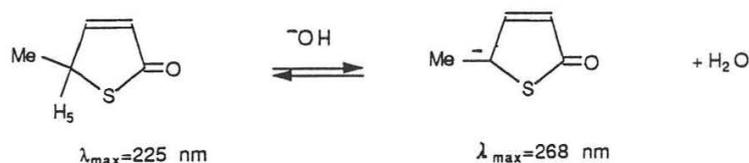
En milieu basique (pH=9) le proton H<sub>4</sub> du 5OHAT ne s'échange pratiquement pas ( $\approx 0\%$  sur une semaine à 20°C). A pH neutre, il est à moitié échangé en 1 semaine. Par contre à pH acide (pH=1) l'échange est total et rapide (quelques minutes).



II-A-1-c Etude UV du 5OHAT - détermination du pKa de la fonction OH en 5

Les spectres UV de l'AT et du 5OHAT sont indiqués figure 16. Le spectre du 5OHAT dépend fortement du pH. Ainsi à pH=1, le maximum d'absorption se situe à 350 nm, alors qu'à pH=7 ou pH=11 il est à 384 nm, avec une augmentation du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) de 15300 à 28000.

Ce déplacement vers les grandes longueurs d'onde et cette augmentation de l' $\epsilon$  sont dus à la conjugaison supplémentaire de la charge négative portée par l'oxygène en milieu basique. Ce même phénomène avait été observé dans le cas de l'hydroxy-2 méthyl-5 thiophène et avait permis la détermination du pKa apparent de ce composé (76).



Dans un premier temps nous avons vérifié que, dans le cas de l'acide thiénique, la titration de la fonction acide carboxylique ne modifiait que très peu la valeur du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon = 14000$  à pH=1, pH=7 et pH=11). De plus, comme nous le verrons plus loin (II-B-1-c), les substituants du noyau benzénique n'influencent pas la valeur de l' $\epsilon$  des dérivés hydroxy-5 aryl-2 thiophènes étudiés. Ainsi dans le cas du 5OHAT la variation de l' $\epsilon$  observée est attribuée à la titration de la fonction hydroxy en 5.

Des solutions tamponnées à différents pH entre 1 et 9 ont été préparées. Le 5OHAT est dissout à concentration identique dans ces différentes solutions. Un spectre UV entre 500 et 220 nm est alors enregistré pour chaque solution. Cet ensemble de courbes se caractérise par un point isobestique à 361 nm. Ensuite la DO mesurée à 390 nm est portée en fonction du pH sur la figure 17. Cette courbe permet de déterminer la valeur du pKa (apparent) du 5OHAT qui est d'environ 2,5. Cette valeur est tout à fait comparable à celle trouvée pour l'acetyl-5 nitro-3 hydroxy-2 thiophène (78) qui est de 2,3.

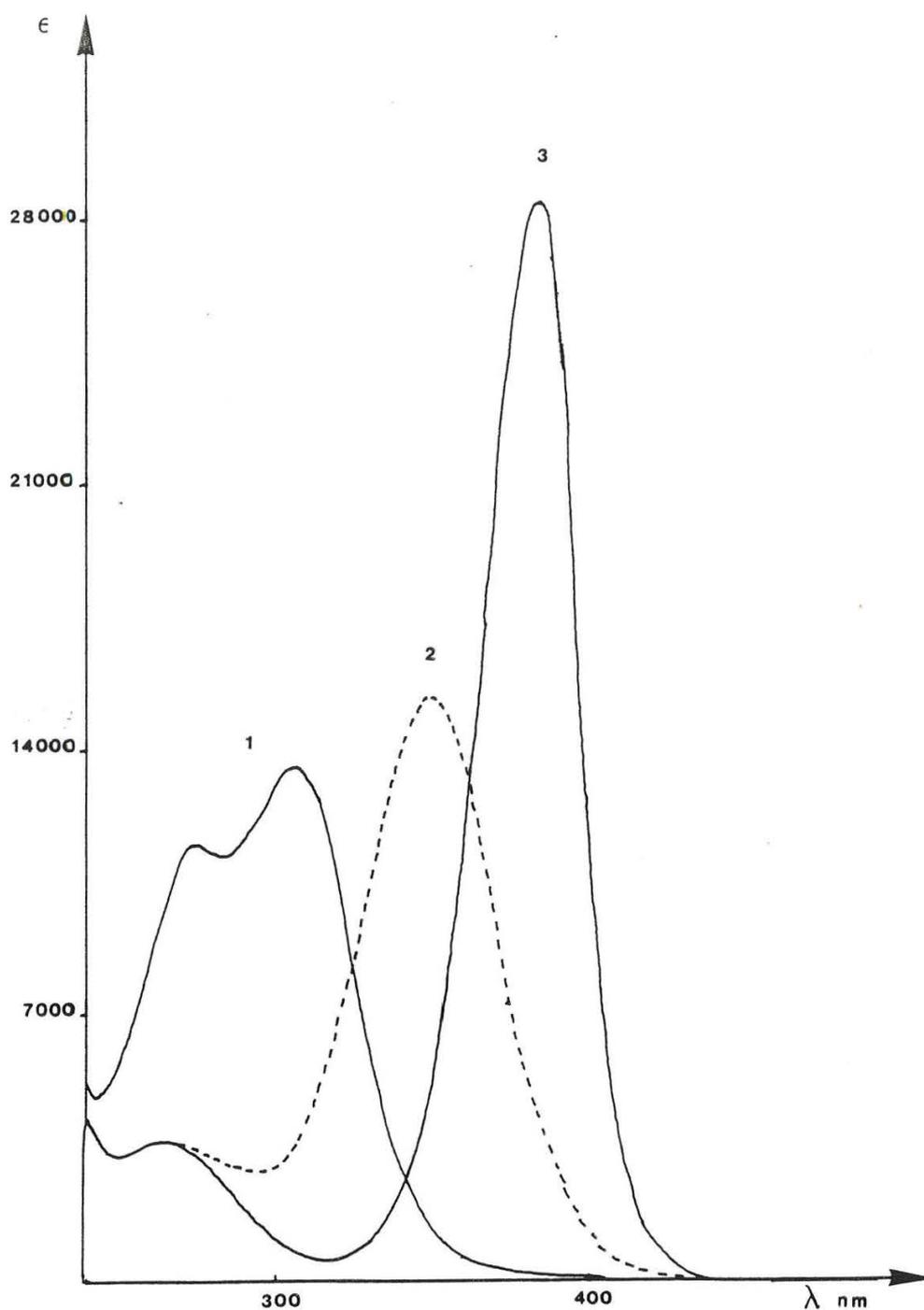


FIGURE 16. Spectre UV-visible de l'acide tiénilique à pH 7,4 (1) et de l'acide hydroxy-5 tiénilique à pH 1 (2) et à pH 11 (3).

pH 1 : tampon HCl/KCl, pH 7,4 : tampon tris/HCl, et pH 11 : tampon carbonate/bicarbonate de sodium.

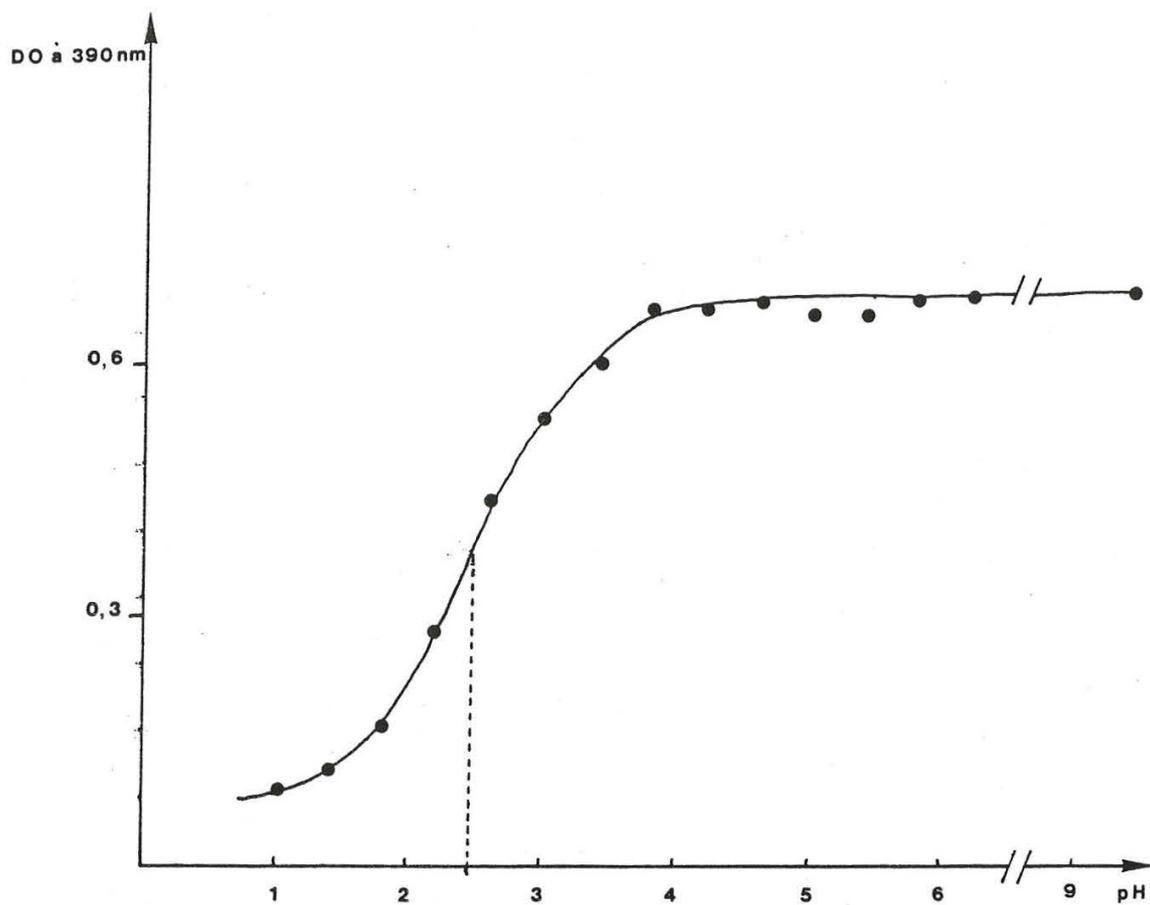


FIGURE 17. Détermination du pKa de la fonction OH en position 5 sur le noyau thiophène de l'acide hydroxy-5 tiénilique.

5OHAT 20  $\mu\text{M}$  final. Expérience réalisée en double, à deux concentrations différentes en 5OHAT, selon le protocole décrit en Y-B-3-A

Cette mesure de pK nous permet d'affirmer qu'à pH physiologique le 5OHAT absorbe vers 384 nm et est sous forme bisanionique. Ceci contribue d'ailleurs à renforcer sa solubilité. Le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) de cette forme mesurée à pH 7,4 (tampon tris HCl) par des techniques classiques est de 28 000 à 384 nm. Ainsi le pK de la fonction OH en position 5 du 5OHAT d'une part, la valeur élevée de son  $\epsilon$  à grande longueur d'onde (384 nm) d'autre part, ont motivé la mise au point d'une technique spectrophotométrique UV simple de détection de ce dérivé en continu dans les conditions de fonctionnement des milieux biologiques.

### II-A-2 Suivi cinétique de la formation du 5OHAT par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital

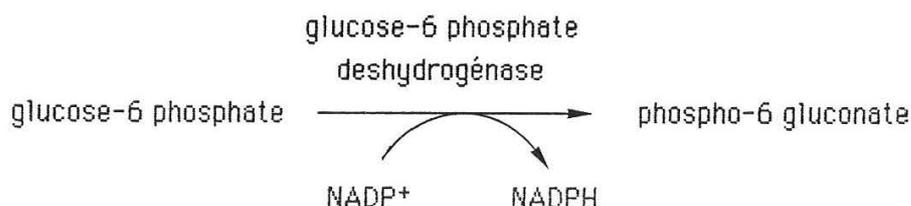
L'acide 5OHAT formé est détecté par spectrophotométrie UV d'une solution contenant les microsomes hépatiques, le NADPH et l'acide tiénilique en présence de l'oxygène de l'air.

#### II-A-2-a Description de la méthode

On dispose d'une solution de tampon phosphate pH 7,4 contenant :

- les microsomes obtenus après plusieurs ultracentrifugations d'homogénats de foie de rats de race Sprague Dawley. Cette fraction contient majoritairement les systèmes monooxygénasiques à cytochrome P-450 du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes.

- une solution de NADP (nicotinamide dinucléotide), G6P (glucose-6 phosphate) et G6PDH (glucose-6 phosphate deshydrogénase) permettant la formation du NADPH et son maintien à un niveau stationnaire selon la réaction :



Cette solution est répartie dans 2 cuves à bords noirs d'un spectrophotomètre et préincubée à 37°C pendant 2 minutes. Le spectre est tracé après addition de l'acide tiénilique dans la cuve échantillon et agitation.

L'enregistrement du spectre UV-visible entre 500 et 370 nm en fonction du temps est présenté figure 18. Après 3 minutes de stabilisation de la solution due à l'agitation, un maximum d'absorption apparaît à 384 nm dont la croissance est linéaire en fonction du temps pendant environ 10 min. Cette bande d'absorption correspond à la formation du 5OHAT.

Le suivi direct de la cinétique de formation du 5OHAT est réalisé dans les mêmes conditions en suivant l'augmentation de la DD au sein de la solution microsomale à 390 nm. L'enregistrement obtenu est reproduit figure 19. La mesure de la vitesse dans la partie linéaire de la courbe permet d'accéder à  $V_0$ , vitesse initiale de la réaction. Connaissant le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) du 5OHAT à 390 nm et la quantité de protéines microsomales, la vitesse est exprimée en nmoles de 5OHAT formées par mg de protéines et par minute.

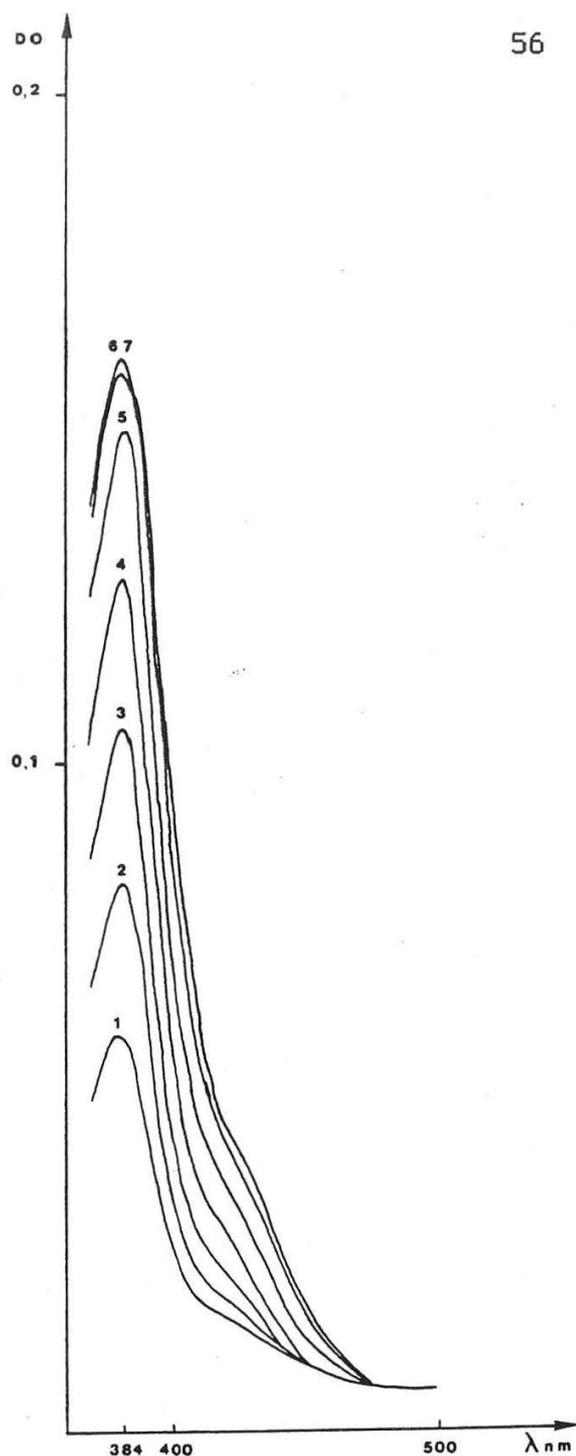
La formation du 5OHAT est linéaire en fonction du temps et atteint un plateau. Le produit formé est stable. L'origine du plateau est due à la consommation de l'oxygène disponible dans la cuve. Une oxygénation du tampon après le plateau permet de redémarrer la réaction ; l'utilisation de tampon saturé en oxygène prolonge sa durée.

A 390 nm, la variation d'absorption due au NADPH, dont la concentration est stationnaire grâce à la présence d'un système générateur permettant sa régénération rapide, est négligeable.

#### **II-A-2-b Validation de la méthode par rapport à la technique CLHP**

La technique CLHP précédemment mise au point au laboratoire (48) comporte une incubation des microsomes, en présence d'AT, et du système générant le NADPH, puis une centrifugation après précipitation des protéines. L'AT et le 5OHAT sont séparés par CLHP et détectés par spectroscopie UV. L'utilisation d'AT radioactif permet de recueillir une fraction de 5OHAT marquée qui est quantifiée par comptage en scintillation liquide.

Afin de comparer les résultats obtenus par les 2 techniques, une incubation réalisée avec un mélange d'AT froid et radioactif et des microsomes

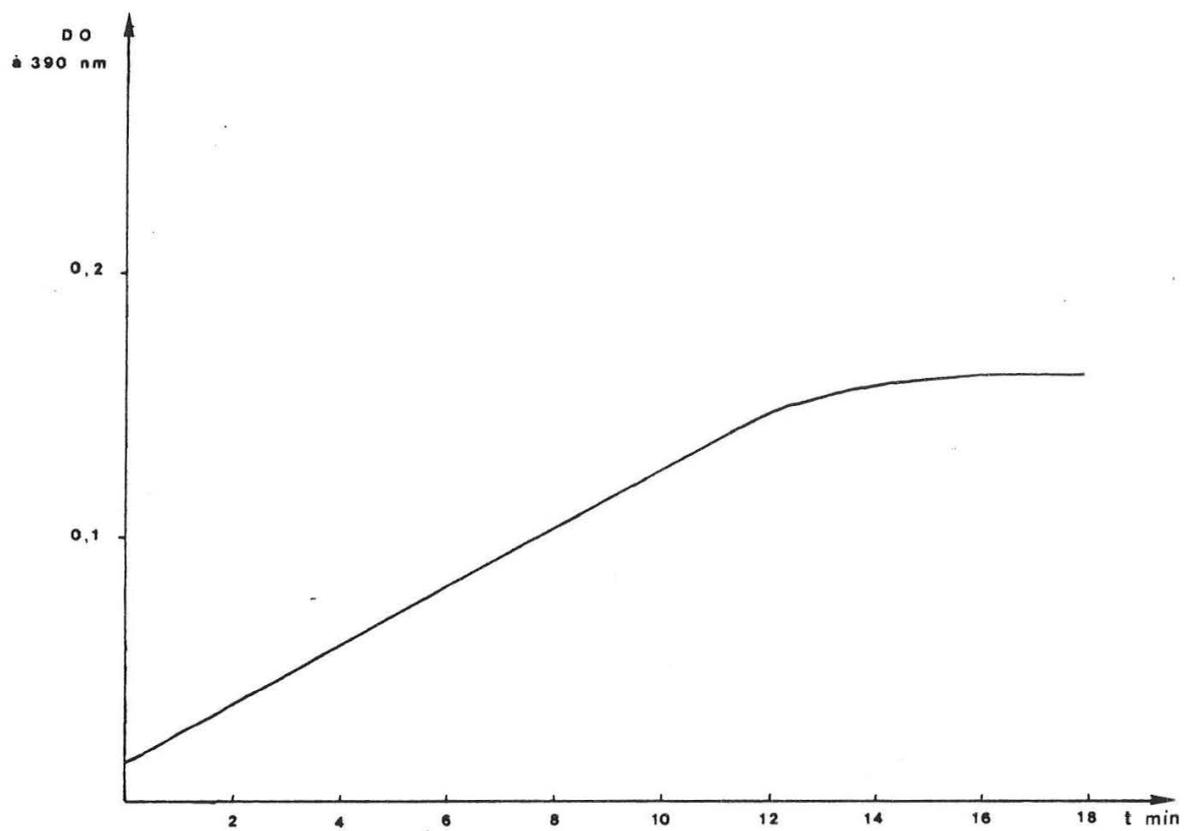


**FIGURE 18.** Suivi en spectroscopie UV-visible de l'hydroxylation de l'AT par les microsomes hépatiques de rats. Apparition du spectre du 5OHAT en fonction du temps.

La préparation de la solution microsomale est réalisée comme décrite en Y-D-2-a (microsomes de rats PB 2,4 nmoles P-450/mg protéine ; P-450 : 1 nmoles P-450/ml d'incubation, AT  $10^{-4}$ M, G6P 10 mM, G6PDH 2 u/ml, NADP 1 mM, tampon phosphate 0,1 M pH 7,4). Le 5OHAT formé est détecté par suivi spectroscopique entre 500 nm et 370 nm.

$t_1 = 4$  min. un spectre est enregistré toutes les 2 min.

$t_2 = 6$  min,  $t_3 = 8$  min, ...



**FIGURE 19.** Hydroxylation en 5 de l'AT ( $10^{-4}M$ ) par les microsomes hépatiques de rat (PB) : étude de la DO à 390 nm en fonction du temps.

La préparation de la solution microsomale et la détection du 5OHAT sont réalisées comme décrit en V-D-2. (conditions figure 18).

hépatiques de rats traités par le PB a été étudiée par la technique UV puis par la technique CLHP. Par la technique UV, selon le protocole décrit en V-D-2, la quantité de 5OHAT formée est de 1,1 nmoles 5OHAT/mg protéine/min. Après avoir suivi la formation du 5OHAT pendant 10 min, la réaction est stoppée par addition de méthanol. La quantité de 5OHAT formée analysée par la technique CLHP (protocole V-D-9) est de 0,98 nmoles 5OHAT/mg protéine/min. Les rendements en 5OHAT obtenus sur 2 expériences ont été concordants ( $\pm 5 \%$ ).

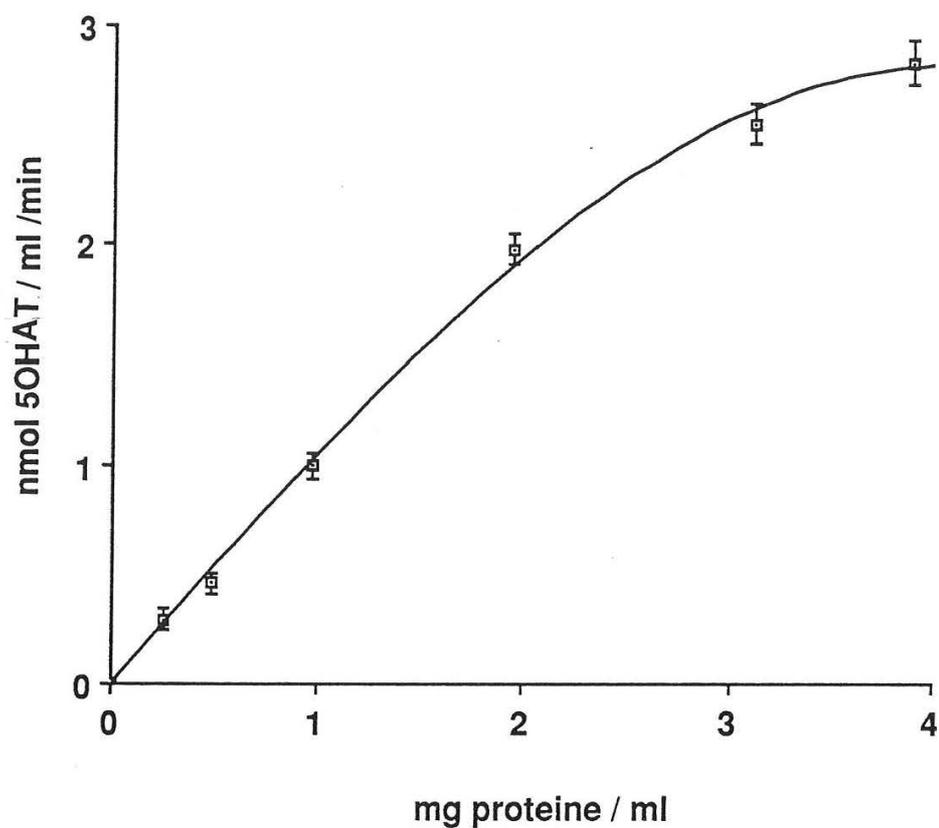
L'utilisation de la technique CLHP en présence de substrat radioactif est relativement lourde à mettre en oeuvre. La technique UV décrite possède trois avantages : tout d'abord elle permet un suivi cinétique précis de la formation du 5OHAT. De plus sa réalisation est rapide et simple. Enfin et surtout elle ne nécessite pas de produit radioactif. Le seuil de détection dans une solution turbide comme la solution microsomale se situe à 0,03 nmoles 5OHAT/mg de protéine/min. Toutefois, pour de très faibles taux d'activité enzymatique, la technique CLHP constitue une méthode de détection plus sensible.

### **II-A-3 Paramètres de la réaction d'hydroxylation en 5 de l'AT**

#### **II-A-3-a Conditions de cinétique michaelienne et mesure de la $K_m$ avec les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital**

L'hydroxylation de l'AT a été étudiée avec les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.

- Les conditions expérimentales pour lesquelles l'activité hydroxylante est proportionnelle à la quantité de protéines hépatiques utilisée ont été déterminées (figure 20). La vitesse de formation du 5OHAT varie linéairement jusqu'à des concentrations de 2 mg de protéine par ml. Au-delà, la densité optique de la suspension microsomale est trop forte et la loi de Beer-Lambert n'est plus respectée. Les barres d'erreurs expriment la déviation standard comme dans la suite du document (sauf notification).



**FIGURE 20.** Vitesse de formation du 5OHAT en fonction de la concentration de protéines microsomales de foies de rats (PB).

Les conditions expérimentales sont celles décrites en Y-D-2. Chaque point est la moyenne de 2 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux (2,4 nmoles P-450/mg protéine)..

- La vitesse de la réaction est fonction de la concentration d'AT dans la cuve et atteint un plateau (0,84nmole/mg protéine/min)  $V_m$  à une concentration en substrat de  $8 \cdot 10^{-5}M$  (figure 21).

- Le tracé de  $1/V$ , inverse de la vitesse d'hydroxylation de l'AT en fonction de  $1/c$ , inverse de la concentration en AT, est présenté figure 22. Le tracé obtenu est une droite. La relation de Michaelis-Menten s'applique donc et selon la représentation de Lineweaver-Burk, on a :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

La valeur de  $1/k_m$  est obtenue en extrapolant la droite obtenue jusqu'à l'axe des abscisses.

$K_m$  exprime l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat. Toutefois le système microsomal des monooxygénases à cytochrome P-450 susceptible de catalyser la réaction est, nous l'avons vu, un système multienzymatique. La  $K_m$  obtenue (figure 22),  $12,4 \cdot 10^{-6}M$ , est dans ce cas une "pseudo  $K_m$ " car elle exprime l'affinité apparente globale d'un certain nombre d'isoenzymes susceptible de catalyser l'hydroxylation de l'AT. La  $V_m$  est de 1,00 nmole de 5OHAT par mg de protéine et par min.

### **II-A-3-b** Influence de différents paramètres sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital

Pour préciser le système enzymatique impliqué dans la réaction d'hydroxylation de l'AT, l'influence de différents paramètres a été étudiée. Les résultats sont résumés dans le tableau 7.

#### **II-A-3-b-1** Nécessité du NADPH, cas du NADH

La réaction d'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital a été étudiée en absence de NADPH avec ou sans NADH. Les résultats obtenus (tableau 7) montrent que le

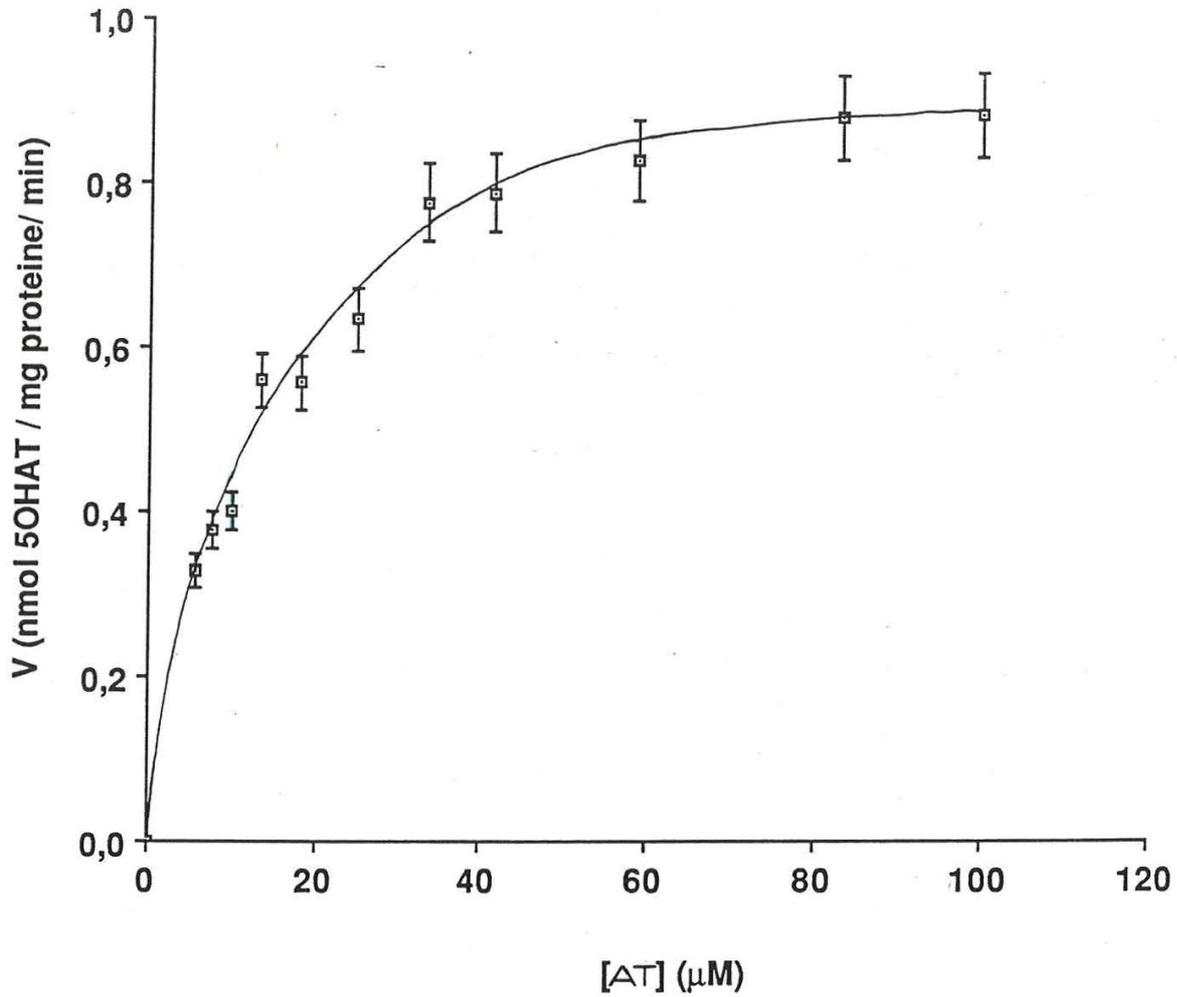


FIGURE 21. Vitesse d'hydroxylation de l'AT par les microsomes hépatiques de foies de rats traités au phénobarbital en fonction de la concentration en AT.

Les conditions expérimentales sont celles décrites en Y-D-2. Chaque point est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux (1 nmole P-450/ml ; 2,45 nmoles P-450/mg protéine). Les barres d'erreur expriment comme dans la suite du document la déviation standard.

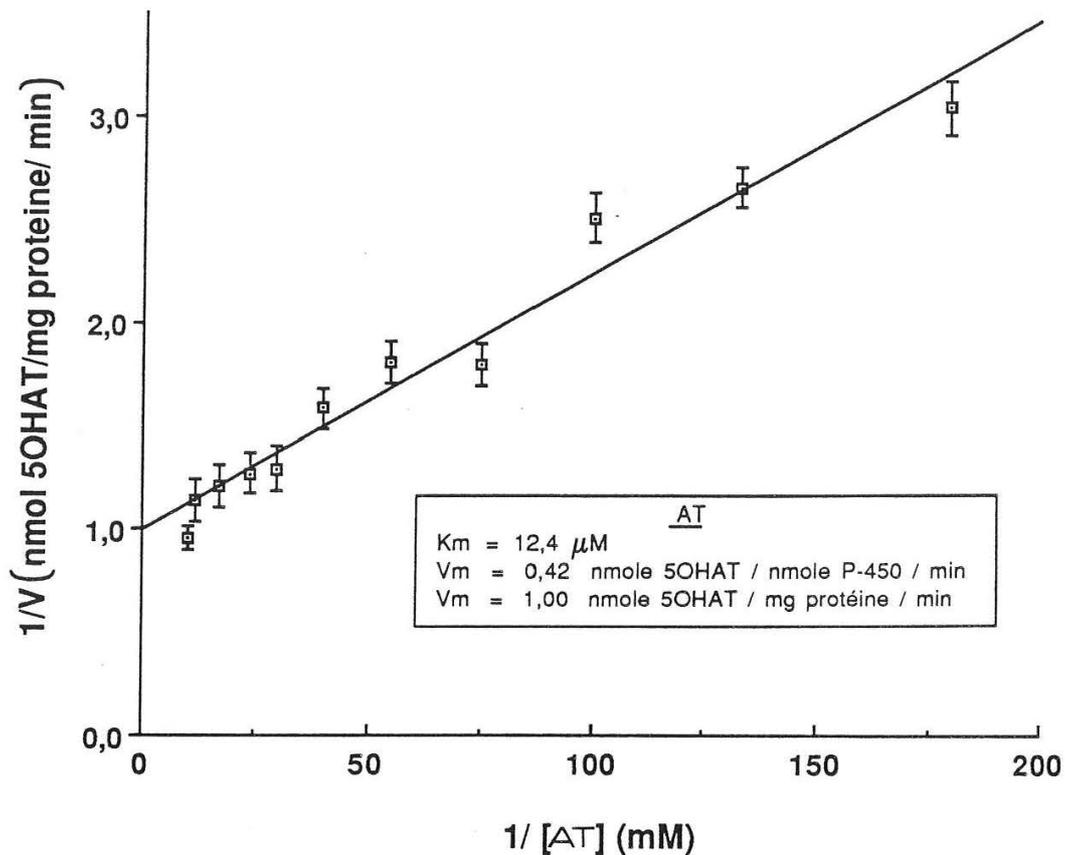


FIGURE 22. Représentation de Lineweaver-Burk de l'hydroxylation de l'AT par les microsomes hépatiques de rats (PB).

Les conditions expérimentales sont celles décrites en Y-D-2. Les conditions d'induction sont décrites en Y-C-1. Chaque point est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux. (1 nmole P-450/ml ; 2,4 nmoles P-450/mg protéine).

Tableau 7. Influence de différents paramètres sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.

Témoin (1)	Activité AT hydroxylase
Cofacteur	nmole 5OHAT/mg protéine/min
- Sans NADPH	< 0,03
- Sans NADPH + NADH 0,7 mM	< 0,03
+ NADH 0,7 mM	1,4
Inhibiteur (2)	<u>% Inhibition (4)</u>
CO	74 %
SKF 525A 2.10 <sup>-6</sup> M	45 %
10 <sup>-5</sup> M	68 %
10 <sup>-4</sup> M	78 %
Métyrapone 10 <sup>-5</sup> M	60 %
10 <sup>-4</sup> M	75 %
α-Naphtoflavone 10 <sup>-5</sup> M	68 %
Traitement thermique	<u>% Activité (4)</u>
45°C 3 min	96 %
100°C 5 min	< 3 %
Inducteur (3)	<u>% Activité (4)</u>
aucun (non traité)	108 %
3MC	65 %
PCN	60 %
CLO	355 %

L'activité AT hydroxylase est mesurée selon la méthode UV décrite en Y-D-2 (G6P 10mM, G6PDH 2u/ml, NADP 1mM, AT 10<sup>-4</sup>M, P-450 1nmole/ml, tampon phosphate 0,1M pH 7,4).

(1) L'activité témoin a été mesurée sur microsomes hépatiques de rats mâles de race Sprague-Dawley traités par le phénobarbital (protocole décrit en Y-C-1). (2) Les inhibiteurs ont été utilisés selon le protocole décrit en Y-E-1-a,b.

(3) Les traitements par les inducteurs ont été réalisés selon le protocole décrit en Y-D-2. nmoles P-450/mg protéine: 2,4 (PB), 0,8 (non traité), 1,5 (3MC), 1,5 (PCN), 1,6 (CLO).

(4) Activité exprimée par rapport au témoin (1).

Chaque valeur est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes de 1 à 2 lots de 5 animaux.

NADPH est bien indispensable au fonctionnement de la réaction. L'addition de NADH 0,7 mM en présence de NADPH entraîne une potentialisation de 40 % de la réaction (1,4 nmoles 5OHAT/mg protéine/min).

#### **II-A-3-b-2** Nécessité de l'intégrité des protéines

Un chauffage préalable 5 min. à 100°C des microsomes inhibe presque totalement l'hydroxylation de l'AT. Par conséquent, d'une part le NADPH, qui assure le transport des électrons aux cytochromes P-450 et le fonctionnement de la flavine monooxygénase, et d'autre part l'intégrité des protéines microsomales sont indispensables pour observer l'hydroxylation microsomale de l'AT. Cette activité enzymatique est donc NADPH dépendante.

#### **II-A-3-b-3** Rôle de la NADPH-cytochrome P-450 réductase

Les anticorps anti-cytochrome P-450 réductase utilisés ont été obtenus par E. Rouer (CHU Necker) après injection de cytochrome P-450 réductase provenant de rats non traités à des lapins et isolement de la fraction immunoglobuline (83). Les anticorps (AC) ont été préincubés à différentes concentrations en présence de la solution microsomale contenant le système formant le NADPH et l'AT ajouté selon le protocole V-E-2-b. Les activités AT hydroxylase mesurées sont rapportées figure 23. A 5 mg d'anticorps anti-cytochrome P-450 réductase, l'inhibition de l'activité AT hydroxylase est proche de 80 %.

A priori, il existe deux systèmes enzymatiques susceptibles de catalyser l'activité AT hydroxylase :

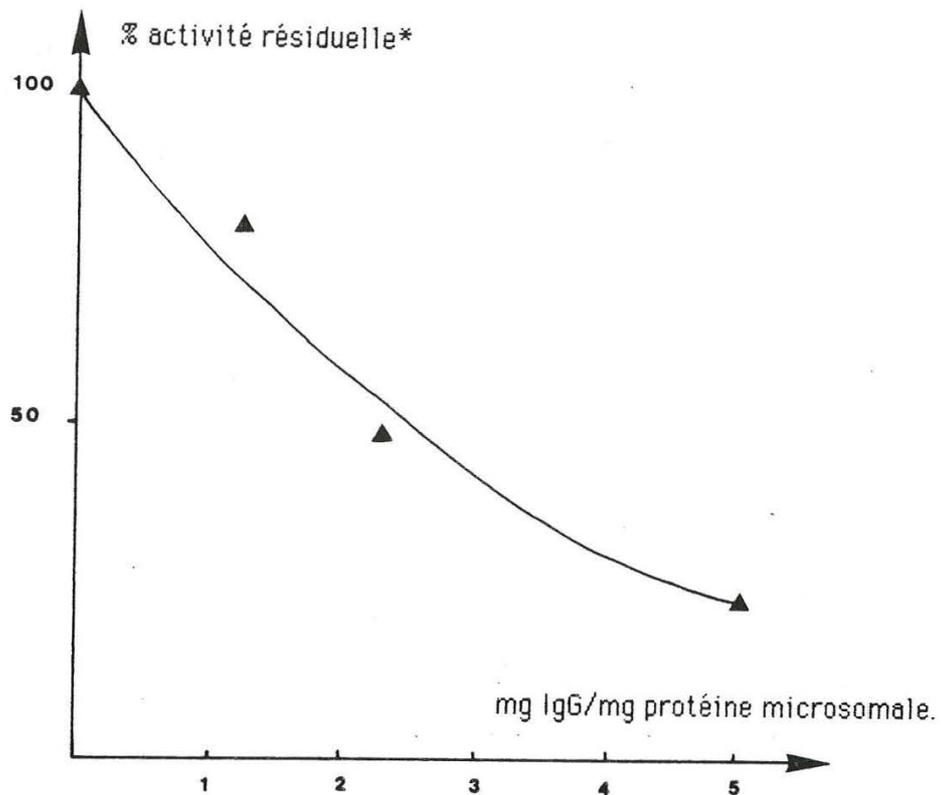
- celui des flavines monooxygénases
- celui des cytochromes P-450

Les deux possibilités sont étudiées dans le paragraphe suivant.

#### **II-A-3-b-4** Rôle du chauffage à 45°C et des inhibiteurs des cytochromes P-450

Les microsomes ont été chauffés à 45°C pendant 3 min., de façon à inhiber l'action des flavine monooxygénases, avant d'être utilisés pour mesurer l'activité AT hydroxylase. Cette activité n'est pas significativement modifiée par ce traitement.

Différentes molécules susceptibles d'inhiber le fonctionnement des cytochromes P-450 ont été incubées en présence de la solution microsomale



**FIGURE 23.** Action de l'anti-cytochrome P-450 réductase sur l'hydroxylation de l'AT  $10^{-4}M$  catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.

\* exprime l'activité mesurée en présence de l'anti-cytochrome P-450 réductase par rapport à l'activité dosée en présence d'une quantité correspondante d'IgG non spécifique. Les microsomes hépatiques proviennent de rats traités par le phénobarbital (protocole Y-C-1) 2,1 nmoles P-450/mg protéine. Les anticorps sont ajoutés selon le protocole décrit en Y-E-2-b puis l'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY (Y-D-2) 1,3 nmole P-450/ml. Chaque point représente une mesure simple. 100 % d'activité : 0,95 nmole 5OHAT/mg protéine/min.

contenant le système générant le NADPH 1 min. avant l'addition de l'AT (protocole décrit en V-E-1-a et b). Le SKF 525 A, la métyrapone, l' $\alpha$ -naphthoflavone utilisés à différentes concentrations inhibent significativement la réaction (de l'ordre de 70 % pour des concentrations respectivement  $10^{-5}M$ ,  $10^{-4}M$  et  $10^{-5}M$ ). De plus, l'hydroxylation de l'AT réalisée dans un tampon saturé par un mélange CO/O<sub>2</sub> : 80/20 est inhibée à 74 %.

Par conséquent des inhibiteurs des cytochromes P-450 agissant par 2 mécanismes ont été utilisés :

- le SKF 525A et l' $\alpha$ -naphthoflavone qui sont connus pour se fixer au site actif de la protéine grâce à des interactions hydrophobes non spécifiques. Dans ce cas l'AT et l'inhibiteur entrent en compétition

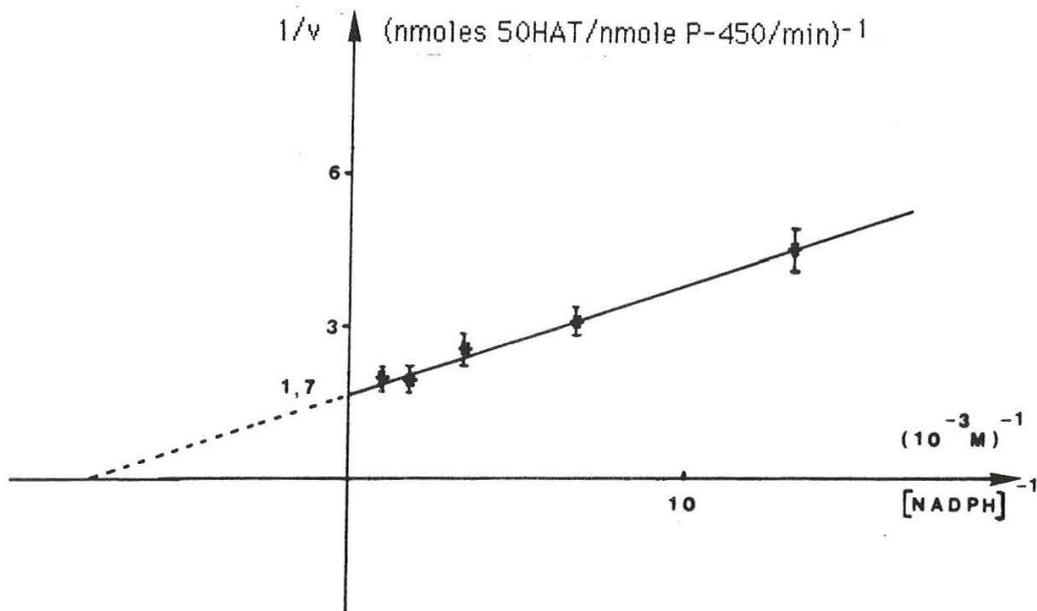
- le CO et la métyrapone qui se lient à l'atome de fer par l'intermédiaire d'un azote pyridinique pour former un complexe. La fixation de l'oxygène moléculaire entre alors en compétition avec cette liaison. Le CO, en milieu réducteur, se fixe sur l'hème et bloque le cytochrome P-450 sous forme cyt. P-450 Fe<sup>II</sup>-CO.

Les résultats obtenus avec ces inhibiteurs et l'effet du chauffage à 45°C de la solution microsomale permettent de conclure que l'activité AT hydroxylase est dépendante des monooxygénases à cytochromes P-450.

#### II-A-3-b-5 Activité AT hydroxylase en fonction de la concentration en NADPH

L'activité AT hydroxylase a été mesurée en présence de différentes concentrations en NADPH.

Le tracé de  $1/v$  (inverse de la vitesse d'hydroxylation de l'AT) en fonction de  $1/[NADPH]$  (inverse de la concentration en NADPH) est présenté figure 24. La droite obtenue permet d'accéder au  $K_m$  de la réaction qui est de  $10^{-4}M$ . Les conditions utilisées dans les mesures précédentes (NADPH 1 mM) sont donc saturantes en NADPH. A titre comparatif, la  $K_m$  en NADPH de l'hydroxylation microsomale de l'acide laurique est également de  $10^{-4}M$  (84).



**FIGURE 24.** Détermination de la  $K_m$  par rapport au NADPH de la réaction d'hydroxylation de l'acide tienilique  $10^{-4}M$  par les microsomes hépatiques de rats (PB). (2,0 nmole P-450/mg protéine ; 1 nmole P-450/ml).

Les conditions de mesure de l'activité AT hydroxylase sont décrites en Y-D-2. Chaque point est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux.

#### II-A-3-b-6 Effet du traitement des rats par des inducteurs des cytochromes P-450

Les activités dépendantes des cytochromes P-450 sont susceptibles d'être modifiées par le traitement des rats par différents inducteurs. Des rats ont été traités par différents inducteurs connus des cytochrome P-450 hépatiques responsables du métabolisme des xénobiotiques chez le rat. Les résultats résumés dans le tableau 7 montrent que :

- le traitement des animaux par le méthyl-3 cholanthrène et la cyano-16  $\alpha$  prégénolone diminue légèrement la vitesse de l'hydroxylation de l'AT
- les microsomes de rats non traités ont une activité proche de ceux traités par le phénobarbital
- l'utilisation du clofibrate, connu pour induire l'hydroxylation hépatique en 12 de l'acide laurique, multiplie par 4 l'hydroxylation de l'acide tiénilique. Une étude plus détaillée de l'induction par le clofibrate fera l'objet du second chapitre.

#### II-A-4 Hydroxylation par les microsomes hépatiques humains

La réaction d'hydroxylation de l'AT a été réalisée en présence de microsomes hépatiques humains. Un tracé expérimental obtenu est présenté figure 25. La réaction est linéaire pendant 5 min et atteint un plateau beaucoup moins rapidement que dans le cas des microsomes hépatiques de rats. La vitesse de la réaction étant plus faible, l'oxygène est consommé moins rapidement. Le tableau 7bis résume les activités mesurées sur les microsomes provenant de 5 donneurs différents. Les valeurs se situent entre 0,2 et 0,4 nmoles de 5OHAT formées/mg de protéine/min. Elles sont inférieures à l'activité mesurée avec les microsomes de rat et là encore comparables aux résultats mesurés par la technique CLHP.

Cette étude préliminaire de l'hydroxylation de l'AT par les microsomes humains vise à démontrer que cette technique n'est pas limitée à l'étude de l'hydroxylation microsomale chez le rat. Elle peut être étendue à tous les systèmes animaux ou végétaux susceptibles de catalyser la réaction .

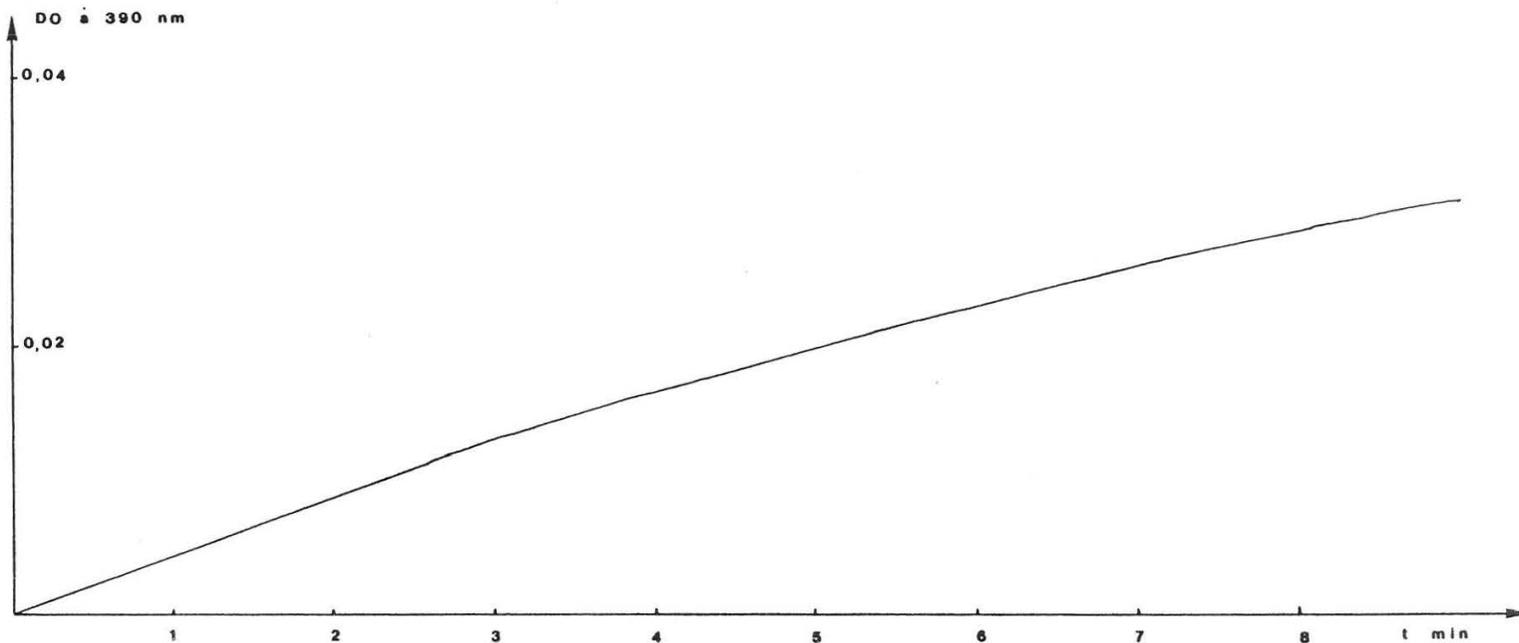
**Tableau 7bis. Hydroxylation de l'acide tiénilique  $10^{-4}M$  par les microsomes hépatiques humains.**

Foie	H 97	F 504	F 510	H 86	H 96
nmole P-450/ mg protéine	0,66	0,24	0,29	0,2	0,74
nmole 5OHAT/ mg protéine/min	0,23	0,24	0,38	0,20	0,37

Les microsomes hépatiques Foie 504 et Foie 510 proviennent de la banque de foies d'Antoinette Lemoine et nous ont été fournis par Liliane Kiffel (CHU Necker). Les microsomes hépatiques H97, H86, H96 nous ont été fournis par Philippe Beaune (CHU Necker).

Les foies ont été prélevés après mort accidentelle et congelés.

La mesure de l'activité AT hydroxylase a été réalisée dans les conditions décrites en Y-D-2. (0,1 à 0,6 nmole P-450/ml).



70

**FIGURE 25.** Hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique  $10^{-4}M$  par les microsomes hépatiques humains H86 : enregistrement de l'absorption à 390 nm en fonction du temps.

L'hydroxylation de l'AT a été mesurée par la méthode UV dans les conditions décrites en Y-D-2 (AT  $2 \cdot 10^{-4}M$ , P-450 : 0,16 nmoles P-450 / ml).

Pour conclure cette première partie nous dégagerons plusieurs points essentiels.

Une nouvelle technique de suivi cinétique de la formation de l'acide hydroxy-5 tiénilique a été mise au point. Elle s'avère particulièrement performante pour mesurer *in vitro* la formation de ce dérivé au sein d'une solution microsomale de foie de rat comme de foie humain. Par cette technique, nous avons montré que la réaction d'hydroxylation de l'AT par les microsomes de rats est catalysée par une ou plusieurs isoenzymes du cytochrome P-450.

En seconde partie de ce chapitre nous étudierons les possibilités plus larges qu'offre cette technique, notamment pour la mise en évidence éventuelle de l'hydroxylation métabolique d'autres dérivés du thiophène.

## **II-B HYDROXYLATION DES AROYL-2 THIOPHENES PAR LES MICROSOMES HEPATIQUES DE RATS**

### **II-B-1 Propriétés physicochimiques comparées des hydroxy-5 aroyl-2 thiophènes**

Afin de détecter la formation éventuelle de produits hydroxylés en 5, dans la famille des aroyl-2 thiophènes, une étude physicochimique (RMN, UV, pKa) a été faite avec les quelques composés suivants :

- l'hydroxy-5 suprofen (5OHSU)
- l'hydroxy-5 parachlorobenzoyl-2 thiophène (5OHCBT)
- l'hydroxy-5 (dichloro-2',3' methoxy-4)-benzoyl-2 thiophène (5OHMBT)

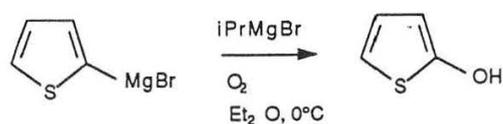
Le 5OHSU nous a été fourni par le Professeur Y. Mori, Directeur du Laboratoire de Radiochimie de l'Université Pharmaceutique de GIFU, Japon.

Pour les 2 autres composés les authentiques ont dû être synthétisés.

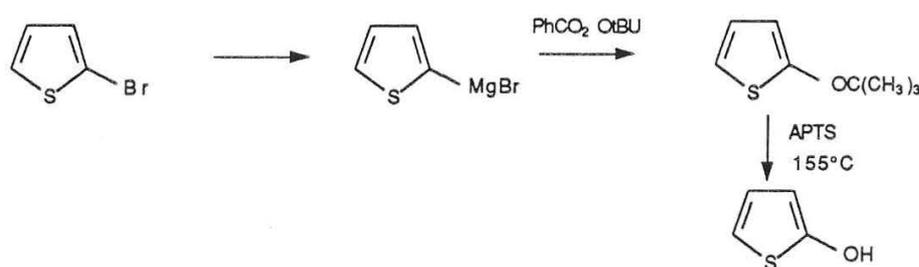
### II-B-1-a Principales méthodes de synthèse des hydroxythiophènes

Historiquement, la première synthèse d'un hydroxythiophène est celle publiée par Paal en 1885 (85). L'hydroxy-2 méthyl-5 thiophène était préparé par cyclisation de l'acide oxo-4 pentanoïque (acide lévulinique) en présence de phosphore tri ou penta sulfure.

Mais ce n'est qu'en 1950 que Hurd et Kreuz (86) ont décrit la première synthèse efficace de l'hydroxythiophène à partir du magnésien du bromo-2 thiophène.

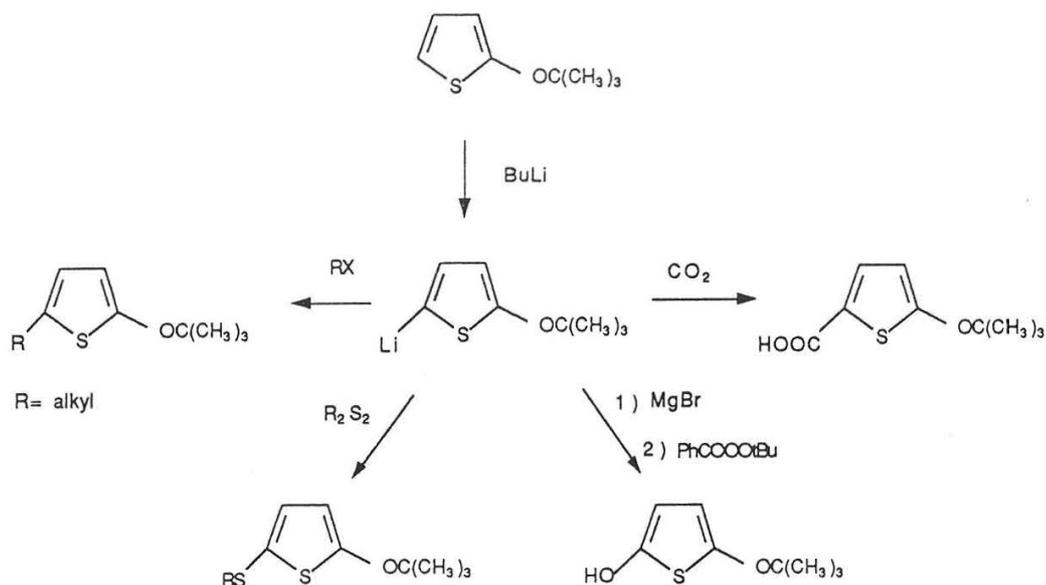


Cette méthode a été améliorée en passant par un intermédiaire tertbutoxy (87) qui est ensuite coupé en milieu acide (acide paratoluène sulfonique) par chauffage.

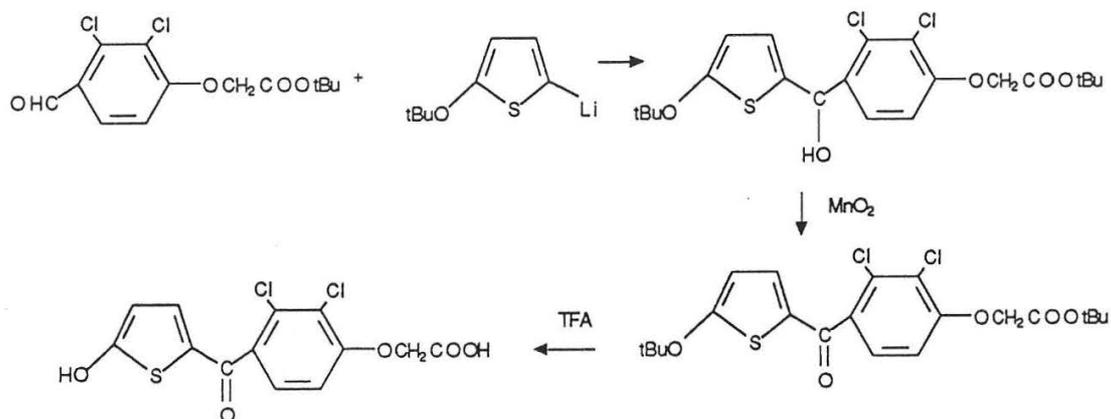


De plus, cette dernière méthode permet au niveau du tertbutoxy éther d'introduire des substituants variés par l'intermédiaire d'un dérivé lithié comme le montre le schéma suivant (82).

73



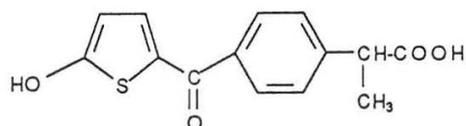
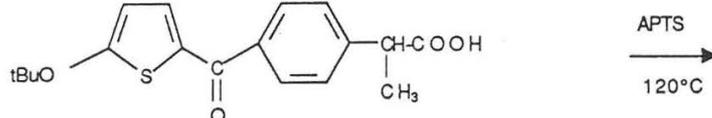
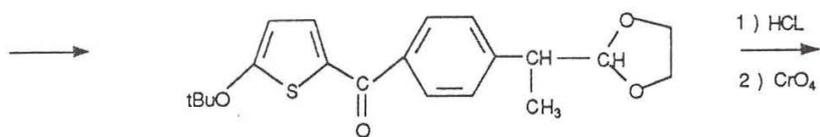
La désalkylation par la méthode précédente conduit alors au dérivé hydroxylé correspondant. C'est d'ailleurs cette dernière technique qui a été utilisée par G. Moinet et N. Bayer (Laboratoire Anphar-Rolland) (48) pour préparer l'authentique du 5OHAT.



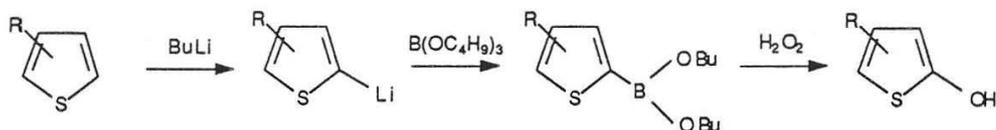
De même, pour la synthèse du 5HSU, le groupement protecteur est encore tBu, mais le magnésien est préparé sur le noyau benzénique (88).



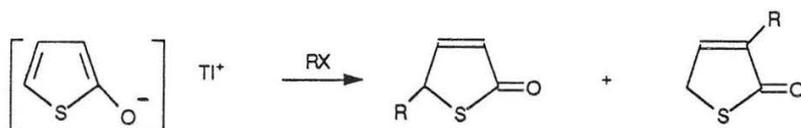
74



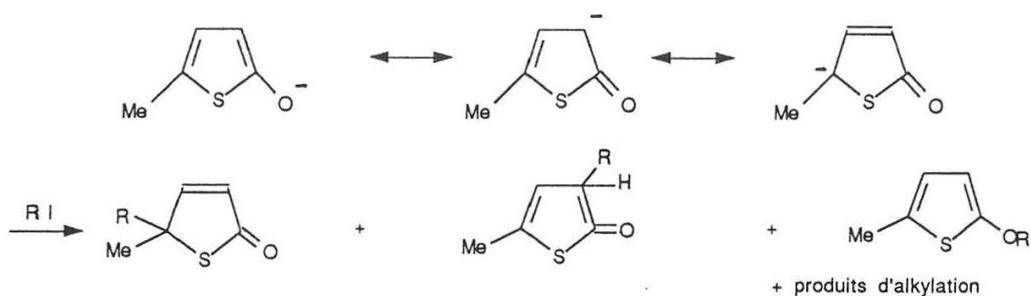
Une deuxième voie, plus douce que la désalkylation à haute température et en milieu acide, passe là encore par les dérivés lithiés en position 2 qui sont successivement traités par B(OBu)<sub>3</sub> puis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (72).



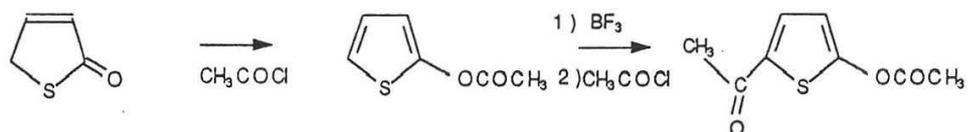
D'autres stratégies à partir de l'hydroxy-2 thiophène ont été proposées :  
- par exemple l'alkylation de sels de thallium de l'hydroxy-2 thiophène (89,90).



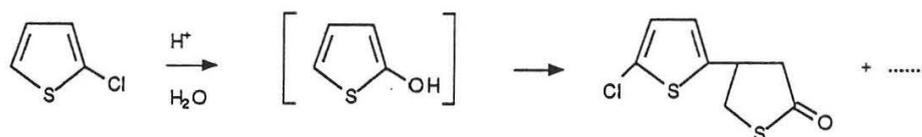
- ou encore l'alkylation de l'hydroxy-2 thiophène par des méthodes de transfert de phase avec des agents alkylants tels que MeI, Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (91,92,93,94).



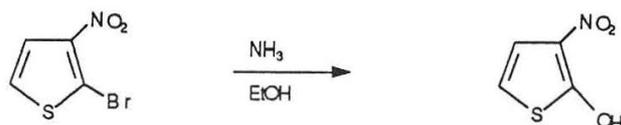
- ou enfin une acylation aromatique de l'acétyl-2 thiophène en présence d'un acide de Lewis ( $\text{BF}_3$  étherate) (95).

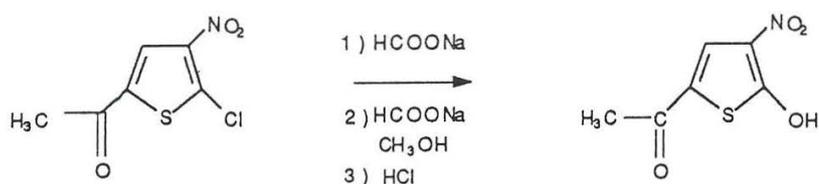


Enfin, une dernière approche passe par l'hydrolyse de dérivés halogénés en position 2 du thiophène. Quand elle est effectuée en milieu acide, elle conduit essentiellement à des dimères, l'hydroxy-2 thiophène se formant de façon intermédiaire (96).



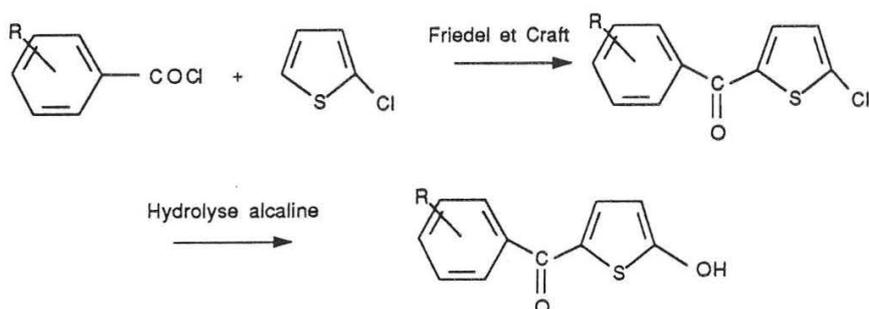
L'hydrolyse en milieu basique donne de meilleurs résultats. Elle est utilisable si le noyau thiophénique est substitué par des groupements électroattracteurs tels que  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COR}$ ,  $\text{COOR}$  (97).





Nous avons utilisé cette dernière technique qui semblait particulièrement prometteuse dans notre cas (présence d'un groupement COAr en position 2 du thiophène).

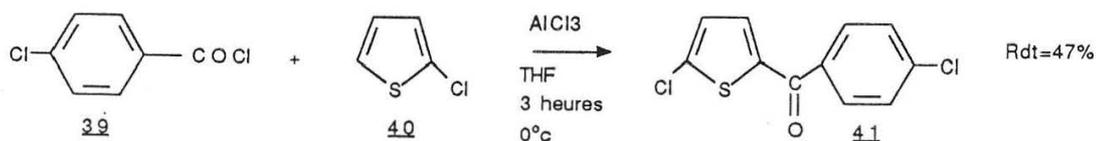
Enfin elle nous permet d'élaborer un schéma de synthèse rapide (2 étapes) et dont le mode opératoire est bien connu en ce qui concerne la première étape (98,99,100).



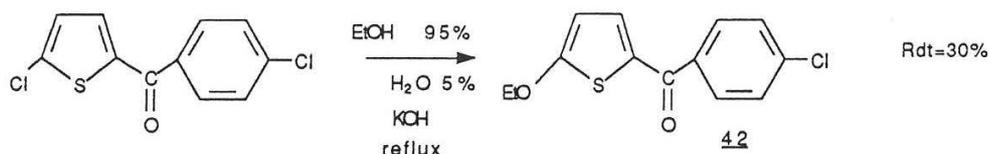
### II-B-1-b Synthèse du 50HCBT et du 50HMBT

#### - Synthèse du 50HCBT

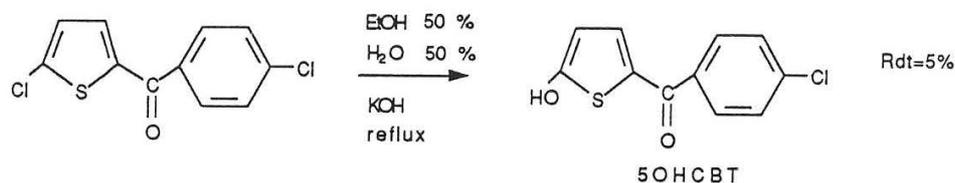
La première étape est une réaction classique de Friedel et Craft et donne un bon rendement en produit cristallisé (TF : 104° - litt. : 105°)(100).



La deuxième étape est plus délicate. En effet, si l'hydrolyse est faite dans l'éthanol à 95 % avec de la potasse en excès, le produit majoritaire dérive de la substitution du chlore avec le groupe OEt. Le produit correspondant a été purifié sur plaque et caractérisé par RMN et spectrométrie de masse.

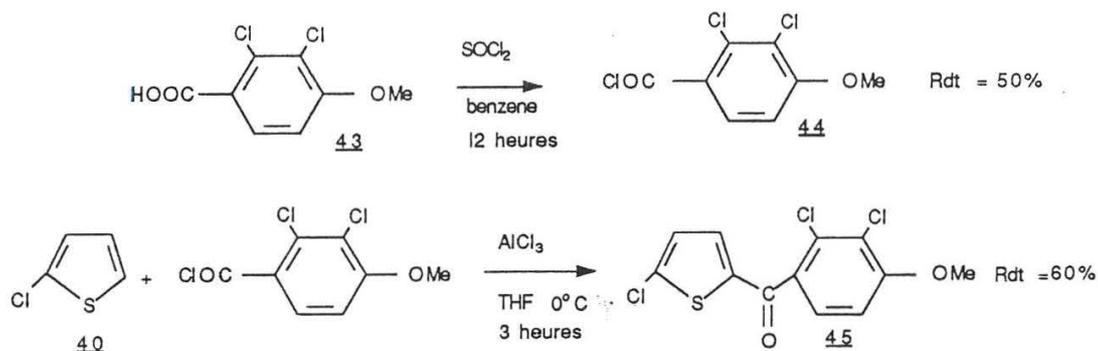


En présence d'un mélange d'eau et d'éthanol 50/50 il y a formation de 5OHCBT qui est détecté par sa bande d'absorption à 385 nm. Le produit de départ est alors éliminé par extraction à l'éther (60 % recyclable), puis le produit hydroxylé extrait à l'éther après acidification. Le brut est alors purifié par CLHP à l'aide d'une colonne en phase inverse et avec un gradient d'acétonitrile dans un tampon d'acétate d'ammonium. Le 5OHCBT est alors caractérisé par son spectre RMN (cf. tableau 8) et son spectre de masse. Le spectre de masse a été réalisé par Valérie Andronik (UA 400).

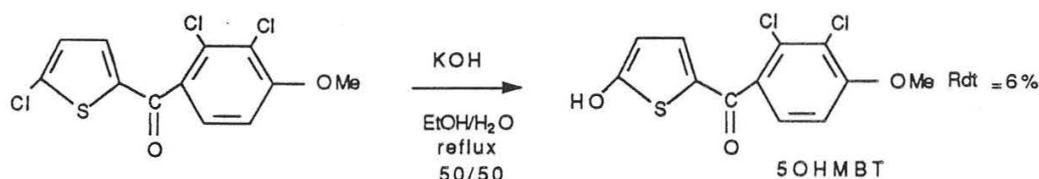


#### - Synthèse du 5OHMBT

Après préparation du chlorure de l'acide méthoxy-4 dichloro-2,3 benzoïque par action de  $\text{SOCl}_2$  sur l'acide carboxylique correspondant (Rdt 90 %), celui-ci est utilisé sans autre purification pour la condensation, type Friedel et Craft, avec le chloro-2 thiophène, pour conduire au chloro-5 (dichloro-2,3 méthoxy-4)-benzoyl-2 thiophène avec un rendement de 60 %. Ce dernier composé a été caractérisé par RMN et spectrométrie de masse ( $T_f = 162^\circ$ ).



Il est ensuite hydrolysé dans  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  : 50/50 par  $\text{KOH}$ . 54 % de produit de départ sont récupérés, et le 5OHMBT est purifié par CLHP avec un rendement de 6 % et caractérisé par RMN (tableau 8) et spectrométrie de masse du dérivé méthylé au diazométhane.



### II-B-1-c Principales caractéristiques physicochimiques des différents aryl-2 thiophènes et de leurs dérivés hydroxylés en 5

#### - Spectre UV-visible

Les valeurs de la longueur d'onde du maximum d'absorption ( $\lambda_{\text{max}}$ ) et du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) à cette longueur d'onde sont rassemblées dans le tableau 8 pour les différents produits dans un tampon phosphate à pH 7,4.

Il y a une grande similitude des spectres UV-visibles des différents composés. En effet pour tous les dérivés hydroxylés en 5 on a :  $382 < \lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} < 385$  et  $27000 < \epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}) < 30000$ . Ceci semble indiquer que le substituant du noyau phényle n'influence que faiblement la conjugaison entre les 2 noyaux aromatiques.



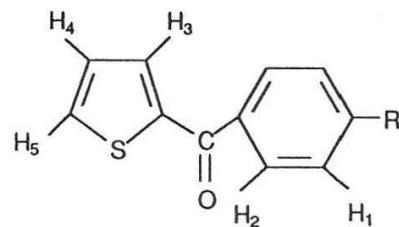
**Tableau 8. Propriétés physicochimiques des aroyl-2 thiophènes et de leurs dérivés hydroxylés.**

	UV (1)		pK de l'hydroxy en 5 ( $\pm 0,1$ )	RMN (2):déplacements chimiques ( $\delta$ ,ppm)					RMN:constantes de couplage (J,Hz)			
	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon$ mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>		H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>1</sub> -H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>4</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub> -H <sub>5</sub>
AT	272	11000	-	6,92	7,36	7,40	7,13	7,87	8,7	3,5	1,0	5,3
	306	14000										
5OHAT	266	3600	2,5	6,95	7,28	7,18	6,09	-	8,5	5,1	-	-
	384	28000										
SU	276	11960	-	7,42	7,77	7,68	7,16	7,81	8,5	3,5	1,0	5,0
	300	14260										
5OHSU	276	6700	2,9	7,39	7,60	7,42	6,16	-	8,5	5,0	-	-
	385	27000										
CBT	267	7750	-	7,47	7,78	7,61	7,16	7,83	8,5	3,5	1,0	5,0
	297	8250										

50HCBT	260	6000	2,3	7,45	7,61	7,36	6,17	-	8,5	5,0	-	-
	385	28800										
MBT	274	8800	-	6,98	7,39	7,43	7,14	7,80	9,0	3,6	1,5	6,0
	309	15400										
50HMBT	264	6300	2,5	7,05	7,32	7,18	6,09	-	8,3	5,0	-	-
	382	29900										

(1) Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

(2) Les spectres RMN ont été enregistrés dans CD<sub>3</sub>CN, 295K, 250MHz, référence/TMS. Les  $\delta$  sont donnés à  $\pm 0,02$  ppm et J en Herz à  $\pm 0,3$  Hz.



- Mesures des pK de la fonction OH des 5OHAT, 5OHSU, 5OHCBT et 5OHMBT

Le pK de ces différents dérivés a été mesuré de la même façon que dans le cas du 5OHAT, par étude des spectres UV-visible de solutions aqueuses tamponnées à différents pH. Les valeurs sont rassemblées dans le tableau 8. Dans tous les cas, le pK se situe aux environs de 2,5.

- Spectres RMN

Les spectres des différents produits hydroxylés et non hydroxylés ont été enregistrés dans CD<sub>3</sub>CN.

Les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage sont rassemblées dans le tableau 8. Là encore, ces valeurs pour les protons thiophéniques des différents hydroxy-5 thiophènes sont très proches sinon identiques. En particulier, le doublet correspondant au proton en position 4 sur le noyau thiophène apparaît blindé et bien dégagé des autres vers 6 ppm. Ce doublet nous sera utile pour caractériser le dérivé hydroxylé en 5 du suprofen dans le chapitre IV.

Les propriétés physicochimiques ( $\epsilon$  et pK) des trois hydroxy-5 aroyl-2 thiophènes étudiés, très similaires à celles du 5OHAT, nous autorisent à utiliser la technique de détection précédemment décrite pour suivre l'hydroxylation des aroyl-2 thiophènes correspondants.

**II-B-2 Hydroxylation du suprofen et d'autres aroyl-2 thiophènes par les microsomes hépatiques de rats**

**II-B-2-a Détermination des  $K_m$  et  $V_m$  apparentes de l'hydroxylation en 5 de ces composés par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital**

- L'hydroxylation métabolique *in vitro* en position 5 sur le noyau thiophène des 3 composés suivants a été étudiée :

- . le SU
- . le CBT
- . le MBT (structure en VIII)

Le suivi UV-visible des solutions microsomaies de foies de rats PB contenant le NADPH montre que tous les composés étudiés sont hydroxylés en 5 sur le noyau thiophène.

- Nous avons étudié la vitesse de formation des dérivés hydroxylés en fonction de la concentration de substrat pour chacun des 3 composés. Les conditions expérimentales sont celles décrites en V-D-2 (G6P 10mM, G6PDH 2u/ml, NADP 1mM dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4, P-450 : 1mg protéine/ml). Le tracé de  $1/V$  inverse de la vitesse initiale en fonction de  $1/c$  inverse de la concentration en substrat est présenté figure 26. Les points s'alignent sur une droite sauf pour le cas du CBT pour les fortes concentrations. La relation de Lineweaver-Burk permet d'accéder aux  $K_m$  et  $V_m$  apparentes. En effet comme nous l'avons vu précédemment le système microsomal des cytochromes P-450 contient de nombreuses isoenzymes.

- Les  $K_m$  et  $V_m$  obtenues sur les microsomes de différents lots d'animaux sont résumées dans le tableau 9. La comparaison des  $V_m$  montre que les vitesses d'hydroxylation de ces différents composés sont du même ordre de grandeur (environ 2 nmoles de 5OH/mg protéine/min). Les  $K_m$  sont plus variables de 9 $\mu$ M pour le CBT jusqu'à 33 $\mu$ M pour le suprofen.

#### II-B-2-b Effet de l'induction sur l'hydroxylation en 5 des aroyl-2 thiophènes étudiés

Des rats mâles de race Sprague-Dawley ont été traités par :

- le phénobarbital
- le méthyl-3 cholanthrène
- la cyano-16 $\alpha$  prégénolone
- le clofibrate

selon le protocole décrit en V-C-1.

Les résultats de l'hydroxylation enzymatique obtenue avec les microsomes de rats induits et de rats non traités (témoins) sont présentes sous forme d'histogramme (figure 27).

Il apparaît d'emblée que les dérivés étudiés, malgré la ressemblance de leurs structures chimiques, ont des réponses très différentes.

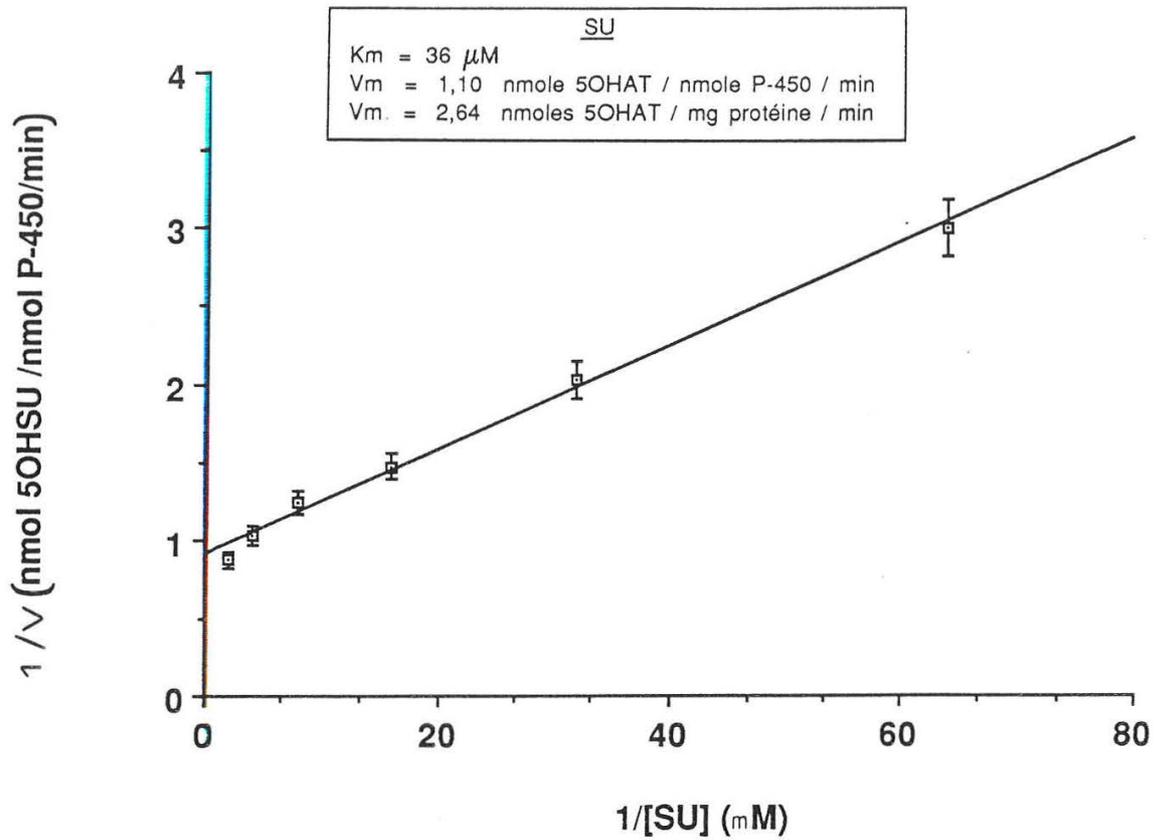
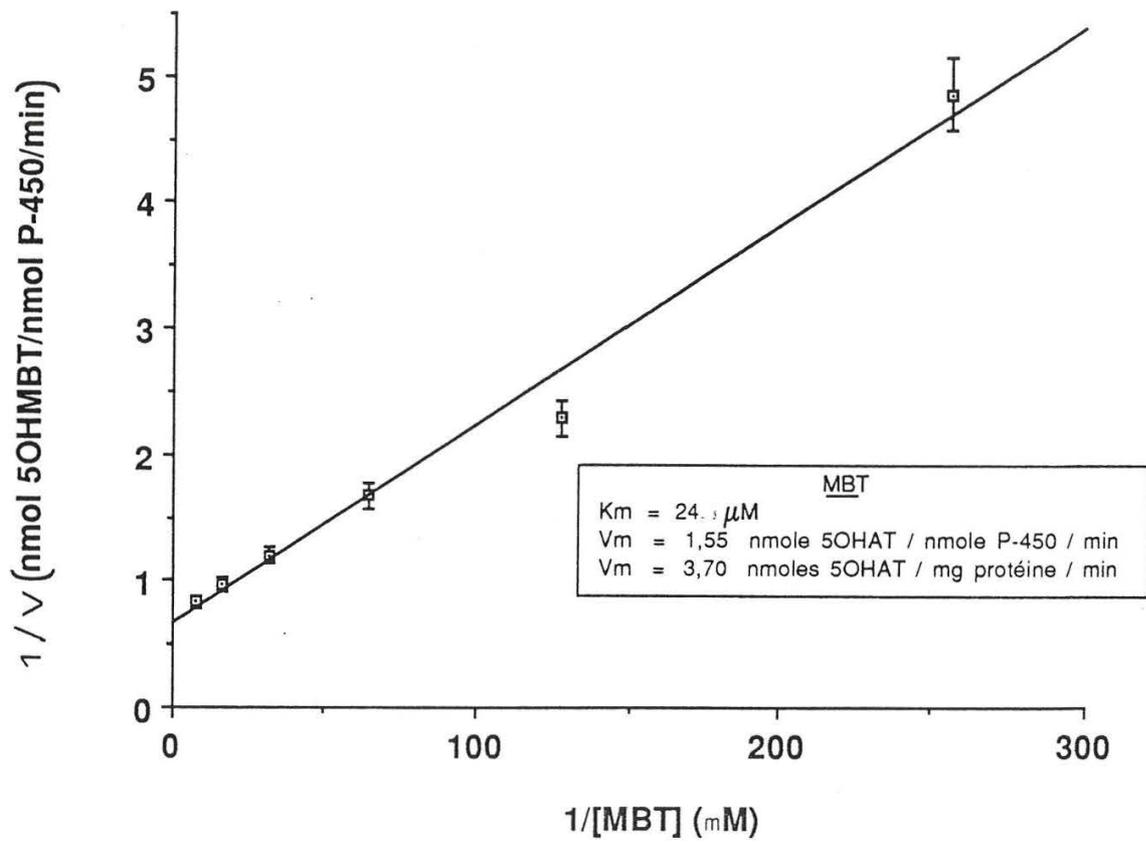
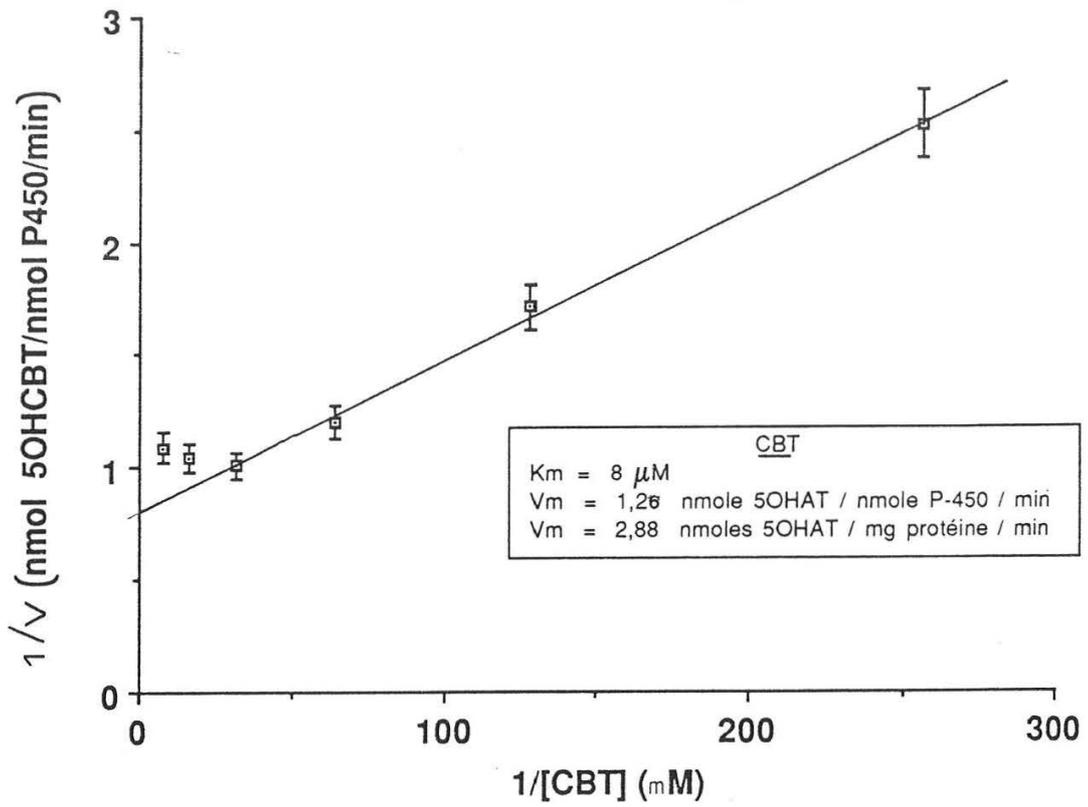


FIGURE 26. Représentation de la cinétique d'hydroxylation catalysée par microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital, du SU (figure 26a), du CBT (figure 26b), du MBT (figure 26c).

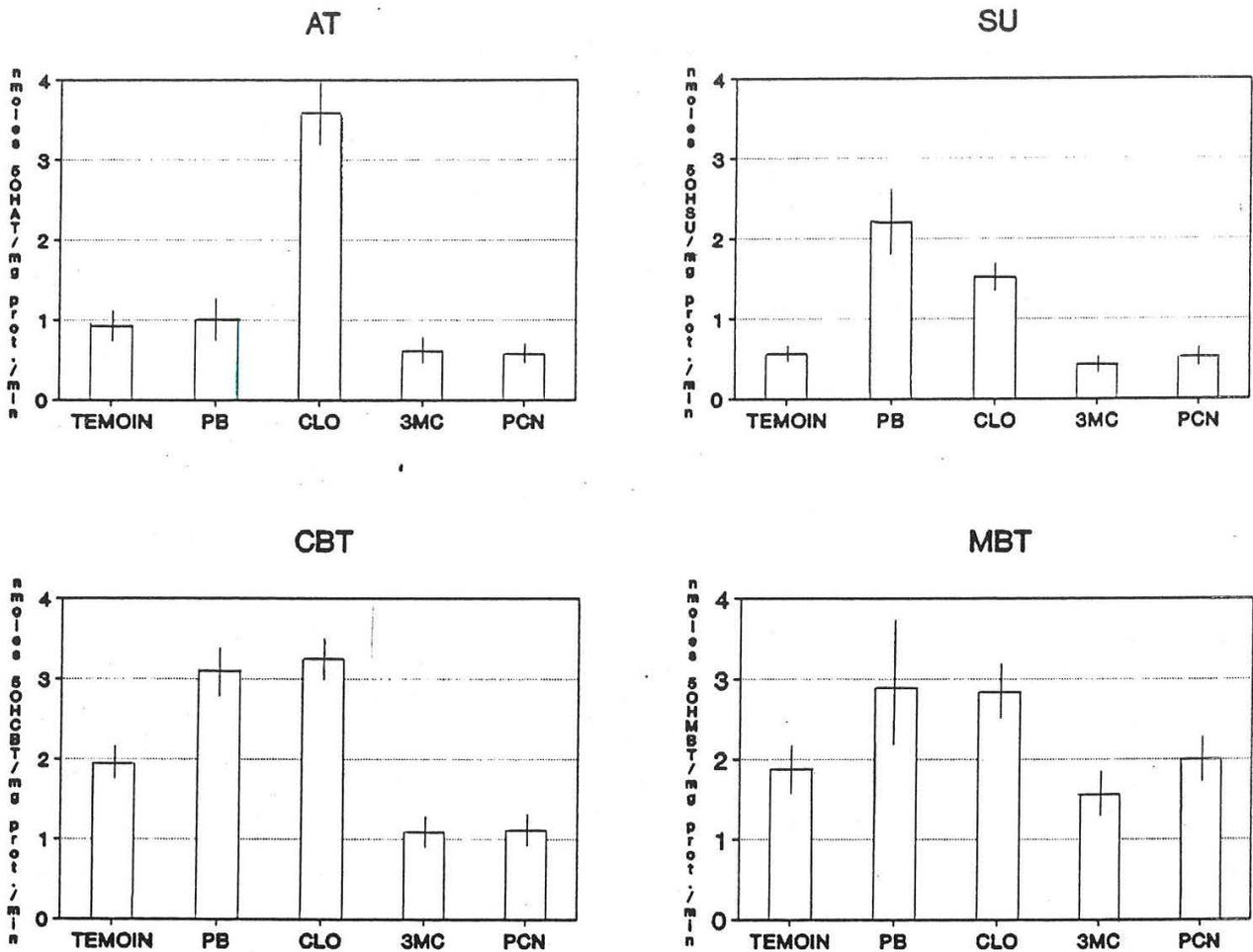
- La formation du 5OHSU, 5OHCBT, 5OHMBT a été mesurée par la méthode UY décrite en Y-D-2 sur des microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital (protocole en Y-C-1) (2,4 nmoles P-450/mg protéine, 1 mg protéine/ml).
- Chaque point est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 4 animaux.



**Tableau 9.  $K_m$  et  $V_m$  apparentes de l'oxydation en position 5 des aroyl-2 thiophènes par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.**

	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_m$	
		(nmole 5OH/nmole P-450/min)	(nmole 5OH/mg protéine/min)
AT	$14 \pm 2$	$0,45 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$
SU	$33 \pm 5$	$1,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,4$
CBT	$9 \pm 2$	$1,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$
MBT	$22 \pm 3$	$1,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,8$

Les déterminations sont réalisées dans des conditions analogues à celles des courbes figure 26 et figure 22, sur les microsomes de 2 à 4 lots de 5 animaux.



**FIGURE 27.** Hydroxylation microsomale de l'AT, du SU, du CBT, du MBT, exprimée en nmoles de hydroxy-5.mg protéine<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> en fonction du traitement des rats par différents inducteurs.

Des rats de race Sprague-Dawley ont été traités par le phénobarbital (PB), le clofibrate (CLO), le méthyl-3 cholanthrène (3MC) et la cyano-16  $\alpha$  prégnénone (PCN) selon le protocole Y-C-1.

nmoles P-450/mg protéine : (PB)  $2,2 \pm 0,2$  ; (CLO)  $1,6 \pm 0,1$  ; (3MC)  $1,7 \pm 0,2$  ; (PCN)  $1,7 \pm 0,1$  ; (témoin)  $1,0 \pm 0,2$ . La formation des dérivés hydroxylés a été mesurée par la méthode UV décrite en Y-D-2 sur les microsomes hépatiques de rats induits et de rats témoins (non traités).

Conditions : (G6P : 10 mM, G6PDH : 2 u/ml, NADP : 1 mM, tampon phosphate: 0,1 M pH 7,4,

AT  $10^{-4}$ M, SU  $2 \cdot 10^{-4}$ M, MBT  $2 \cdot 10^{-4}$ M, CBT  $2 \cdot 10^{-4}$ M, 1 à 2 nmoles P-450/ml).

Chaque valeur est la moyenne d'un nombre variable de déterminations réalisées sur les microsomes d'un nombre également variable de lots d'animaux. Un lot est constitué de 5 rats.

Valeur	Nombre de déterminations	Nombre de lots
AT (CLO)	25	5
AT (PB, TEM)	10	5
Autres	6 à 10	2 à 4

- Après traitement des animaux par le clofibrate, la vitesse d'hydroxylation de l'AT est multipliée par 3,9 par rapport aux témoins pour atteindre 3,6 nmole 5OHAT/mg protéine/min. L'induction par le 3MC et par la PCN provoque une diminution de la vitesse d'hydroxylation par rapport aux témoins (0,6 nmole 5OHAT/mg protéine/min). Les activités AT hydroxylases mesurées sur les rats témoins et les rats PB sont du même ordre (1 nmole 5OHAT/mg protéine/min).

- Dans le cas du **suprofen**, la vitesse d'hydroxylation est multipliée par 4 après induction des rats par le PB et par 3 pour l'induction par le clofibrate. Le traitement des rats par le 3MC et la PCN ne modifie pas l'activité suprofen hydroxylase. La vitesse de métabolisation par les microsomes témoins est deux fois plus faible pour le suprofen que pour l'AT. Pour le CBT et le MBT, on observe par contre peu d'effet de l'induction.

Par conséquent, l'AT est hydroxylé par les enzymes microsomiales de rats témoins. On n'observe pas d'augmentation notable de cette activité après traitement des rats par des inducteurs classiques des cytochromes P-450 sauf dans le cas du clofibrate. Dans ce cas l'activité AT hydroxylase est multipliée environ d'un facteur 4 par rapport aux témoins. Il existe donc une ou plusieurs formes de cytochrome induites par le clofibrate, très actives pour prendre en charge cette hydroxylation. De la même façon, pour le suprofen, l'hydroxylation a lieu avec les isoenzymes de rats témoins. Mais dans ce cas l'augmentation d'activité est observée principalement après traitement des rats par le phénobarbital.

Pour le CBT et le MBT, on observe une activité **importante** en présence de microsomes de rats témoins. Le phénobarbital et le clofibrate induisent légèrement les activités CBT et MBT hydroxylases.

Il apparaît que des substitutions portées par le noyau phényle provoquent des différences importantes de comportement vis-à-vis de l'hydroxylation microsomiale du noyau thiophène. Le noyau phényle et ses substituants jouent donc un rôle clef dans la reconnaissance des acyl-2 thiophènes par les divers cytochromes P-450 hépatiques. La chaîne acide paraît indispensable pour observer un effet partiel d'induction par le clofibrate. Toutefois la nature de cette chaîne, comme la présence d'autres substituants

sur le phényle, pourrait jouer un rôle important dans la reconnaissance du site actif.

### **II-B-3 Etude qualitative de l'hydroxylation d'autres dérivés thiophéniques par les microsomes hépatiques de rats (PB)**

#### **II-B-3-a Cas des aroyl-2 thiophènes**

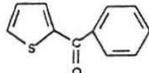
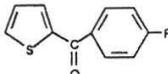
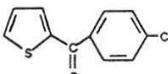
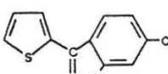
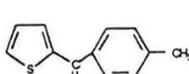
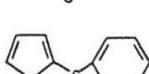
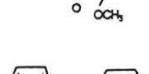
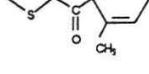
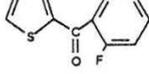
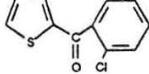
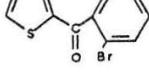
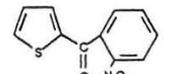
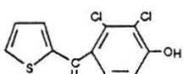
La méthode de détection UV mise au point a permis l'étude des paramètres fondamentaux de l'hydroxylation de l'AT par les cytochromes P-450 hépatiques de rat. La validité de cette technique a été étendue à la détection des dérivés hydroxylés du suprofen, du CBT et du MBT après analyse des propriétés spectroscopiques des authentiques synthétisés chimiquement. Pour poursuivre la démonstration de la généralité du phénomène d'hydroxylation de la structure aroyl-2 thiophène, une série de dérivés de cette famille a été soumise au test UV. Ces molécules nous ont été fournies par le Professeur Andrieu du Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Caen. Les résultats qualitatifs, puisque l' $\epsilon$  des aroyl-2 hydroxy-5 thiophènes ne sont pas connus, figurent dans le tableau 10. Toutefois la vitesse est exprimée et est calculée en prenant comme valeur de  $\epsilon_{390nm} = 26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Ceci se justifie par la faible variation de l' $\epsilon$  observée sur les dérivés hydroxylés étudiés précédemment.

Tous les dérivés testés sont hydroxylés avec des vitesses du même ordre de grandeur (entre 0,2 et 1,7 nmoles/nmole P-450/min). Les différences observées peuvent être dues soit à des différences d' $\epsilon$  des différents dérivés hydroxylés (ce qui est peu probable), soit à des différences de reconnaissance du site actif par les composés.

#### **II-B-3-b Cas d'autres dérivés thiophéniques**

Pour tester la généralité de la méthode de détection des dérivés hydroxylés du thiophène au sein d'une solution microsomale, diverses molécules

**Tableau 10.** Hydroxylation de divers aryl-2 thiophènes substitués ( $2 \cdot 10^{-4}M$ ) catalysés par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.

Produits	Vitesse d'hydroxylation (nmoles/nmole P-450/min)*
 <u>46</u>	1,39
 <u>47</u>	1,10
 CBT	1,5
 <u>48</u>	0,23
 <u>49</u>	0,87
 <u>50</u>	1,70
 <u>51</u>	1,39
 <u>52</u>	1,61
 <u>53</u>	1,26
 <u>54</u>	0,63
 <u>55</u>	0,74
 <u>56</u>	0,90
 MBT	1,4

\* Les vitesses ont été calculées en admettant pour les dérivés hydroxylés un  $\epsilon$  390 nm = 28000. - Les activités ont été mesurées par la méthode UY décrite en Y-D-2 (G6P 10mM, G6PDH 2u/ml, NADP 1mM dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4; 1 mg protéine/ml., 2,4 nmoles P-450/mg protéine, substrat  $2 \cdot 10^{-4}M$ . - Chaque valeur est la moyenne de 2 à 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux.

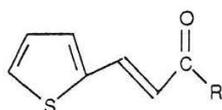
ont été étudiées. Celles-ci possèdent toutes un noyau thiophène impliqué dans un système hautement conjugué par une substitution en position 2 :

- le thiofantile<sup>R</sup> (thenylidone) commercialisé par les laboratoires Ana comme cholérétique
- le nocodazole<sup>R</sup> inhibiteur de la synthèse des microtubules (laboratoire Janssen)
- le morantel<sup>R</sup> antihelminthique des laboratoires Pfizer
- la dithiénone.

Le spectre UV-visible (pour  $\lambda > 370$  nm), en fonction du temps, de chacun de ces composés mis en présence de microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital et de NADPH (V-D-2) a été enregistré. Les maxima observés ont été comparés à ceux des produits de départ. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 11.

Dans le cas de la dithiénone on observe l'apparition de 2 maxima, à 404 et à 425 nm, pouvant être attribués à la formation du dérivé hydroxylé sur un et peut être 2 noyaux thiophènes. Dans le cas du nocodazole, il se forme un épaulement à 385 nm. Dans les 2 cas, la situation est proche des cas de l'AT et du SU en raison de la structure commune aroyl-2 thiophène. On observe une différence entre la longueur d'onde d'absorption du produit de départ et celle du produit formé de 80 nm.

Pour le thiophantile, une bande d'absorption apparaît également à 470 nm de façon très rapide. Mais dans ce cas, le substrat est plus conjugué selon le schéma suivant :



Pour le morantel<sup>R</sup>, aucun changement de la DO n'est observé. Soit il ne se forme pas de dérivé hydroxylé, soit celui-ci n'est pas détecté (absorption inférieure à 370 nm et/ou  $\epsilon$  trop faible).

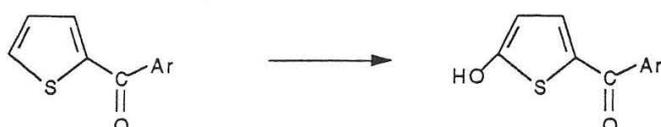
**Tableau 11. Etude qualitative de l'hydroxylation de divers dérivés thiophéniques par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.**

Dérivé	Thiophantile <u>57</u>	Nocodazole <u>58</u>	Morantel <u>59</u>	Dithiénone <u>60</u>
Structure				
$\lambda_{\max}$ du produit	390	316	280	318    470
Maxima observé (nm) (2)	470	385	-	404    425

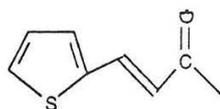
(1) Spectre réalisé en solution dans un tampon phosphate pH 7,4. (2) Les maxima ont été observés entre 650 et 370 nm par détection UV de la solution microsomale préparée selon le protocole décrit en Y-D-2 (substrat  $10^{-4}$ M, 1 mg de protéine par ml ; 2,0 nmoles P-450/mg protéine).

En conclusion, cette étude nous a permis d'établir les points suivants :

- Les microsomes hépatiques hydroxylient de façon très générale les dérivés de structure aroyl-2 thiophène en position 5 sur le noyau thiophène.



- Cette réaction semble généralisable à des dérivés possédant la structure suivante :



- Une méthode de détection UV-visible a été mise au point qui permet de suivre la formation de ces aroyl-2 hydroxy-5 thiophènes au sein de la solution microsomale. Ce test précis et facile à mettre en oeuvre rend possible une étude fine de l'hydroxylation des aroyl-2 thiophènes.

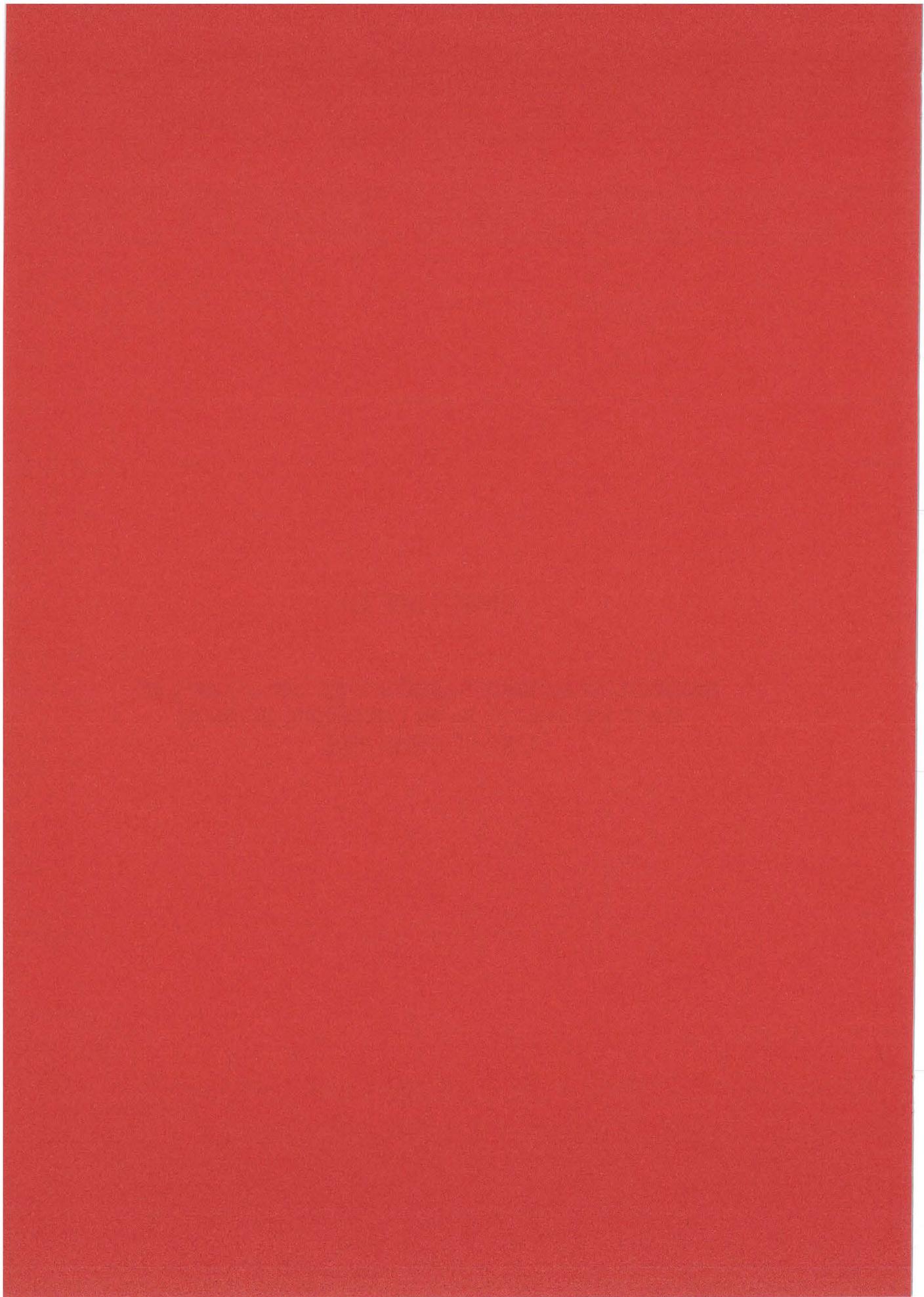
En ce qui concerne l'AT, la formation du 5OHAT est catalysée par les cytochromes P-450 dans les microsomes hépatiques de rats. Cette activité est induite spécifiquement (facteur 4) par le clofibrate ; ce qui n'est pas le cas pour les autres aroyl-2 thiophènes étudiés. L'hydroxylation en 5 du suprofen est induite principalement par le phénobarbital.

Les activités CBT hydroxylase et MBT hydroxylase sont peu inductibles par les inducteurs classiques des cytochromes P-450. Les substituants portés par le noyau phényle sont donc susceptibles d'induire des modifications importantes dans la reconnaissance des substrats par les différents cytochromes P-450.



## CHAPITRE III

CARACTERISATION DES ISOENZYMES HEPATIQUES DE  
RATS IMPLIQUEES DANS L'HYDROXYLATION DE  
L'ACIDE TIENILIQUE



### III-A INTRODUCTION

Le clofibrate et ses analogues structuraux sont des dérivés hypolipoprotéïnémisants et hypocholestérolémisants, dont certains sont très largement utilisés en thérapeutique dans la correction des anomalies du métabolisme lipidique et la prévention présumée du risque athérogène (101).

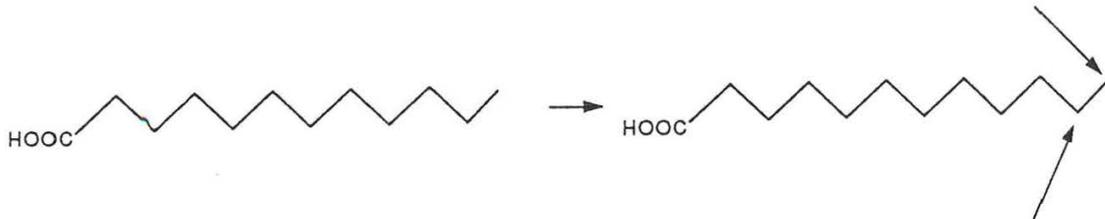
L'administration au rat de ces dérivés s'accompagne généralement d'une hépatomégalie, d'une prolifération et d'un changement de composition enzymatique des peroxyosomes, de modifications mitochondriales et d'une prolifération du réticulum endoplasmique lisse associée à une induction des cytochromes P-450 (102). Enfin, les agents hypolipidémisants également inducteurs de la prolifération des peroxyosomes sont impliqués dans la formation de tumeurs hépatocellulaires (103). A ces différents titres, ces dérivés sont actuellement largement étudiés.

#### III-A-1 Caractérisation du ou des cytochromes P-450 induits par le clofibrate

En 1965, Hess et coll. rapportent pour la première fois l'effet du clofibrate sur la prolifération du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes de rats (104). Parallèlement, Lu et Coon, en 1968, par des expériences réalisées en présence de microsomes de foies de rats, mettent en évidence l'implication directe des cytochromes P-450 dans l'hydroxylation en position 12 et 11 de l'acide laurique (105).

En 1982, Gibson établit définitivement la participation d'un cytochrome P-450 induit par le clofibrate à l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique (106). Pour ce faire, à partir de microsomes hépatiques de rats traités par le clofibrate, il purifie un cytochrome P-450 dont le complexe  $Fe^{II}CO$  possède un maximum d'absorption à 452 nm. Cette hémoprotéine, qui catalyse l'oxydation de l'acide laurique en positions 12 et 11 avec un rapport 4:1, ne métabolise pas la benzphétamine. Cette nouvelle isoenzyme dénommée cytochrome P-452 est isolée et comparée aux formes majeures induites par le phénobarbital et la  $\beta$ -naphthoflavone. Ses propriétés spectrales sont établies et le poids moléculaire du monomère évalué à 51500 d (107). Son rôle dans l'hydroxylation en 12 de

l'acide laurique catalysée par les microsomes de rats traités au clofibrate est confirmé par l'utilisation d'IgG anti-cytochrome P-452 (108).



A ce stade il apparaît clairement que l'hydroxylation en 11 de l'AL fait appel à des isoenzymes du cytochrome P-450 peu spécifiques et induites par le phénobarbital (augmentation de l'activité après induction au phénobarbital de l'ordre d'un facteur 2 à 3). L'hydroxylation en 12 est fortement induite par les inducteurs type clofibrate (facteur 28) (109). Elle est catalysée par le cytochrome P-452 isoenzyme constitutive qui représente 5 % du taux basal de cytochrome P-450 chez le rat non traité (108) et 45 % de la population totale des cytochromes P-450 des rats traités par du clofibrate (102).

En 1987, Gonzalez et son équipe isolent, à partir de foies de rats traités par le clofibrate, le cytochrome P-452. Des anticorps dirigés contre cette isoenzyme sont utilisés pour cloner un ADNc à partir d'une banque d'ADNc provenant de foies de rats traités au clofibrate. L'ADNc est séquencé et après insertion dans un plasmide de levure, Gonzalez et son équipe obtiennent l'expression de la protéine, le cytochrome P-450 LA $\omega$ , qui catalyse l'hydroxylation en position 12 de l'AL (110). Considéré comme identique au cytochrome P-450 isolé par Gibson, et de poids moléculaire 52000, son mécanisme de régulation est étudié. Le taux de transcription de son gène est augmenté une heure après l'administration de clofibrate et se traduit par une élévation de l'ARNm et de l'activité du cytochrome P-450. Ce cytochrome P-450 possède moins de 35 % d'acides aminés communs avec les cytochromes P-450 c,d,e et PCN. Il appartient donc à une nouvelle famille de gènes du cytochrome P-450 qui pourrait d'après l'analyse effectuée par transfert selon Southern comporter 2 ou 3 isoenzymes (110).

En effet, en utilisant des anticorps dirigés contre le cytochrome P-450 LA $\omega$ , un autre cytochrome P-450 de poids moléculaire légèrement supérieur à 52000 a été détecté dans les foies de rats. Cette enzyme est induite par le clofibrate et suit une cinétique d'induction extrêmement proche de celle du cytochrome P-450 LA $\omega$ . Montellano et son équipe ont montré que seuls 50 % du

cytochrome P-452 purifié est accessible à l'inhibition suicide par l'acide undécène-10 oïque. Ce travail confirme l'existence d'au moins deux cytochromes P-452 (111a).

Par ailleurs, à l'hôpital Necker, l'équipe du Professeur Leroux a purifié et caractérisé une isoenzyme du cytochrome P-450 isolée de foies de rats traités par le clofibrate. Sur la base des caractéristiques immunochimiques, ce cytochrome P-450 apparaît comme différent de celui isolé précédemment par Gibson et Gonzalez (111b). Enfin récemment, une technique fondée sur la détection HPLC couplée à une analyse radiochimique en continu a permis de mettre en évidence dans les incubations de microsomes de rats la formation d'acide hydroxy-10 laurique associé aux dérivés hydroxylés en 11 et 12 dans les proportions (7 %, 65 %, 28 %). La purification de la forme de cytochrome P-450 qui hydroxyle l'acide laurique en 10 est en cours. Les études préliminaires suggèrent que la même isoenzyme pourrait catalyser l'hydroxylation en position 10 et 11 (112).

### **III-A-2 Les inducteurs type clofibrate**

Un effet inducteur de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique a pu être observé avec différents dérivés, pour la plupart agents de prolifération des peroxyosomes. Ceux-ci peuvent être classés en 4 catégories.

1- les analogues structuraux du clofibrate. Ce sont des agents hypolipémiants qui provoquent une induction spécifique de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique.

2- les herbicides dérivés de l'acide phénoxyacétique qui sont également proches par leurs structures chimiques du clofibrate. Ils entraînent une augmentation significative (3 à 8 fois) de l'hydroxylation en 12 et sont sans effet sur l'hydroxylation en 11.

3- les dérivés hypolipémiants non reliés structurellement au clofibrate.

4- une catégorie de dérivés divers comprenant :

- . le DEHP, diéthylhexylphthalate, un agent plastifiant dont l'effet inducteur sur l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique est contreversé
- . le triméthyl-2,2,4 pentane (TMP) ou iso-octane.

Les structures chimiques de ces dérivés ainsi que les références concernant leur effet sur l'hydroxylation de l'acide laurique sont résumées tableau 12.

### **III-A-3 Les modalités de l'induction**

L'induction par le clofibrate de la transcription de gènes codants pour la synthèse du cytochrome P-450 LA $\omega$  comme pour l'activation de la transcription des enzymes peroxysomales, a conduit à postuler l'existence d'un mécanisme commun. Deux types d'hypothèses ont été avancés sur la nature de l'agent inducteur :

- selon la première hypothèse, les agents hypolipémiants et/ou leurs métabolites seraient des substrats des systèmes enzymatiques et entraîneraient leurs inductions (120).

- selon la seconde hypothèse, le traitement conduirait à un afflux d'acides gras au niveau du foie. Les acides gras présents serviraient de substrat à un cytochrome P-450 et à la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et les induiraient (121).

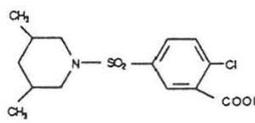
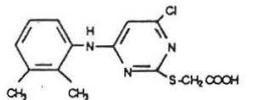
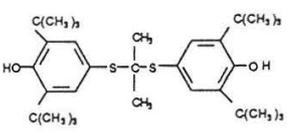
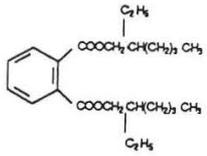
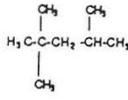
En ce qui concerne le mécanisme, l'induction pourrait résulter de l'interaction des hypolipémiants et/ou de leurs métabolites avec des récepteurs du cytoplasme des hépatocytes selon un mécanisme comparable à celui de l'induction par le méthyl-3 cholanthrène (26). Une protéine liant la nafénopine a été détectée dans le cytosol des cellules hépatiques (122) et récemment partiellement purifiée (123). Toutefois ces résultats n'ont pas pu être confirmés par les travaux menés par l'équipe de Gibson (124).

L'hydroxylation microsomale hépatique de l'AT est multipliée par 4 par le traitement des rats avec le clofibrate. L'acide tiénilique constituerait le premier substrat exogène connu dont l'hydroxylation serait fortement induite par le clofibrate. Dans ce chapitre, seront présentées les études réalisées pour confirmer les résultats préliminaires du chapitre précédent et préciser les enzymes qui catalysent la réaction.



Tableau 12. Les inducteurs type clofibrate.

<b>1- Les analogues structuraux du clofibrate.</b>		
Nom	Structure	Référence
* clofibrate		dans le texte
bezafibrate		108
ciprofibrate		108
cloburazit		114, 108
* fénofibrate		109, 115
méthylclofénapate		114, 109
nafénoquine		113
<b>2- Les herbicides dérivés de l'acide chlorophénoxyacétique</b>		
$R_1 = \text{Cl}$ $R_2 = \text{Cl, H, CH}_3$ $R_3 = \text{Cl, H}$		116

<b>3- Les hypolipémiants non reliés au clofibrate</b>		
acide fibrique		109
* WY 14643		108, 113
probucol		113
<b>4- Les autres dérivés</b>		
diéthylhexylphthalate		117, 118, 113
* triméthyl-2,2,4 pentane		119

\* Dérivés utilisés au laboratoire.

### III-B EFFET DES INDUCTEURS TYPE CLOFIBRATE SUR L'HYDROXYLATION DE L'AT PAR LES MICROSOMES DE FOIES DE RATS

#### III-B-1 Paramètres cinétiques ( $K_m$ , $V_m$ ) comparés de l'hydroxylation de l'AT par des microsomes de foies de rats témoins et traités par le clofibrate

Des rats de race Sprague-Dawley adultes ont été traités par le clofibrate (500 mg/kg/jour administré par voie intrapéritonéale dans l'huile de maïs pendant 4 jours). Deux lots de rats témoins ont été constitués. Le premier est composé d'animaux non traités. Le second est composé d'animaux traités à l'huile de maïs dans les conditions décrites précédemment. En effet, comme on s'intéresse à des formes de cytochrome P-450 susceptibles d'être impliquées dans le métabolisme des lipides, il était essentiel de réaliser cette expérience témoin souvent négligée.

L'hydroxylation de l'AT par des microsomes de rats traités à l'huile, au clofibrate et non traités a été étudiée par la technique précédemment décrite. Le traitement selon Lineweaver-Burk des résultats obtenus,  $1/V=f(1/[AT])$  est indiqué figure 28 a,b,c. Les  $K_m$  obtenues sur les microsomes de différents lots d'animaux sont rassemblées dans le tableau 13 et comparées à celles trouvées précédemment dans le cas de l'induction par le phénobarbital.

Premier élément apporté par la comparaison des constantes de Michaelis, l'affinité apparente de l'acide tiénilique déterminée dans des microsomes hépatiques de rats traités par le clofibrate est de 8  $\mu M$ , soit supérieure à celle observée chez les animaux témoins ou chez ceux traités par le phénobarbital (respectivement 15  $\mu M$  et 14  $\mu M$ ).

Deuxième élément, l'huile de maïs n'entraîne pas de modification de la  $V_m$  et semble par contre interférer avec la détermination de la  $K_m$  qui est de 80  $\mu M$ .

Par conséquent, le traitement par le clofibrate augmente à la fois l'activité et l'affinité des enzymes du cytochrome P-450 catalysant l'hydroxylation de l'AT.

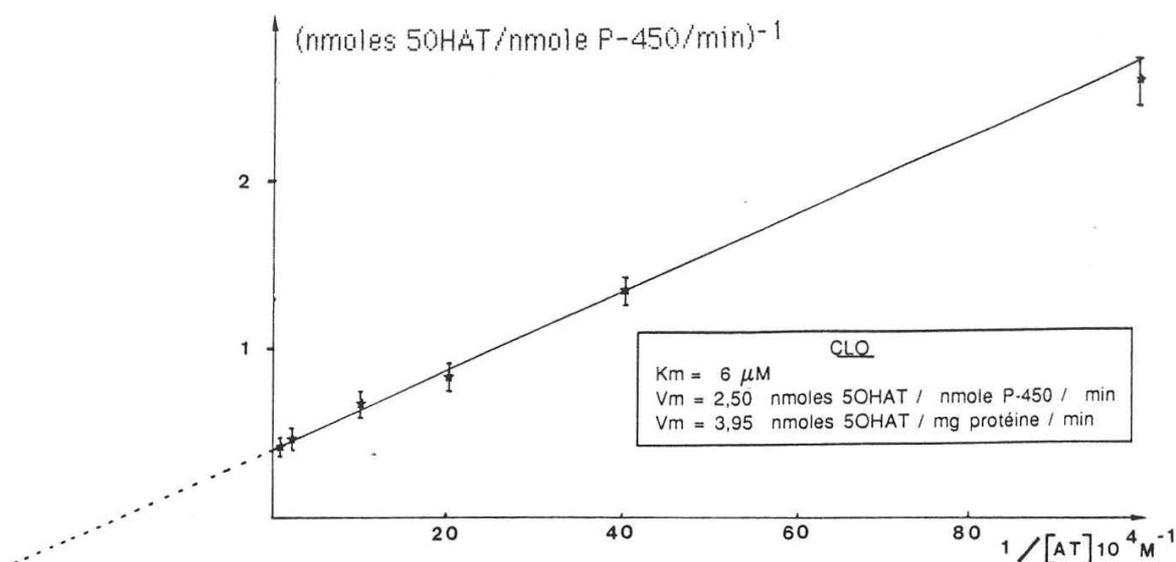


FIGURE 28a. CLO.

**FIGURE 28.** Représentation de la cinétique d'hydroxylation de l'acide tiénique catalysée par les microsomes hépatiques (a) de rats traités par le clofibrate (fig.28a), (b) de rats non traités (fig.28b), (c) de rats traités par l'huile de maïs (fig.28c).

Chaque point est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux. L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UV décrite au Y-D-2.

(a) - Les rats de race Sprague-Dawley ont été traités par le clofibrate (i.p.) en solution dans l'huile de maïs à la dose 500 mg/kg/j pendant 4 j (protocole décrit en Y-C-1). 1,6 nmoles P-450/mg protéine, 0,6 nmoles P-450/ml.

(b) Les rats n'ont été soumis à aucun traitement : 1,2 nmoles P-450/mg protéine ; 1,3 nmoles P-450/ml.

(c) Les rats ont été traités à l'huile de maïs (2,5 ml/kg) i.p. pendant 5 jours, 0,8 nmole P-450/mg protéine ; 1,2 nmoles P-450/ml.

(nmoles 5OHAT/nmole P-450/min)<sup>-1</sup>

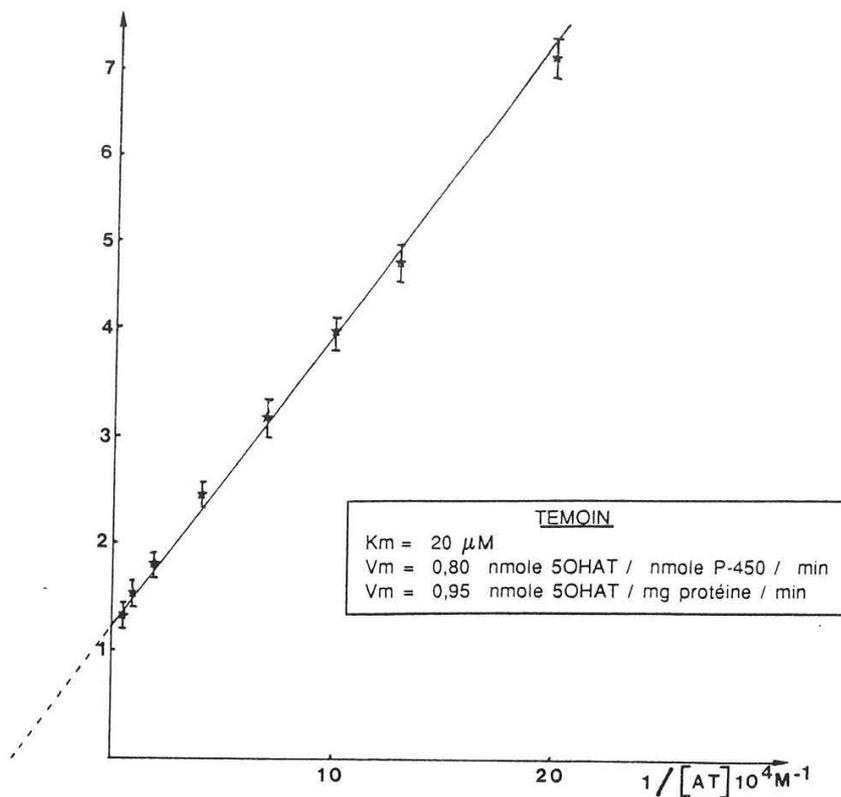


FIGURE 28b. (non traité)

(nmoles 5OHAT/nmole P-450/min)<sup>-1</sup>

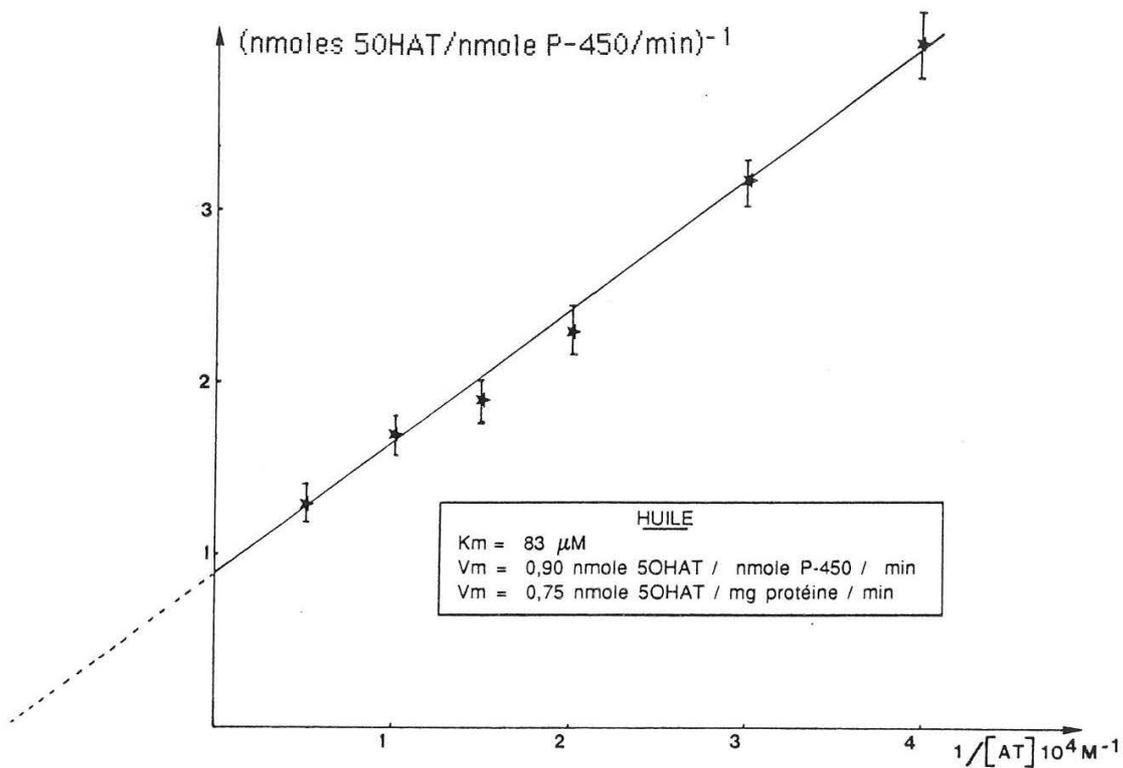


FIGURE 28c. (huile)

**Tableau 13. Données cinétiques apparentes de l'hydroxylation de l'AT par les microsomes hépatiques de rats témoins et traités par PB, CLO ou à l'huile de maïs.**

	PB	CLO	Témoin	Huile
$K_m$ ( $\mu M$ )	$14 \pm 2$	$8 \pm 3$	$15 \pm 6$	$80 \pm 11$
$V_m$ (nmole 5OHAT /nmole P-450/min)	$0,45 \pm 0,1$	$2,24 \pm 0,30$	$0,87 \pm 0,11$	$0,92 \pm 0,20$
$V_m$ (nmole 5OHAT /mg protéine/min)	$1,0 \pm 0,2$	$3,42 \pm 0,60$	$0,90 \pm 0,11$	$0,80 \pm 0,25$

Les valeurs sont la moyenne des déterminations réalisées dans des conditions analogues à celles des courbes figure 28 et figure 22 sur les microsomes de 2 à 4 lots de 5 animaux.

### III-B-2 Effet du mode d'administration du clofibrate sur l'effet inducteur de l'hydroxylation de l'AT

Après administration, le clofibrate est rapidement hydrolysé par les estérases tissulaires et/ou plasmatiques en acide clofibrique qui est la forme pharmacologiquement active du clofibrate (125). 90 % de la dose administrée est éliminée dans l'urine en 24 heures sous forme d'acide clofibrique libre ou conjugué avec l'acide glucuronique (126). Le clofibrate est classiquement administré selon 4 procédés :

- . mélangé à l'alimentation 0,4 % (poids) pendant 10 à 14 jours (107,108,127)
- . par tubage gastrique à 100 mg/kg/j ( 115) ou à 250 mg/kg/j (128)
- . par voie sous-cutanée 650 mg/kg/j durant 4 jours dans l'huile (129)
- . par voie intrapéritonéale à 200 mg/kg/j pendant 7 jours (113), 400 mg/kg/j pendant 4 jours (111) et 500 mg/kg/j 1 et 2 jours (110).

L'effet de deux paramètres : la durée d'administration du clofibrate par voie i.p. et l'administration par tubage gastrique a été étudié.

Le clofibrate a été administré par voie intrapéritonéale pendant 1, 4 et 8 jours à la dose de 500 mg/kg/jour. L'hydroxylation microsomale de l'AT a été mesurée. Les résultats présentés dans le tableau 14 montrent que, après 24 heures de traitement, 70 % de l'effet maximal observé après 4 jours de traitement est obtenu. Après 8 jours de traitement, l'activité AT hydroxylase est diminuée. Dans le cas de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique, l'effet maximal a été obtenu après 1 jour de traitement (110) par voie i.p. et 4 jours de traitement dans le cas de l'administration dans l'alimentation.

L'induction par gavage par une solution de clofibrate dans l'huile de maïs pendant 4 jours provoque une induction de l'activité AT hydroxylase d'un facteur 5,5 par rapport aux rats gavés à l'huile. Une expérience réalisée avec la méthylcellulose comme vecteur n'a pas permis d'observer une augmentation similaire.

**Tableau 14. Effet de la durée du traitement et du mode d'administration du clofibrate sur l'hydroxylation en 5 de l'AT ( $10^{-4}M$ ) catalysée par les microsomes hépatiques de rat.**

	taux P-450 (1)	5OHAT (2)	% activité par rapport au témoin (3)
<b>non traité</b>	1	0,91	-
<b>CLOFIBRATE</b>			
i.p. dans 24h	1,60	2,56 ± 0,15	266 %
l'huile 4j	1,57	3,80 ± 0,20	370 %
de maïs 8j	1,43	2,63 ± 0,10	224 %
<b>per OS</b> dans l'huile de maïs	1,73	2,90 ± 0,15	556 %
dans méthylcellulose	1,88	1,70 ± 0,10	160 %

1- exprimé en nmole P-450 par mg de protéine.

2- nmoles/mg protéine<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>

3- exprime le pourcentage de l'activité rapportée à celle obtenue en traitant les animaux de façon identique (voie, durée d'administration) uniquement par le véhicule (témoin)

Du clofibrate est administré à des rats de race Sprague-Dawley : (i) par voie i.p. à la dose de 500 mg/kg/j en solution dans l'huile de maïs pendant 24h, 4j ou 8j sous un volume de 0,5 ml ; (ii) per OS à la dose de 250 mg/kg/j en solution dans l'huile de maïs ou en suspension dans la méthylcellulose pendant 4j.

Pour les rats témoins le véhicule est administré dans les mêmes conditions (i) par voie i.p. ou (ii) per OS.

L'activité AT hydroxylase est mesurée par UY dans les conditions décrites en Y-D-2. 0,6 à 1 nmole P-450/ml.

Chaque valeur est la moyenne de 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux.

### III-B-3 Effet des inducteurs type clofibrate sur l'hydroxylation de l'AT

Pour établir si l'augmentation de l'activité AT hydroxylase est spécifiquement liée à l'action du clofibrate, ou plus généralement observée avec les inducteurs de l'activité acide laurique hydroxylase, l'effet de 3 de ces dérivés a été étudié. Les formules sont présentées tableau 12.

- le fénofibrate qui est le principe actif du lipanthyl<sup>R</sup>, médicament hypolipidémiant largement utilisé en thérapeutique, car moins controversé que le clofibrate (130,131).

Actif sous forme d'acide fénofibrique, le métabolite urinaire majeur chez le rat est l'acide fénofibrique "réduit" libre produit par réduction du groupe carbonyle de l'acide fénofibrique (132). L'administration d'acide fénofibrique ou de fénofibrate entraîne une augmentation de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique d'un facteur 8 (109). Le dérivé a été administré à la dose de 500mg/kg/j en suspension dans l'huile de maïs par voie intrapéritonéale pendant 4 jours.

- le WY 14643 est un hypolipidémiant puissant non relié structuralement au clofibrate. Il multiplie par 8 l'hydroxylation de l'acide laurique (113). Ce dérivé a été administré en suspension aqueuse avec quelques gouttes de tween 80 à la dose de 200 mg/kg/j pendant 7 jours.

- le triméthyl-2,2,4 pentane (TMP) est un solvant fortement néphrotoxique. Récemment il a été montré que son administration entraîne une augmentation du cytochrome P-450 catalysant l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique (facteur 7,5) mais également de l'hydroxylation en 11 (facteur 3) chez le rat mâle (119). Les rats ont été traités à la dose de 12 mmoles/kg en solution dans l'huile de maïs (5 ml/kg) par gavage pendant 10 jours consécutifs.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15.

Tout d'abord, au niveau du taux des cytochromes P-450 hépatiques, il apparaît que le fénofibrate et le WY 14643 induisent une augmentation comparable à celle du clofibrate. Le TMP induit une forte augmentation des cytochromes P-450 hépatiques (102,107) chez les rats Sprague-Dawley utilisés, qui n'avait pas été observée dans l'étude de Lock et Elcombe réalisée sur des rats de souche Alderley-Park. Enfin, point marquant de cette étude, les trois dérivés sont des inducteurs efficaces de l'activité AT hydroxylase.

Tableau 15. Hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par différents inducteurs "type clofibrate".

Traitement des rats	Taux P-450 nmoles P-450.mg protéine <sup>-1</sup>	5OHAT nmoles.mg protéine <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
témoin (1)	1,0 ± 0,05	0,95 ± 0,06
Clofibrate (2)	1,5 ± 0,1	3,80 ± 0,21
Fénofibrate (3)	1,4	4,60 ± 0,27
WY 14643 (4)	1,3	3,25 ± 0,13
TMP (5)	2,7	5,41 ± 0,27

Des lots de 5 rats mâles adultes de race Sprague-Dawley ont été

(1) soumis à aucun traitement et traités:

(2) par le clofibrate

(3) par le fénofibrate à la dose de 500 mg/kg pendant 4j (i.p.)

(4) par le WY 14643 (tableau 12) 200 mg/kg/j 7j en solution aqueuse (po)

(5) par le 2-2-4 TMP (tableau 12) 12 mmoles/kg/j 10j dans l'huile de maïs (po).

L'activité AT hydroxylase est mesurée par UV dans les conditions décrites en Y-D-2 (tampon phosphate 0,1M pH 7,4 ; G6P 10mM ; G6PDH 2u/ml ; NADP 1mM ; 1 mg protéine/ml ; AT 10<sup>-4</sup>M initial).

Les valeurs sont la moyenne de 4 à 6 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux.

Par rapport aux animaux non traités, l'activité AT hydroxylase est multipliée par 4,8 avec le fénofibrate, par 3,4 avec le WY 14643 et par 5,6 avec le TMP.

Ce résultat est obtenu avec des inducteurs qui dans le cas du WY 14643 et du TMP ont des structures chimiques très éloignées de celle du clofibrate.

L'action des dérivés type clofibrate n'entraîne aucune augmentation de certaines activités classiques des cytochromes P-450 comme la déalkylation de l'aminopyrine et de l'éthoxyrésorufine, l'hydroxylation en 4 du noyau biphenyle ou l'hydroxylation en 16 $\alpha$  de la testostérone (109). L'augmentation de l'activité AT hydroxylase par le traitement avec les dérivés type clofibrate semble donc un phénomène spécifique. C'est à ce jour la plus forte induction de l'oxydation d'un composé exogène observée avec ce type d'inducteur.

Les enzymes supportant l'activité AT hydroxylase et l'activité acide laurique 12 hydroxylase sont induites par le même type de molécule. De façon logique, nous avons cherché à savoir si les mêmes isoenzymes catalysaient les 2 réactions.

#### **III-B-4 Les activités acide tiénilique et acide laurique hydroxylases dépendent-elles d'une même monooxygénase ?**

Pour apporter des éléments de réponse à cette question, deux types d'expériences ont été menées :

- une tentative de corrélation entre les activités acide tiénilique et acide laurique hydroxylase
- une étude d'inhibition croisée de l'hydroxylation de l'acide laurique par l'acide tiénilique et de l'hydroxylation de l'acide tiénilique par l'acide laurique.

III-B-4-a Tentative de corrélation entre la formation du 5OHAT et celle des dérivés hydroxylés de l'acide laurique par des microsomes hépatiques de rats différemment induits

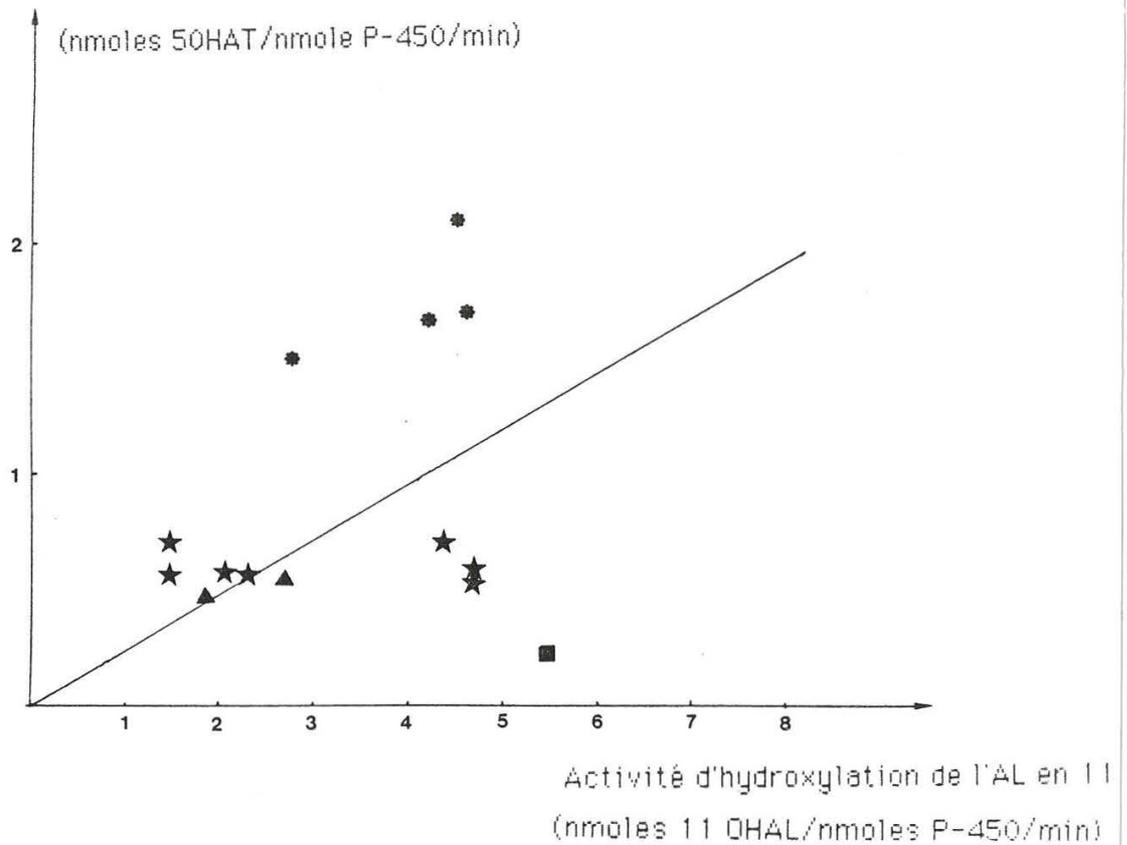
Sur des microsomes hépatiques de rats traités par différents inducteurs, l'activité AT hydroxylase d'une part et l'activité 11 et 12 hydroxylase de l'acide laurique d'autre part ont été mesurées parallèlement.

L'étude de l'hydroxylation de l'AL a été réalisée au laboratoire par Jean-Luc Boucher. Un mélange d'acide laurique marqué au  $^{14}\text{C}$  et d'acide laurique froid est incubé en présence de système engendrant le NADPH et de microsomes hépatiques de rats. La détection des acides hydroxy-11 et -12 lauriques est réalisée selon la méthode décrite par Fan et coll. (133). Après arrêt de la réaction par précipitation des protéines au méthanol, les métabolites sont extraits, séparés par CLHP et quantifiés par comptage de la radioactivité des fractions obtenues en scintillation liquide.

La figure 29a correspond à un essai de corrélation de l'hydroxylation de l'AT et de l'hydroxylation en 11 de l'acide laurique par des microsomes hépatiques de rats traités par différents inducteurs. Chaque type d'inducteur utilisé est représenté par un sigle différent. Premier élément, la corrélation est dans l'ensemble extrêmement faible. Les points représentant les activités des microsomes de rats témoins ou de rats induits par le clofibrate ou la cyano-16 $\alpha$  prégnénolone (PCN) se trouvent très dispersés. Seuls les points correspondant à des microsomes de rats induits au phénobarbital (PB) s'alignent raisonnablement.

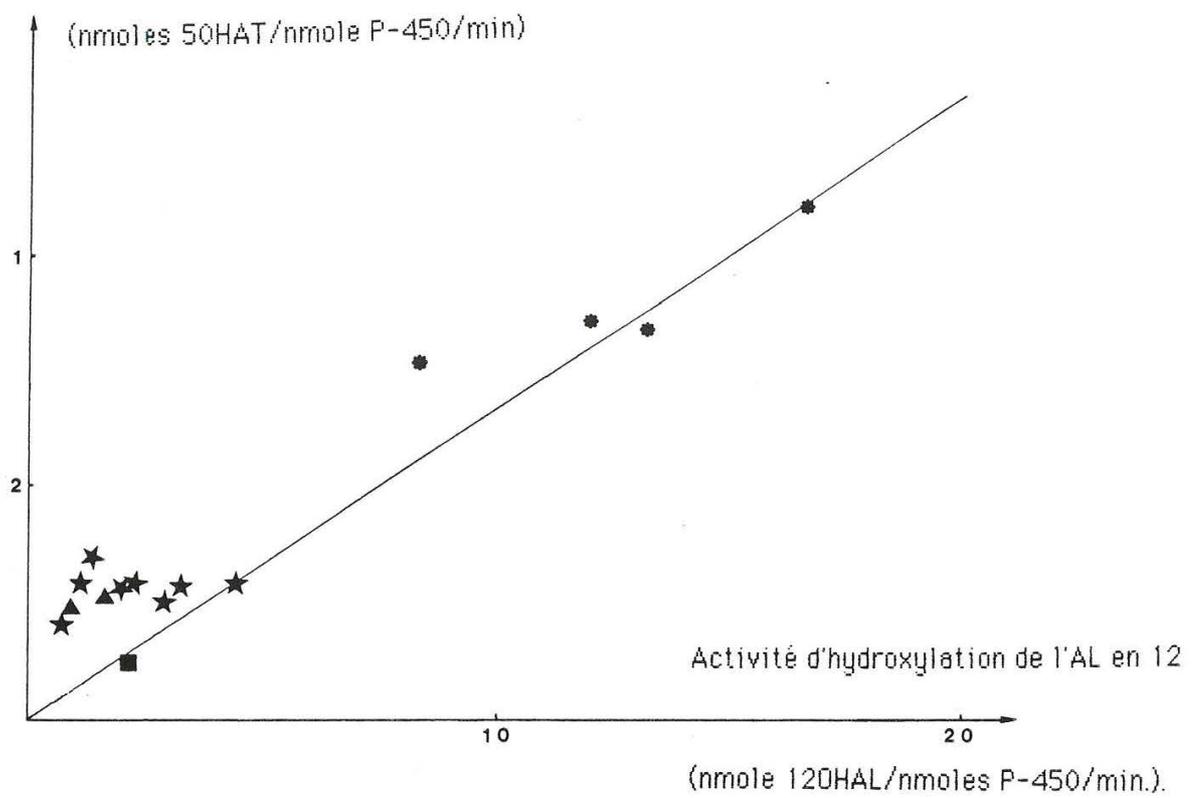
La figure 29b présente un essai de corrélation de l'hydroxylation de l'AT et de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique par des microsomes de rats traités par les différents inducteurs. On observe un resserrement général des points. Les points correspondant à des microsomes de rats induits au clofibrate ou à des composés du même type s'alignent à peu près avec ceux correspondant à des microsomes de rats induits au PCN. Mais la plupart des points correspondant aux microsomes de rats témoins ou traités par le PB sont hors de cette corrélation faible.

Par conséquent, cette étude ne permet pas d'observer de corrélation nette entre l'hydroxylation de l'AT et l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique.



**FIGURE 29a.** Tentative de corrélation entre la formation du 50HAT et l'hydroxylation en 11 de l'AL catalysée par les microsomes hépatiques de rats différemment induits.

- Les microsomes hépatiques proviennent de rats non traités (★), de rats traités par des dérivés type clofibrate (●), de rats traités par le phénobarbital (▲) et la PCN (■), selon le protocole décrit en Y-C-1.
- L'activité AT hydroxylase a été mesurée dans les conditions décrites en Y-D-2.
- L'activité AL hydroxylase a été mesurée dans les conditions décrites en Y-D-4.
- Chaque point est la moyenne de 2 à 4 déterminations de l'activité AT hydroxylase et AL hydroxylase sur l'ensemble des microsomes d'un lot de 5 animaux.



**FIGURE 29b.** Tentative de corrélation entre la formation du 50HAT et l'hydroxylation en 12 de l'AL catalysée par les microsomes hépatiques de rats différemment induits.

#### III-B-4-b Inhibition de l'activité acide tiénilique hydroxylase par l'acide laurique

L'activité AT hydroxylase à différentes concentrations en acide tiénilique a été mesurée en présence de concentrations variables d'acide laurique. La représentation de Dixon, figure 30, montre que l'acide laurique inhibe l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique par les microsomes de rats traités au clofibrate de façon compétitive. Le  $K_i$  est de 5  $\mu$ M. Par conséquent, l'acide laurique présente une bonne affinité pour les cytochromes P-450 catalysant l'hydroxylation de l'acide tiénilique.

#### III-B-4-c Inhibition de l'acide laurique hydroxylase par l'acide tiénilique

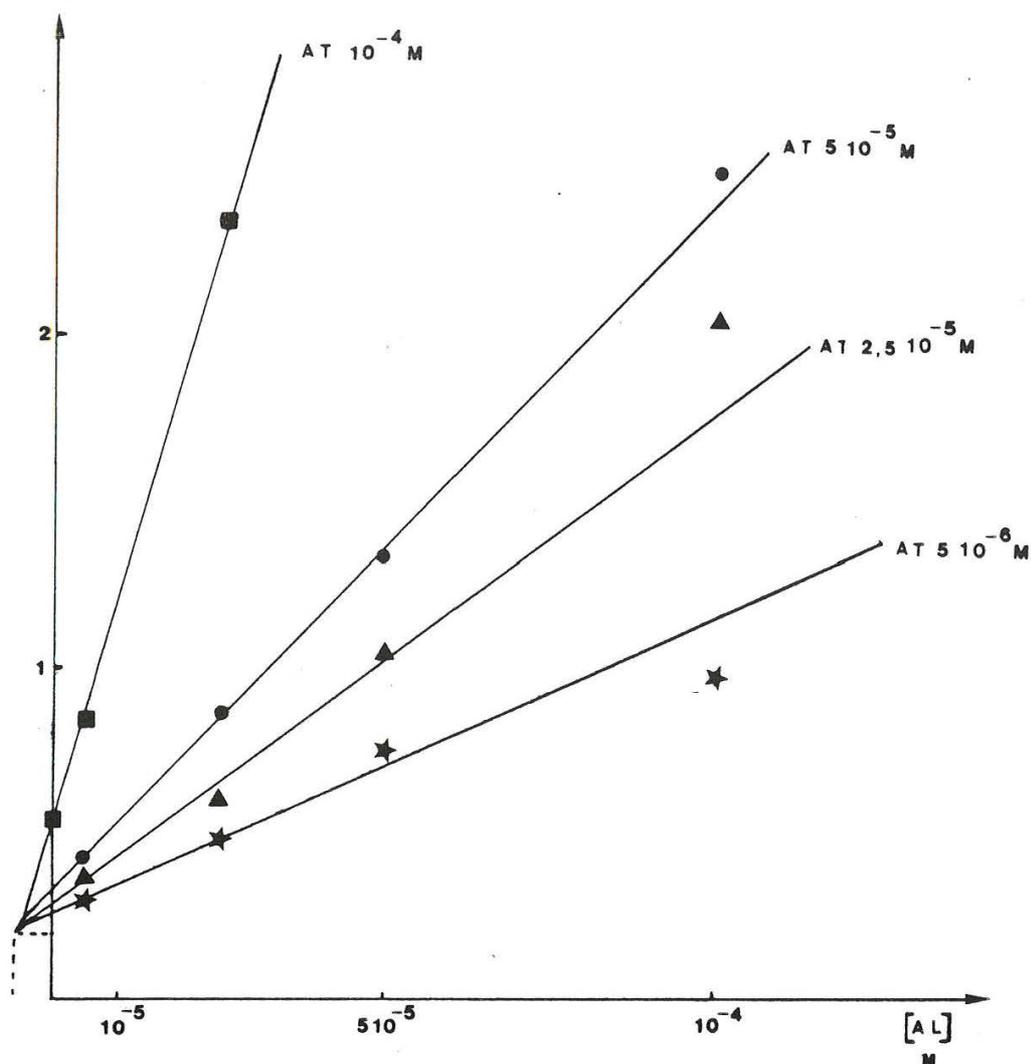
Le tableau 16 présente les résultats obtenus concernant l'inhibition par l'acide tiénilique de l'hydroxylation de l'acide laurique par les microsomes hépatiques de rats non traités et traités par le clofibrate et le phénobarbital.

L'acide tiénilique doit être utilisé à des concentrations 50 fois supérieures à celles de l'acide laurique pour inhiber d'environ 50 % la formation de ses dérivés hydroxylés en position 11 et 12. De plus, l'acide laurique est un composant des membranes. Il existe donc une concentration d'acide laurique endogène dans les incubations microsomales qui est négligée.

Enfin, en fonction du type d'inducteur utilisé, aucune différence significative de l'effet de l'acide tiénilique n'est observée.

En résumé, il apparaît clairement que l'acide laurique inhibe de façon compétitive l'hydroxylation de l'acide tiénilique mais que l'hydroxylation de l'acide laurique en 11 ou en 12 n'est que faiblement inhibée par l'AT. De plus l'absence de corrélation claire entre les 2 activités (figure 29a et b) semble montrer que plusieurs isoenzymes sont impliquées dans l'hydroxylation de l'acide laurique et de l'acide tiénilique dont seules certaines pourraient être communes aux deux substrats. Afin de progresser dans la caractérisation de ces isoenzymes, il a été nécessaire de recourir à des techniques différentes.

(nmole 5OHAT/nmole P-450/min)<sup>-1</sup>  
 1/Activité AT hydroxylase



**FIGURE 30.** Représentation de Dixon de l'inhibition par l'acide laurique de l'hydroxylation en 5 de l'acide tienilique catalysée par des microsomes hépatiques de rats traités par le clofibrate.

- Les microsomes hépatiques proviennent de rats traités par le clofibrate (500 mg/kg/j, 4 j, dans l'huile de maïs) selon le protocole décrit en Y-C-1.
- L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY décrite en Y-D-2 (0,1 nmole P-450 par essai de 300  $\mu$ l ; 1,7 nmoles P-450/mg protéine). L'AL est ajouté en même temps que l'AT dans les conditions décrites en Y-E-1-c.
- Chaque point est la moyenne de 2 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux.

**Tableau 16. Effet de l'AT sur l'activité acide laurique hydroxylase des microsomes hépatiques de rats traités par différents inducteurs.**

	Traitement des rats					
	Aucun (1)		Phénobarbital (2)		Clofibrate (3)	
	% activité AL hydroxylase	110H/120H	% activité AL hydroxylase	110H/120H	% activité AL hydroxylase	110H/120H
AT=0	100	0,3	100	0,8	100	0,2
AT=5.10 <sup>-4</sup> M	53	0,4	57	0,6	57	0,2
AT=10 <sup>-3</sup> M	44	0,4	23	0,6	36	0,17

Acide laurique 10<sup>-5</sup>M.

- Des lots de 5 rats mâles adultes Sprague-Dawley ont été traités (2) par le PB (0,1% dans l'eau de boisson pendant 5j) ou (3) par le CLO (500 mg/kg/j. 4j i.p. dans l'huile de maïs) selon le protocole décrit en V-C-1.

- L'activité AL hydroxylase est mesurée par CLHP couplée au comptage en scintillation liquide dans les conditions décrites en V-D-4 (AL 10<sup>-5</sup>M initiale, 0,2 nmole P-450/ml).

(1) activité de base (11+12) = 4,9 ± 0,2 nmoles 11+12 AL/nmole P-450/min ; 0,9 nmole P-450/mg protéine.

(2) activité de base (11+12) = 4,0 ± 0,2 nmoles 11+12 AL/nmole P-450/min ; 2,1 nmoles P-450/mg protéine.

(3) activité de base (11+12) = 15,2 ± 3 nmoles 11+12 AL/nmole P-450/min ; 1,5 nmoles P-450/mg protéine.

Chaque valeur est la moyenne de 2 à 4 déterminations réalisées sur les microsomes d'un lot de 5 animaux.

### III-C CARACTERISATION DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS L'ACTIVITE ACIDE TIENILIQUE HYDROXYLASE EN UTILISANT DES ENZYMES PURIFIEES ET DES ANTICORPS SPECIFIQUES

Les cytochromes P-450 sont associés au sein de la membrane microsomale à la NADPH-cytochrome P-450 réductase et aux phospholipides. Historiquement, en 1969, Omura parvient à inhiber avec des anticorps dirigés contre la cytochrome P-450 réductase l'hydroxylation de l'aniline catalysée par les microsomes hépatiques (134). La même année, en utilisant le désoxycholate comme détergent en présence de dithiothréitol et de glycérol, Lu et coll. reconstituent le métabolisme de différents substrats à partir de NADPH-cytochrome P-450 réductase et de cytochrome P-450 microsomal de foies partiellement purifiés (135).

Ces approches sont encore largement utilisées pour caractériser les activités enzymatiques dépendantes des monooxygénases. Les principes en sont les suivants :

- la NADPH-cytochrome P-450 réductase est le donneur d'électron physiologique du cytochrome P-450. La démonstration de sa participation à une réaction par inhibition antigène-anticorps contribue à prouver la participation du cytochrome P-450 dans certaines réactions enzymatiques. Il faut noter que cette conclusion ne peut être tirée dans certains cas de réduction métabolique où la NADPH-cytochrome P-450 réductase elle-même catalyse la réduction de plusieurs exogènes.

- L'utilisation d'AC produits contre une forme purifiée de cytochrome P-450 permet de déterminer l'implication de cette isoenzyme dans une réaction microsomale et de réaliser une mesure quantitative. Par exemple, les AC dirigés contre le cytochrome P-450 c (levin) inhibent le métabolisme du benzo[a]pyrène de façon partielle dans les microsomes hépatiques de rats non traités ou traités par le PB. Mais en présence de microsomes hépatiques de rats traités par le 3MC, la réaction est inhibée presque totalement. Ces résultats permettent de conclure que le cytochrome P-450 c joue un rôle mineur dans le métabolisme du benzo[a]pyrène chez le rat non traité ou traité par le PB mais est majoritairement impliqué chez le rat traité par le 3MC.

- L'utilisation d'isoenzymes purifiées permet de reconstituer, en présence de phospholipides et de NADPH-cytochrome P-450 réductase, le

système enzymatique et de déterminer la spécificité de cette isoenzyme à l'égard d'un substrat.

L'étude d'une activité microsomale dépendante des cytochromes P-450 peut donc s'effectuer selon 3 approches différentes mais complémentaires ayant chacune des avantages et des inconvénients :

1) L'étude sur microsomes entiers. Cette étude réalisée au chapitre II permet de déterminer dans les grandes lignes d'une part si le substrat est pris en charge par les cytochromes P-450 de rats non traités et d'autre part l'effet des inducteurs classiques du cytochrome P-450 sur l'activité étudiée. Cette approche, la moins complexe techniquement, est souvent limitée par la faible spécificité des isoenzymes (cf. I-B-1). En effet, une activité enzymatique peut être catalysée par plusieurs isoenzymes. Les modifications quantitatives des différentes isoenzymes liées à l'induction peuvent alors entraîner des erreurs d'interprétation. Par exemple, dans le cas de la déméthylation de la benzphétamine, la mesure de l'activité catalytique est la même chez les rats non traités et chez ceux traités par le phénobarbital. Une interprétation logique est la non-implication de formes induites au phénobarbital dans la N-déméthylation de la benzphétamine. Pourtant cette activité est catalysée à la fois par le cytochrome P-450 b (levin) forme majeure induite par le phénobarbital et par le cytochrome P-450 h (levin) forme qui représente environ 50 % des cytochromes P-450 de rats non traités (figure 7).

Dans les microsomes de rats témoins, la déméthylation de la benzphétamine est presque totalement prise en charge par le cytochrome P-450 h. Après traitement des rats par le phénobarbital, cette forme régresse fortement mais le cytochrome P-450 b augmente considérablement. Ceci met bien en évidence les limites d'une étude uniquement réalisée sur microsomes entiers.

Par conséquent, si le phénomène d'induction permet d'obtenir des indications importantes sur le métabolisme d'un substrat, la multiplicité des cytochromes P-450 présents dans les microsomes d'animaux traités ou non limite la portée de ces investigations.

### 2) L'utilisation d'AC spécifiques sur microsomes entiers

Les techniques immuno-chimiques constituent un outil particulièrement performant pour évaluer la participation d'une forme de cytochrome P-450 à une activité métabolique. En effet, dans certains cas, les paramètres tels que l'activité catalytique, le poids moléculaire, les propriétés spectrales ou la séquence N-terminale ne sont pas suffisamment spécifiques pour différencier toutes les isoenzymes du cytochrome P-450. Les anticorps, en raison de leur haute spécificité, sont en principe capables de faire la distinction même si ces protéines possèdent une très forte homologie dans la séquence de leurs acides aminés (136). Toutefois il existe des phénomènes de reconnaissance croisée ; certains anticorps préparés à partir d'une forme particulière de cytochrome P-450 reconnaissent d'autres formes proches immunologiquement (137). La difficulté réside dans l'obtention d'AC hautement spécifiques et dans l'évaluation de cette spécificité par des méthodes appropriées d'une part, et dans l'obtention d'AC actifs en catalyse d'autre part.

### 3) L'utilisation d'isoenzymes purifiées de cytochromes P-450

L'utilisation de formes purifiées constitue une technique de choix pour préciser les isoenzymes prenant en charge un substrat. Toutefois, cette technique est subordonnée d'une part à la purification et à la caractérisation de différents cytochromes P-450 doués d'activité. Au cours de la purification, certaines formes de cytochromes P-450 peuvent perdre de leur activité ou de leur spécificité. D'autre part, la mise au point des conditions de fonctionnement du système reconstitué peut s'avérer délicate.

Enfin, dans le cas de l'utilisation d'AC spécifiques ou de formes purifiées, il faut souligner une évidence : ces deux méthodes ne permettent de caractériser que les isoenzymes de cytochrome P-450 qui sont connues et purifiées. Or nous l'avons vu dans l'introduction, toutes les formes de cytochromes P-450 ne sont pas actuellement purifiées.

Nous présenterons les résultats obtenus par les techniques précédentes afin de caractériser les enzymes impliquées dans l'hydroxylation de l'AT. En conclusion de ce chapitre, nous discuterons les principaux résultats obtenus sur les microsomes entiers, sur les cytochromes P-450 purifiés et enfin avec les anticorps spécifiques et nous proposerons une explication des faits expérimentaux en partant de cette conclusion.

Les études réalisées au chapitre II ont permis de mettre en évidence l'implication des cytochromes P-450 dans l'hydroxylation de l'acide tiénilique catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital. Toutefois, certains xénobiotiques contenant un atome de soufre ou un atome d'azote peuvent être pris en charge simultanément par le système microsomal des flavines monooxygénases et par les cytochromes P-450. C'est le cas pour la N-oxydation de la N,N-diméthylaniline (138) et pour l'oxydation du thiobenzamide (139). Nous déterminerons donc si la flavine monooxygénase participe à la réaction d'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le clofibrate. Rappelons que la nature de l'intermédiaire conduisant aux atteintes hépatiques n'est pas connue et qu'il n'est pas indifférent de savoir s'il peut être produit par une enzyme microsomale autre que le cytochrome P-450. Pour cela, nous étudierons :

- d'une part l'influence de l'anti-cytochrome P-450 réductase sur l'hydroxylation de l'AT car la flavine n'a pas besoin de réductase pour fonctionner
- d'autre part l'hypothèse de la contribution de la flavine monooxygénase à cette réaction.

Ces travaux ont été menés en collaboration avec Evelyne Rouer INSERM U75 CHU Necker.

### **III-C-1 Effet de l'anti-cytochrome P-450 réductase sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités au clofibrate**

- La NADPH-cytochrome P-450 réductase a été purifiée par E.Rouer à partir de foies de rats non traités et injectée à des lapines de race New Zealand pour produire des anticorps. L'effet inhibiteur de ces anticorps a été testé par E. Rouer et coll. (83)

sur l'activité NADPH-cytochrome P-450 réductase de foies de souris. L'inhibition maximum (85 %) est observée à 5mg IgG/mg de protéine microsomale

sur le métabolisme de l'imipramine dépendant du cytochrome P-450. La formation de la desméthylimipramine, de l'hydroxy-10 imipramine et de l'hydroxy-2 imipramine est inhibée de 90 à 100 %.

- La figure 31 représente l'activité AT hydroxylase résiduelle obtenue en présence de l'anti-cytochrome P-450 réductase. Avec 3 mg d'IgG/mg de protéine, près de 90 % de l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique catalysée par les microsomes de foies de rats traités au clofibrate sont inhibées.

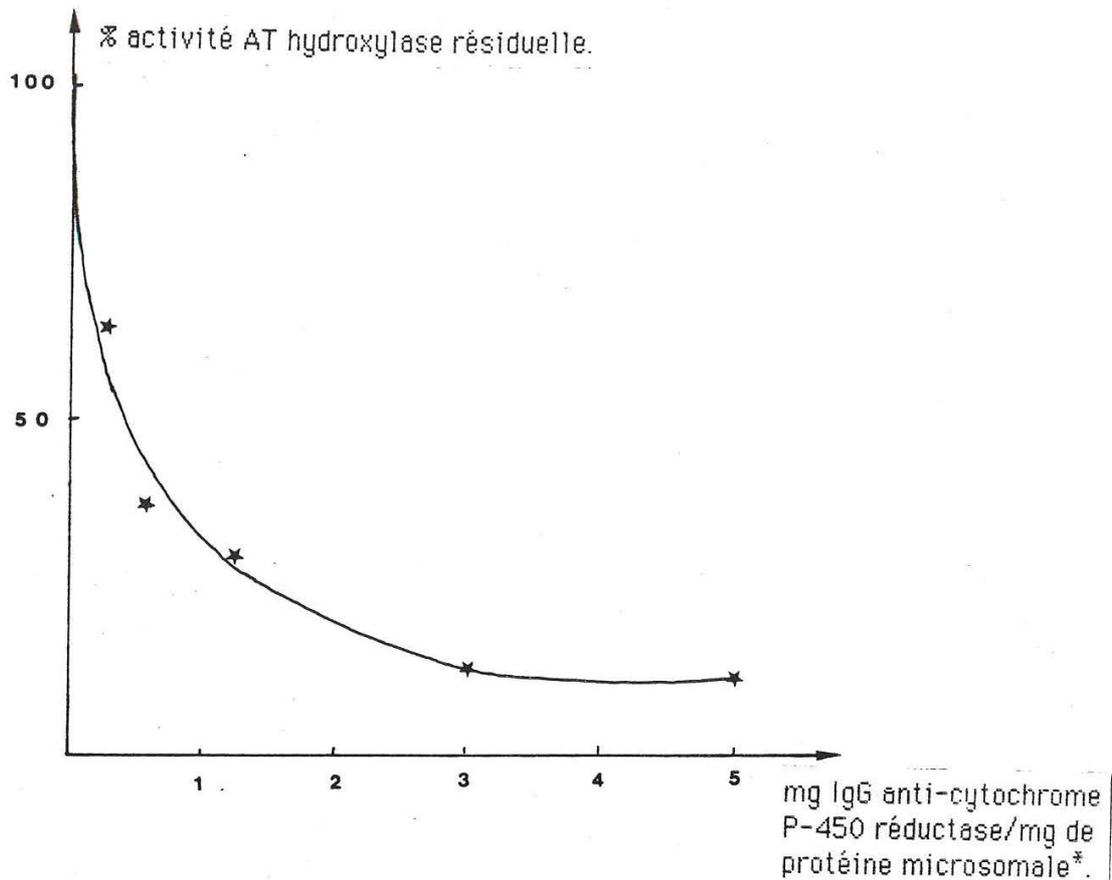
- Le taux d'inhibition est supérieur à celui observé dans les mêmes conditions avec les microsomes de rats traités par le phénobarbital (II-A-3-b-3). Il démontre que la réaction est très majoritairement dépendante des monooxygénases. L'activité résiduelle peut être attribuée à une inactivation incomplète de la cytochrome P-450 réductase.

### **III-C-2 Rôle éventuel d'une monooxygénase à flavine dans l'hydroxylation microsomale en 5 de l'AT**

Comme les cytochromes P-450, les monooxygénases à flavine sont présentes majoritairement dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Purifiées et caractérisées à l'origine à partir de foie de porc par Ziegler (140), elles l'ont été ensuite chez la souris (141) et le rat (142). Chez la lapine deux formes ont pu être isolées. La flavine monooxygénase existant dans le poumon est immunologiquement et catalytiquement distincte de celle présente dans le foie et induite d'un facteur 5 à la fin de la gestation (143,144).

Le seul substrat endogène connu des flavines monooxygénases est la cystéamine qui est oxydée en cystamine (disulfure). C'est pourquoi leur implication dans la régulation du rapport thiol/disulfure intracellulaire a été proposée (140). Toutefois, leur rôle physiologique exact n'a pas encore été élucidé.

Les flavines monooxygénases sont douées d'une spécificité de substrats. Les amines tertiaires et secondaires, les hydrazines, les hydroxylamines N-disubstituées, les thiocarbamides, les thioamides, les sulfones et les thiols sont susceptibles d'être métabolisés. Les deux réactions les plus utilisées pour



**FIGURE 31.** Effet de l'anti-cytochrome P-450 réductase sur l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique  $10^{-4}M$  catalysée par des microsomes hépatiques de rats traités par le clofibrate.

- \* exprime l'activité mesurée en présence de l'anti-cytochrome P-450 réductase par rapport à l'activité dosée en présence d'une quantité correspondante d'IgG non spécifiques.

Les microsomes hépatiques proviennent de rats traités par le clofibrate (selon le protocole décrit en Y-C-1). Les AC sont ajoutés selon le protocole décrit en Y-E-2-b puis l'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UV (Y-D-2). 0,5 nmole P-450/ml ; 1,6 nmoles P-450 mg/protéine.

Chaque point représente une mesure simple.

- 100 % d'activité = 2,1 nmoles 5OHAT/nmole P-450/min.

caractériser l'activité flavine monooxygénase sont la N-oxydation de la diméthylaniline et la S-oxydation du thiobenzamide (145).

La possibilité que la formation du 5OHAT passe, même de façon minoritaire, par une étape intermédiaire d'oxydation du soufre catalysée par les flavines monooxygénases a été étudiée par deux approches.

### III-C-2-a Action de l'anti-flavine monooxygénase sur l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique catalysée par les microsomes hépatiques de rats

La flavine monooxygénase a été purifiée à partir de foies de rats non traités. Les anticorps ont été obtenus chez la lapine. Leur activité a été testée par double immunodiffusion d'Ouchterlony, en immuno-transfert et par immuno-inhibition de la sulfoxydation de la thiobenzamide par E. Rouer et coll. (146).

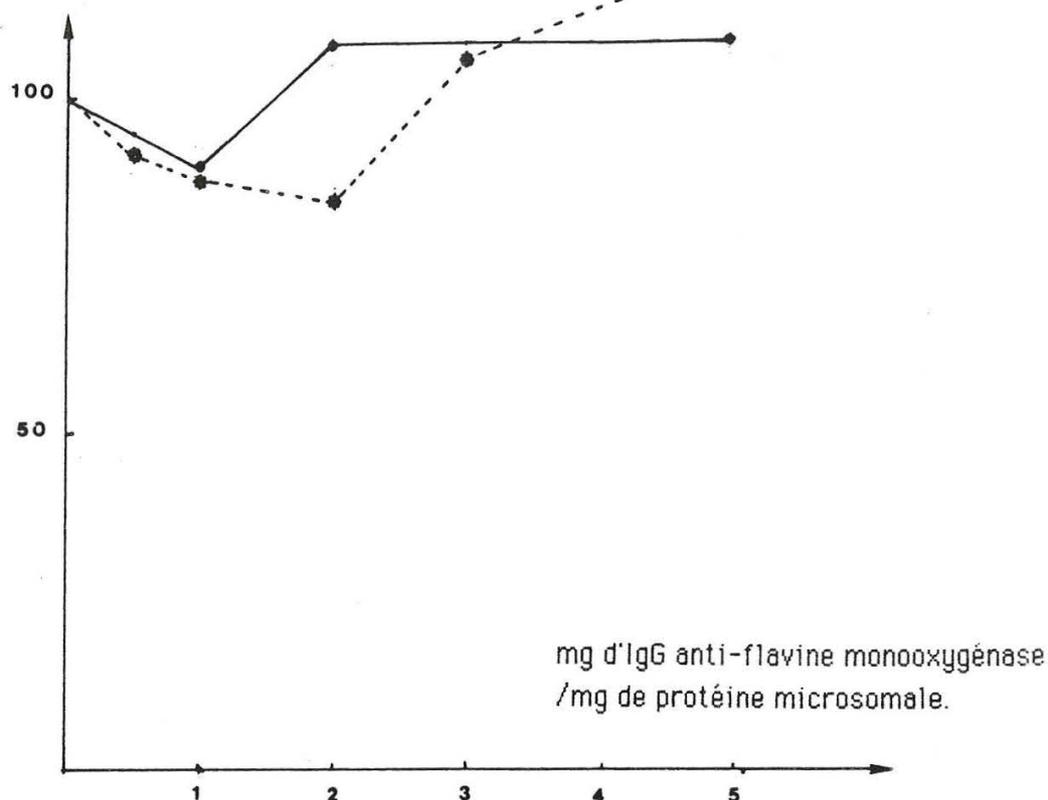
L'activité AT hydroxylase catalysée par les microsomes hépatiques de rats non traités et traités par le phénobarbital a été mesurée en présence de ces anticorps anti-flavine monooxygénase à des concentrations de 0,5 à 5 mg d'IgG/mg de protéines. L'activité résiduelle exprimée en pourcentage de l'activité obtenue en présence de quantités comparables d'immunoglobulines non spécifiques de lapines témoins est présentée figure 32. A 5 mg d'IgG, aucune inhibition de l'activité AT hydroxylase n'est observée, chez les animaux traités par le clofibrate ou par le phénobarbital.

### III-C-2-b Reconstitution du système enzymatique de la flavine monooxygénase

Les monooxygénases à flavine sont des systèmes enzymatiques relativement instables *in vitro* (145). Ce système a été reconstitué à partir de flavine monooxygénase purifiée dans les conditions décrites précédemment et de système engendrant le NADPH dans un tampon tris 100 mM MgCl<sub>2</sub> 10mM pH 8. L'activité catalytique de ce système a été testée sur la S-oxydation du thiobenzamide (10<sup>-4</sup>M) par la technique spectrophotométrique de Cashman et Hanzlick (147). Dans ces conditions, la vitesse de cette réaction est de 0,79 nmole de thiobenzamide formé /0,12 nmole de flavine/min.

En présence d'acide tiénilique, aucune augmentation de la densité optique n'a été détectée entre 600 et 370 nm.

% d'activité AT hydroxylase résiduelle\*



**FIGURE 32.** Action de l'anti-flavine monooxygénase sur l'hydroxylation en 5 de l'AT  $10^{-4}M$  catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par le clofibrate (-) et par le phénobarbital (---).

\* exprime l'activité AT hydroxylase mesurée en présence de l'anti-flavine monooxygénase par rapport à l'activité dosée en présence d'une quantité correspondante d'IgG non spécifiques.

Les microsomes hépatiques proviennent de rats traités selon le protocole décrit en Y-C-1 par le clofibrate et le phénobarbital. (PB : 2,1 nmole P-450/mg protéine, 1,3 nmole P-450/ml ; CLO : 1,5 nmole P-450/mg protéine, 0,5 nmole P-450/ml).

Les AC sont ajoutés selon le protocole décrit en Y-E-2-b puis l'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY (Y-D-2).

Chaque point correspond à une mesure simple.

100 % d'activité = 0,45 nmole 5OHAT/nmole P-450/min (rats PB)

100 % d'activité = 2,15 nmole 5OHAT/nmole P-450/min (rats CLO)

Les études d'immuno-inhibition réalisées en présence d'anticorps anti-flavine monooxygénase d'une part, l'absence d'activité AT hydroxylase du système flavine monooxygénase reconstitué d'autre part, permettent de conclure à la non-participation de ce système dans l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats. Compte-tenu de l'effet de l'anti-cytochrome P-450 réductase, il apparaît que cette activité est totalement dépendante des cytochromes P-450 dans les microsomes hépatiques de rats.

### III-C-3 Utilisation de cytochromes P-450 purifiés de foies de rats pour catalyser l'hydroxylation en 5 de l'AT

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Roland Wolf, Directeur du laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et de Métabolisme des Xénobiotiques d'Edimbourg (GB) qui nous a fourni les cytochromes P-450 purifiés et les anticorps obtenus contre ces isoenzymes chez le lapin (137).

#### III-C-3-a Purification des isoenzymes du cytochrome P-450 hépatique de foies de rats

Les isoenzymes du cytochrome P-450 ont été purifiées par R. Wolf à partir de foies de rats Wistar (137).

#### III-C-3-b Caractérisation des isoenzymes du cytochrome P-450 hépatique de rats

L'activité de 10 cytochromes P-450 a été testée. Ceux-ci sont désignés selon la nomenclature adoptée par R. Wolf qui tend à classer les cytochromes P-450 par sous-famille génomique. La correspondance avec les autres nomenclatures figure dans le tableau 2 de l'introduction. Les caractéristiques principales de ces cytochromes P-450 publiées par Wolf et coll. (10,137,148) sont résumées dans le tableau 17.

**Tableau 17. Cytochromes P-450 purifiés de foies de rats provenant du laboratoire de R. Wolf utilisés dans les reconstitutions (d'après 27,137, 159).**

Nom	Sous-Famille n°gènes	Inducteur <sup>a</sup>	Facteur <sup>b</sup> d'induction <sup>b</sup>	Séquence N-terminale	Homologie /PB-2a <sup>c</sup>
PB 1a	5			1 5 10 15 20 MDLVMLLVLTLT-LILLSI-	58 %
PB 1b	II C6	PB	2-4	MDLVMLLVLTLT-LILLSI-	58 %
PB 2a	II C11	aucun	-	MDPVLVLVLTLSLLLLSLW	100 %
PB 3a	II B1 8	PB, ACLR	≥30	MEPSILLLL ALLVGFLLLLV	40 %
PB 3b	II B2	PB, ACLR	≥20	MEPSILLLL ALLVGFLLLLV	40 %
MC 1a	I A2 2	ISF,BNF,ACLR	≥20	(M)AFSQYISLAP.ELLLATAIP	20 %
MC 1b	I A1	BNF,MC,ACLR	≥30	(M)PSVYGFP AFTSATELLLA V	25 %
UT 1	II A1	BNF,PB	≈ 2	MLDTGLLLVVILASLSVMLL	20 %
P 452	IV A1	CLO	≈15	MSVSA L S ST Arg FTG S I S G F L Q	10 %

<sup>a</sup> PB : phénobarbital ; PCN cyano-16 $\alpha$  prégénolone ; BNF  $\beta$ -naphthoflavone ; ACLR arochlor 1254 ; MC méthyl-3 cholanthrène ; CLO clofibrate ; ISF isosafrole.

<sup>b</sup> P-450/mg protéine.

<sup>c</sup> Homologie sur les 20 premiers acides aminés.

Quatre formes, PB 1a, PB 1b, PB 2a et PB 2b font partie de la même sous-famille et sont clairement distinctes des formes PB 3a et PB 3b, formes majeures induites par le phénobarbital.

- PB 1a et PB 1b diffèrent par leur poids moléculaire (52700 et 52900), leur spectre d'absorption et la nature des fragments obtenus après protéolyse à la papaine. Toutefois, leur séquence N-terminale est identique à celle de la forme PB 1 isolée par Waxman et Walsh (149).

- PB 2a a un poids moléculaire de 52900. Sa séquence N-terminale est identique à celle décrite par Hanniu et coll. comme la forme h (150), par Waxman comme la forme 2c (151), par Cheng et Schenkman comme la forme RLM<sub>5</sub> (152), par Kamataki et coll. comme le cytochrome P-450 m (153) et par Guengerich et coll. comme la forme UT-A (154).

La forme PB 2a représente environ 50 % des isoenzymes du cytochrome P-450 présentes dans le foie de rat adulte (154). L'expression de cette enzyme est dépendante du sexe et de l'âge. A la puberté, le taux de ce cytochrome P-450 augmente considérablement chez le rat mâle pour être environ 20 fois plus élevé chez le mâle que chez la femelle (155). Morgan et coll. ont montré que le niveau du cytochrome P-450 PB 2a est régulé dans le foie par les hormones stéroïdes et par la GH, hormone de croissance (156). Le gène codant pour ce cytochrome P-450 a été isolé récemment (157).

La forme PB 2a hydroxyle spécifiquement la testostérone en position 2 $\alpha$  et participe à l'hydroxylation de diverses positions (6 $\beta$ , 16 $\alpha$ , C<sub>17</sub>). Elle catalyse également l'hydroxylation de divers stéroïdes en position 2 $\alpha$  et 16 $\alpha$  (progestérone, estradiol). Secondairement elle participe à l'hydroxylation de différents xénobiotiques : la méphénytoïne nous l'avons vu, la benzphétamine et l'hexobarbital (158,159,160).

Le traitement des rats mâles par les inducteurs classiques du cytochrome P-450 (PB,  $\beta$ NF, PCN, ISF) diminue considérablement la forme PB 2a et l'activité 16 $\alpha$  testostérone hydroxylase associée (155). Ces inducteurs ne modifient pas le taux de P-450 PB 2a de la femelle. Le clofibrate n'induit pas l'activité 16 $\alpha$  hydroxylase du rat mâle (107).

- La forme PB 2c est proche, sans être identique, de la forme induite par la PCN décrite par Gonzalez (161).

- Les formes PB 3a et PB 3b sont les deux formes majeures induites par le traitement des rats par le phénobarbital et identiques respectivement aux formes PB-B et PB-D de Guengerich et coll. (154).

- Les formes MC 1a et MC 1b sont inductibles 20 à 30 fois par le 3MC et correspondent aux formes ISFG et  $\beta$ NFB de Guengerich (154).

- La forme UT 1, identique à la forme UT-F de Guengerich est une forme constitutive c'est à dire présente dans le foie de rat non traité.

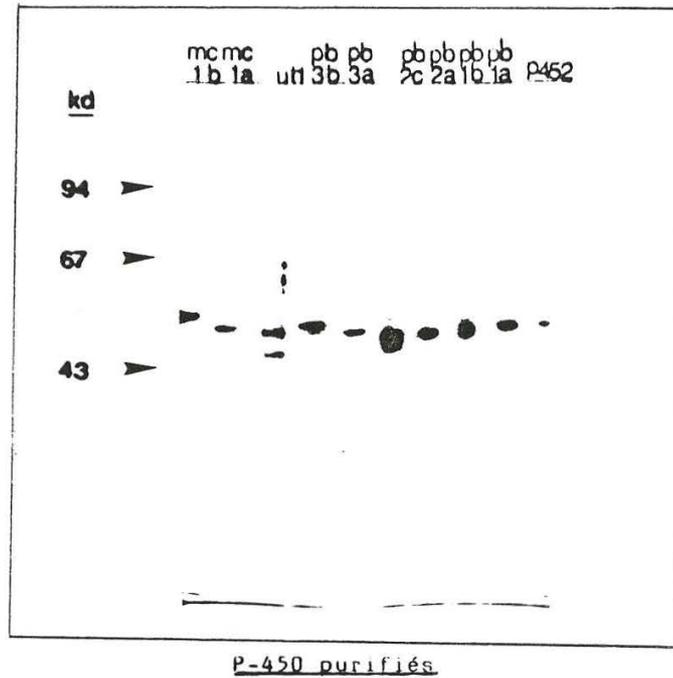
- La forme P-452 est comparable au cytochrome P-450 LA $\omega$  de Gonzalez et au cytochrome P-452 de Gibson.

Pour vérifier la pureté des différents cytochromes P-450 utilisés, une électrophorèse discontinue sur gel SDS polyacrylamide a été réalisée au laboratoire par Catherine Pons. Cette technique développée à l'origine par Laemmli (162) est particulièrement adaptée pour séparer, identifier et estimer l'homogénéité des différents cytochromes P-450 purifiés. La photographie du gel est présentée figure 33. Les formes PB 1a, PB 2a, PB 3a, MC 1a, MC 1b et P-452 sont pures et résolues en une seule bande. La forme PB 1b est contaminée par une trace de la forme PB 1a. La forme PB 3b est contaminée également par une trace de la forme PB 3a. La forme PB 2c est mal résolue. Une autre bande est visible en dessous de la bande caractéristique de la forme UT-1.

### III-C-3-c Mise au point de la technique de reconstitution

#### **III-C-3-c-1 Influence des lipides**

Durant la purification, l'environnement lipidique des cytochromes P-450 qui était celui des microsomes est changé en un environnement constitué de molécules de détergents. Les détergents sont éliminés à la fin de la purification par différents traitements (purification sur colonne d'hydroxyapatite, traitement sur gel de phosphate de calcium...) mais il est virtuellement impossible de les éliminer totalement. Afin d'obtenir une activité catalytique, la reconstitution d'un environnement lipidique est indispensable dans la quasi totalité des cas. Strobel et coll. ont montré que pour le transfert des électrons de la NADPH-cytochrome P-450 réductase au cytochrome P-450, les phospholipides étaient essentiels (163). La dilaurylphosphatidylcholine (chaîne à 12 carbones) fut identifiée plus tard comme le meilleur phospholipide (159).



**FIGURE 33.** Etude des cytochromes P-450 de foie de rats purifiés par électrophorèse.

Electrophorèse sur gel SDS/polyacrylamide 9 %. Dépôt à 0,25  $\mu$ g de chaque protéine purifiée. Coloration du gel au bleu de coomassie.

L'influence de la concentration en dilaurylphosphatidylcholine a été étudiée sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par la forme PB 2a.

La courbe obtenue est présentée figure 34. La vitesse de la réaction est maximale pour 0,05 mg lipides/0,1 nmole de P-450 et redescend à un plateau, au-delà de 0,1 mg lipides.

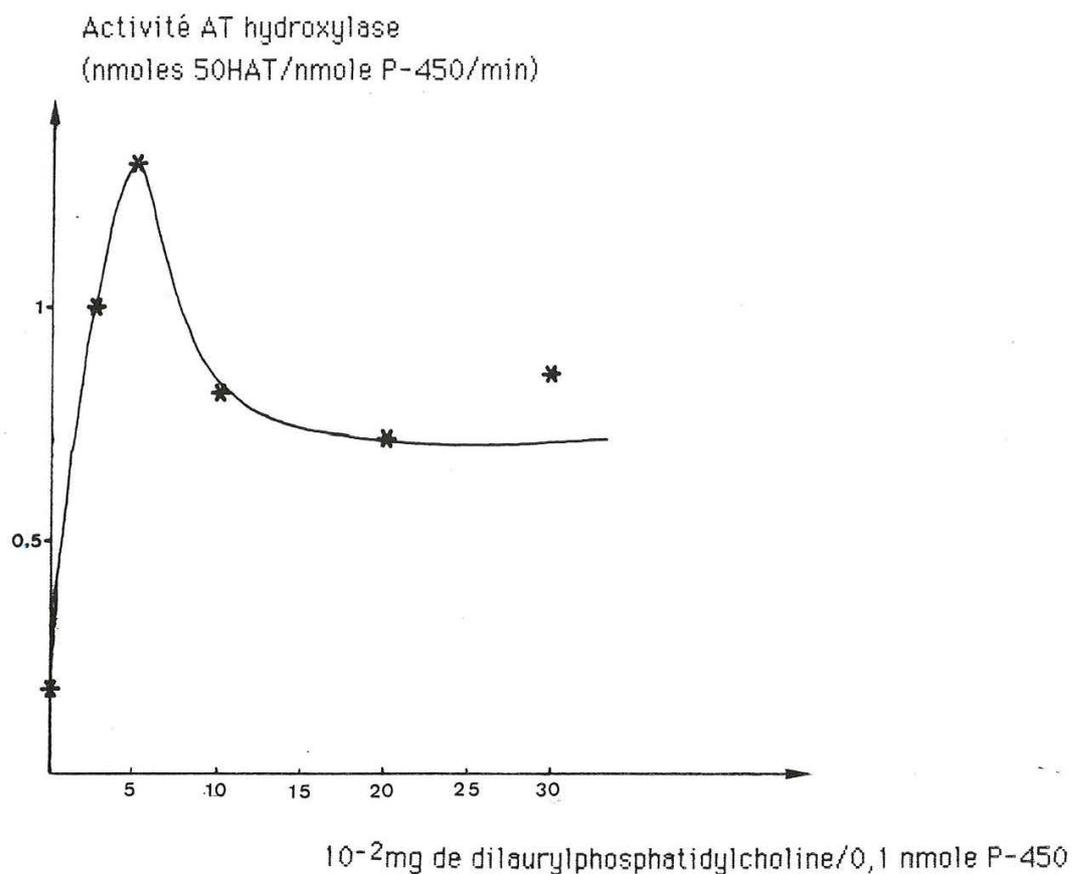
### III-C-3-c-2 Influence de la cytochrome P-450 réductase

L'effet de 3 types de réductases purifiées à partir de rats différemment traités a été étudié à 2 concentrations. Les résultats réunis dans le tableau 18 montrent que l'activité de la réductase 1 est maximale à 0,5 u/0,1 nmole de cytochrome P-450. Les 2 autres réductases utilisées ne permettent pas d'augmenter significativement la vitesse d'hydroxylation ainsi obtenue.

### III-C-3-d Hydroxylation de l'AT

L'activité de ces différentes isoenzymes sur l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique est résumée dans le tableau 19. Premier résultat marquant : le cytochrome P-452 ne catalyse pas l'hydroxylation de l'acide tiénilique. De même, la forme UT-1, les formes MC 1a et MC 1b et les 2 formes majeures induites par le phénobarbital PB 3a et PB 3b ne catalysent pas la réaction.

Seules les formes de la même sous-famille PB 1 et PB 2 présentent une activité. Parmi elles, la forme PB 2a catalyse de façon très efficace la réaction (1,76 nmole/nmole P-450/min). Les formes PB 1a, PB 1b et PB 2c hydroxylent l'AT également mais nettement moins efficacement (0,13 ; 0,25 ; 0,36 nmoles/nmole P-450/min). Par conséquent, parmi les cytochromes P-450 étudiés la forme majeure qui catalyse l'hydroxylation de l'acide tiénilique est la forme PB 2a. Les paramètres cinétiques ( $K_m$ ,  $V_m$ ) ont été déterminés (figure 35). La  $K_m$  obtenue est de 10  $\mu$ M et la  $V_m$  de 1,26 nmoles/nmole de P-450/min. L'affinité observée en système reconstitué est du même ordre que celle observée avec les microsomes de rats (Figure 35). La  $V_m$  est intermédiaire entre celle obtenue pour les microsomes de rats traités avec du clofibrate et celle de microsomes de rats non traités.



**FIGURE 34.** Influence de la concentration en lipides (dilaurylphosphatidylcholine) sur l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique  $10^{-4}M$  catalysée par le cytochrome P-450 2a purifié.

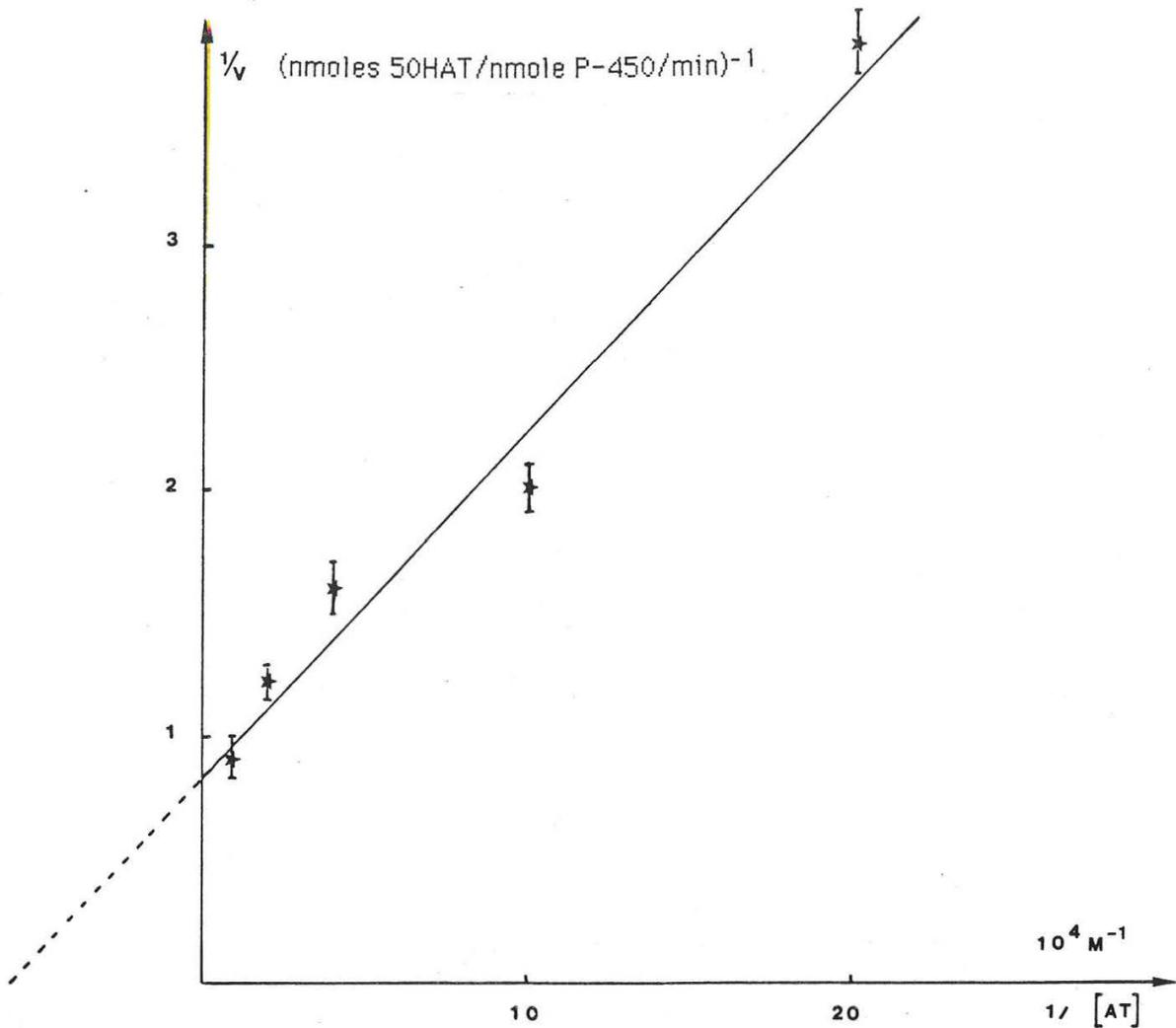
La reconstitution a été réalisée dans les conditions décrites en Y-F-2. (0,1 nmole P-450, 6  $\mu$ J réductase (1,1u) dans 600  $\mu$ l final). L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UV selon le protocole Y-D-2.

Chaque point est la moyenne de deux déterminations.

**Tableau 18. Influence de la cytochrome P-450 réductase sur l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique ( $10^{-4}M$ ) catalysée par la forme purifiée PB 2a.**

Réductase	P7 Red I V <sub>0</sub> 1D		P8 Red R <sub>2</sub>		P8 Red R <sub>1</sub>
$10^{-3}$ Unité réductase/ 0,1 nmole P-450	500	1000	500	1000	1000
% de l'activité	100	98,6	60	61	112

- La reconstitution est effectuée dans les conditions décrites en Y-F-2 (0,1 nmole P-450, 0,05 mg de dilaurylphosphatidylcholine dans un tampon tris HCl 50 mM pH 7,4 sous un volume de 300 $\mu$ l par cuve, AT  $10^{-4}M$ ).
- L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY décrite en Y-D-2.
- Ces chiffres sont la moyenne de 2 mesures.
- 100 % = 1,4 nmole 5OHAT/nmole P-450/min.



**FIGURE 35.** Calcul des  $K_m$  et  $V_m$  pour l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par le cytochrome P-450 PB 2a purifié.

La reconstitution a été réalisée avec 0,1 nmole P-450, 6  $\mu\text{l}$  de cytochrome P-450 réductase (1,15u) et 0,05 mg de lipides par essai de 300  $\mu\text{l}$  selon le protocole décrit en Y-F-2.

L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY dans les conditions décrites en Y-D-2. Chaque point est la moyenne de 2 déterminations. Les barres représentent l'écart entre les deux valeurs extrêmes.

Tableau 19. Activité des cytochromes P-450 purifiés de foie de rat sur l'hydroxylation de l'AT ( $10^{-4}M$ ) et sur l'hydroxylation en 11 et 12 de l'acide laurique ( $10^{-4}M$ ).

P-450	Acide tiénilique hydroxylase nmoles/nmole P-450/min	Acide laurique hydroxylase		
		§ 11	§ 12	Conversion 11 + 12 nmoles/nmole P-450/min.
PB 1a	0,13 ± 0,01	30,2	69,8	1
PB 1b	0,25 ± 0,03	39,2	60,8	1
PB 2a	1,76 ± 0,5 (1)	60	40	7
PB 2c	0,36 ± 0,03	34,5	65,5	2
PB 3a	< 0,01	36,0	64,0	1
PB 3b	< 0,01	38,7	61,3	0,9
MC 1a	< 0,01	46,2	53,8	1,5
MC 1b	< 0,01	25,4	74,6	1,3
UT 1	< 0,01	44,1	55,9	0,8
P-452	< 0,01	6,8	93,2	35

- La reconstitution est effectuée en présence de 0,05 mg de dilaurylphosphatidylcholine, 6 µl de réductase (1,1u) et 0,1 nmole de P-450 dans un volume final de 300 µl de tampon tris HCl 50mM pH 7,4. L'incubation a lieu à 37°C en présence d'une concentration initiale de  $10^{-4}M$  en AT et en AL (conditions décrites en Y-F-2).

- Ces chiffres sont la moyenne de 4 déterminations sauf dans le cas (1) qui est la moyenne de 6 déterminations. Les erreurs représentent l'écart type.

- L'activité AT hydroxylase est mesurée selon la méthode décrite en Y-D-2.

- L'activité AL hydroxylase est mesurée selon la méthode décrite en Y-D-4.

### III-C-3-e Hydroxylation de l'acide laurique

L'hydroxylation de l'acide laurique par les mêmes cytochromes P-450 a été mesurée au laboratoire par Jean-Luc Boucher. Les résultats présentés dans le tableau 19 mettent en évidence chez tous les cytochromes P-450 une activité basale pour cette réaction (aux environs de 1 nmole d'acide hydroxy-11 et hydroxy-12 laurique formée/nmole P-450/min). Comme prévu, le cytochrome P-452 catalyse avec une forte activité et très sélectivement (93 %) l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique. Enfin, il apparaît clairement que la forme PB 2a est également capable de prendre en charge l'hydroxylation de l'acide laurique. L'activité est environ 5 fois plus faible que dans le cas du cytochrome P-452 mais est 5 fois supérieure à celle obtenue avec les autres cytochromes P-450. L'oxydation de l'acide laurique en position 11 et 12 par la forme PB 2a n'a jamais été décrite auparavant dans la littérature. La formation de 5OHAT catalysée par la forme PB 2a a été étudiée en présence d'acide laurique, ajouté de façon compétitive à l'acide tiénilique (tableau 20). A concentration  $10^{-4}M$  en AT et  $10^{-5}M$  en AL, la réaction d'hydroxylation de l'AT est inhibée à 50 %. La forme PB 2a semble donc hydroxyler les deux substrats.

A ce stade, une conclusion partielle peut être tirée :

- la forme PB 2a hydroxyle, et de façon majoritaire, l'AT
- Cette isoenzyme semble capable également de contribuer à l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique.
- Enfin, le cytochrome P-452 catalyse spécifiquement l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique et ne participe en rien à l'hydroxylation de l'acide tiénilique.

Ces données ne permettent pas de conclure définitivement quant à l'hydroxylation de l'AT dans les microsomes hépatiques de rats. Nous avons donc étudié les activités observées sur les microsomes différemment induits en présence d'anticorps spécifiques de différents cytochromes P-450.

**Tableau 20. Inhibition par l'acide laurique de l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique catalysée par le cytochrome P-450 purifié PB 2a de foies de rats.**

	AT=10 <sup>-4</sup> M AL=0	AT=10 <sup>-4</sup> M AL=10 <sup>-5</sup> M	AT=10 <sup>-4</sup> M AL=10 <sup>-5</sup> M
Activité AT hydroxylase	100 %	80 %	50 %

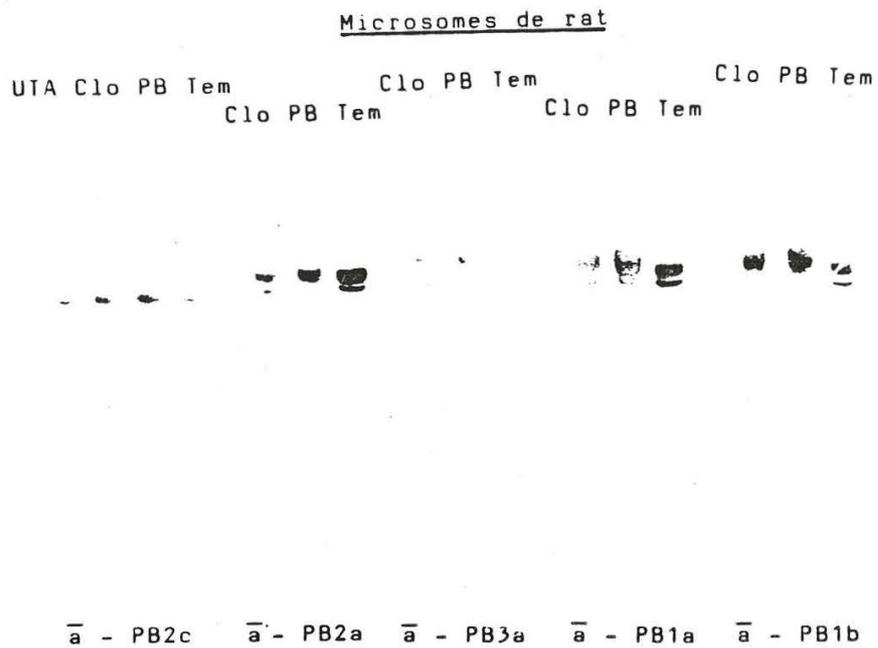
- La reconstitution est réalisée dans les conditions de la figure 35.
- L'activité basale (100 %) est de 1,3 nmole de 5OHAT/nmole P-450/min.
- L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY décrite en Y-D-2 et en Y-E-1-C. Ces pourcentages sont la moyenne de 2 déterminations.

### III-C-4 Effet d'AC anti-cytochrome P-450 spécifiques sur l'activité AT hydroxylase microsomale de rats

#### - Définition des AC

Les AC ont été obtenus par R. Wolf après injection à des lapins des cytochromes P-450 purifiés. Les AC dirigés contre les formes PB 1a, PB 1b, PB 2c, PB 3a sont sous forme de sérum. Les AC anti-PB 2a sont sous forme d'IgG. Leur spécificité a été testée au laboratoire par Catherine Pons, par immuno-transfert sur les microsomes de foies de rats non traités et traités par le PB ou le clofibrate. La technique d'immuno-transfert comporte une séparation des protéines microsomales par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, puis un transfert de ces protéines sur une feuille de nitrocellulose. Les anticorps (IgG) sont ajoutés. La reconnaissance protéine-anticorps est révélée par addition d'un anti-IgG couplé à une peroxydase qui catalyse une réaction colorée utilisant l' amino benzidine. Les immuno-transferts des protéines hépatiques microsomales de rats traités par le clofibrate ou le phénobarbital et de rats non traités (témoins) sont présentés figure 36. Ils doivent être examinés en tenant compte des reconnaissances croisées existant entre les cytochromes P-450 et les anticorps explicités d'après les travaux de R. Wolf (tableau 21)(137). Ainsi, les anti-PB 2a semblent reconnaître, en dehors de la forme PB 2a, une autre forme, et ceci particulièrement dans les microsomes de rats témoins. Les anti-PB 3a ont une bonne spécificité et ne reconnaissent aucune bande chez les animaux témoins. Les anti-PB 2c ont également une bonne spécificité. Les anti-PB 1a et anti-PB 1b sont moins spécifiques et donnent une bande relativement diffuse.

De plus, un AC bien que spécifique d'une forme de P-450 peut se révéler plus ou moins actif pour inhiber l'activité catalytique. Cela peut être le cas, notamment si la reconnaissance antigène anticorps n'implique pas le site catalytique de l'enzyme. Ainsi nous avons pu constater que les anticorps anti-PB 2a bien que reconnaissant parfaitement la forme purifiée PB 2a en immuno-empreinte étaient faiblement inhibiteurs de la réaction d'hydroxylation de l'AT catalysée en système reconstitué par la forme PB 2a.



**FIGURE 36.** Immuno-transferts de microsomes hépatiques de rats traités au clofibrate ou au phénobarbital et non traités avec révélation par les AC anti-PB (PB 2c, PB 2a, PB 3a, PB 1a et PB 1b).

Les inductions ont été réalisées selon le protocole décrit en Y-C-1. Electrophorèse sur gel SDS/polyscrilamide 9 %. Dépôt de 4 µg de chaque fraction microsomale hépatique. Transfert sur nitrocellulose et immunorévélation par différents AC anti-cytochromes P-450 utilisés à la dilution 1/1000°.

**Tableau 21.** Réactivité des anticorps anti-cytochromes P-450 de foie de rats avec les cytochromes P-450 purifiés de foie de rats.

Anticorps anti- Enzyme	PB 1a	PB 1b	Pb 2a	Pb 2c	PB 3a
PB 1a	++++	+++	++	-	(+)
PB 1b	+++	++++	+	-	(+)
PB 2a	++	++	++++	++	(+)
PB 2c	(+)	(+)	+++	++++	(+)
PB 3a	(+)	(+)	+	+	++++

D'après (137) + réactivité très faible ; ++++ très forte réactivité ;  
- aucune réactivité détectable.

- Action des AC sur l'activité AT hydroxylase

. En raison de la faible activité inhibitrice des anticorps anti-PB 2a dont nous disposons, la réaction d'hydroxylation de l'AT a été étudiée en présence d'immunoglobuline purifiée jusqu'à la concentration de 20 mg de protéine par nmole de P-450. Des concentrations identiques en IgG ont déjà été utilisées dans la littérature notamment par Gibson (108) pour inhiber l'hydroxylation en 12 de l'AL par les anticorps dirigés contre le cytochrome P-452. La courbe présentée figure 37 montre que à 20 mg de protéines/nmole de P-450, 60 % de l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes de foie de rats traités par le clofibrate est inhibée. Les IgG préimmunes utilisées à la même concentration, ne modifient pas significativement la réaction.

. Les AC dirigés contre les 2 formes induites de façon minoritaire par le phénobarbital, anti-PB 1a et anti-PB 1b, et contre les formes PB 2c et PB 3a ont été testés sur l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes de foies de rats non traités et traités par le PB et le clofibrate. Les résultats présentés tableau 22 montrent que :

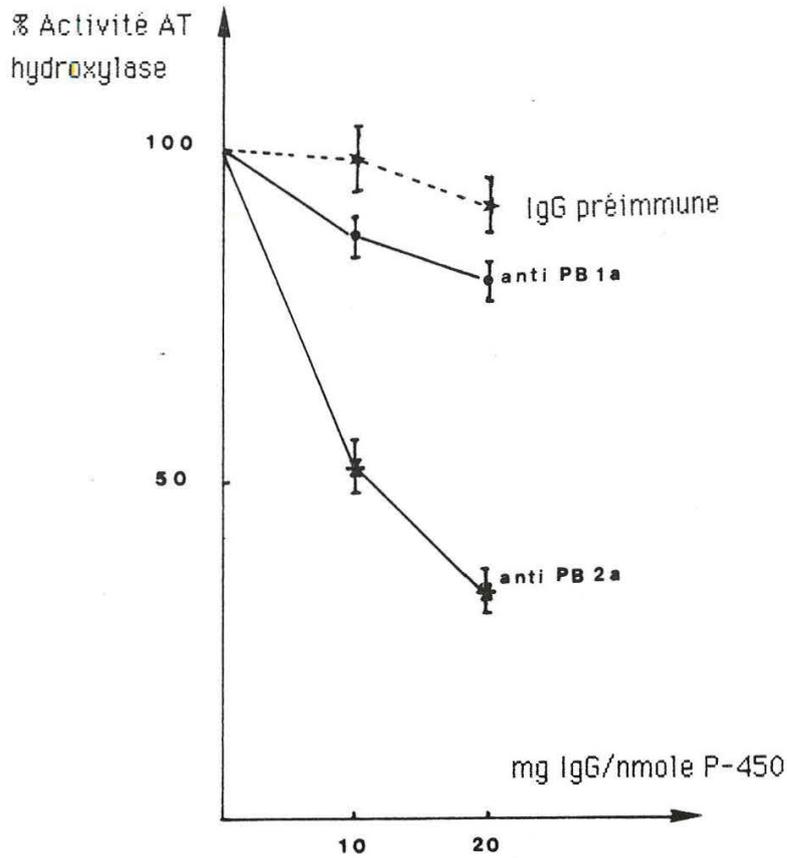
- dans les trois types de microsomes, les anticorps dirigés contre les cytochromes PB 1a, PB 2c, PB 3a n'inhibent pas l'hydroxylation de l'AT

- les anticorps dirigés contre la forme PB 1b ont une action différente selon le type de microsomes utilisés. Ils ne modifient pas la réaction catalysée par les microsomes de rats traités par le clofibrate. Mais ils inhibent la réaction dans le cas des microsomes de rats non traités (40 %) et, plus fortement, dans le cas des microsomes de rats induits par le PB (70 %). Dans ces deux derniers cas, les courbes d'inhibition sont présentées figures 38.

Il ressort clairement de ces études que l'hydroxylation de l'AT est catalysée par au moins 2 cytochromes P-450.

- la forme PB1b intervient dans la formation du 5OHAT particulièrement dans les microsomes traités par le PB

- la forme PB 2a est principalement responsable de cette réaction dans les microsomes de rats non traités. Elle participe également à la réaction dans les microsomes de rats traités par le clofibrate.



**FIGURE 37.** Effet des anticorps anti-PB 2a et des IgG préimmunes sur l'hydroxylation en 5 de l'AT  $10^{-4}M$  catalysée par les microsomes de rats traités par le clofibrate.

L'activité AT hydroxylase a été mesurée en présence des anticorps et des IgG préimmunes (Y-E-2-C) selon la méthode UY décrite en Y-D-2. Les microsomes proviennent de rats traités par le clofibrate (Y-C-2). (1,6 nmole P-450/mg protéine ; 0,16 nmole P-450/ml). 100 % = 2,05 nmoles 5OHAT/nmole P-450/min. Chaque point est la moyenne de 2 déterminations.

Tableau 22. Effet des anticorps anti-cytochromes P-450 purifiés de foies de rats sur l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par PB et CLO (exprimée en pourcentage de l'activité obtenue en l'absence d'AC).

	Induction	sérum CONT (1)	anti- PB 1a	anti- PB 1b	anti- PB 2c	anti- PB 3a
AT	sans	90	76	60	86	84
	PB	98	83	27	87	82
hydroxylase	CLO	107	111	92	100	93

(1) Comme sérum contrôle, le sérum préimmun de lapin a été utilisé.

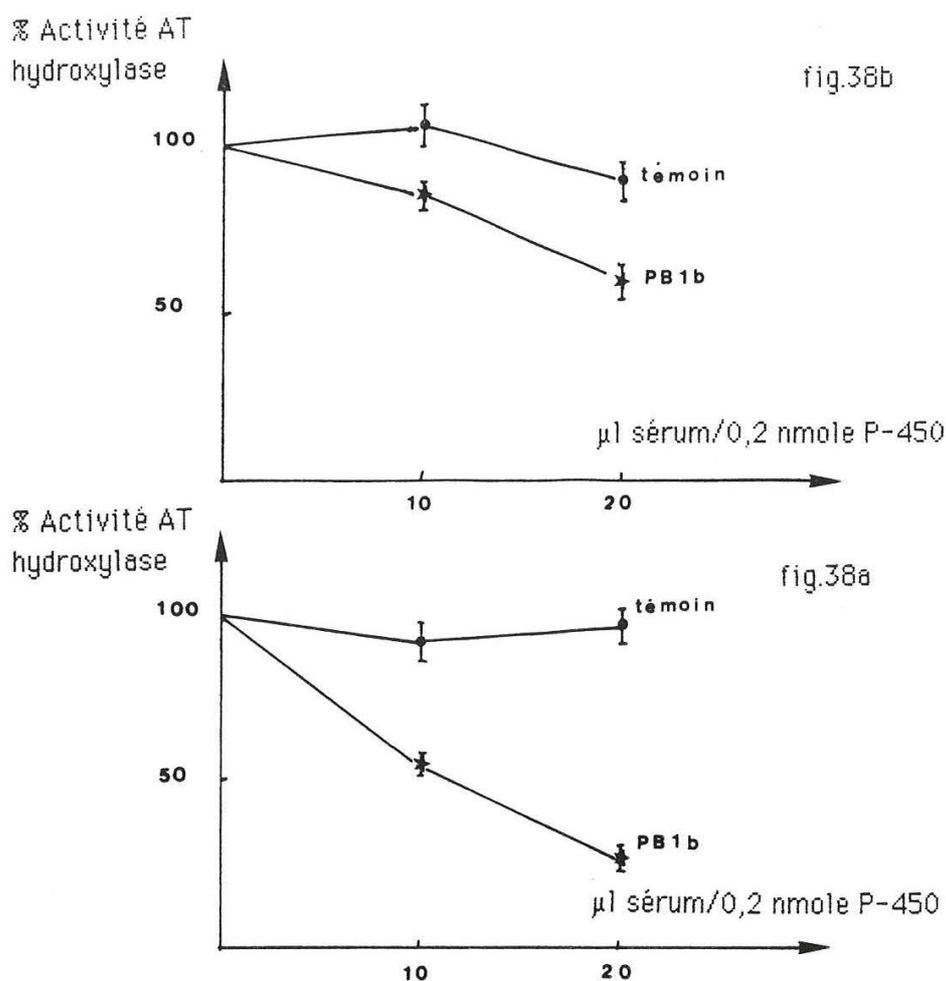
- Le traitement des rats a été réalisé dans les conditions décrites en Y-C-1 (PB 0,1 % 5j p.o. dans l'eau ; CLO 500 mg/kg/j 4j dans l'huile de maïs i.p.). Microsomes PB : 2,1 nmoles P-450/mg Protéine ; microsomes CLO : 1,6 nmoles P-450/mg protéine ; microsomes témoins : 0,9 nmoles P-450/mg Protéine.

- L'inhibition par les AC est réalisée dans les conditions décrites en Y-E-2-C (préincubation des P-450 et des sérums 20 mn à 5°C, 20 µl sérum/0,2 nmole P-450)

- L'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UY (cf. Y-D-2) (0,1 nmole P-450/essai (300 µl) dans le cas des microsomes CLO) ; (0,2 nmole P-450/essai (300 µl) dans le cas des microsomes PB ou CONT) ; AT  $10^{-4}$ M.

- Chaque valeur est la moyenne de 2 à 4 déterminations.

- 100 % = 0,95 (non traité), 0,6 (PB), 2,3 (CLO) nmoles 5OHAT/nmoles P-450/min.



**FIGURE 38.** Action des sérums contenant des anticorps anti-PB 1b sur l'activité AT hydroxylase (AT  $10^{-4}M$ ) des microsomes hépatiques de rats non traités (figure 38a) et traités par le phénobarbital (figure 38b).

L'activité AT hydroxylase a été mesurée en présence des sérums anti-PB 1b ou de sérums témoins (Y-E-2-C) selon la méthode UV décrite en Y-D-2. Les microsomes proviennent de rats traités par le CLO ou le PB selon Y-C-2 (cf. tableau 22). 100 % = 0,95 (fig.38a) 0,6 (fig.38b) nmoles 50HAT/nmole P-450/min. Chaque point est la moyenne de 2 déterminations et dans le cas des anti-PB 1b sur microsomes PB de 3 déterminations.

### III-C-5 Effet d'AC anti-LKM<sub>2</sub> sur l'activité AT hydroxylase microsomale de rat et d'homme

La connaissance des cytochromes P-450 chez le rat trouve sa pleine justification quand celle-ci peut être reliée à celle des cytochromes P-450 humains. En effet, malgré des différences dans la régulation, le séquençage des aminoacides et l'utilisation de sonde d'ADN ont montré que certaines formes de cytochromes P-450 sont très similaires d'une espèce à l'autre.

Des microsomes hépatiques provenant de foies humains ont été analysés par transfert selon Western par R. Wolf en utilisant des AC dirigés notamment contre les membres des sous-familles de cytochromes P-450, P-450 I et P-450 IIC. Ainsi des AC dirigés contre les cytochromes hépatiques de rat de la sous-famille P-450 I (nomenclature recommandée) reconnaissent une protéine dans tous les foies humains avec des variations inter-individuelles d'un facteur 10. Ces variations sont corrélées au métabolisme de l'éthoxy-7 résorufine. Les anticorps dirigés contre les cytochromes hépatiques de rat de la sous-famille IIC reconnaissent dans les microsomes hépatiques humains 3 protéines de poids moléculaires respectifs 53,7 ; 51,2 et 50,0 KD. La variation du niveau d'expression de la protéine de 51,2 KD est corrélée à l'hydroxylation en 4 de la [S]méphénytoïne. De plus les sérums contenant des AC dirigés contre les cytochromes P-450 de la sous-famille IIC inhibent la production de ce métabolite (164).

Les anti-LKM<sub>2</sub> sont des anticorps trouvés dans le sérum de patients traités à l'AT et faisant une hépatite auto-immune. Il a été montré au laboratoire que ces anticorps sont dirigés contre un cytochrome P-450 humain, le cytochrome P-450-8 et inhibent l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes humains (2). Patrick Dansette de l'UA 400 a montré que ces anticorps inhibaient également l'hydroxylation de la méphénytoïne catalysée par les microsomes humains (165). Le cytochrome P-450 qui catalyse l'hydroxylation de la méphénytoïne, le P-450 MEPH, a été purifié et caractérisé par Gut et coll (166) puis sous 2 formes similaires MP-1 et MP-2 par Shimada et coll. (167). L'antigène de l'anti-LKM<sub>2</sub>, la forme MP (MP-1 et MP-2) comme le P-450 8 pourrait faire partie de la même sous-famille ou être identique.

Précédemment, nous avons pu établir qu'une forme PB 1, la forme PB 1b, participe de façon importante à l'hydroxylation de l'AT dans les microsomes de rats traités par le phénobarbital.

Or différentes études réalisées par R. Wolf tendent à prouver que la sous-famille PB 1 serait reliée à la forme qui métabolise la méphénytoïne chez l'homme (164). En étudiant l'effet des anti-LKM<sub>2</sub> sur l'hydroxylation de l'AT par les microsomes humains et les microsomes de rat, notre but est d'apporter des éléments pour associer au moins partiellement la famille PB 1 au métabolisme de l'AT.

#### III-C-5-a Inhibition de l'activité AT hydroxylase des microsomes hépatiques humains par les anti-LKM<sub>2</sub>

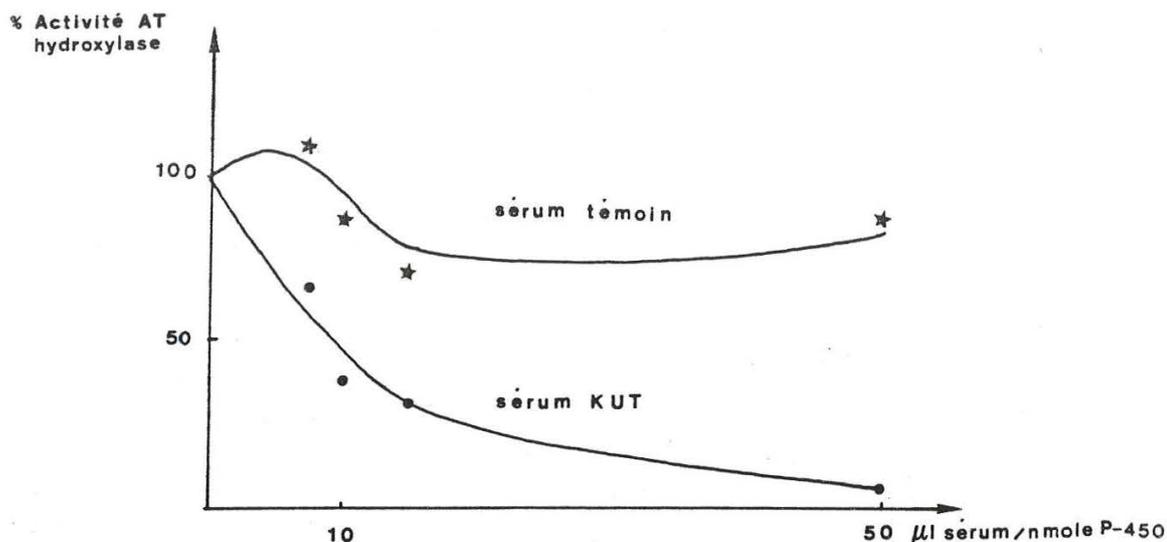
L'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes de foies humains H97 a été étudiée en présence de sérum KUT contenant des anti-LKM<sub>2</sub> et de sérum humain témoin.

La courbe présentée figure 39 montre que le sérum contenant les anti-LKM<sub>2</sub> à 60 µl/nmole de P-450 inhibe complètement la réaction. Ce résultat est similaire à ceux obtenus avec les différents sérums contenant des anti-LKM<sub>2</sub> testés au laboratoire (2).

#### III-C-5-b Effet des sérums humains contenant des anti-LKM<sub>2</sub> sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats

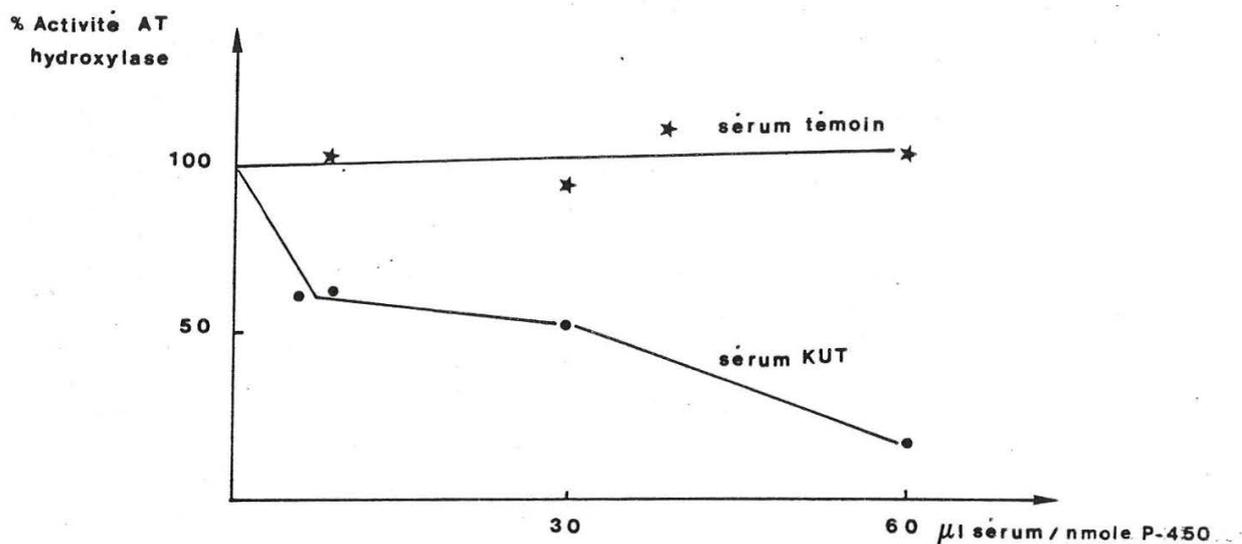
Les anti-LKM<sub>2</sub> présents dans le sérum de 3 patients ont été testés sur l'hydroxylation de l'AT catalysée d'une part par les microsomes de foies de rats non traités ou traités par le phénobarbital et le clofibrate et, d'autre part, par la forme purifiée de cytochrome PB 2a.

Les résultats présentés dans le tableau 23 apportent 2 informations. Tout d'abord, aucune inhibition significative n'est observée quel que soit le sérum utilisé dans le cas de l'hydroxylation catalysée par les microsomes CLO, témoin ou par la forme PB 2a, ceci bien que la forme PB 2a soit reconnue en immuno-transfert par les anti-LKM<sub>2</sub> (168). Par contre, l'inhibition de l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes de rats traités par le phénobarbital est importante, de l'ordre de 70 à 90 % selon les sérums testés (figure 40).



**FIGURE 39.** Action du sérum humain KUT (contenant des anti-LKM<sub>2</sub>) sur l'activité acide tiénilique hydroxylase (AT 10<sup>-4</sup>M) des microsomes humains (Hg<sub>7</sub>).

L'activité AT hydroxylase a été mesurée en présence de sérums humains témoins ou KUT (contenant des anti LKM<sub>2</sub>) (Y-E-2-C) selon la méthode UV décrite en Y-D-2 (0,2 nmole P-450/ml ; 0,66 nmole P-450/mg protéine).  
100 % = 0,3 nmole 5OHAT/nmole P-450/min. Chaque point représente une détermination.



**FIGURE 40.** Action du sérum humain KUT (contenant des anti-LKM<sub>2</sub>) sur l'activité acide tiénilique hydroxylase (AT 10<sup>-4</sup>M) des microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital.

L'activité AT hydroxylase a été mesurée en présence de sérums humains témoins ou KUT (Y-E-2-C) selon la méthode UV décrite en Y-D-2 sur des microsomes hépatiques de rats traités par le phénobarbital selon Y-C-1 (2,0 nmole P-450/mg protéine ; 0,5 nmole P-450/ml). 100 % = 0,6 nmole 5OHAT/nmole P-450/min. Chaque point représente une détermination.

Tableau 23. Effet des sérums humains contenant des anti-LKM<sub>2</sub> sur l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes hépatiques de rats (non traités, traités par le phénobarbital et le clofibrate) et par la forme purifiée de cytochrome P-450 de foie de rat PB 2a (60 µl sérum/nmole P-450).

	mic témoin	mic PB	mic CLO	P-450 purifié PB 2a (1)
sérum témoin	119	95	110	81
Jor	109	33	80	86
Tay	107	26	103	82,6
Kut	80	13	100	68

- le traitement des rats est celui décrit en V-C-1.
- les sérums témoins ou contenant les anti-LKM<sub>2</sub> sont incubés 20 min à 5°C avec les microsomes puis l'activité AT hydroxylase est mesurée par la méthode UV décrite en V-D-2 (0,5 à 1 nmole P-450/ml). Dans le cas (1) la reconstitution est réalisée selon la méthode décrite en V-F-2 (conditions tableau 19).
- Chaque valeur est la moyenne d'au moins 2 mesures.
- L'activité basale (100 %, sans sérum contenant les anti-LKM<sub>2</sub>) est de :
  - 0,95 nmoles 5OHAT/mg protéine/min dans le cas de rats non traités (0,9 nmole P-450/mg protéine)
  - 1,2 nmoles 5OHAT/mg protéine/min dans le cas de rats PB (2,2 nmoles P-450/mg protéine)
  - 3,2 nmoles 5OHAT/mg protéine/min dans le cas de rats CLO (1,5 nmoles P-450/mg protéine)
  - 2,1 nmoles 5OHAT/nmole P-450/min dans le cas du P-450 PB 2a.

Par conséquent, les anti-LKM<sub>2</sub> inhibent la réaction catalysée par les microsomes induits au PB. Ils sont pratiquement sans effet sur la réaction catalysée par les microsomes clofibrate comme par la forme PB 2a.

Cette étude va dans le sens d'une analogie entre le cytochrome P-450 qui catalyse l'hydroxylation de l'AT chez l'homme et le cytochrome PB 1b qui catalyse l'hydroxylation chez le rat traité par le phénobarbital.

Toutefois le fait que, d'une espèce à l'autre, certains cytochromes puissent être reliés immunologiquement n'implique pas qu'ils aient la même spécificité de substrat. Nous en citerons 2 exemples. Le premier concerne le cytochrome humain HLx caractérisé par Wrighton. La forme HLx est reliée à la forme LM<sub>1</sub> du lapin qui catalyse l'hydroxylation de la progestérone. Or les microsomes humains, ou la forme HLx reconstituée, ne catalysent pas cette activité (169). Second exemple, comme nous l'avons vu en I-B-2, c'est la forme PCNE qui chez le rat hydroxyle majoritairement la méphénytoïne et non la forme donnée comme homologue du P-450 MEPH chez le rat, P-450 UTI. Toutefois la forme PB 2a est également susceptible de catalyser cette hydroxylation (170). Chez l'homme, la méphénytoïne et l'AT sont métabolisés par des enzymes proches voire identiques (P-450 MEPH, P-450 8). Chez le rat, la forme PB 2a qui n'est pas immunologiquement la plus proche de ces formes humaines est toutefois capable de prendre en charge ces 2 substrats. Nous avons, par l'intermédiaire des anti-LKM<sub>2</sub>, confirmé l'existence de relations immunologiques entre le P-450 8 humain et la forme majoritairement responsable du métabolisme de l'AT chez le rat PB, la forme PB 1b.

D'après les résultats obtenus sur les microsomes entiers :

1/ L'activité AT hydroxylase est très fortement induite après traitement des rats par le clofibrate et d'une manière générale par les inducteurs "type clofibrate". Ces derniers, de structure différente du clofibrate, sont connus pour induire l'acide laurique-12 hydroxylase et pour déclencher une prolifération des peroxysomes. Ceci se traduit par une  $V_m$  multipliée par jusqu'à 5 et une  $K_m$  apparente légèrement diminuée (8  $\mu M$  au lieu de 15  $\mu M$ ).

Par contre, l'induction par le PB, le 3MC, la PCN ... n'ont que très peu d'effet sur l'AT hydroxylase.

2/ L'AT hydroxylase, première activité vis-à-vis d'un composé exogène à être aussi fortement induite par les inducteurs type clofibrate ne semble pas nettement corrélée avec l'activité acide laurique hydroxylase qui est l'activité classique la plus fortement induite par les composés type clofibrate.

Il n'existe pas de relation linéaire entre l'acide laurique 11 hydroxylase et l'AT hydroxylase dans les microsomes de rats traités par des inducteurs classiques (sauf dans le cas des microsomes induits au phénobarbital).

Il n'existe pas de relation linéaire entre l'hydroxylation en 12 de l'AL et l'hydroxylation de l'AT (sauf peut être dans le cas des microsomes induits au clofibrate).

Il existe un effet inhibiteur de l'AL sur l'activité AT hydroxylase mais un faible effet inhibiteur de l'AT sur l'AL hydroxylase.

D'après les résultats obtenus sur les cytochromes P-450 purifiés :

1/ Le cytochrome P-452 ne catalyse pas l'hydroxylation de l'AT. L'acide laurique 12 hydroxylase et l'AT hydroxylase sont des activités dissociées.

2/ Seuls sont actifs les cytochromes P-450 de la famille PB 1 et PB 2. C'est surtout la forme PB 2a, forme constitutive qui représente presque 50 % du total des cytochromes P-450 des rats témoins, qui hydroxyle majoritairement l'AT. Ce cytochrome P-450 PB 2a est également impliqué dans l'hydroxylation de l'acide laurique. Ceci explique les effets partiels d'inhibition de l'activité AT hydroxylase par l'acide laurique.

D'après l'utilisation des anticorps anti-cytochromes P-450 :

1/ Seuls les anti-PB 1b sont actifs pour inhiber l'activité AT hydroxylase et surtout chez les microsomes de rats induits au PB.

- La forme PB 1b catalyse donc de façon importante l'activité AT hydroxylase des microsomes induits au PB.

- La forme PB 1b est un peu ( $\approx 30\%$ ) impliquée dans l'activité AT hydroxylase des microsomes témoins.

- La forme PB 1b n'est pas impliquée significativement dans l'activité AT hydroxylase des microsomes CLQ.

2/ Les anti-PB 2a inhibent l'hydroxylation en 5 de l'AT catalysée par les microsomes induits au CLO (mais faiblement).

En conclusion :

L'activité AT hydroxylase dépend :

- . de la forme PB 2a qui joue un rôle majeur dans les microsomes témoins
- . de la forme PB 1b qui joue un rôle majeur dans les microsomes PB
- . des formes PB 1a et PB 2c mais avec des activités beaucoup plus faibles
- . d'un autre cytochrome P-450 non connu pour l'instant, induit par le CLO et qui n'est pas le cytochrome P-452. Ce cytochrome P-450 jouerait un rôle majeur dans l'activité AT hydroxylase des microsomes CLO.

En partant de cette conclusion on explique d'une part l'effet des inducteurs. Les microsomes de rats témoins présentent une activité AT hydroxylase importante. En effet, la forme PB 2a représente 50 % du total des cytochromes P-450.

. Chez les rats traités par le PB, la forme PB 1b augmente mais la forme PB 2a est fortement réprimée. L'activité AT hydroxylase est donc globalement peu modifiée.

. Chez les rats traités par le PCN ou la  $\beta$ NF, la forme PB 1b est diminuée et la forme PB 2a fortement réprimée. L'activité AT hydroxylase baisse donc.

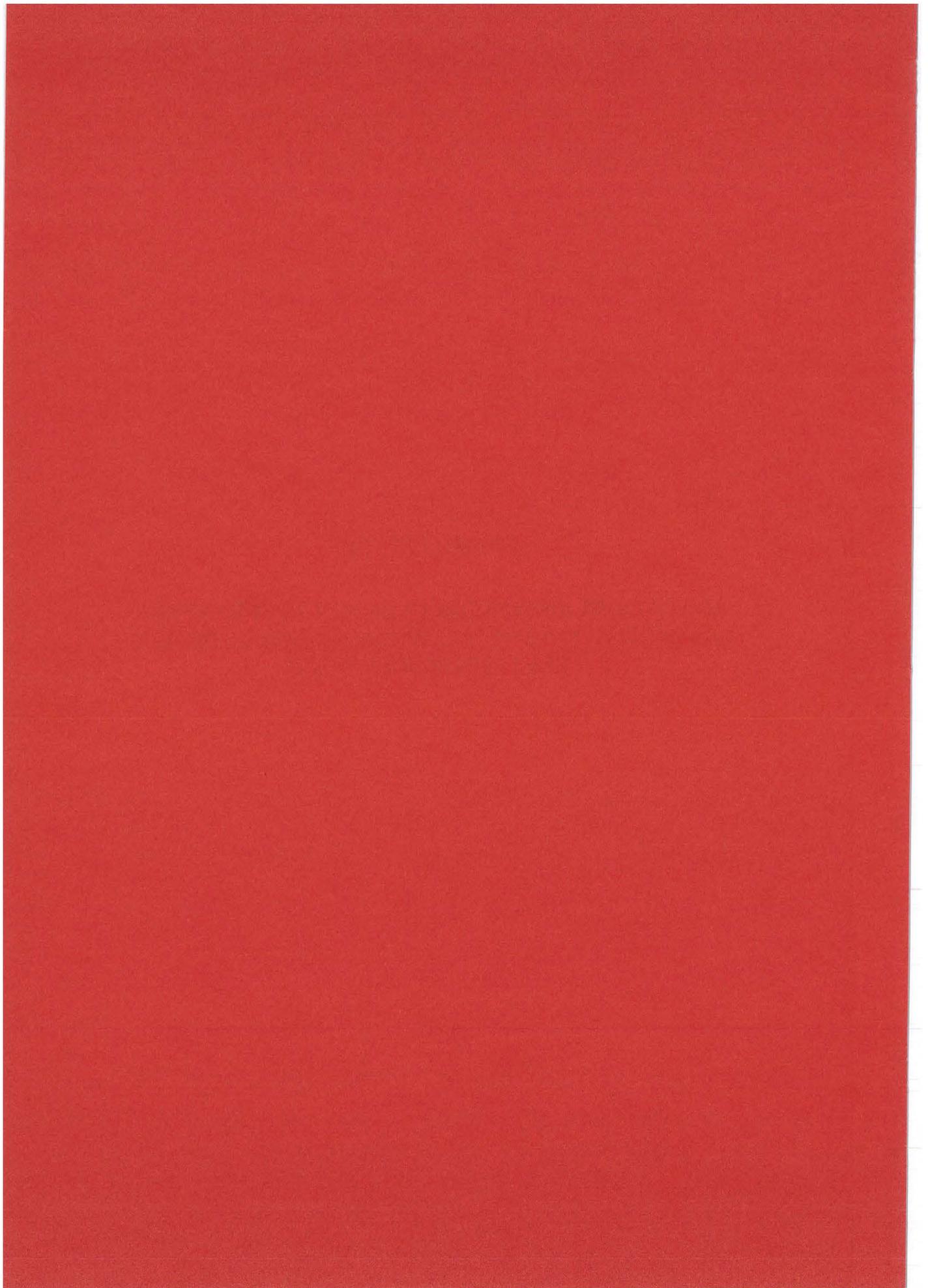
. Chez les rats traités par le clofibrate, il se produit une augmentation très forte d'un cytochrome P-450 impliqué dans le métabolisme de l'AT et différent du cytochrome P-452. L'activité AT hydroxylase est donc fortement augmentée.

D'autre part, cette conclusion permet d'expliquer les résultats obtenus lors de la corrélation des activités AT et AL hydroxylases.

Ces deux activités sont dépendantes de la forme PB 2a. Ceci explique la corrélation grossière obtenue. Mais après induction au CLO, ces deux activités dépendent d'enzymes différentes (cytochromes P-452 et X, une forme qui n'a pas pu être identifiée avec le matériel dont nous disposons). Il est possible qu'après induction au phénobarbital, les deux activités dépendent également d'enzymes différentes.

## CHAPITRE IV

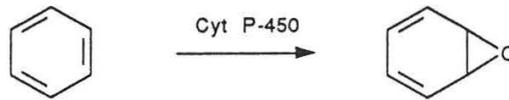
OXYDATIONS BIOMIMETIQUES DE DIVERS THIOPHENES  
PAR DES SYSTEMES METALLOPORPHYRINIQUES MODELES  
DES CYTOCHROMES P-450



## IV-A- INTRODUCTION

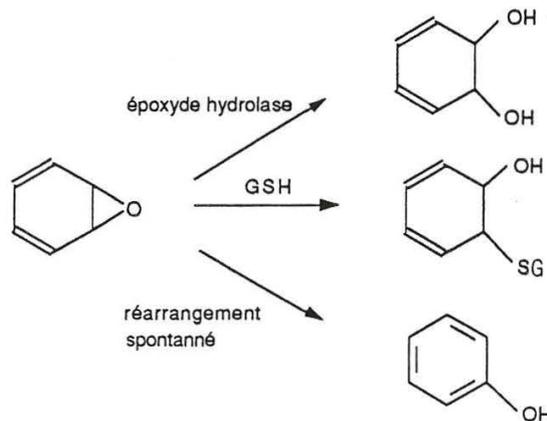
IV-A-1 Oxydation des noyaux aromatiques par le cytochrome P-450

Les noyaux aromatiques sont métabolisés par le système des monooxygénases à cytochrome P-450 en époxydes d'arènes (171).

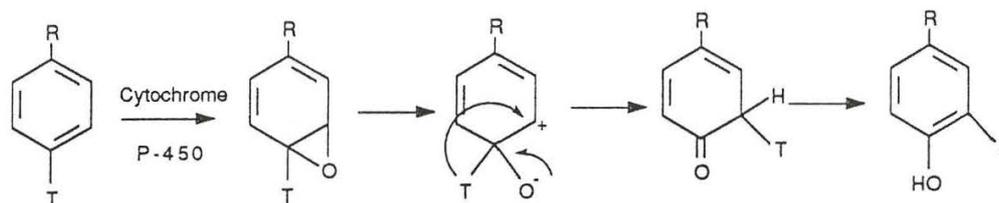


Ces molécules, très électrophiles, sont susceptibles de réagir avec les nucléophiles cellulaires (protéines, acides nucléiques (172)). Toutefois, deux systèmes sont capables de détoxifier ces époxydes :

- le système enzymatique des époxydes hydrolases, par formation d'un diol
- le glutathion qui réagit par sa fonction thiol pour former un adduit.
- enfin, l'époxyde formé peut se transformer en phénol par réarrangement interne.



Ce dernier réarrangement peut se faire par migration 1-2 de l'hydrogène de la position à hydroxyler et est connu sous le nom de NIH shift (173).



Dans le cas du noyau thiophène, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, plusieurs voies métaboliques ont été mises en évidence :

- le thiophène lui-même est vraisemblablement hydroxylé via un époxyde 2-3 (I-D-1)
- les thiophènes substitués en position 2 par des groupements aroyles sont hydroxylés en position 5 (I-D-3)
- le dibenzothiophène et le benzo[b]thiophène sont oxydés en sulfoxyde et en sulfone (I-D-3)

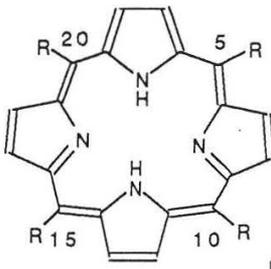
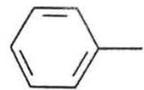
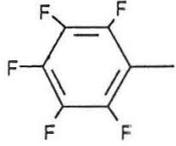
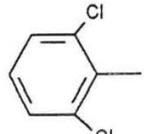
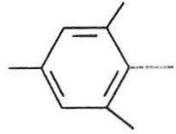
Il semblait particulièrement intéressant d'essayer d'étudier le mécanisme de l'oxydation des thiophènes en général et dans le cas de l'acide tiénilique, la nature des métabolites réactifs formé par des processus d'oxydation. Pour cela nous avons utilisé des modèles chimiques biomimétiques des cytochromes P-450.

#### **IV-A-2 Modélisation des monooxygénases à cytochromes P-450 en utilisant des métalloporphyrines**

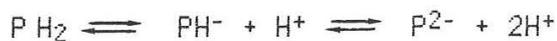
Les métalloporphyrines ont été utilisées comme catalyseurs pour modéliser le site actif du cytochrome P-450.

Toutes dérivent du macrocycle tétrapyrrolique présenté figure 41. Elles peuvent être substituées en position pyrrolique, comme les porphyrines naturelles, ou en position méso (5,10,15,20), pour ce qui est des modèles les plus usuels.

La perte de 2 protons conduit à la forme dianionique. Celle-ci peut alors coordiner un ion métallique.

Structure	Nom	R
	mésotétra-phényl porphyrine (TPP)	
	mésotétra-pentafluorophényl porphyrine (TFPP)	
	mésotétra-paratolyl porphyrine (TTP)	
	mésotétra-(dichloro-2,6 phényl) porphyrine (TDCPP)	
	mésotétramésityl porphyrine (TMP)	

**FIGURE 41.** Principales porphyrines utilisés dans les systèmes modèles du cytochrome P-450.



#### IV-A-2-a Système modèle : métalloporphyrine

##### P(M)/réducteur/O<sub>2</sub>

Dans ce type de modélisation sont utilisés :

- un catalyseur porphyrinique métallique pour remplacer l'hème
- un réducteur ou donneur d'électrons pour modéliser le NADPH
- enfin, un oxydant (O<sub>2</sub> ou l'air)

P-450 (Fe<sup>III</sup>) / NADPH / O<sub>2</sub>

P(M) / réducteur / O<sub>2</sub> ou air

avec M = Fe<sup>III</sup> ou Mn<sup>III</sup>

Cette première modélisation est la plus biomimétique, en effet elle modélise le cycle long du cytochrome P-450 (I-A-4). Mais la principale difficulté est la coexistence dans le même milieu réactionnel de l'entité active très oxydante "fer-oxo" et de réducteur en large excès. Néanmoins, avec le manganèse comme métal, quelques systèmes ont été mis au point. Mais les taux de conversion restent faibles.

Différents réducteurs ont été utilisés, NaBH<sub>4</sub> (174) et nBu<sub>4</sub>BH<sub>4</sub> (175), permettant l'oxydation du cyclohexane en cyclohexanol et cyclohexanone. L'utilisation de H<sub>2</sub>/Pt en présence d'imidazole conduit par contre à la cyclohexanone et à l'époxydation du cyclohexène (176,177,178). Le zinc peut être aussi utilisé en tant qu'agent réducteur avec l'acide acétique comme donneur de proton en présence de Mn(TPP)(Cl) + N-méthyl imidazole (179,179 bis). Enfin l'ascorbate en milieu biphasique a permis l'oxydation d'alcane en alcools et cétones, et d'alcènes en époxydes (179 ter).

#### IV-A-2-b Systèmes modélisant le cycle court : métalloporphyrine

##### P(M)/donneur d'atome d'oxygène (AO)

Devant les difficultés à mettre au point des systèmes reproduisant le cycle long du P-450, une seconde approche qui mime le cycle court a été

proposée. Elle utilise directement un donneur d'atome d'oxygène AO ( $\text{ClO}^-$ ,  $\text{IO}_4^-$ ,  $\text{PhIO}$ ,  $\text{ROOH}$ ...).

P-450 ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) / AO

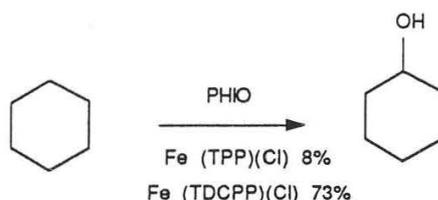
P(M) / AO

#### IV-A-2-b-1 AO = PhIO

##### Porphyrines de fer

Le premier donneur d'oxygène et le plus couramment utilisé est l'iodoso benzène ( $\text{PhIO}$ ) (180). En présence de porphyrine de fer (181), le système ainsi constitué reste le plus étudié en ce qui concerne la modélisation des oxydations des alcanes et des oléfines (sélectivité, spécificité).

Ainsi, les alcanes sont oxydés en alcools (182,183) avec une formation de cétones très minoritaire :



Ce système est également capable de catalyser des sulfoxydations (184) et des O et N-désalkylations oxydantes d'éthers et d'amides (185,186,187). Par contre il est peu efficace pour oxyder les aromatiques (188). Dans le cas des alcènes (181,182) l'époxyde est le produit majoritaire et se forme stéréospécifiquement (189). On observe aussi la formation minoritaire d'alcools allyliques (190) et, dans le cas des oléfines terminales, d'aldéhydes (191). D'un point de vue mécanistique, ces réactions font intervenir un intermédiaire actif électrophile, car :

- les liaisons CH tertiaires sont oxydées plus rapidement que les liaisons secondaires et les primaires sont relativement inertes
- plus une double liaison est riche en électrons, plus elle est réactive, (189).

De plus il se forme un complexe métal-oxo intermédiaire comme l'indique :

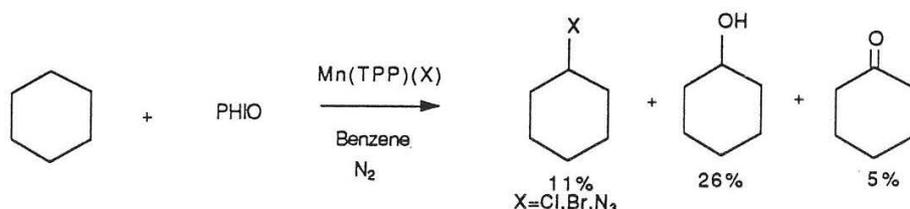
- une réactivité plus importante des alcènes 1,2-disubstitués cis par rapport au trans

- une influence du substituant de la porphyrine sur la régiosélectivité de l'oxydation des alcanes (182,192) et des alcènes (191-193)

- enfin, le complexe a été isolé à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans le cas d'une oxydation par la ferrimesotétramésityl porphyrine en présence de PhIO. Ce complexe est alors capable d'oxyder des alcènes (194).

#### Porphyrines de manganèse

Dans le cas de porphyrines de manganèse, de très bons résultats sont obtenus dans l'hydroxylation des alcanes (195,196) ou l'époxydation des oléfines (179-197).



Comme pour les porphyrines de fer, la réactivité radicalaire du complexe manganèse-oxo intermédiaire a été mise en évidence (195,196). Un mécanisme a été proposé pour l'hydroxylation des alcanes (198) en présence d'oxygène (figure 42).

#### **IV-A-2-b-2 AO = NaOCl**

L'hypochlorite de sodium est utilisé dans un système triphasique en présence de trioctyl méthylammonium comme agent de transfert et de Mn(TPP) (Cl) par Tabushi et coll. (199). Ce système est alors capable d'oxyder l'alcool benzylique en benzaldéhyde et l'adamantane en dérivé hydroxylés ou chlorés. Un système analogue a été utilisé par Meunier et coll. (200) pour époxyder le styrène et le cyclohexène. Ce système a été amélioré par la suite en ajoutant de la pyridine qui accélère la vitesse et augmente le rendement et la stéréospécificité de la réaction (201).

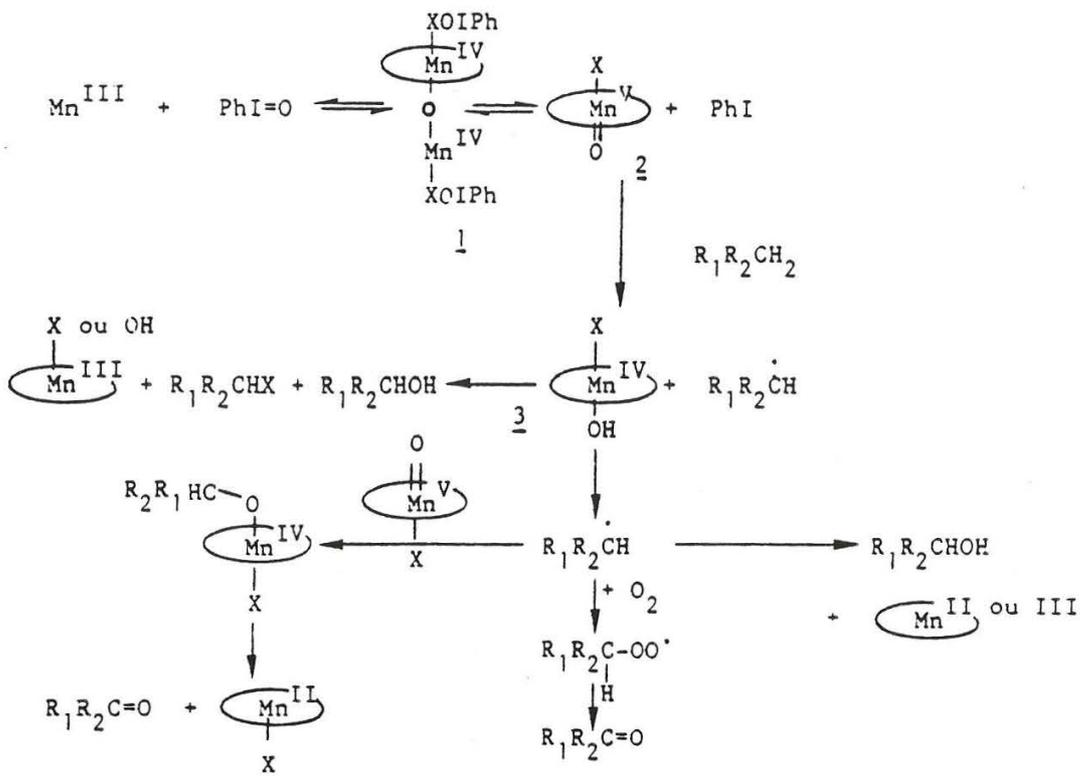
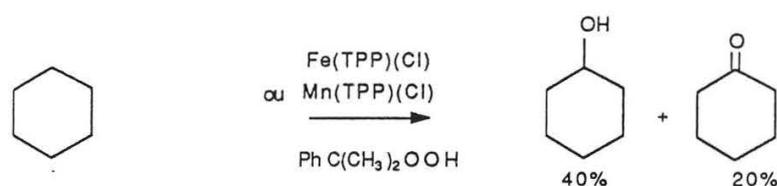


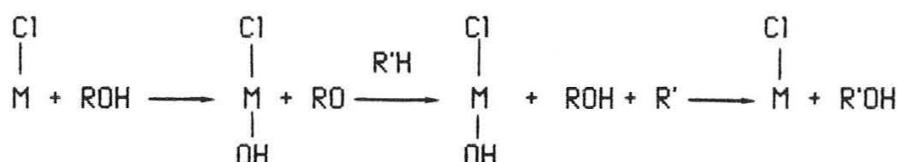
FIGURE 42. Mécanisme d'oxydation des alcanes par les systèmes  $\text{Mn}^{\text{III}}$ .  
(P)(X)/PhI=O.(179)

## IV-A-2-b-3 AO = ROOH

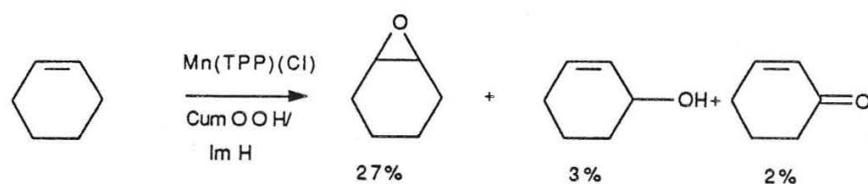
Les porphyrines de fer ou de manganèse catalysent l'oxydation des alcanes par l'hydroperoxyde de cumyle. Les produits obtenus sont l'alcool et la cétone correspondante (202).



Le mécanisme de la réaction d'oxydation est différent de celui obtenu avec le système utilisant l'iodosobenzène. Il passe par la formation d'un radical alkoxy RO, formé par coupure homolytique de l'hydroperoxyde (192).



Si on ajoute de l'imidazole au système, il devient alors possible d'époxyder des alcènes tels que le styrène, le cyclohexène ou le stilbène (203).

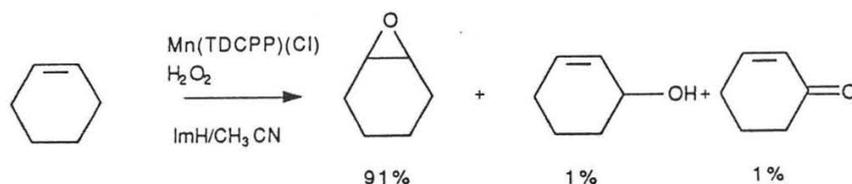


Il semble que l'imidazole, en favorisant une coupure hétérolytique du peroxyde, conduise à la formation du complexe  $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$  qui lui est capable d'époxyder les oléfines.

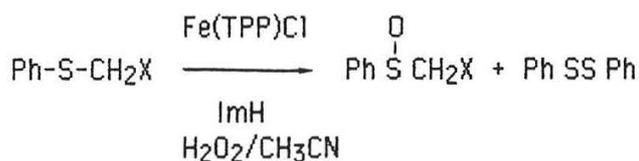
## IV-A-2-b-4 AO = HOOH

En général, les porphyrines sont dégradées par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Mais au laboratoire, la meso-tétra-dichloro-2,6 phényl porphyrine de manganèse ( $\text{Mn(TDCPP)(Cl)}$ ), qui résiste aux conditions de réactions, a été utilisée en présence d'imidazole,

indispensable pour obtenir de bons rendements (204), pour oxyder des alcanes et des alcènes :

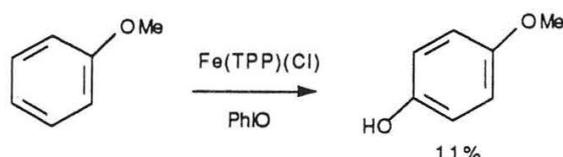


Par ce type de système, les sulfures sont oxydés en sulfoxydes (205).



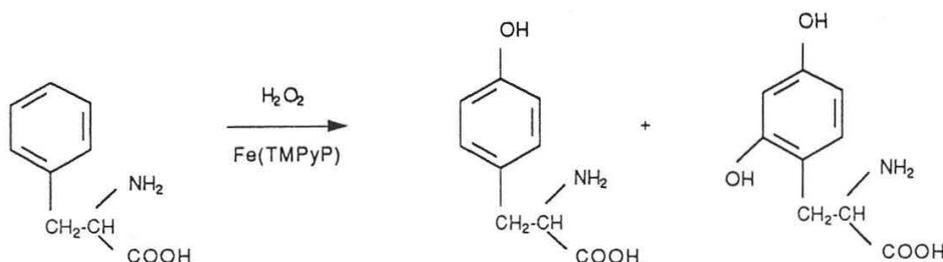
#### IV-A-3 Oxydation du noyau aromatique par les métalloporphyrines

Comme nous l'avons vu dans cette revue rapide des principaux systèmes modèles, il existe peu d'exemples de réactions concernant des noyaux aromatiques. En effet, les rendements sont moyens comparés à ceux obtenus pour l'hydroxylation des alcanes ou l'époxydation des oléfines. L'anisole est oxydé en parahydroxyanisole avec un rendement de 11 % (188).

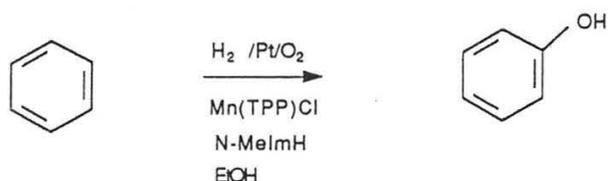


De plus le noyau phénol est facilement suroxydé dans ce milieu.

Mais depuis peu, d'autres systèmes commencent à être mis au point. Shimidzu et coll. (206) utilise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une porphyrine de fer pour oxyder la phénylalanine.

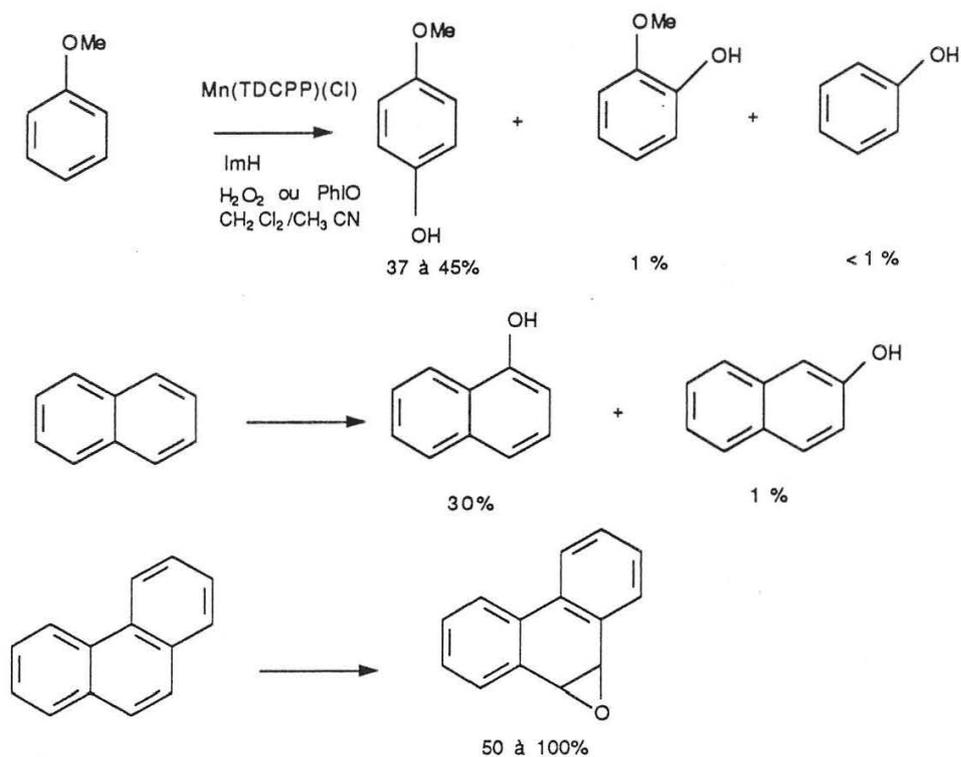


Tabushi et coll. (207) en utilisant un système modèle du cycle long du cytochrome P-450 oxydent le benzène en phénol.



Au laboratoire, les études réalisées par Pascal Gouvine ont montré que la Mn(TDCPP)(Cl) était capable d'oxyder divers noyaux aromatiques en présence d'imidazole, en utilisant comme agent oxydant  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou PhIO (208).

L'anisole est principalement hydroxylé en position para. Le naphthalène est majoritairement transformé en  $\alpha$ -naphthol. Le phénanthrène est époxydé sur la liaison 9-10.

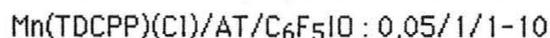


Enfin, le système Mn(TPP)(Cl)/MeImH/AcOH+Zn/O<sub>2</sub> réalise les mêmes réactions. Il laisse le catalyseur intact, et les rendements sont constants tout au long de l'expérience sans suroxydation du noyau aromatique (Pascal Gouvine 208).

Rien n'est connu actuellement sur l'oxydation d'hétérocycles aromatiques et donc thiophéniques par les systèmes modèles du cytochrome P-450. Nous avons choisi d'étudier l'oxydation de certains de ces dérivés en utilisant comme porphyrine la Mn(TDCPP)(Cl), particulièrement résistante à l'oxydation, en présence de ArIO.

#### IV-B OXYDATION DE L'ACIDE TIENILIQUE CATALYSEE PAR LES METALLOPORPHYRINES

Le catalyseur choisi, la méso-tétra-dichloro-2,6 phényl porphyrine de manganèse Mn(TDCPP)(Cl), a été synthétisé au laboratoire. La réaction est réalisée dans un mélange d'acétonitrile et de dichlorométhane 2/1 pour solubiliser respectivement le substrat ainsi que ses produits d'oxydation et la porphyrine. L'oxydant utilisé est le pentafluoroiodosobenzène, C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO. Il ne possède pas d'hydrogène, ce qui est particulièrement intéressant pour suivre la réaction par RMN du proton. De plus il s'est avéré plus soluble et plus réactif que l'iodosobenzène. Enfin les proportions choisies sont les suivantes :



En général, pour ce type de réaction, le substrat est utilisé en excès et les rendements sont calculés par rapport à l'oxydant. Dans notre cas, afin d'obtenir des quantités appréciables de produits oxydés, nous avons travaillé en présence d'un excès d'oxydant, sans toutefois dépasser 10 équivalents par rapport au substrat (soit 200 par rapport à la porphyrine). Au delà, la porphyrine subit une dégradation oxydante. Les rendements seront donc exprimés par rapport au substrat de départ.

### IV-B-1 Etude par CLHP de l'oxydation de AT par C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO catalysée par les métalloporphyrines

#### IV-B-1-a Conditions expérimentales

A une solution de porphyrine (Mn(TDCPP)(Cl)) dans l'acétonitrile à température ambiante est ajouté en une fois l'acide tiénilique éventuellement marqué. Le tout est agité jusqu'à dissolution complète. Puis 1 équivalent de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO est ajouté en une fois, et laissé 5 minutes sous agitation. Un échantillon est alors prélevé afin d'être analysé par CLHP. Un nouvel équivalent de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO est ajouté à la solution principale pour l'étude à 2 équivalents et au-delà. Dans l'échantillon prélevé, l'excès de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO est détruit par addition de cristaux de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Le brut réactionnel a été soit étudié directement par CLHP dans le cas où nous sommes partis d'acide tiénilique marqué au <sup>14</sup>C, soit extrait par une solution tampon NaHCO<sub>3</sub> (pH=8). Dans ce dernier cas, on retrouve les produits hydroxylés et l'AT dans la phase aqueuse, qui est analysée par CLHP couplée à une détection UV-visible à 370 et 270 nm (figure 43).

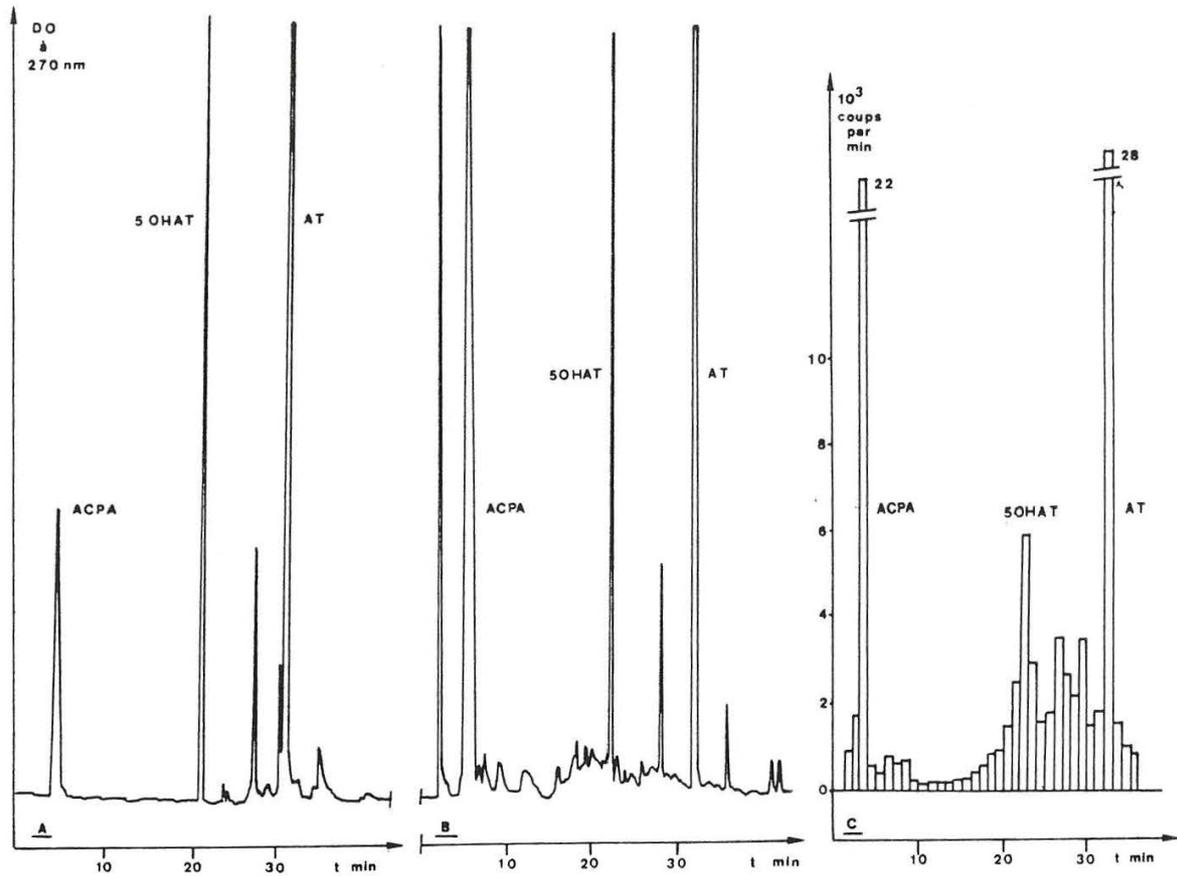
#### IV-B-1-b Détection

Une première expérience faite avec du substrat non radioactif a permis d'identifier par CLHP, en particulier grâce à des coinjections avec les authentiques dont nous disposons, les pics du chromatogramme correspondant à AT, 5OHAT et au composé ACPA résultant de la coupure de la liaison CO-thiophène (figure 43 A,B).

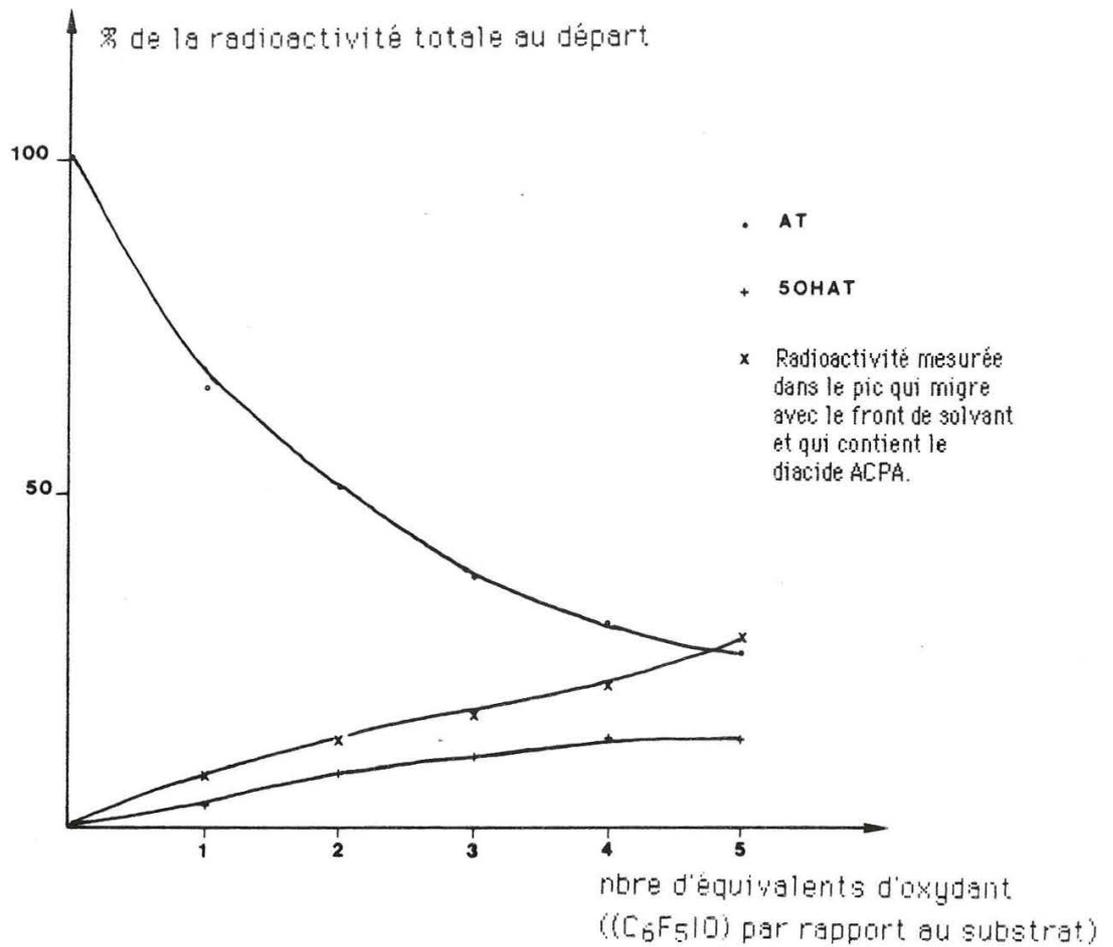
L'utilisation de substrat radioactif marqué sur le carbone de la fonction cétone a confirmé ce résultat (figure 43 C).

#### IV-B-1-c Quantification

Pour éviter toute perte de molécules marquées à l'extraction, le brut réactionnel a été injecté et les différentes fractions au sortir de la colonne de CLHP comptées en scintillation liquide. Nous avons pu observer qu'un temps de réaction de 10 min n'améliore pas le rendement en 5OHAT par rapport à 5 min. Le rendement en 5OHAT formé et en AT inchangé, en fonction de quantités variables d'oxydant, est représenté figure 43bis. Le rendement en 5OHAT atteint un plateau de 15 % pour 5 équivalents d'oxydant. La quantité d'AT non transformé



**FIGURE 43.** Oxydation de l'AT par le système modèle  $Mn(TDCPP)(Cl)/C_6F_5IO$ . (A) Analyse par CLHP d'un mélange d'authentique de AT, 5OHAT et de ACPA. (B) Analyse par CLHP de l'ACPA et du 5OHAT formé à partir d'AT froid et après extraction ( $Na_2S_2O_5/NaHCO_3$ ) et (C) Comptage en scintillation liquide des fractions collectées en présence d'AT  $^{14}C$ ..



**FIGURE 43bis.** Hydroxylation de l'AT (<sup>14</sup>C) par le système modèle Mn(TDCPP)(Cl)/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO. Evolution de la réaction en fonction du nombre d'équivalent de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO ajouté par rapport au substrat Mn(TDCPP)(Cl)/AT = 0,05/1 ; AT 10 mM ; température ambiante ; temps de réaction 5 min. Solvant : CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 2/1.

ne fait que diminuer. Enfin le composé ACPA, dont la quantité croît avec la quantité d'oxydant, est détecté avec le front du solvant.

#### **IV-B-2 Etude par RMN $^1\text{H}$**

Plusieurs éléments se sont trouvés réunis pour faciliter une étude RMN de la réaction. Tout d'abord, le rendement en 5OHAT (15 %), rend envisageable une détection par cette technique. De plus, le déplacement chimique du proton en 4 du noyau thiophène de ce dérivé est d'environ 6 ppm. Il se situe en dehors du massif des autres protons aromatiques et permet une détection facile du 5OHAT. Enfin, seul l'AT et ses produits d'oxydation ou de dégradation présentent des signaux. En effet, la porphyrine utilisée en quantité catalytique (5 %) se situe en dessous du seuil de détection.

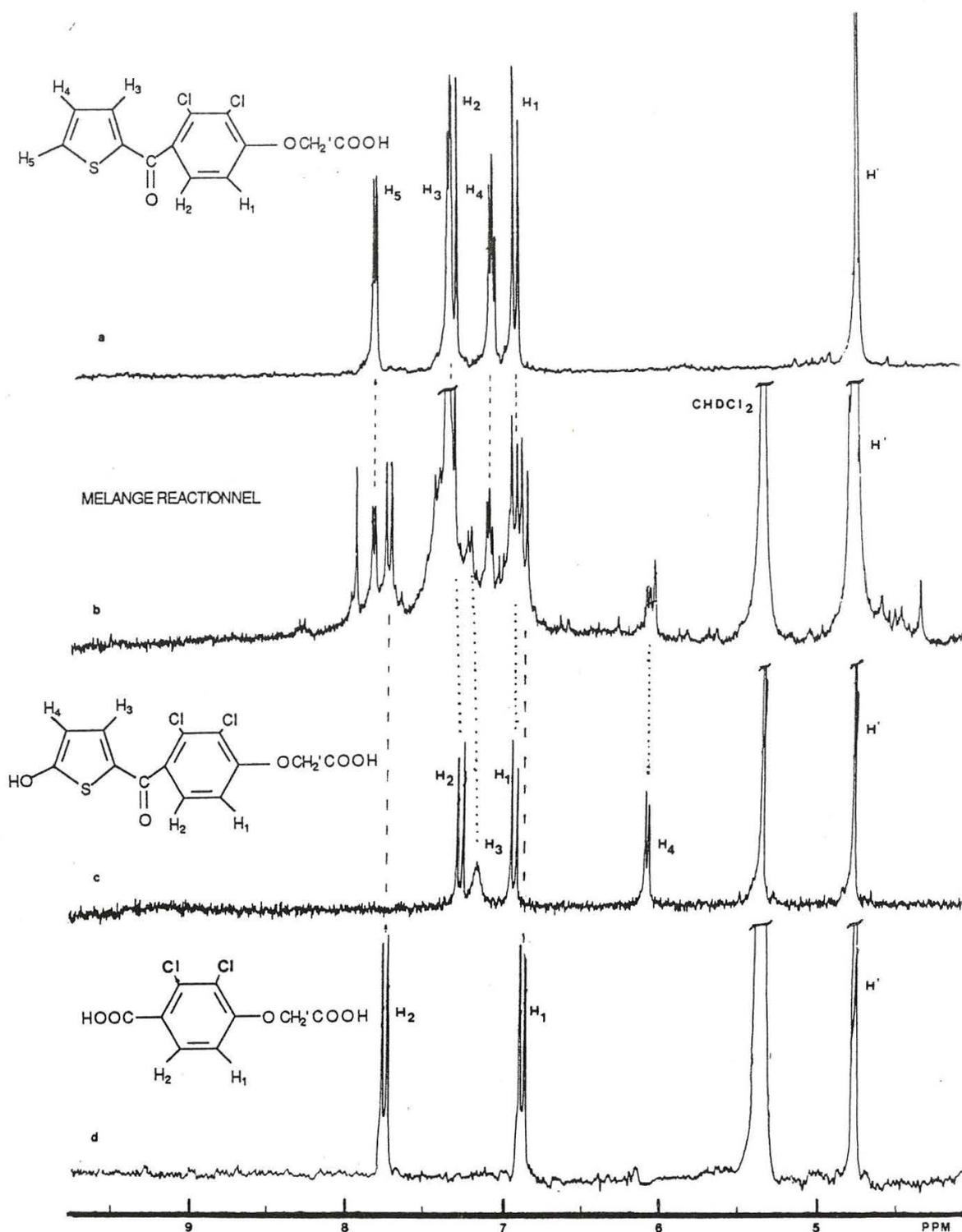
##### **IV-B-2-a Conditions expérimentales et détection**

Les proportions utilisées sont identiques à celles de l'étude par CLHP : Mn(TDCPP)(Cl)/AT/ $\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$  : 0,05/1/1-5. La concentration en substrat est de 40 mM dans  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ . Le premier équivalent de  $\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$  est ajouté et un premier spectre enregistré après 5 minutes. La réaction n'évolue pas d'ailleurs après ce premier enregistrement et ceci pendant 24 heures. 60 minutes plus tard 2 autres équivalents, puis 2 autres encore après 60 minutes et ainsi de suite.

La figure 44 b présente le spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange réactionnel, après addition de 5 équivalents de  $\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$  par rapport au substrat. Il apparaît que :

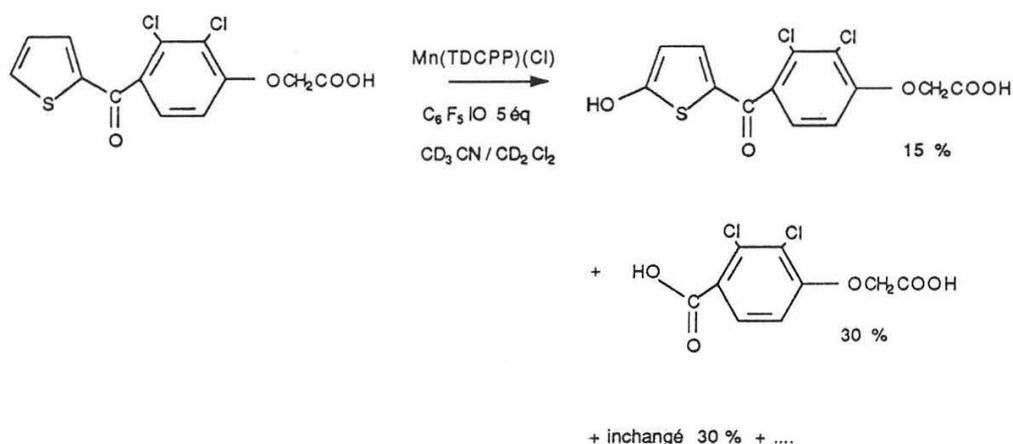
- l'AT n'est pas totalement transformé. On observe en effet les signaux de la partie thiophénique de ce composé à 7,13 ; 7,40 et 7,87 ppm et ceux de la partie benzénique à 6,92 et 7,36 ppm.

- Un doublet est présent à 6,10 ppm ( $J=5,1$  Hz). Par double irradiation, nous avons montré qu'il est couplé à un second doublet d'intensité égale présent à 7,24 ppm. Les deux doublets sont caractéristiques de la partie thiophénique du 5OHAT, comme le montre le spectre de l'authentique (figure 44 c). Les protons aromatiques ne sont pas identifiables car ils sont superposés à ceux de l'AT et à ceux d'autres produits secondaires.



**FIGURE 44.** Etude par RMN  $^1\text{H}$  de l'oxydation de l'AT par le système  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$   
 a-AT ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  
 b- mélange réactionnel :  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{AT}/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO} = 0,05/1/5$  ; AT  
 40 mM dans  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , T. amb. 10 min.  
 c- 5OHAT authentique ( $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  
 d- Acide (carboxy-4' dichloro-2',3') phénoxy acétique (ACPA) ( $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )

- Deux doublets à 6,87 et 7,73 ppm ( $J=8,8$  Hz) ont pu être attribués par comparaison à un authentique, au diacide ACPA (figure 44 d).



Toutefois, un certain nombre de signaux n'ont pu être attribués, en particulier le singulet présent à 6,05 ppm.

#### IV-B-2-b Etude de l'interaction AT, porphyrine, oxydant

La RMN <sup>1</sup>H a été utilisée pour étudier les principales interactions pouvant exister entre les différentes espèces en solution : interaction AT-C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO et interaction AT-C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO-porphyrine.

##### IV-B-2-b-1 Interaction AT-C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO

L'oxydant, C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO (1 puis 2 équivalents), est ajouté à une solution d'AT. Les valeurs des déplacements chimiques des protons de l'AT sont rassemblées dans le tableau 24.

Un blindage progressif des différents signaux du substrat est observé. Ce blindage est d'autant plus important que les protons sont proches de la fonction acide. Il est très faible et même nul au niveau des protons thiophéniques. A 2 équivalents, le blindage s'accroît et les raies sont élargies. Aucun pic supplémentaire n'est observé.

**Tableau 24. Valeurs des déplacements chimiques de l'AT obtenues par RMN <sup>1</sup>H en présence d'oxydant (C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO) et de porphyrine (Mn(TDCPP)(Cl)) dans CD<sub>3</sub>CN/CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.**

Conditions			Déplacements chimiques <sup>(c)</sup>					
Substrat <sup>(a)</sup>	C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> IO <sup>(b)</sup>	Catalyseur	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>τ</sub>	H <sub>β</sub>	CH <sub>2</sub>
AT	0	0	7.86	7.12	7.39	7.35	6.97	4.77
AT	1	0	7.86	7.12	7.36 (-0.03) <sup>d</sup>	7.28 (-0.07)	6.82 (-0.015)	4.53 (-0.24)
AT	2	0	7.86	7.12	7.35 (-0.04)	7.26 (-0.09)	6.66 (-0.31)	4.47 (-0.30)
AT	1	0.05	7.86	7.12	7.39 (0)	7.35 (0)	6.97 (0)	4.77 (0)

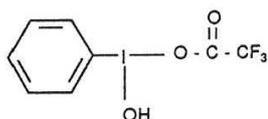
(a) AT : 40 mM

(b) C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO porphyrine en équivalent par rapport à AT.

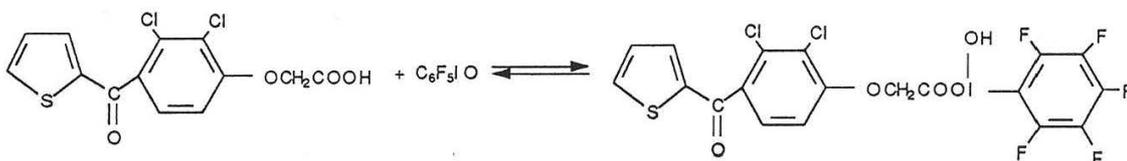
(c) déplacement chimique à 295 K avec pour référence le pic de l'acétonitrile à 1.87 ppm/TMS.

(d) variation du déplacement chimique par rapport à AT seul en solution.

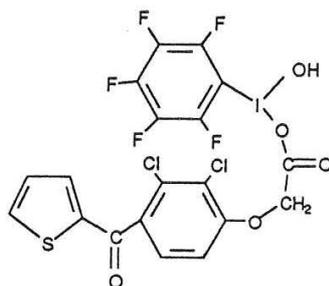
Il semble donc que le pentafluoriodosobenzène interagisse avec la fonction acide de l'AT. De la même façon, l'interaction de l'iodosobenzène avec l'acide trifluoro acétique pour former le dérivé suivant est connue (209).



Dans le cas de l'acide tiénilique, il s'établit probablement l'équilibre suivant :



Cet équilibre est rapide, relativement au temps RMN, puisqu'il y a un seul signal et que la variation du déplacement chimique se fait de façon progressive lors de l'addition de  $C_6F_5IO$ . Le blindage peut soit être dû à l'effet inductif du groupement  $C_6F_5IO$  à travers les liaisons, soit être dû à un effet d'anisotropie engendré par le noyau aromatique  $C_6F_5$ . Ce dernier effet peut être amplifié par un phénomène d'empilement des noyaux aromatiques (stacking).



La même expérience a été réalisée en mettant en présence l'AT avec du  $C_6H_5IO$  afin d'observer le comportement des protons de l'iodosobenzène. Les protons de  $C_6H_5IO$  sont fortement perturbés. Mais quand dans les mêmes conditions, le CBT, dérivé sans fonction acide, est mis en présence de  $C_6F_5IO$  aucune variation de déplacement chimique des protons du CBT n'est observée.

Par contre, il est intéressant de noter que l'addition de  $C_6F_5IO$  (1 équivalent) à une solution de 5OHAT produit un élargissement considérable des protons thiophéniques  $H_3$  et  $H_4$ . Les protons aromatiques sont eux beaucoup moins élargis. Aucune variation de déplacement chimique n'est observée. Il semble donc que  $C_6F_5IO$  se fixe sur la fonction OH du thiophène qui est en fait, comme nous l'avons vu au chapitre I, la plus acide. La distance entre les 2 noyaux aromatiques étant plus courte, l'empilement n'est plus possible et les effets d'anisotropie ne sont plus visibles (données non présentées).

#### IV-B-2-b-2 Interaction AT- $C_6F_5IO$ -Mn(TDCPP)(Cl)

Quand, au mélange AT- $C_6F_5IO$ , la porphyrine est additionnée en quantité catalytique (Porphyrine/AT/ $C_6F_5IO$  : 0,05/1/1), le spectre RMN de l'acide tiénilique retrouve des déplacements chimiques initiaux, comme en absence d'oxydant (tableau 24).

### IV-C OXYDATION DU SUPROFEN CATALYSEE PAR LES PORPHYRINE DE MANGANESE

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la technique RMN s'était avérée tout à fait performante pour identifier deux produits d'oxydation de l'acide tiénilique. Cette étude a été étendue au suprofen.

Les conditions expérimentales sont en tout point identiques aux précédentes soit : Mn(TCPPP)(Cl)/substrat/ $C_6F_5IO$  : 0,05/1/1-5, substrat 40 mM dans  $CD_3CN/CD_2Cl_2$ , addition de un équivalent de  $C_6F_5IO$ , enregistrement du premier spectre après 5 minutes, puis addition de 2 équivalents après 60 min. puis ceci une seconde fois, le tout à température ambiante.

La figure 45b présente le spectre RMN du mélange réactionnel. L'allure du spectre est moins nette que dans le cas de l'AT. Toutefois, on observe :

- le produit de départ non transformé (17 %) (figure 45a)
- l'apparition d'un doublet à 6,10 ppm. Par double irradiation, nous avons montré que ce doublet est couplé avec un doublet à 7,24 ppm. Cet ensemble de

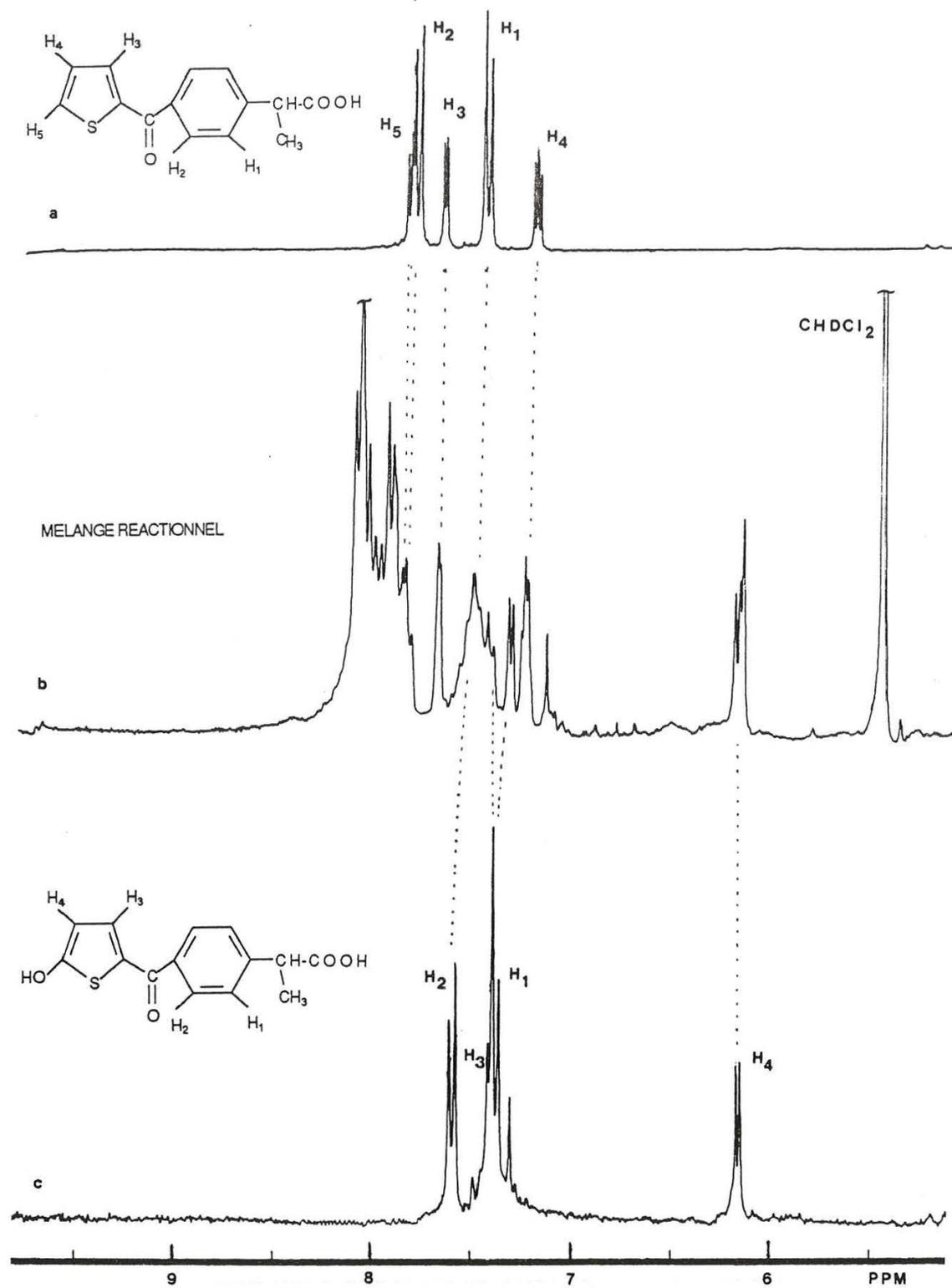


FIGURE 45. Etude par RMN  $^1\text{H}$  de l'oxydation du SU par le système Mn(TDCPP)(Cl)/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO.

(a) SU (CD<sub>3</sub>CN)

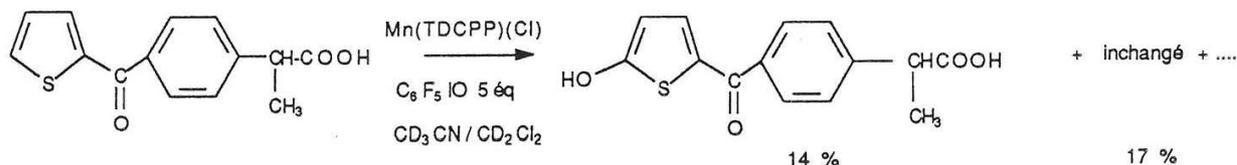
(b) mélange réactionnel : Mn(TDCPP)(Cl)/SU/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO = 0,05/1/5 ;

SU 40 mM dans CD<sub>3</sub>CN/CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, T. amb. 10 min.

(c) 5HSU authentique (CD<sub>3</sub>CN).

deux doublets est caractéristique de la partie thiophénique du 5OHSU dont le spectre est présenté figure 45c. Les protons du noyau benzénique sont eux difficilement repérables dans le massif correspondant entre 7,4 et 7,8 ppm (rendement : 14 %). De plus l'ajout d'une quantité supplémentaire de 5OHSU authentique dans le milieu réactionnel permet de montrer l'augmentation de l'intensité des signaux correspondants.

- enfin, la formation de nombreux pics non identifiés en particulier vers 8 ppm et un singulet à 6,05 ppm comme dans le cas de l'acide tiénilique. Ceux-ci pourraient inclure l'acide carboxy-4' phényl-2 propionique (ACPP) correspondant à la coupure au niveau de la liaison CO-thiophène.



En conclusion des études réalisées dans cette première partie de ce chapitre, nous soulignerons les points suivants.

Le système modèle  $\text{C}_6\text{F}_5\text{IO/Mn(TDCPP)(Cl)}$  réalise l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique. La réaction est terminée en 5 minutes. Le rendement optimal est obtenu avec 5 équivalents de  $\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$ . Les détections par CLHP et par RMN ont mis en évidence la formation de 5OHSU avec un rendement de 15 % et de composé ACPA avec un rendement de 30 %. Ces composés ont été isolés et identifiés aux authentiques. Enfin 30 % de l'acide tiénilique est retrouvé inchangé dans ces conditions.

Le suprofen est oxydé dans les mêmes conditions en 5OHSU avec un rendement de 14 %. 17 % du suprofen est retrouvé inchangé.

Dans les deux cas il y a formation d'autres produits non identifiés dont un caractérisé par un singulet à 6,05 ppm.



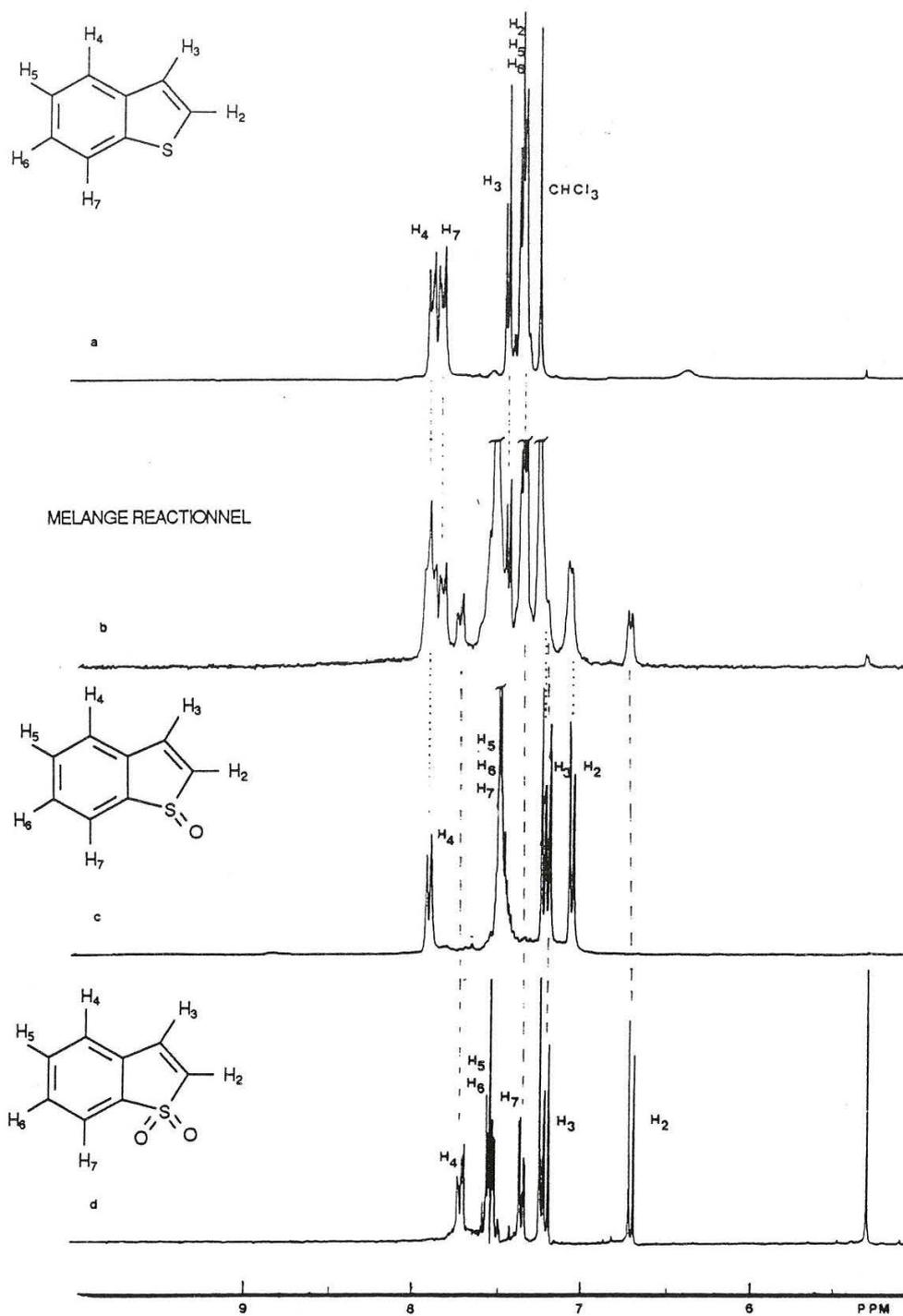


FIGURE 46. Etude par RMN  $^1\text{H}$  de l'oxydation du BT par le système  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$ .

(a) BT ( $\text{CDCl}_3$ )

(b) Mélange réactionnel  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{BT}/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}=0,05/1/1$  ;  
BT 40 mM dans  $\text{CDCl}_3$ , T. amb. 10 min.

(c) BTSO authentique ( $\text{CDCl}_3$ )

(d) BTSO<sub>2</sub> authentique ( $\text{CDCl}_3$ ).

Tableau 25. Oxydation du benzothiophène (BT) par les systèmes modèles métalloporphyrine/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>I<sub>0</sub>. BT : 40 mM, T amb. ; 10 min.

Conditions		% des produits présents en fin de réaction				
Solvants	Catalyseur (0.05 éq.)	C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> I <sub>0</sub> (éq.)	BT	BTSO	BTSO <sub>2</sub>	inconnu (% estimé)
CDCl <sub>3</sub>	Mn(TDCPP)(Cl)	1	31	47	22	0
-	-	3	0	0	87	13
CD <sub>3</sub> CN/CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	1	86	1	13	0
-	-	3	0	0	75	25
-	-	5	0	0	44	55
CD <sub>3</sub> CN/CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fe(TDCPP)(Cl)	1	80	0	20	0
		3	15	0	85	0

éq. : équivalent par rapport au BT.

4,97 ppm. Bien que ce produit n'ait pu être isolé, on peut néanmoins proposer comme structure hypothétique l'époxy-2,3-benzo[b]thiophène sulfone. En effet ce spectre est compatible avec une structure type époxyde (212). De plus ce produit dérive d'une suroxydation du  $\text{BTSO}_2$ . Cependant il n'a pas été possible de conclure.

Nous avons ensuite étudié l'effet de différents paramètres sur les produits de la réaction (tableau 25).

Tout d'abord l'utilisation d'un solvant polaire favorise grandement la formation des produits les plus oxydés. Ainsi, dès 1 équivalent d'oxydant, il se forme directement de la sulfone (13 %) avec quelques traces de sulfoxyde (1 %). A 3 équivalents, le sulfoxyde est totalement suroxydé en sulfone (74 %). Il commence à apparaître un produit de suroxydation de la sulfone, vraisemblablement l'"époxyde". Enfin, avec 5 équivalents de  $\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$ , ce dernier devient majoritaire (55 %).

Comme nous l'avons vu en présence d'un solvant moins polaire ( $\text{CDCl}_3$ ), le sulfoxyde est majoritaire à 1 équivalent d'oxydant (47 %) ; mais curieusement le taux de conversion du produit de départ est supérieur. A 3 équivalents, le sulfoxyde disparaît et la sulfone devient majoritaire (87 %) dans une plus grande proportion que dans  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .

Enfin, l'utilisation d'une porphyrine de fer  $\text{Fe}(\text{TDCPP})(\text{Cl})$  conduit à la formation de sulfone uniquement avec un rendement de 85 %. Aucune trace de sulfoxyde ni d'époxyde n'est détectée.

Par conséquent, le système  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$  s'est avéré efficace pour catalyser l'oxydation du benzo[b]thiophène. Comme dans le cas de l'oxydation par l'acide métachloroperbenzoïque, la sulfone a été caractérisée (211). Par contre le sulfoxyde a pu être isolé et caractérisé. Enfin, un produit de suroxydation de la sulfone se forme, qui n'a pas été observé lors de l'oxydation par le peracide.

#### **IV-D-2 Cas du diphenyl-2,5 thiophène (DPT)**

L'oxydation par les systèmes  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$  (IV-C ) conduit à la formation de 2 nouveaux produits uniquement (figure 47, tableau 26). Mais

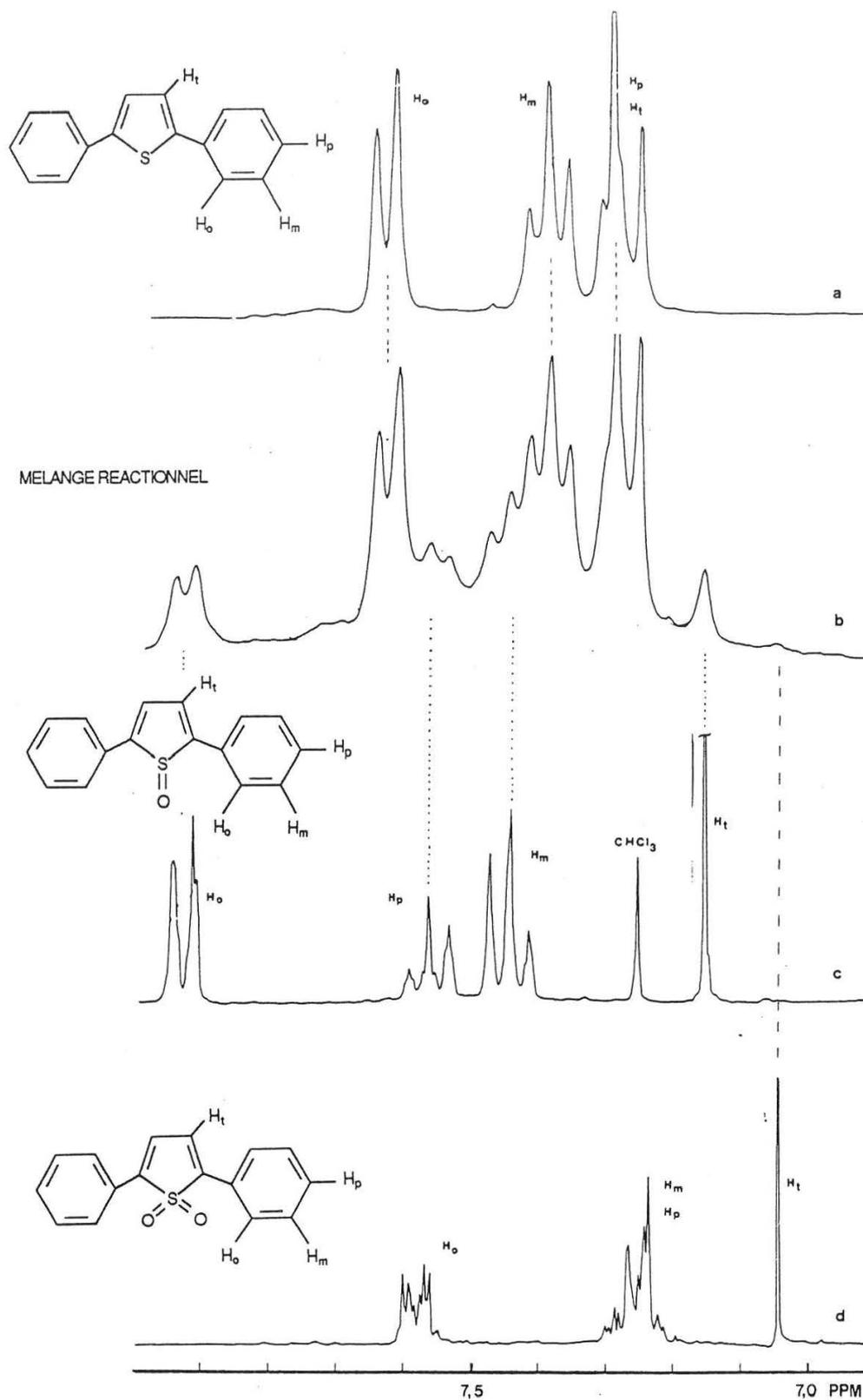


FIGURE 47. Etude par RMN  $^1\text{H}$  de l'oxydation du DPT par le système  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO}$ .

(a) DPT ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ).

(b) Mélange réactionnel  $\text{Mn}(\text{TDCPP})(\text{Cl})/\text{DPT}/\text{C}_6\text{F}_5\text{IO} = 0,05/1/3$  ;  
DPT 40 mM dans  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , T. amb. 10 min.

(c) DPTSO authentique ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )

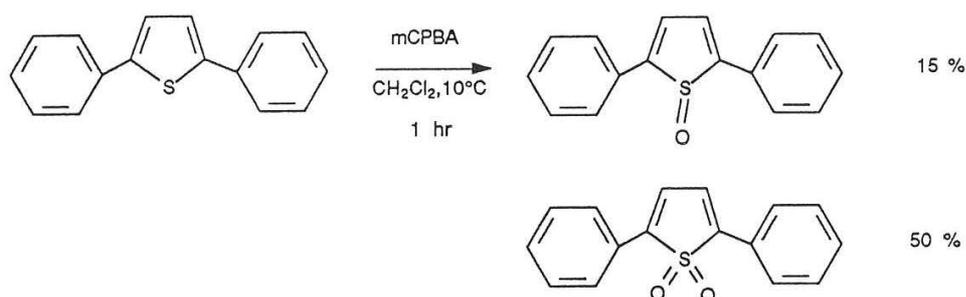
(d) DPTSO<sub>2</sub> authentique ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ).

Tableau 26. Oxydation du diphenyl-2,5 thiophène (DPT) par le système Mn(TDCPP)(Cl)/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>I<sub>0</sub>. DPT : 40 mM ; T amb. ; 10 min.

Conditions		% des produit présents en fin de réaction			
Solvant	Catalyseur (0.05 éq.)	C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> I <sub>0</sub> (éq.)	DPT	DPTSO	DPTSO <sub>2</sub>
CD <sub>3</sub> CN/CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mn(TDCPP)(Cl)	1	85	15	0
-	-	3	70	28	2
-	-	5	47	47	5
-	-	7	5	80	8

éq. : équivalent par rapport au BT.

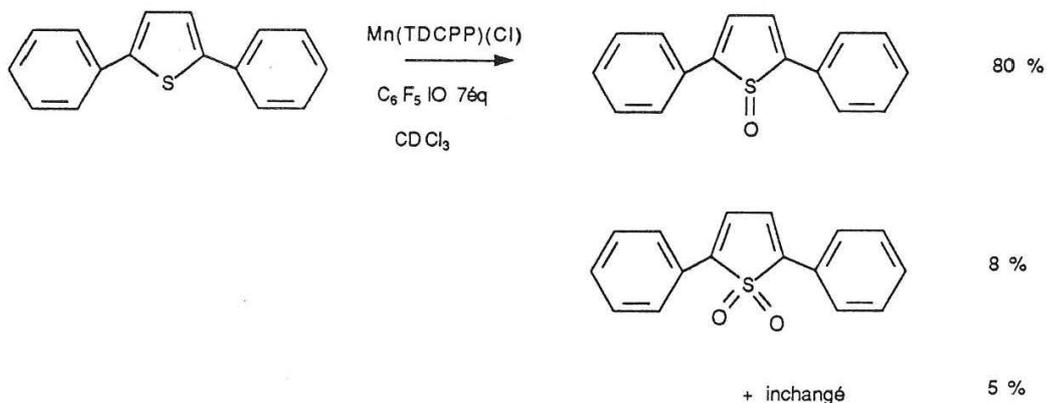
même à 7 équivalents de  $C_6F_5IO$ , l'un des 2 reste largement minoritaire (8 %). Aussi, pour caractériser ces 2 composés, il a été préféré d'isoler les 2 authentiques par une voie de synthèse différente : l'oxydation du diphényl-2,5 thiophène par l'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA) (213).



La purification s'est faite sur plaque de silice éluée à  $CH_2Cl_2$ . La sulfone est d'ailleurs moins polaire que le sulfoxyde. La sulfone jaune ainsi obtenue a été caractérisée par son spectre de masse et son spectre RMN. Ce dernier est identique à celui décrit par Von Tillborg (213).

Par contre, le sulfoxyde incolore n'avait pas été isolé et a été aussi caractérisé par son spectre RMN et son spectre de masse.

La préparation de ces authentiques a permis d'identifier les 2 produits de l'oxydation par le système modèle comme étant le sulfoxyde pour le produit majoritaire (80 % avec 7 éq. de  $C_6F_5IO$ ) et la sulfone pour le produit minoritaire (8 % avec 7 éq. de  $C_6F_5IO$ ) (tableau 26).



On remarque que l'oxydation biomimétique catalysée par  $Mn(TDCPP)(Cl)$  s'avère plus douce que l'oxydation par le mCPBA et conduit au sulfoxyde.

L'oxydation du noyau thiophène par les systèmes modèles à métalloporphyrine du cytochrome P-450 n'avait jamais été étudié auparavant. Nous avons étudié l'oxydation de divers thiophènes en utilisant une porphyrine de manganèse substituée, Mn(TDCPP)(Cl) en présence de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO.

- L'oxydation de l'acide tiénilique conduit à la formation de 5OHAT (15 %) et d'ACPA, composé résultant de l'oxydation de la liaison cétone-thiophène (30 %). Les produits majeurs de l'oxydation par le système modèle sont aussi ceux observés lors de l'oxydation métabolique *in vivo* et *in vitro* (I-C-2).

- Le suprofen conduit également à la formation de 5OHSU (rendement 14 %), produit d'oxydation métabolique *in vivo* (I-D-2) et *in vitro* comme nous l'avons montré en II-B-2.

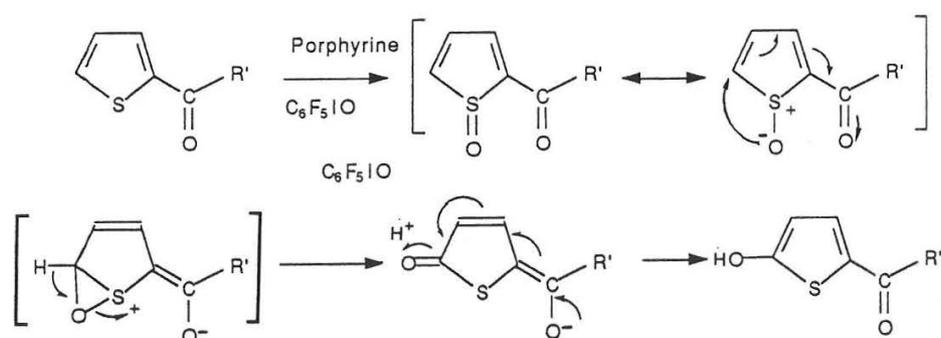
Le soufre du benzo[b]thiophène et du diphényl-2,5 thiophène est oxydé par le système Mn(TDCPP)(Cl)/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO en sulfoxyde et en sulfone. Aucune donnée n'est disponible sur l'oxydation métabolique du diphényl-2,5 thiophène. Mais le métabolisme de 2 benzo[b]thiophènes substitués a été étudié. Le mobam (18, figure 13) est oxydé sur le soufre en sulfoxyde. Dans le cas du dérivé 19, aucun produit d'oxydation du soufre n'a été détecté. Par conséquent, le système porphyrine de manganèse/C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO s'avère dans les cas où l'oxydation métabolique est connue un système effectivement biomimétique.

- Les métalloporphyrines en reproduisant les oxydations biologiques du cytochrome P-450 s'avèrent un outil efficace pour en comprendre les mécanismes. Les qualités principales de ce système étant la souplesse des conditions d'utilisation (solvant, température), la sélectivité plus ou moins grande de différentes porphyrines et l'efficacité des divers agents oxydants qui permettent de favoriser la formation de certaines entités. Les études réalisées dans ce but dans le cadre de ce travail restent très préliminaires.

Néanmoins, la gamme, restreinte, des thiophènes étudiés permet de mettre en évidence une différence de réactivité importante entre ceux-ci. Le benzo[b]thiophène est oxydé sur le soufre en sulfoxyde et en sulfone qui sont relativement stables. La formation de dérivé hydroxylé en 2 n'a pas été mise en évidence. Dans le cas du diphényl-2,5 thiophène, le soufre est également oxydé en sulfoxyde et en sulfone qui sont stabilisés par les groupements phényles.

Ces deux exemples démontrent l'oxydabilité du soufre du noyau thiophène. Aussi, dans le cas de l'AT et du SU il peut être émis l'hypothèse de la

formation d'un sulfoxyde intermédiaire. Ce dérivé, instable en raison de l'effet de résonance et de l'électronégativité engendré par le groupement aroyl pourrait se réarranger pour former un dérivé hydroxylé (figure 48).



**FIGURE 48.** Mécanisme postulé de l'oxydation de divers thiophènes par le système modèle à métalloporphyrine.



## CONCLUSION GENERALE

Il n'existe dans la littérature qu'un très petit nombre de données sur le métabolisme oxydatif (en particulier *in vitro*) des dérivés thiophéniques.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique simple et générale pour l'étude de l'oxydation métabolique des aroyl-2 thiophènes. Cette technique est basée sur les propriétés particulières des hydroxy-5 aroyl-2 thiophènes, qui sont des métabolites potentiels des aroyl-2 thiophènes, d'exister sous forme anionique à pH physiologique (du fait de leurs pKa très bas, de l'ordre de 2,5) ; cette forme anionique ayant une absorption U.V.-visible caractéristique et intense ( $\epsilon = 28000$ ) vers 390 nm.

Appliquée à l'étude de l'oxydation de l'acide tiénilique par des microsomes de foies de rat et d'homme, cette technique s'est révélée supérieure à celle qui avait été utilisée jusqu'alors et qui était basée sur la détection de l'acide hydroxy-5 tiénilique par chromatographie liquide haute performance (CLHP) après oxydation de l'acide tiénilique radioactif. En effet,

- elle est rapide à mettre en oeuvre (1/4 d'heure). La détection par CLHP requierrait un temps d'analyse relativement long en raison de la séparation de l'acide tiénilique de ses métabolites
- elle permet un suivi cinétique de la réaction. La technique par CLHP fournissait une analyse point par point
- elle ne requiert pas l'utilisation de substrat radioactif.

L'utilisation de cette technique nous a permis de déterminer les constantes cinétiques apparentes de l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique par les microsomes de foies de rats prétraités par le phénobarbital ( $V_m$  de l'ordre de 0,4 nmole de produit formé par nmole de cytochrome P-450 et par minute,  $K_m$  de l'ordre de 14  $\mu$ M). Elle a aussi permis de montrer que cette oxydation dépend du NADPH et de l'O<sub>2</sub> et est catalysée par des monooxygénases à cytochromes P-450.

Nous avons démontré qu'un autre médicament, le suprofen et que 2 autres composés de type aroyl-2 thiophène, le parachlorobenzoyl-2 thiophène (CBT) et

le (dichloro-2',3' methoxy-4')-benzoyl-2 thiophène (MBT), sont aussi hydroxylés en position 5 par les microsomes de foies de rats. Pour ce faire, nous avons préparé de façon non ambiguë des échantillons authentiques de dérivés hydroxylés en 5 de ces composés, et montré qu'ils avaient tous des propriétés physico-chimiques (pKa, absorbance à 390 nm) très analogues à celles de l'acide tiénilique. Les constantes cinétiques déterminées pour l'hydroxylation de ces 3 composés par les microsomes de foies de rats traités au phénobarbital sont proches de celles obtenues dans le cas de l'acide tiénilique ( $V_m$  entre 0,5 et 1,5 nmole par nmole de cytochrome P-450 et par min,  $K_m$  entre 9 et 30  $\mu$ M).

Enfin, nous avons montré qu'une dizaine de composés de type aroyl-2 thiophène avec différents substituants sur le noyau aroyl étaient hydroxylés par les microsomes de foies de rats en position 5 du noyau thiophène, ce qui met bien en évidence la généralité de cette voie métabolique.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes efforcés de préciser la nature des cytochromes P-450 hépatiques impliqués dans l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique ou de composés apparentés.

Le traitement des rats par des inducteurs classiques des cytochromes P-450 tels que le PB, le 3MC ou le PCN modifie peu l'activité d'hydroxylation de l'acide tiénilique, du MBT ou du CBT. Par contre, l'induction au PB augmente significativement l'hydroxylation en 5 du suprofen. Toutefois, le résultat le plus spectaculaire a été obtenu après un traitement des rats par le clofibrate qui conduit, dans le cas de l'acide tiénilique, à une multiplication de l'activité hydroxylante par un facteur 4.

Une augmentation comparable de l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique a été aussi observée après traitement des rats par d'autres hypolipémiants comme le fénofibrate ou le WY 14643 ainsi que par d'autres composés comme le triméthyl-2,2,4 pentane connus pour déclencher une prolifération des peroxisomes et une induction de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique par les microsomes hépatiques. Il est à noter que l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique est la première activité portant sur un médicament (ou composé exogène) aussi fortement et spécifiquement augmentée par les inducteurs type clofibrate.

Les enzymes responsables de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique et de l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique étant induites par le même type de

molécules, différentes approches ont été utilisées pour savoir si les mêmes isoenzymes catalysaient les deux réactions et pour caractériser les enzymes impliquées dans l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique. Pour cela, nous avons utilisé deux types de systèmes :

- les microsomes hépatiques entiers en présence de divers anticorps dirigés contre différents cytochromes P-450 de foies de rats ;
- divers cytochromes P-450 de foies de rats purifiés utilisés en présence de cytochrome P-450 réductases et en présence de phospholipides pour reconstituer les activités enzymatiques.

De ces études il ressort que :

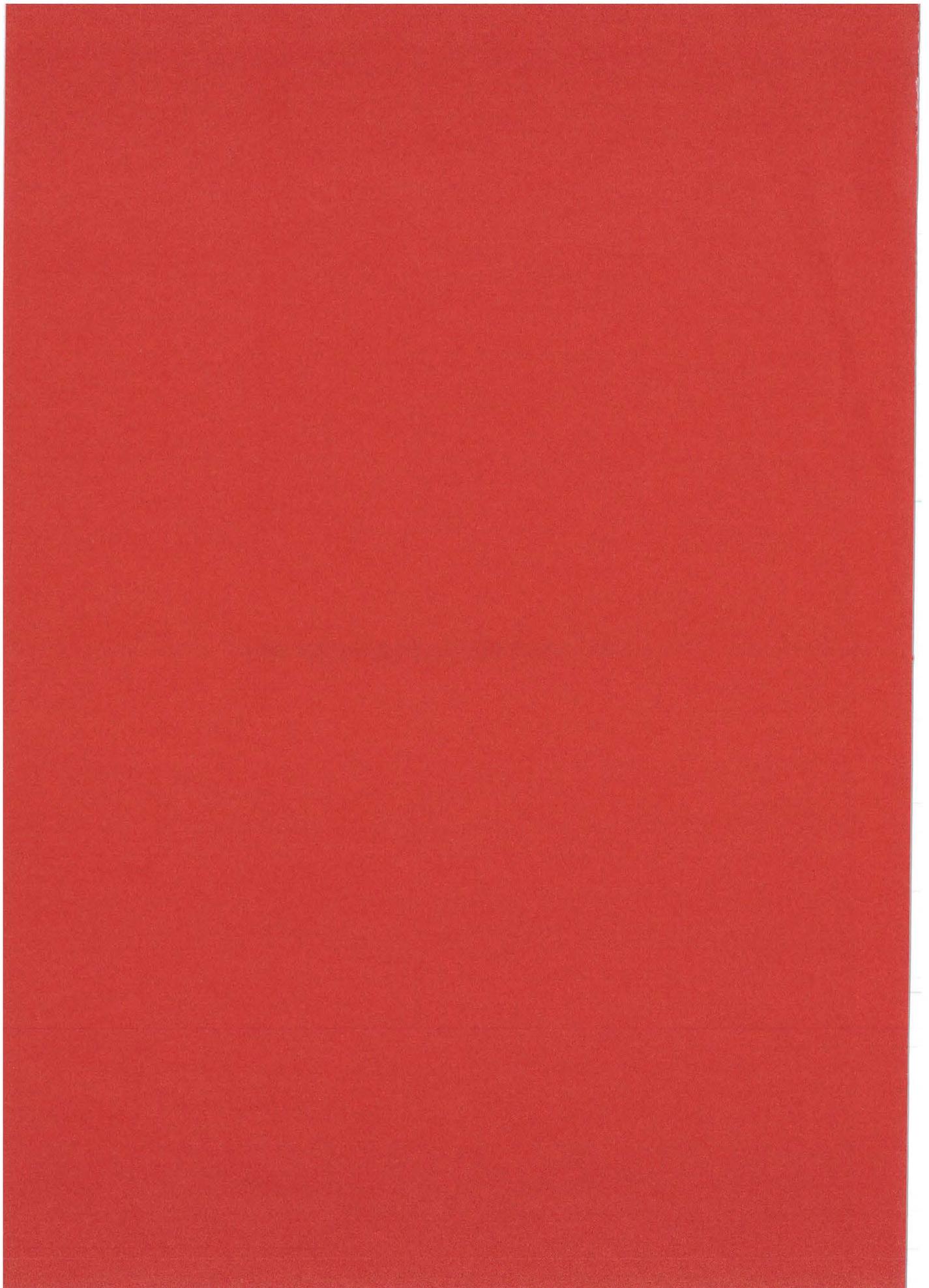
- le cytochrome P-452 qui est l'isoenzyme majeure responsable de l'hydroxylation en 12 de l'acide laurique et qui est spécifiquement induit par le clofibrate, ne catalyse pas l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique. Ceci explique au moins en partie l'absence de corrélation nette observée entre les 2 activités dans des microsomes de rats différemment induits
- des cytochromes P-450 purifiés dont nous disposons, le cytochrome P-450 PB 2a (ou P-450 UTA), isoenzyme majeure du foie de rats non traités, présente la plus forte activité pour l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique
- l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique semble surtout dépendante du cytochrome P-450 PB 2a (UTA) dans les microsomes de foies de rats non traités, du cytochrome P-450 PB 1b dans les microsomes de foies de rats traités au phénobarbital, et d'un autre cytochrome P-450 (différent du cytochrome P-452) dans les microsomes de foies de rats induits au clofibrate. La nature de cette isoenzyme reste à déterminer. Ceci est d'autant plus intéressant qu'il s'agit de l'isoenzyme présentant la plus forte affinité et la plus grande activité vis-à-vis de l'acide tiénilique.

Dans un dernier temps, nous avons essayé de reproduire les réactions d'hydroxylation en 5 des aroyl-2 thiophènes en utilisant des systèmes chimiques biomimétiques. La modélisation de cette réaction enzymatique devrait être d'une grande aide pour la détermination du mécanisme de ces réactions jusqu'alors inconnu.

En utilisant le donneur d'atome d'oxygène  $C_6F_5IO$  en présence d'une métalloporphyrine de manganèse, nous avons pu reproduire l'hydroxylation en 5 de l'acide tiénilique et du suprofen avec des rendements de l'ordre de 15 %. A côté de ces produits d'hydroxylation en 5, il y a formation de quantités

importantes de produits provenant d'une coupure oxydante de la liaison thiophène-C=O. Il est à noter que ces produits de coupure ont aussi été détectés lors du métabolisme de l'acide tiénilique et du suprofen *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus avec les systèmes biomimétiques sont pour l'instant très préliminaires. Toutefois, le fait d'obtenir des produits identiques avec les systèmes biomimétiques et les systèmes enzymatiques est très encourageant pour l'utilisation de ces systèmes biomimétiques dans l'avenir. Ceux-ci devraient permettre la détermination du mécanisme détaillé de l'oxydation métabolique des noyaux thiophènes et de l'origine des métabolites réactifs de l'acide tiénilique et des effets secondaires observés avec ce médicament.

V- PARTIE EXPERIMENTALE



#### V-A APPAREILS DE MESURES ET D'ANALYSE

- Les spectres électroniques ont été réalisés grâce à :

- . un spectrophotomètre UV-visible AMINCO DW2
- . un spectrophotomètre UV-visible UVIKON 820 muni d'une sphère de diffusion.

La température du compartiment contenant les cuves est réglée avec un cryothermostat Haacke.

- La CLHP a été effectuée sur un appareil Touzart et Matignon 380 équipé de pompes A110 et d'un programmeur Altex 330.

- Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker WM 250 opérant à 250 MHz équipé d'un ordinateur Aspect 2000. Les produits sont dissous dans des solvants deutérés CEA. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS. Les constantes de couplage sont en Herz. Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire le spectre :

s singulet ; d doublet ; t triplet ; q quadruplet ; m multiplet.

- Les spectres de masse ont été obtenus grâce à un appareil Nermag R10-10 en impact électronique avec une énergie d'accélération des particules de 70 eV (IE) ou en ionisation chimique utilisant  $\text{NH}_3$  comme vecteur (IC $\text{NH}_3$ ).

- Les plaques analytiques et préparatives sont à base de silicagel 60 Merk F 254 de 0,25 ou 1 mm d'épaisseur.

#### V-B AUTHENTIQUES DES HYDROXY-5 AROYL-2 THIOPHENES : 5OHAT, 5OHSU, 5OHCBT, 5OHMBT

- le 5OHAT nous a été fourni par les laboratoires Anphar Rolland (48)
- le 5OHSU nous a été aimablement envoyé par Y. Mori, Laboratoire de Radiochimie, Université Pharmaceutique de Gifu, Japon (88).

**V-B-1 Synthèse de l'hydroxy-5 parachlorobenzoyl-2 thiophène (50HCBT)**

**\* Préparation du chloro-5 parachlorobenzoyl-2 thiophène**

Dans un ballon ont été mélangés 50 mmoles (6g) de chloro-2 thiophène, 50 mmoles (9g) du chlorure de l'acide parachlorobenzoïque et 70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> le tout sous un courant d'argon. 54 mmoles (7g) de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) pulvérisé au mortier sont ajoutées par petite quantité. Le mélange réactionnel est laissé 3 heures sous agitation à 0°C. L'AlCl<sub>3</sub> en excès est hydrolysé par addition de 70 ml d'eau. Le mélange est filtré sur laine de verre, puis extrait avec 2x70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est lavée deux fois à l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée pour donner 8,20g de produit brut. Une purification par chromatographie sur colonne de silice conduit à 6g de produit cristallisé (rendement 47 %). Après 2 recristallisations dans l'éthanol le produit obtenu présente un point de fusion T<sub>F</sub> = 104°C (T<sub>F</sub> litt. = 105°C réf.(100)).

RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 7,76 (d, 8,5Hz,1H) ; 7,46 (d, 8,5Hz,1H) ; 7,38 (d, 4,2Hz,1H) ; 6,98 (d, 4,2Hz,1H).

**\* Hydroxy-5 parachlorobenzoyl-2 thiophène**

Dans un ballon sont mélangées 0,2 mmoles (50 mg) du produit de la synthèse précédente avec 15 ml d'éthanol. Le tout est porté à 60°C. Puis sont additionnées 35 mmoles de KOH (2g) dans 15 ml d'eau (60°C). Après 16 heures à 60°C, le mélange est filtré. 30 mg (60 %) du produit de départ est ainsi récupéré. La phase aqueuse est lavée à l'éther, puis après acidification extraite à l'éther. Cette phase étherée est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée.

Le brut est purifié par CLHP avec une colonne Chromascience SA type SSC (125x4,6 mm) garnie de nucléosil C<sub>18</sub> 5μ (ref. C06461835) en phase inverse. L'élution est réalisée au moyen d'un gradient acétonitrile-tampon d'acétate d'ammonium (0,1M, pH 4,6) (0 à 60 % en 15 min, 1 ml par min). Les produits sont détectés par UV à 310 nm. La fraction correspondant au produit attendu est extraite après acidification (pH 1) à l'éther. La phase étherée est séchée et évaporée pour donner des cristaux jaunes clairs (rendement 5 %). T<sub>F</sub> = 187°C.

RMN (CD<sub>3</sub>CN) : 7,61 (d, 8,5Hz,2H) ; 7,45 (d, 8,5Hz,2H) ; 7,36 (d, 5,0Hz,1H) ; 6,17 (d, 5,0Hz,1H,échangeable par D<sub>2</sub>O, H<sup>+</sup>).

Masse : (réalisée par V. Andronick) (I.E.) : 240 (7 %) ; 238 (20 %) ; 224 (5 %) ; 222 (15 %) ; 187 (3 %) ; 141 (30 %) ; 139 (100 %) ; 127 (10 %) ; 113 (13 %) ; 111 (40 %) ; 75 (80 %).

Analyse (réalisée par V. Andronick) :  $C_{11}H_7O_2SCl$  ; C, H, Cl ; trouvé : 55,23 ; 3,12 ; 14,6 ; calculé : 55,35 ; 2,96 ; 14,85.

### **V-B-2 Synthèse de l'hydroxy-5 (dichloro-2',3' méthoxy-4')-benzoyl-2 thiophène (5OHMBT)**

#### **\* Chlorure de l'acide chloro-5 carboxy-2 thiophène**

Dans un ballon sont mélangés 12,3 mmoles d'acide chloro-5 carboxy-5 thiophène et 10 ml de benzène à 0°C. 16 mmoles (1,5 ml) de  $SOCl_2$  sont ajoutées goutte à goutte. Puis le mélange est agité une nuit à température ambiante.  $SOCl_2$  et le benzène sont évaporés, ce qui conduit à 2,1 g de produit brut qui sera utilisé sans autre purification.

#### **\* Chloro-5 (dichloro-2',3' méthoxy-4')-benzoyl-2 thiophène**

Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées pour la synthèse du chloro-5 parachlorobenzoyl-2 thiophène. Le rendement est de 60 % en produit cristallisé  $T_f = 162^\circ C$ .

RMN ( $CDCl_3$ ) : 7,32 (d,8,5Hz,1H) ; 7,28 (d,4,2Hz,1H) ; 6,94 (d,4,2Hz,1H) ; 6,90 (d,8,5Hz,1H) ; 3,97 (s,3H). Spectre RMN en accord avec la structure.

#### **\* Hydroxy-5 (dichloro-2',3' méthoxy-4')-benzoyl-2 thiophène**

Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées pour la synthèse de l'hydroxy-5 parachlorobenzoyl-2 thiophène. Le rendement est de 6 % (+ 54 % de produit de départ inchangé).

RMN ( $CD_3CN$ ) : 7,32 (d,8,3Hz,1H) ; 7,18 (d,5,0Hz,1H) ; 7,05 (d,8,3Hz,1H) ; 6,09 (d,5,0Hz,1H) ; 3,95 (s,3H).

Masse du produit après méthylation au diazométhane ( $IC, NH_3$ ) 320 (60 %) , 318 (100 %) , 316 ( $M^+$ , 25 %) , 286 (28 %) , 254 (15 %).

### V-B-3 Propriétés acidobasiques et UV-visibles des 5OHAT, 5OHSU, 5OHCBT, 5OHMBT

#### V-B-3-a Détermination du pK de la fonction OH en 5 sur le noyau thiophène

Des solutions ont été préparées pour accéder à des tampons de différents pH :

- tampons HCl/KCl : pH 1 à pH 2,2
- tampons glycine/HCl : pH 2,2 à pH 2,8
- tampons acide citrique/phosphate de sodium : pH 2,6 à pH 7
- tampons tris/HCl : pH 7,2 à pH 9
- tampons carbonate/bicarbonate de sodium : pH 7,2 à pH 9 (214).

Les dérivés hydroxylés sont mis en solution, à des concentrations identiques ( $10^{-5}M$ ) dans ces tampons de pH 1 à pH 9 toutes les 0,4 unités de pH. Le spectre UV visible est enregistré entre 500 et 250 nm. La titration de la fonction OH en position 5 sur le noyau thiophène est réalisée par mesure de l'intensité de la bande d'absorption vers 385 nm en fonction du pH. Le pK est déterminé en portant en abscisses le pH et en ordonnées la DO à 390 nm. L'abscisse du point d'inflexion de la courbe obtenue donne le pK de la fonction OH acide (voir exemple de la figure 17).

#### Détermination de l'É des différents composés à 390 nm.

- 5OHAT et 5OHSU : le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) a été déterminé par pesée puis mesure de la DO d'une solution diluée à une concentration de  $10^{-5}M$  dans un tampon HCl/tris 0,05 M pH 7,4.

- 5OHCBT et 5OHMBT : une solution dans  $D_2O$  d'authentique hydroxylé en 5 est ajoutée à un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Une quantité connue d'étalon (dioxanne) est ajoutée à la solution dans le but d'obtenir dans le spectre RMN un signal d'intensité comparable à ceux de l'authentique. Un spectre RMN est alors enregistré avec un temps de relaxation suffisamment long entre chaque scan (5 secondes). Enfin une comparaison quantitative des intégrations du signal de l'étalon et de ceux de l'authentique permet de déterminer sa concentration. Un aliquot de la solution est prélevé et dilué jusqu'à une concentration de l'ordre de  $10^{-5}M$ . La mesure de la DO permet d'accéder à l'É.

## V-C OBTENTION DES MICROSOMES DE FOIES DE RATS INDUITS

### V-C-1 Traitement des animaux par les inducteurs du cytochrome P-450

Des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley pesant de 200 à 250 g et provenant de chez Iffa-Credo sont placés en animalerie en cages plastiques par groupe de 5 avec une litière de sciure de bois. Ils disposent librement d'eau du robinet et d'alimentation standard fournie par la Société UAR (Gille-Moisson sur Orge).

Les traitements suivants ont été réalisés :

- **le phénobarbital (PB)** a été administré en solution dans l'eau de boisson à une concentration de 0,1% pendant 5 jours après une 1<sup>ère</sup> injection de 80 mg/kg en solution dans NaCl 0,9 % par voie i.p.

- **le cyano-16  $\alpha$  prégnénolone (PCN)** en suspension dans l'huile de maïs (5 mg/ml) a été administré par une voie i.p. à la dose de 25 mg/kg et par jour pendant 5 jours.

- **le clofibrate (CLO)** a été administré :

- . d'une manière générale : par voie i.p. en solution dans l'huile de maïs (2,5 ml/kg) à la dose de 500 mg/kg et par jour pendant 4 jours.

- . pour l'étude chapitre II A2 : par voie i.p. en solution dans l'huile de maïs (2,5 ml/kg) à la dose de 500 mg/kg et par jour pendant 1 et 8 jours.

- . par tubage gastrique : en solution dans l'huile de maïs et dans la méthyl cellulose (2,5 ml/kg) à la dose de 250 mg/kg et par jour pendant 4 jours.

- **l'huile de maïs** a été administrée par voie i.p. à la dose de 2,5 ml/kg et par jour pendant 5 jours

- **le fénofibrate** nous a été fourni par le laboratoire Fournier. Ce dérivé a été administré par voie i.p. dans l'huile de maïs à la dose de 500 mg/kg et par jour pendant 4 jours.

- **le WY 14643** (tableau 12) produit de recherche des laboratoires Wyeth-Byla nous a été envoyé par Daniel Dournaux, Directeur Général de Wyeth-Byla, France. Ce dérivé a été administré par tubage gastrique en suspension aqueuse avec quelques gouttes de tween 80 à la dose de 200 mg/kg/j pendant 7 jours consécutifs.

- **le triméthyl-2,2,4 pentane (TMP)** en solution dans l'huile de maïs (5 ml/kg) a été administré par gavage à la dose de 12 mmoles/kg et par jour pendant 10 jours.

Les rats sont privés de nourriture 1 jour avant d'être sacrifiés. La mort est provoquée par dislocation des cervicales. Les animaux sont saignés par section de la carotide et le foie est prélevé. Les microsomes hépatiques sont préparés suivant les méthodes usuelles décrites en V-C-2. Les microsomes sont ensuite congelés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Avec ce type de conservation, leurs concentrations en cytochrome P-450 ne varient pas significativement pendant plusieurs mois.

### **V-C-2 Préparation des microsomes de foies de rats**

Les foies perfusés par NaCl 0,154 M jusqu'à décoloration (élimination de l'hémoglobine) sont découpés en petits dés dans du tampon sucrose 0,2M, TRIS 0,1 M, EDTA 1 mM, puis homogénéisés dans un appareil de Potter-Elvehjem (20 à 40 g de foie pour 100 ml de tampon). Le surnageant est centrifugé 20 min à 13500g (précipitation des mitochondries). Le surnageant obtenu est centrifugé 1h à 100000g. Le glycogène et les microsomes précipitent. Le surnageant contient le cytosol. Le culot obtenu est homogénéisé dans un tampon pyrophosphate de sodium 100 mM pH 7,5 puis centrifugé 30 min à 100000g (élimination de l'hémoglobine qui cosédimente). Le culot obtenu est homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 100 mM, glycérol 20g pour 100 ml, pH 7,4. Ce dernier constitue les microsomes qui sont congelés dans l'azote liquide et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Toutes les manipulations sont effectuées à  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### **V-C-3 Dosages effectués sur les microsomes fraîchement préparés**

Trois dosages sont immédiatement effectués après préparation des microsomes. Le cytochrome  $b_5$  est dosé par spectroscopie UV-visible différentielle entre la suspension microsomale réduite par quelques grains de dithionite de sodium (cuvette échantillon) et la suspension microsomale non traitée ( $\epsilon$  427-410 nm =  $181 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ). La concentration des microsomes en cytochromes P-450 est déterminée par la méthode de Omura et Sato : les

hémoprotéines contenues dans les deux cuvettes sont réduites par l'addition de quelques grains de dithionite et la cuvette échantillon est saturée en monoxyde de carbone par barbotage ( $\epsilon_{450-490 \text{ nm}} = 91 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )(215). La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Lowry en utilisant la sérumalbumine de boeuf comme standard (216).

## V-D MÉTHODES D'ÉTUDES DE L'OXYDATION MÉTABOLIQUE DES DÉRIVÉS THIOPHÉNIQUES

### V-D-1 Origine de dérivés utilisés comme substrats

- l'acide tiénilique nous a été fourni par Mr. Levy des laboratoires Anphar-Rolland.

- le suprofen nous a été fourni par le laboratoire Janssen

- le (chloro-4 benzoyl)-2 thiophène (CBT) a été synthétisé selon Buu Hoi et coll. (100)

- le MBT a été préparé par méthylation au diazométhane du (dichloro-2',3' hydroxy-4')-benzoyl-2 thiophène fourni par le laboratoire Anphar-Rolland.  
 RMN ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) : 7,80 (dd,6,0 et 1,5Hz,1H) ; 7,43 (dd,3,6 et 1,5Hz,1H) ; 7,39 (d,8,5Hz,1H) ; 7,15 (dd,6,0 et 3,6Hz,1H) ; 6,98 (d,8,5Hz,1H).

- L'ensemble des dérivés de type aroyl-2 thiophène dont un hydrogène du noyau aromatique est substitué par un groupement nitro, méthyl, orthométhyl, brome, chlore en différentes positions (voir tableau 10) nous a été envoyé par Mr. Andrieu, du laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Caen (99).

- La thénylidone a été obtenue par extraction du principe actif du thiophantile<sup>R</sup> commercialisé par les laboratoires Ana,

- le nocodazole<sup>R</sup> (R 17934) nous a été fourni par les laboratoires Janssen,

- le morante<sup>R</sup> nous a été fourni par les laboratoires Pfizer,

- le chlorure de tiodonium<sup>R</sup> nous a été fourni par les laboratoires Merrel Dow,

- la dithiénone a été synthétisée par P. Dansette au laboratoire selon la méthode décrite par Andrieu et coll.(99) à partir de chlorure de thénoyle et de thiophène.

$T_F$  : 92°C     $T_F$  littérature : 87°C (99)

RMN : 7,90 (dd, 4,5 et 1,4Hz, 2H) ; 7,70 (dd, 1,4 et 5,8Hz, 2H) ; 7,19 (dd, 5,8 et 4,5Hz, 2H).

Masse : (IC, NH<sub>3</sub>) 212 (M+18, 27 %), 195 (M+1, 100 %), 111 (52 %).

**V-D-2 Méthode de suivi cinétique en UV de la formation des hydroxy-5 acyl-2 thiophènes au sein d'une solution microsomale ou d'une solution de système enzymatique purifié reconstitué.**

**- Préparation de la solution microsomale contenant le NADPH**

Le compartiment destiné à recevoir les cuves de mesure d'un spectrophotomètre UV visible AMINCO DW2 est réglé à 37°C. Les cuves de mesure sont en verre, à bords noirs afin de diminuer la diffusion de la lumière par la solution microsomale. Le trajet optique est de 1 cm. On a à disposition, maintenus à 5°C :

. des microsomes fraîchement décongelés de -80°C et n'ayant pas subi de décongélation antérieure

. une solution de système produisant le nicotinamide dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et contenant du glucose-6 phosphate (G6P), de la glucose-6 phosphate deshydrogénase (G6PDH) et du nicotinamide dinucléotide phosphate provenant de chez Boehringer dans un tampon phosphate de sodium 0,1M à pH 7,4. On met dans les cuves échantillons et références 300 µl d'une solution contenant les microsomes et la solution de cofacteur ajustée pour obtenir une concentration finale de 10 mM en glucose-6 phosphate, 2 unités/ml de G6PDH et 1mM en NADP ainsi que de 0,4 à 1,5 mg de protéines microsomales par ml.

**- Détection des hydroxy-5 acyl-2 thiophènes**

Les cuves contenant le système générant le NADPH et soit la solution microsomale, soit les éléments indispensables au fonctionnement du système enzymatique purifié sont mises à température pendant 2 minutes à 37°C. La réaction est démarrée par addition du substrat 10<sup>-6</sup> à 5.10<sup>-4</sup>M dans la cuve échantillon et agitation manuelle à l'aide d'une spatule plastique. La réaction est suivie 390nm, 2 minutes après la fin de l'agitation.

L'acide tiénilique et le suprofen sont ajoutés en solution dans un tampon tris pH 7,4. Les autres dérivés testés sont introduits en solution méthanolique sous un volume correspondant à 1 % du volume final, sauf le nocodazole qui est introduit en solution dans le DMSO dans des conditions identiques. Sauf dans les cas précisés, l'AT a été utilisé à une concentration finale de  $10^{-4}M$  et le suprofen à une concentration finale de  $2 \cdot 10^{-4}M$ .

#### **V-D-3 Méthode de détection par CLHP de la formation du 5OH AT à partir d'AT marqué au $^{14}C$ au sein d'une solution microsomale**

La méthode est celle décrite dans la référence 2.

Les concentrations en microsomes et en système engendrant le NADPH sont celles décrites précédemment. Le substrat est marqué au  $^{14}C$  sur la fonction cétone (5 Ci/moles, 30 nmoles/300  $\mu$ l) et utilisé mélangé à du substrat froid ( $10^{-4}M$  final). Après incubation, 600  $\mu$ l de méthanol contenant 6 nmoles de 5OHAT non marqué sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les protéines ainsi précipitées sont centrifugées à 2000 g et le surnageant est transféré dans un nouveau tube et concentré sous un flux de  $N_2$  pour atteindre un volume de 200  $\mu$ l. La solution est gardée à 4°C jusqu'à l'analyse par CLHP.

Les produits de réaction sont séparés par CLHP en phase inverse sur une colonne MDS hypersil 5u 8 1/4"x250mm (SFCC) éluée à 1 ml/min par un gradient d'acétonitrile (0 à 50 % en 20 minutes) dans un tampon d'acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,6 et détectés en UV à 310 nm. Les fractions sont collectées dans des tubes en propylène de 3 ml toutes les 0,5 min et la radioactivité est quantifiée après addition de 2 ml de Picofluor 30 (Packard), dans un compteur à scintillation Packard Tricarb 300. La quantité de 5OHAT est déterminée en totalisant la radioactivité située sous le pic UV.

#### **V-D-4 Méthode de détection par CLHP de l'hydroxylation en 11 et 12 de l'AL à partir d'AL marqué**

Les produits d'hydroxylation de l'AL en position 11 et 12 sont formés par incubation de l'AL soit avec une solution microsomale dans un 1er cas, soit avec le système reconstitué des cytochromes P-450 purifiés dans un second cas. La

détection de ces produits d'hydroxylation est réalisée d'après la méthode décrite par Fan et coll.(133).

Environ 7 nmoles d'AL marqué sur le carboxy C<sub>14</sub> (50 µCi/µmole) en solution dans 5 µl d'hexane sont déposées au fond d'un tube. L'hexane est évaporé sous un courant d'azote. On ajoute la solution d'AL froid dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4. (50 µl par incubation d'une solution 2 mM). (Deux fractions identiques sont comptées en scintillation liquide après addition de 2 ml de picofluor).

- Dans le 1er cas 50 µl d'une solution microsomale sont additionnés pour obtenir une concentration finale de 0,2 nmole de cytochrome P-450/ml. On complète par un volume de 335 µl de tampon phosphate 0,1M pH 7,4. Enfin, la solution engendrant le NADPH est ajoutée sous un volume de 60 µl pour démarrer la réaction et atteindre les concentrations finales de 10 mM en G6P, 2 u/ml en G6PDH et 1mM en NADP.

- Dans le second cas on utilise la solution contenant le cytochrome P-450 purifié, la cytochrome P-450 réductase et les lipides préparés selon le protocole décrit en V-F-2. Celle-ci est complétée à 445 µl avec une solution permettant d'obtenir une concentration finale de 10 mM en G6P, 2u/ml en G6DPH et 1 mM en NADP dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4. Dans les 2 cas, le volume final de 500 µl est incubé sous agitation 20 min à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 250 µl d'une solution CH<sub>3</sub>OH/HCl 1N (3/1). L'ensemble est extrait 2 fois par 2 ml d'AcOEt après avoir augmenté la force ionique de la phase aqueuse en ajoutant 150 µl d'une solution saturée en NaCl et agité au vortex 1 min. La radioactivité de la phase aqueuse est quantifiée par comptage en scintillation liquide. L'acétate d'éthyle est évaporé de la phase organique puis celle-ci est reprise par 500 µl d'un mélange (50/50) d'acide hydroxy-11 laurique et d'acide hydroxy-12 laurique à 0,2 mg/ml. 300 µl de ce mélange sont analysés par CLHP sur une colonne chromascience type C<sub>18</sub> 5µ. L'élution est réalisée à 1 ml/min par un gradient de solvant B de 0 à 100 % en 12 min dans le solvant A puis pendant 13 min par le solvant B pur.

Le solvant de migration A est un mélange de CH<sub>3</sub>CN 37 % dans l'AcONH<sub>4</sub> 0,1M pH 4,6. Le solvant B est composé de CH<sub>3</sub>CN pur. Les fractions de 500 µl sont recueillies et la radioactivité est quantifiée après addition de 2 ml de picofluor par comptage en scintillation liquide.

## V-E PROTOCOLES UTILISÉS POUR INHIBER L'ACTIVITÉ AT HYDROXYLASE

### **V-E-1 Effet des inhibiteurs**

Les conditions opératoires sont celles décrites précédemment. L'introduction de l'inhibiteur a été réalisée dans les conditions suivantes :

#### **V-E-1-a CO (tableau 7)**

La solution contenant les microsomes et le système générant le NADPH est soumise à un courant gazeux contenant un mélange (CO/O<sub>2</sub> = 80/20) pendant 1 minute. Le résultat est exprimé par rapport à une solution témoin soumise à un courant d'air.

#### **V-E-1-b Inhibiteurs classiques du cytochrome P-450 (tableau 7)**

Le SKF 525A, la métyrapone, l' $\alpha$  naphthoflavone ont été incubés 1 min dans la solution microsomale contenant le système générant le NADPH avant addition de l'AT. Les inhibiteurs sont en solution méthanolique sous un volume correspondant à 1 % du volume final.

#### **V-E-1-c Inhibition par l'acide laurique (figure 30)**

L'acide laurique en solution dans le tampon phosphate 0,1M pH 7,4 est introduit simultanément avec l'acide tiénilique dans la cuve échantillon.

### **V-E-2 Effet des anticorps**

#### **V-E-2-a Anticorps anti-flavine monooxygénase (figure 18)**

Les anticorps anti-flavine monooxygénase (IgG) ont été obtenus par Evelyne Rouer au laboratoire de Biochimie de Necker (Groupe du Pr.J.P.Leroux, INSERM U75) après injection de la protéine purifiée provenant de rats non traités à des lapins femelles de race New Zealand (146). Les anticorps sont ajoutés dans la cuve UV contenant les microsomes et la solution générant le NADPH. Le tout est agité et préincubé 5 min. à 37°C avant addition de l'AT. Le spectrophotomètre AMINCO DW2A est utilisé en mode différentiel. La mesure du 5OHAT formé est réalisée par étude de la différence de DO entre 390 nm et 490 nm (point isobestique). L'activité est exprimée par rapport à l'activité dosée en

présence d'une quantité correspondante d'IgG provenant de sérums de lapins non traités.

#### V-E-2-b Anticorps anti-cytochrome P-450 réductase (figures 10 et 17)

Les anticorps anti-cytochrome P-450 réductase (IgG) ont été obtenus par Evelyne Rouer au laboratoire de Biochimie de Necker après injection de la protéine purifiée provenant de rats non traités à des lapins femelles de race New Zealand (83). Dans ce cas, un tampon Tris 100 mM, 10 mM en MgCl<sub>2</sub> pH 8 a été utilisé à la place du tampon phosphate habituel. Comme précédemment, les anticorps sont ajoutés dans la cuve UV contenant les microsomes et la solution générant le NADPH. L'ensemble est préincubé 5 min à 37°C avant l'addition de l'AT. Le mode de détection du 5OHAT est différentiel ( $\lambda = 390\text{nm}-490\text{nm}$ ). L'activité est exprimée par rapport à l'activité dosée en présence d'une quantité correspondante d'IgG provenant de sérums de lapins non traités.

#### V-E-2-c Anticorps et sérums anti-cytochromes P-450 hépatiques de rats

Les anticorps polyclonaux nous ont été fournis par Roland Wolf et proviennent du laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et de Métabolismes des Xénobiotiques d'Edimbourg. Ils ont été obtenus après injection de la protéine purifiée provenant de rats mâles Wistar chez le lapin (137). Ce sont :

- sous forme de sérums, les anti-cytochromes P-450 : PB 1a, PB 1b, PB 2c et PB 3a
- sous forme d'IgG (anticorps polyclonaux) l'anti-cytochrome P-450 PB 2a.

Les anticorps sont incubés 20 min à 5°C avec les microsomes. La solution contenant le système engendrant le NADPH est ensuite ajoutée et l'ensemble est réparti dans les 2 cuves UV. Le protocole expérimental est ensuite inchangé.

#### V-E-2-d Sérum humain contenant les anti-LKM<sub>2</sub>

Le sérum contenant les anti-LKM<sub>2</sub> est incubé 20 min à 5°C avec les microsomes. La solution contenant le système engendrant le NADPH est ajoutée et répartie comme précédemment.

## V-F RECONSTITUTION DES SYSTEMES ENZYMATIQUES PURIFIÉS

### V-F-1 Reconstitution du système des flavines monooxygénases

La flavine monooxygénase a été purifiée à partir de foies de rats non traités par Evelyne Rouer (146). 0,12 nmole (10  $\mu$ l) de flavine monooxygénase sont incubés à 37°C pendant 5 min avec la solution contenant le système engendrant le NADPH en présence de tampon tris 100 mM pH 8 contenant du  $MgCl_2$  10 mM.

- Activité thiobenzamide-S oxydase : le thiobenzamide est ajouté en solution dans  $CH_3CN$  pour obtenir une concentration finale de  $10^{-4}M$ . On observe l'augmentation de la DO à 370 nm, caractéristique de la formation du thiobenzamide-S-oxyde (147).

- Activité acide tiénilique hydroxylase : l'acide tiénilique est ajouté en solution dans le tampon tris pour une concentration finale de  $10^{-4}M$ . On observe l'évolution de la DO entre 600 et 370 nm comme décrit en V-D-2.

### V-F-2 Reconstitution du système des monooxygénases à cytochrome P-450

Les cytochromes P-450 et la cytochrome P-450 réductase utilisés nous ont été fournis par Roland Wolf. Ils ont été purifiés à partir de foies de rats mâles Wistar au laboratoire de Pharmacologie Moléculaire et de Métabolisme des Xénobiotiques d'Edimbourg (137). 0,025 mg de dilaurylphosphatidylcholine en solution dans 5  $\mu$ l de chloroforme sont déposés dans un tube et le  $CHCl_3$  est évaporé sous un courant d'azote. On ajoute 0,2 nmoles de P-450 et 12  $\mu$ l (2,3 u) de cytochrome P-450 réductase. Le tout est agité une minute au vortex et préincubé à 37°C pendant 15 min. On complète alors à 600  $\mu$ l avec la solution portée à 37°C de système produisant le NADPH dans un tampon tris HCl 50 mM pH 7,4 pour obtenir une concentration finale de G6P 10 mM, G6PDH 2 u/ml et NADPH 1mM. L'ensemble est agité au vortex 1 min puis réparti dans les cuves du spectrophotomètre (2 fois 300  $\mu$ l). Après 2 min, le substrat est ajouté dans la cuve échantillon. Les mesures de l'activité AT hydroxylase et SU hydroxylase se font par la méthode UV décrite précédemment en V-D-2 ( $\lambda = 390$  nm, température = 37°C).

## V-6 OXYDATION DE DIVERS THIOPHENES PAR LES SYSTEMES MODELES DES CYTOCHROMES P-450 À MÉTALLOPORPHYRINES

### V-6-1 Les produits utilisés

V-6-1-a Les métalloporphyrines : les deux catalyseurs utilisés Mn(TDCPP)(Cl) et Fe(TDCPP)(Cl) ont été synthétisés au laboratoire par Mme. P. Battioni selon les techniques décrites par Wagner (217) et Lindsey (218).

V-6-1-b L'oxydant : Le C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO nous a été donné par Isabelle Arthaud. Le procédé de synthèse est celui décrit par Traylor (183).

Le C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>IO a été synthétisé au laboratoire par Jean-Pierre Lallier (219).

V-6-1-c Les substrats : Le benzo(b)thiophène est commercial. Le diphenyl-2,5 thiophène nous a été donné par Mme. Gharbi, Paris VI.

### V-6-2 Etude par CLHP de l'oxydation de l'AT par C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO catalysée par les métalloporphyrines

- protocole d'oxydation utilisant AT\* : 100 nmoles d'acide tiénilique marqué (2,5 µCi) et 10 µmoles (3,3 mg) d'acide tiénilique froid sont dissoutes dans 1 ml d'acétonitrile dans lequel a été préalablement solubilisé 0,5 µmole de Mn(TDCPP)(Cl) (0,45 mg). Le tout constitue la solution S. On ajoute 10,1 µmoles de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO (3,1 mg) à S. L'ensemble est agité à température ambiante. Après 5 minutes un aliquot de 50 µl est prélevé et traité par 50 µl d'une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,1M et de 10 µl d'une solution aqueuse de pH 9 de 5OHAT à 0,3 mg/ml. Un deuxième équivalent de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>IO (10,2 µmoles) est ajouté à S et après 5 minutes on prélève un aliquot S<sub>2</sub>. Cette opération est répétée jusqu'à 5 équivalents.

- analyse des aliquots prélevés : 40 µl de chaque aliquot sont injectés sur une colonne en phase inverse chromatographie type SSC (4,6x60mm) garnie de nucléosil C<sub>18</sub> 5 µ (ref. C06461835) et analysés selon la technique décrite en (2).

- analyse du brut final : a la solution S ayant reçu 5 équivalents de  $C_6F_5IO$ , on ajoute 0,5 ml de  $CH_2Cl_2$ . Ce mélange est alors extrait à l'eau bicarbonatée 0,1M en  $Na_2S_2O_5$ . L'acide tiénilique et ses produits d'oxydations sont ainsi séparés de la porphyrine. La phase aqueuse est alors analysée par CLHP dans les conditions décrites précédemment.

### **V-6-3 Etude des oxydations biomimétiques par RMN $^1H$**

1  $\mu$ mole de  $Mn(TDCPP)(Cl)$  (0,9 mg) est solubilisée dans 160  $\mu$ l de  $CD_2Cl_2$ . On ajoute alors 20  $\mu$ moles de substrat (6,6 mg d'AT) en solution dans 330  $\mu$ l de  $CD_3CN$ . Un premier spectre est alors enregistré. 1 équivalent (6,1 mg), puis 2 et encore 2 équivalents de  $C_6F_5IO$  sont ajoutés et 15 min après chaque addition un spectre est enregistré. Eventuellement, un étalon interne est ajouté pour la quantification (dioxanne en solution dans  $CD_3CN$ ).

### **V-6-4 Caractérisation des produits d'oxydation obtenus par les réactions d'oxydations catalysées par les métalloporphyrines**

#### **V-6-4-a Benzo(b)thiophène sulfone (BTSO<sub>2</sub>)**

Dans un tube 1  $\mu$ mole de  $Mn(TDCPP)(Cl)$  (0,9 mg) est solubilisée dans 0,5 ml d'un mélange  $CH_3CN/CH_2Cl_2 = 2/1$ . 20  $\mu$ moles (2,7 mg) de benzothiophène sont alors ajoutées ainsi que 100  $\mu$ moles de  $C_6F_5IO$  (30 mg) en 5 fois pendant 15 min sous agitation. Après 15 min à température ambiante, le solvant est évaporé et le mélange réactionnel est déposé sur une plaque de silice. Après élution par  $CH_2Cl_2$  on isole la sulfone avec un rendement de 61 % (2 mg).

CCM ( $CH_2Cl_2$ )  $R_f = 0,33$ .  $T_F = 140^\circ C$ . ( $T_F$  litt. =  $143^\circ C$ , 220).

RMN ( $CD_3CN/CD_2Cl_2 = 3/1$ ) : 7,63 (d,7Hz,1H) ; 7,52 (m,2H) ; 7,41 (d,7Hz,1H) ; 7,30 (d,6,6Hz,1H) ; 6,60 (d,6,6Hz,1H).

Masse (IE) 166 ( $M^+$ , 47 %) ; 137 (100 %).

#### **V-6-4-b Benzo(b)thiophène sulfoxyde (BTSO)**

Dans un tube regard, 5  $\mu$ moles de  $Fe(TDCPP)(Cl)$  (4,5 mg) sont solubilisées dans 2 ml de  $CHCl_3$ . 100  $\mu$ moles (13,5 mg) de benzothiophène sont

alors ajoutées ainsi que 100  $\mu$ moles (22 mg) de  $C_6H_5IO$  en 4 fois pendant 10 min sous agitation. Après solubilisation de ce dernier, le chloroforme est évaporé et le mélange réactionnel est déposé sur une plaque de silice. Après élution par un mélange de  $CH_2Cl_2/CH_3OH$  (9/1) on isole le benzo[b]thiophène sulfoxyde avec un rendement de 23 % (3 mg).

CCM ( $CH_2Cl_2/MeOH$ : 9/1) :  $R_f = 0,57$ .  $T_F = 105^\circ C$ .

RMN ( $CDCl_3$ ) : 7,90 (d,6,5Hz,1H) ; 7,49 (m,3H) ; 7,20 (d,6,0Hz,1H) ; 7,07 (d,6,0Hz,1H).

Masse (IC,  $NH_3$ ) : 284 (dimère, 10 %) ; 270 (dimère, 17 %) , 253 (dimère, 70 %) , 235 (dimère, 16 %) , 184 (24 %) , 168 ( $M+NH_4^+$ , 89 %) , 151 ( $M+H^+$ , 100 %) , 134 (28 %).

**V-6-5 Préparation d'échantillons authentiques pour la**  
**caractérisation des produits issus de l'oxydation par**  
**les métalloporphyrines : sulfoxyde et sulfone du**      **diphényl-2,5**  
**thiophène**

A une solution de 50 mmoles (12,6 mg) de diphénylthiophène dans 25 ml de  $CH_2Cl_2$  est ajoutée goutte à goutte, sous agitation à  $0^\circ C$ , une solution de 150 mmoles (26 mg) d'acide métachloroperbenzoïque dans 50 ml de  $CH_2Cl_2$ . Après l'addition le mélange réactionnel est laissé 1 heure à  $10^\circ C$ . La solution est filtrée pour éliminer l'acide métachlorobenzoïque.

On extrait par  $NaHCO_3$ , 3x50 ml, puis on sèche sur  $Na_2SO_4$ . Le brut de réaction est évaporé et déposé sur une plaque de silice (Merk F 254 - 1mm) et élué par  $CH_2Cl_2$ . On observe 5 bandes dont 2 majoritaires :  $R_f$  0,6 jaune et  $R_f$  0,2 incolore.

- diphényl 2,5-thiophène sulfoxyde (Rdt : 80 %)

CCM ( $CH_2Cl_2$ ) :  $R_f = 0,20$ .

RMN ( $CDCl_3$ ) : 7,92 (dd,8,0Hz,1,5Hz,4H) ; 7,56 (tt,7,0Hz,1,5Hz,2H) ; 7,43 (dd,8,0Hz,7,0Hz,4H) ; 7,14 (s,2H)

Masse (IC,  $NH_3$ ) : 270 ( $M+18$ , 2 %) ; 252 ( $M^+$ , 1,5 %) ; 237 (100 %).

- diphényl-2,5 thiophène sulfone (Rdt : 8 %)

CCM ( $CH_2Cl_2$ ) :  $R_f = 0,70$ .

RMN ( $CDCl_3$ ) : 7,78 (m,4H) ; 7,45 (m,6H) ; 7,09 (s,2H). Spectre en accord avec la littérature (213).

Masse (IE) : 268 (M, 24 %) ; 220 (29 %) ; 202 (4 %) ; 102 (100 %).

ANNEXEETUDE PRELIMINAIRE DES ENZYMES IMPLIQUEES  
DANS L'HYDROXYLATION EN 5 DU SUPROFEN

L'étude de l'hydroxylation en 5 du suprofen réalisée en présence de microsomes hépatiques de rats traités par différents inducteurs a permis de préciser les points suivants :

- les formes induites par le phénobarbital semblent prendre en charge majoritairement l'activité suprofen hydroxylase
- les formes de cytochromes P-450 induites par le clofibrate ne semblent catalyser que secondairement la réaction.

Malgré la structure aroyl-2 thiophène commune, le suprofen et l'AT ne semblent donc pas pris en charge par les mêmes cytochromes P-450. Pour confirmer cette différence de comportement, deux types d'études précédemment réalisées dans le cas de l'AT ont été menées avec le suprofen.

. D'une part, l'utilisation de cytochromes P-450 purifiés de foies de rats pour catalyser l'hydroxylation du suprofen.

. D'autre part, l'effet d'AC anti-cytochrome P-450 sur l'activité SU hydroxylase microsomale de rat.

Ces études restent très préliminaires et sont insuffisantes pour déterminer les enzymes impliquées dans l'hydroxylation du suprofen. Les résultats obtenus seront présentés en regard de ceux déjà mentionnés dans le cas de l'AT et analysés afin de mettre en évidence la spécificité de chaque substrat.

Utilisation de cytochromes P-450 purifiés de foies de rats  
pour catalyser l'hydroxylation du suprofen.

L'activité suprofen hydroxylase de 10 cytochromes P-450 purifiés (III-C-3-b) a été reconstituée en présence de dilaurylphosphatidylcholine et de cytochrome P-450 réductase dans les mêmes conditions que dans le cas de l'AT. Les résultats obtenus sont présentés tableau 27. Trois formes de cytochromes P-450 induites de façon mineure par le phénobarbital catalysent la réaction de façons sensiblement comparables : les formes PB 1a, PB 1b et de façon moindre, PB 2a. L'activité marquée de la forme PB 2a dans le cas de l'hydroxylation de l'AT n'est pas observée dans le cas de l'hydroxylation du suprofen. La forme PB 2a reconnaît donc la structure de l'AT de façon préférentielle. Mais contrairement à ce qui a été observé dans le cas de l'AT, le cytochrome MC 1a catalyse de façon efficace l'hydroxylation du suprofen. Les formes PB 2c, PB 3a, PB 3b, Mc 1b, UT1 et P-452 ne catalysent pas la réaction.

#### Utilisation d'AC anti-cytochrome P-450 sur l'activité suprofen hydroxylase

Des anticorps dirigés contre les formes PB 1a, PB 1b, PB 2c et PB 3a ont été testés sur l'hydroxylation du suprofen catalysée par les microsomes de foies de rats traités par le phénobarbital et le clofibrate. Les résultats obtenus sont présentés tableau 28 et figure 49. Dans les deux types d'induction, conformément aux résultats obtenus avec les cytochromes P-450 purifiés, les anti PB 2c et les anti PB 3a n'inhibent pas la réaction. Les anticorps anti PB 1b et anti PB 1a utilisés à la concentration de 20  $\mu$ l de sérum/0,2 nmoles de P-450 inhibent l'hydroxylation de l'AT catalysée par les microsomes PB respectivement de 80 et 55 %.

Ceci confirme donc la participation notable des formes PB 1a et PB 1b à la réaction, observée en présence de P-450 purifié.

#### Conclusion

L'activité suprofen hydroxylase est supportée : par la forme PB 2a, par les formes PB 1a et PB 1b qui jouent un rôle majeur dans les microsomes de rats traités par le phénobarbital, et par la forme MC 1a. Cette activité se

Tableau 27. Activité des cytochromes P-450 purifiés de foie de rat sur l'hydroxylation du SU ( $2 \cdot 10^{-4}M$ ).

P-450	suprofen hydroxylase nmoles/nmole P-450/min
PB 1a	0,85
PB 1b	0,69
PB 2a	0,4
PB 2c	<0,01
PB 3a	<0,01
PB 3b	<0,01
MC 1a	1,54
MC 1b	<0,01
UT 1	<0,01
P-452	<0,01

Notes cf. tableau 19.

**Tableau 28. Effet des anticorps anti-cytochromes P-450 purifiés de foie de rats sur l'hydroxylation du SU catalysée par les microsomes hépatiques de rats traités par PB et CLO exprimée en pourcentage de l'activité obtenue en l'absence d'AC.**

inducteur	sérum contrôle	anti-PB1a	anti-PB1b	anti-PB2c	anti-PB3a
Activité SU PB	90	46	20	108	100
hydroxylase CLO	108	62	36	108	116

cf. notes tableau 22. SU  $2 \cdot 10^{-4}M$ .

100 % = 2,2 (PB) ; 1,6 (CLO) nmoles 50HSU/mg protéine/min.

‰ Activité  
Suprofen  
hydroxylase

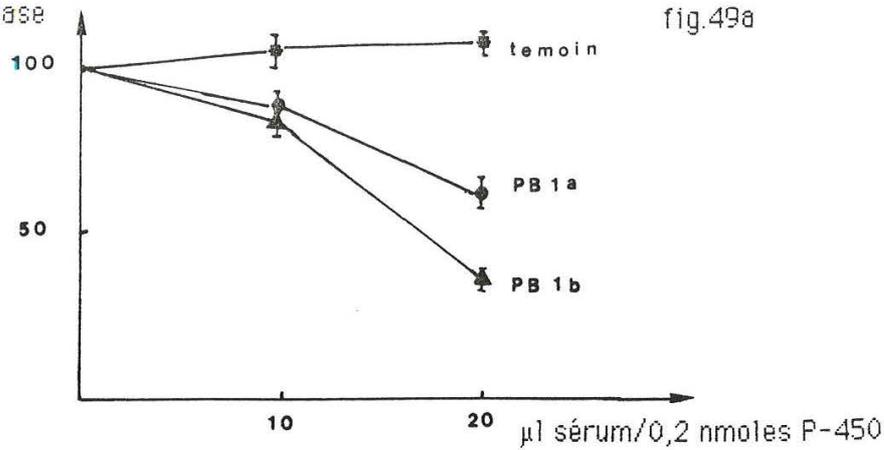


fig.49a

‰ Activité  
Suprofen  
hydroxylase

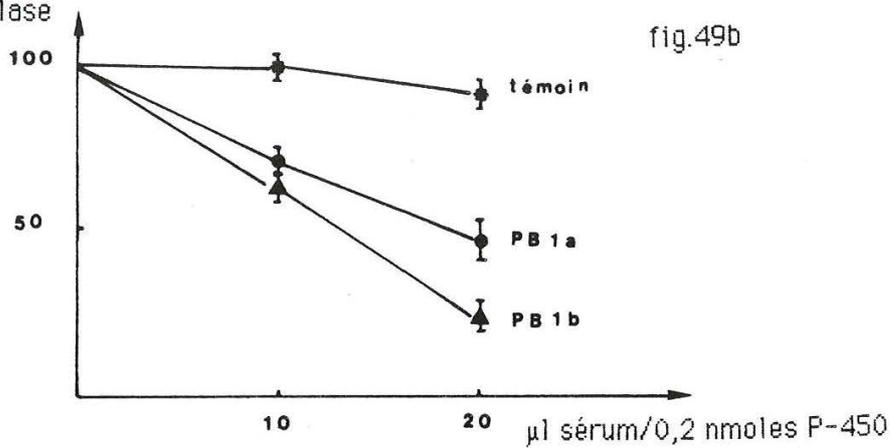


fig.49b

**FIGURE 49.** Action des sérums contenant les AC anti-PB 1a et anti-PB 1b sur l'activité suprofen hydroxylase ( $SU 2 \cdot 10^{-4}M$ ) des microsomes PB (figure 49a) et des microsomes CLO (figure 49b).

L'activité SU hydroxylase a été mesurée en présence des sérums témoins et des sérums contenant les anti-PB 1a et anti-PB 1b (Y-E-2-C) selon la méthode UY décrite en Y-D-2. Les microsomes proviennent de rats traités par le CLO ou le PB selon Y-C-2 (cf. notes tableau 22).

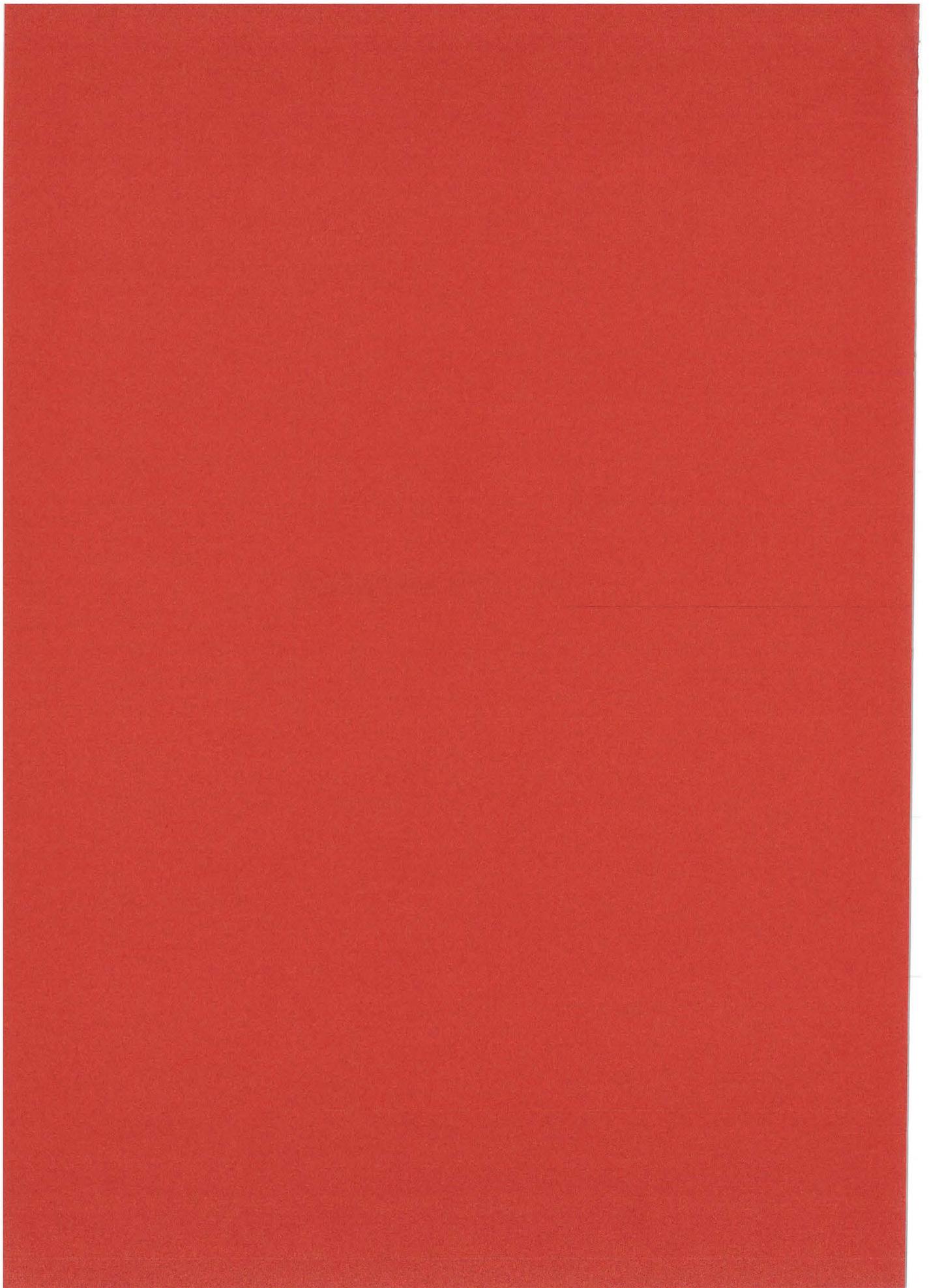
- 100 ‰ = 1,1 (fig.49a) ; 1 (fig.49b) nmoles 50HSU/nmole P-450/min.

- chaque point est la moyenne d'au moins 2 à 4 déterminations.

distingue de l'activité AT hydroxylase pour laquelle la forme MC 1a n'intervient pas.

Dans le fait que l'activité suprofen hydroxylase ne soit pas induite par le 3MC, la contradiction n'est qu'apparente. Ce type d'effet est connu dans la littérature. Par exemple l'hydroxylation en position 2 de l'estradiol est catalysée de façon équivalente par les cytochromes PB 2a et MC 1a en système reconstitué. Le traitement des rats par le 3MC entraîne une diminution de la forme PB 2a et une augmentation de la forme MC 1a. Il en résulte qu'aucune induction de l'activité n'est observée dans les microsomes (159).

VI - BIBLIOGRAPHIE



1. J.C. HOMBERG, C. ANDRE et M. ABUAF : "A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM<sub>2</sub>) in tienilic acid-induced hepatitis". Clin. Exp. Immunol., 1984, **55**, 561.
2. P. BEAUNE, P.M. DANSETTE, D. MANSUY, L. KIFFEL, M. FINCK, C. AMAR, J.P. LEROUX et J.C. HOMBERG : "Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, **84**, 551.
3. D. MANSUY : "Activation des composés organiques exogènes par les cytochromes P-450. Implications en pharmacologie et en toxicologie." dans "Mise au Point de Biochimie Pharmacologique," Masson, 1979, p.123.
4. G.C. MUELLER, J.A. MILLER, "Metabolism of 4-dimethyl amino benzene by liver homogenate" J. Biol. Chem. 1948, **176**, 535.
5. G.C. MUELLER, J.A. MILLER, "The metabolism of methylated aminoazo dyes" J. Biol. Chem. 1953, **202**, 579.
6. B.B. BRODIE, J.R. GILLETTE et B.N. LA DU, "Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds", Annu. Rev. Biochem. 1958, **27**, 427.
7. M. KLINGENBERG, "Pigments of rat liver microsomes", Arch. Biochem. Biophys. 1958, **75**, 376.
8. D. GARFINKEL, "Studies on pig liver microsomes. I-Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions". Arch. Biochem. Biophys. 1958, **77**, 493.
9. T. OMURA et R. SATO, "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes : II- Solubilization, purification and properties". J. Biol. Chem. 1964, **239** (7), 2379.
10. C.R. WOLF : "Cytochrome P-450s : polymorphic multigene families involved in carcinogen activation." Trends in Genetics, 1986, 209
11. K. RUCKPAUL, H. REIN, "Cytochrome P-450," Akademie-Verlag, Berlin, 1984, 11.
12. D. MANSUY : "Activation de l'oxygène par les cytochromes P-450". Images de la Chimie, CNRS, 1981, **41**, 73.
13. T.L. POULOS, B.C. FINZEL, I.C. GUNSALUS, G.C. WAGNER, J. KRAUT. "The 2-6-Å Crystal Structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450". J. Biol. Chem. 1985, **260**, 16122.
14. T.L. POULOS, B.C. FINZEL et A.J. HOWARD : "High-resolution crystal structure of cytochrome P-450 cam". J. Mol. Biol. 1987, **195**, 687.

15. G.D. NORDBLOM, R.E. WHITE, M.J. COON : "Studies on Hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450" *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, **175**, 524.
16. E. SARTORI, "Effet des antibiotiques macrolides sur le cytochrome P-450 hépatique. Contribution à l'étude de certaines interactions médicamenteuses". Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, 1986.
17. D.R. NELSON et N.W. STROBEL "On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins", *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** (13), 6038.
18. A. CLAUDE, "Fraction from normal chicken embryo similar to the tumor-producing fraction of chicken tumor". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, **39**, 398.
19. A.H. CONNEY, "Pharmacological implications of microsomal enzyme induction". *Pharmacol. Rev.* 1967, **19** (3), 317.
20. M. INGELMAN-SUNDBERG "Cytochrome P-450 organization and membrane interactions" dans "Cytochrome P-450, Structure Mechanism and Biochemistry", Edité par P.R. ORTIZ de MONTELLANO, Plenum Press, 1986, 119.
21. P. BECHTEL et J.P. THENOT "Polymorphisme génétique de biotransformation des médicaments", *Pharmacologie clinique : actualités et perspectives*, G. Strauch, A. Spriet Eds., Colloque Inserm, 1987, **156**, 69.
22. G.G. GIBSON et P. SKETT "Factors affecting drug metabolism : external factors" dans "Introduction to drug metabolism", Chapman and Hall, 1986.
23. G.G. GIBSON et P. SKETT "Factors affecting drug metabolism" : internal factors" dans "Introduction to drug metabolism", Chapman and Hall, 1986.
24. A.H. CONNEY, E.C. MILLER et J.A. MILLER, "The metabolism of methylated aminoazo dyes. V- Evidence for the induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene", *Cancer Res.*, 1956, **16**, 450.
25. H. REMMER "Die Beschleunigung des Evipanabbaues unter der Wirkung von Barbituren" *Naturwissenschaften*, 1958, **45**, 189.
26. A.B. OKEY, E.A. ROBERTS, P.A. HARPER et M.S. DENISON "Induction of drug-metabolizing enzymes : mechanisms and consequences". *Clinical Biochemistry*, 1986, **19**, 132.
27. D.W. WAXMAN "Rat hepatic cytochrome P-450" dans "Cytochrome P-450. Structure Mechanism and Biochemistry", Edited by P.R. ORTIZ de MONTELLANO, Plenum Press, 1986, 525.

28. J.B. SCHENKMAN, L.V. FAVREAU, J. MOLE, D.L. KREUTZER et I. JANSSON "Fingerprinting rat liver microsomal cytochromes P-450 as a means of delineating sexually distinctive forms". Arch. Toxicol. 1987, **60**, 43.
29. D.W. NEBERT, M. ADESNIK, M.J. COON ... M. WATERMAN "The P-450 gene superfamily : recommended nomenclature". DNA, 1987, **6** (1), 1.
30. D.W. NEBERT et F.J. GONZALEZ "Cytochrome P-450 gene expression and regulation". Trends Pharmacol. Sci. 1985, **6**, 160.
31. A.R. BOOBIS, D.S. DAVIES "Human cytochromes P-450". Xenobiotica, 1984, **14**, 151.
32. M. BRÜCH, L. KLING, W. LEGRUM et C. MASER "The  $^{14}\text{C}$  breath test : facilities and limitations of a rapid and noninvasive method for in vivo evaluation of modified hepatic cytochrome P-450. A critique". Arch. Toxicol. 1987, **60**, 81.
33. A.R. BOOBIS, S. MURRAY, C.E. SEDDON et D.S. DAVIES "In vitro studies of induction and inhibition of drug oxidation in man". Pharmac. Ther. 1987, **33**, 101.
34. U.A. MEYER "Genetic polymorphisms of human cytochromes P-450" dans "Porphyrins and porphyrias". Y. NORMANN, éditeur. Colloque Inserm, 1986, **134**, 101.
35. F.P. GUENGERICH, D.R. UMBENHAUER, P.F. CHURCHILL, P.H. BEAUNE, R. BÖCKER, R.D. KNODELL, M.V. MARTIN et R.S. LLOYD. "Polymorphism of human cytochrome P-450". Xenobiotica, 1987, **17** (3), 311.
36. L.M. DISTLERATH et F.P. GUENGERICH. "Enzymology of human liver cytochrome P-450" dans "Mammalian cytochrome P-450", vol.1, F.P. GUENGERICH, Editor. C.R.C. Press, 1986, 133.
37. J. GUT, T. CATIN, P. DAYERS, T. KRONBACH, U. ZANGLER et U.A. MEYER. "Debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxydation. Purification and characterization of two functionally different human liver cytochrome P-450 enzymes involved in impaired hydroxylation of the prototype substrate bufuralol". J. Biol. Chem. 1986, **261** (25), 11734.
38. M. KITADA, T. KAMATAKI, K. ITAHASHI, T. RIKIHISA, Y. KANAKUBO. "P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal liver, is the  $16\alpha$ -hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate". J. Biol. Chem. 1987, **262** (28), 13534.

39. S.A. WRIGHTON, P.E. THOMAS, D.E. RYAN et W. LEVIN "Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P-450 HLj". Archives of Biochem. and Biophys., 1987, **258** (1), 292.
40. J.M. LASKER, J. RAUCY, S. KUBOTA, B.P. BLOSWICK, M. BLACK et C.S. LIEBER "Purification and characterization of human liver cytochrome P-450 ALC". Bioch. et Biophys. Res. Com., 1987, **148** (1), 232.
41. D. MANSUY et P. BATTIONI "Particular ability of cytochromes P-450 to form reactive intermediates and metabolites" dans "Drug Metabolism, Molecular Approaches and Pharmacology Implications". Pergamon Press Pub., 1985, 195.
42. B.K. PARK, J.W. COLEMAN et N.R. KITTINGHAM "Drug disposition and drug hypersensibility". Biochem. Pharmacol., 1987, **36** (5), 581.
43. J.C. HOMBERG, N. ABUAF, S. HELMY-KHALIL ... J.P. BENHAMOU "Drug-induced hepatitis associated with anticytoplasmic organelle autoantibodies". Hepatology, 1985, **5** (5), 722.
44. J.C. HOMBERG, N. ABUAF, O. BERNARD ... D. ALAGILLE. "Chronic active hepatitis associated with antiliver kidney microsome antibody type 1 : a second type of "Autoimmune" hepatitis". Hepatology, 1987, **7** (6), 1333.
45. M. MANNS, G. GERKEN, A. KYRIATSOULIS, H.P. DIENES et K.H. MEYER ZUM BUSCHENFELDE. "Methodology and significance of the detection of liver-kidney microsomal (LKM). Autoantibodies in autoimmune-type chronic active hepatitis". Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1987, **1**, 344.
46. I.R. MACKAY "Induction by drugs of hepatitis and autoantibodies to cell organelles : significance and interpretation". Hepatology, 1986, **5** (5), 904.
47. J. NEUBERGER et J.G. KENNA "Halothane hepatitis : a model of immune drug hepatotoxicity". Clinical Science 1987, **72**, 263.
48. D. MANSUY, P.M. DANSETTE, C. FOURES, M. JAQUEN, G. MOINET et N. BAYER. "Metabolic Hydroxylation of the thiophene ring : isolation of 5-hydroxy-tienilic acid as the major urinary metabolite of tienilic acid in man and rat". Biochem. Pharmacol., 1984, **33** (9), 1429.
49. P.M. DANSETTE, C. AMAR, C.B. SMITH, E. NEAU, C. PONS et D. MANSUY "Hydroxylation of the thiophene ring : *in vitro* the 5-hydroxylation of tienilic acid is catalysed by cytochrome P-450 in rat and human microsomes". 6th. International Conference on Biochemistry and Biophysics of cytochrome P-450, 1988 (à paraître).

50. J.P. LAFAY, Thèse pour le Doctorat en Médecine, Université Paris Val de Marne, Faculté de Médecine de Créteil, 1981. "Les atteintes hépatiques associées à l'anticorps antimicrosomal de foie et de rein de Type 2 ; rôle de l'acide tiénilique".
51. T. CRESTEIL, P. BEAUNE, P. KREMERS, C. CELIER, F.P. GUENGERICH, J.P. LEROUX. "Immunoquantification of epoxide hydrolase and cytochrome P-450 isozymes in fetal and adult human liver microsomes". *Eur. J. Biochem.*, 1985, **51**, 345.
52. J.B. PRESS "Pharmacologically active compounds and other thiophene derivatives" dans "Thiophene and its derivatives. Part I". Heterocyclic compounds. **44**. Edited by Salo Gronowitz, Interscience Publication, 1985, 353.
53. H.G. BRAY, F.M.B. CARPANINI et B.D. WATERS. "The metabolism of thiophen in the rabbit and in the rat". *Xenobiotica*, 1971, **1** (2), 157.
54. R.J. McMURTRY et J.R. MITCHELL. "Renal and hepatic necrosis after metabolic activation of 2-substituted furans and thiophenes, including furosemide and cephaloridine". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1977, **42**, 285.
55. M. IMLER, G. CHABRIER, J. CHERFAN, C. SIMON. "Hépatite imputable au thiophène". *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1987, **11**, 173.
56. P.A. TODD et R.C. HEEL. "Suprofen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and analgesic efficacy". *Drugs*, 1985, **30**, 514.
57. R.J. CAPETOLA, J.L. McGUIRE, M.E. ROSENTHALE. "Introduction to the pharmacology of suprofen". *Pharmacology*, 1983, **27**, suppl. **1**, 1.
58. Y. MORI, F. YOKOYA, K. TOYOSHI, S. BABA et S. SAKAI. "Absorption and excretion of suprofen in rats". *Drug Metab. Dispos.*, 1983, **11** (4), 387.
59. Y. MORI, Y. SAKAI, N. KURODA, F. YOKOYA, K. TOYOSHI, M. HORIE et S. BABA. "Further structural analysis of urinary metabolites of suprofen in the rat". *Drug Metab. Dispos.*, 1984, **12** (6), 767.
60. Y. MORI, N. KURODA, Y. SAKAI, K. TOYOSHI et S. BABA. "Species differences in the metabolism of suprofen in laboratory animals and man". *Drug Metab. and Dispos.*, 1985, **13** (2), 239.
61. N.S. DAVIS, A. SPITAL, D.E. KAMM. "Suprofen and acute renal failure". *Annals of Internal Medicine*, 1986, **105** (6), 976.
62. C. ROSSI, L. BOSCO, G.A. FAICH, A. TANNER, R. TEMPLE. "The importance of adverse reaction reporting by physicians. Suprofen and the flank pain Syndrom." *JAMA*, 1988, **259** (8), 1203.

63. D. KLEINKNECHT, P. LANDAIS et B. GOLDFARB. "Analgesic and non-steroidal anti-inflammatory drug associated acute renal failure : a prospective collaborative study". *Clinical Nephrology*, 1986, **25** (6), 275.
64. T. NISHIKAWA, O. NAGATA, K. TANBO, T. YAMADA, Y. TAKAHARA, H. KATO et Y. YAMAMOTO. "Absorption, excretion and metabolism of tiqizium bromide in dogs, and relationship between pharmacological effect and plasma levels of unchanged drugs". *Xenobiotica*, 1985, **15** (12), 1053.
65. VON WARTBURG (Laboratoire Sandoz), Communication personnelle.
66. S. ICHIHARA, Y. TSUYUKI, H. TOMISAWA, H. FUKASAWA, N. NAKAYAMA, M. TATEISHI et R. JOLY. "Metabolism of tenoxicam in rats". *Xenobiotica*, 1984, **14** (9), 727.
67. M.J. LYNCH, F.R. MOSHER, W.R. LEVESQUE et T.J. NEWBY. "The *in vitro* and *in vivo* metabolism of morantel in cattle and toxicology species". *Drug Metabolism Reviews*, 1987, **18** (2 et 3), 253.
68. R.C. KAMMERER, D.A. SCHMITZ, M.A. LAMPE et K. KLOC. "The *in vivo* metabolism of methapyrilene, a hepatocarcinogen, in the rat". *Xenobiotica*, 1988, **18** (7), 869.
69. J.D. ROBBINS, J.E. BAKKE et V.J. FEIL. "Metabolism of benzo(b)thien-4-yl methylcarbamate (moban) in dairy goats and a lactating cow". *J. Agr. Food Chem.*, 1970, **18** (1), 130.
70. S.D. HARRISON, Jr., T.R. BOSIN et R.P. MAICKEL. "Metabolism of 3-(2-dimethylaminoethyl) benzo(b)thiophene *in vitro* and *in vivo* in the rat". *Drug Metab. Dispos.*, 1974, **2** (3), 228.
71. V. VIGNIER, F. BERTHOU, Y. DREANO et H.H. FLOCH. "Dibenzothiophene sulfphoxidation : a new and fast high performance liquid chromatographic assay of mixed-function oxidation". *Xenobiotica*, 1985, **15** (12), 991.
72. A.B. HÖRNFELDT. "Tautomeric properties and some sections of the 2-hydroxythiophene and 2-hydroxyfuran system". *Svensk. Kemisk. Tidskrift*, 1968, **80** (10), 343.
73. D. BARTON et W.D. OLLIS. "Comprehensive Organic Chemistry : the synthesis and reaction of organic compounds, volume 4 : Heterocyclic Compounds". Ed. P.G. SAMMES, Pergamon Press, p.820.
74. S. GRONWITZ et A. BUGGE. "On the tautomerism of some 3-hydroxy thiophene carboxaldehydes and -carboxylic acids". *Acta Chem. Scand.* 1966, **20**, 261.

75. H.J. JAKOBSEN, S.O. LAWESSON. "Thiophene chemistry. XII : Synthesis and tautomeric structure of acetyl and carbethoxy chelated 2-hydroxy-thiophenes". *Tetrahedron*, 1967, **23**, 871.
76. A.B. HORNFEJLDT. "Unsaturated  $\gamma$ -thiolactones IX : dissociation constants and UV spectra of 5-methyl and 5-tert-butyl-thiolen-2-ones". *Arkiv. för Kemi.*, 1968, **29**, (21), 247.
77. G.R. SPRENGLING et C.W. LEWIS. "Dissociation constants of some phenols and methylol phenols". *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 5709.
78. C.D. HURD et K.L. KREUZ. "Nitrothienols and halogenated nitrothiophenes". *J. Am. Chem. Soc.* 1952, **74**, 2965
79. L.B. MAGNUSSON, C.J. POTMUS et C.A. CRAIG. "Coordination in solutions. I- Acid strengths of phenol derivatives in water". *J. Am. Chem. Soc.* 1963, **85**, 1711.
80. P. NATCHITAÏLO, J. MOREL et J.C. HALLE. "Acidic dissociation constant of some 2-substituted 3-hydroxythiophene in water-DMSO mixtures ; a comparison with the corresponding orthosubstituted phenols". *J. Chem. Res.* 1977, (S) 196.
81. A.B. HÖRNFELDT. "Unsaturated  $\gamma$ -thiolactones X : Tautomeric rearrangement of 5-chloro- and 5-fluorothiolen-2-ones". *Arkiv för Kemi*, 1968, **29** (34), 427.
82. H.J. JAKOBSEN, E.H. LARSEN et S.O. LAWESSON. "Thiophene chemistry IX : Preparation and dealkylation of 5-substituted 2-t-butoxythiophenes". *Tetrahedron*, 1963, **19**, 1867.
83. E. ROUER, A. LEMOINE, T. CRESTEIL, P. ROUET, J.P. LEROUX. "Effects of genetic or chemically induced diabetes on imipramine metabolism. Respective involvement of flavin monooxygenase and cytochrome P-450 dependant monooxygenase". *Drug Metab. Dispos.*, 1987, **15** (4), 524.
84. B.S. SILERMASTER. "The role of NADPH-cytochrome c (P-450) reductase in detoxication". *Enzymatic basis of detoxication*, édité par W.R. Jakoby, Academic Press, 1980, **1**, 183.
85. M. KUES et C. PAAL, "Synthese des thioténols (oxythiotolox) und des thiotolens". *Berichte*, 1886, **19**, 555.
86. C.D. HUND et K.L. KREUZ. "Thienol". *J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**, 5543.
87. C. FRISELL et S.O. LAWESSON. "2-Hydroxythiophene". *Org. Synth.*, 1961, **41**, 91.

88. Y. MORI, M. SHIBATA, Y. SAKAI, F. YOKOYA, K. TOYOSHI, S. BABA. "Synthesis of deuterated phenylpropionic acid derivatives". *Radioisotopes*, 1983, **32** (11), 533.
89. E.B. PEDERSEN et S.O. LAWESSON. "Thiophene chemistry XXI : Alkylation of ambident ions from potential hydroxythiophenes". *Tetrahedron*, 1972, **28**, 2479-2488.
90. E.B. PEDERSEN et S.O. LAWESSON. "Thiophene chemistry XX : C- and O-methylation of thallium (I)-salts of 3-thiolen-2-ones". *Tetrahedron*, 1971, **27**, 3861.
91. B. CEDERLUND et A.B. HORNFEJDT. "Unsaturated  $\gamma$ -thiolactones XIV : Alkylation of the 2-hydroxythiophene system". *Acta Chem. Scand.* 1971, **25** (9), 3324.
92. B. CEDERLUND, A. JESPERSON, A.B. HORNFEJDT. "Unsaturated  $\gamma$ -thiolactones XV : Alkylation of the 2-hydroxythiophene system and 2-hydroxyfuran system with an ion pair extraction method". *Acta Chem. Scand.* 1971, **25** (10), 3656.
93. B. CEDERLUND et A.B. HORNFEJDT. "Unsaturated  $\gamma$ -thiolactones XVI : Alkylation of the thallium salt of the 5-methyl-2-hydroxythiophene system". *Acta Chem. Scand.* 1971, **25** (9), 3546.
94. B. CEDERLUND et A.B. HORNFEJDT. "Unsaturated  $\gamma$ -thiolactones XVII : Alkylation of the 2-hydroxythiophene system and its 3-methyl and 3-tertbutyl derivatives". *Chemica Scripta*, 1975, **6**, 140.
95. G.A. KRAUS. "Rearrangement of acyloxy furans and thiophenes prepared from butenolides". U.S. Patent, 1980, 4, 214, 092.
96. T. SONE, O. SHINOMARU, S. IGARASHI, E. KATO, M. SAWARA. "Reactions of 2-chlorothiophene with cation exchange resin and 100 % orthophosphoric acid. Formation of the dimer type products containing a tetrahydro-2-thiophenone moiety". *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1979, **52** (4), 1126.
97. S. NISHIMURA, E. IMOKO, *Nippon Kagaku Zasshi*, 1961, **82**, 1543.
98. M. HERBERT et L. PICHAT. "Synthèse d'un diurétique marqué au carbone 14. Acide dichloro-2,3 (thenoyl-2  $^{14}\text{C}=\text{O}$ )-4 phenoxyacetic". *J. Labelled Compound and Radiopharm.*, 1976, **12**, 437.
99. C. ANDRIEU, Y. MOLLIER et N. LOZAC'H. "Composés sulfurés hétérocycliques XXXII : Préparation de cétones et thiocétones thiophéniques". *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1969, (3), 827.

100. N.P. BUU-HOI, N. HOAN, N.D. XUONG. "Etudes dans la série du thiophène V : Nouvelles cétones thiophéniques et leurs dérivés". Recueil Trav. Chim. 1950, **69**, 1083.
101. B. LEWIS. "The hyperlipidaemias : clinical and laboratory practice". Blackwell Scientific Publications, 1976, ch.9, 10 et 15.
102. J.M. HAWKINS, W.E. JONES, F.W. BONNER, G.G. GIBSON. "The effect of peroxysome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney". Drug Metabolism Reviews, 1987, **18** (4), 441.
103. J.K. REDDY, D.L. AZARNOFF et C.E. HIGNITE. "Hypolipidaemic hepatic peroxysome proliferators form of a novel class of chemical carcinogens". Nature, 1980, **283**, 397.
104. R. HESS, W. STAUBLI et W. RIESS. "Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxyisobutyrate in the rat". Nature, 1965, **208**, 856.
105. A.Y.H. LU et M.J. COON. "Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes". J. Biol. Chem. 1968, **243**, 1331.
106. G.G. GIBSON, T.C. ORTON et P.P. TAMBURINI. "Cytochrome P-450 induction by clofibrate". Biochem. J., 1982, **203**, 161.
107. P.P. TAMBURINI, H.A. MASSON, S.K. BAINS, R.J. MAKOWSKI, B. MORRIS, G.G. GIBSON. "Multiple forms of hepatic cytochrome P-450 : purification, characterization and comparison of a novel clofibrate-induced isoenzyme with other major forms of cytochrome P-450". Eur. J. Biochem. 1984, **139**, 235.
108. S.T. BAINS, S.M. GARDINER, K. MANNWEILER, D. GILLET et G.G. GIBSON. "Immunochemical study of the contribution of hypolipidaemic-induced cytochrome P-452 to the metabolism of lauric acid and arachidonic acid". Biochem. Pharmacol., 1985, **34**, (16), 3221.
109. T.C. ORTON et G.L. PARKER. "The effect of hypolipidaemic agents on the hepatic microsomal drug metabolising enzyme system of the rat : induction of cytochrome(s) P-450 with specificity towards terminal hydroxylation of lauric acid". Drug Metab. Dispos. 1982, **10** (2), 110.

110. J.P. HARDWICK, B.J. SONG, E. HUBERMAN et F.J. GONZALEZ. "Isolation, complementary DNA sequence and regulation of rat hepatic lauric acid  $\omega$ -hydroxylase (cytochrome P-450L $\omega$ ). Identification of a new cytochrome P-450 gene family". *J. Biol. Chem.*, 1987, **262** (2), 801.
- 111a. C.A. JACOB, W.K. CHAN, E. SHEPHARD et P.R. ORTIZ DE MONTELLANO, "The catalytic site of rats hepatic lauric acid  $\omega$  hydroxylase". *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 18640.
- 111b. L. KIFFEL, C. CELIER et J.P. LEROUX. "Purification and characterization of a cytochrome P-450 isoenzyme isolated from the liver of rate pretreated with clofibrate". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **156**, 282.
112. M.C. ROMANO, K.M. STRAUB, L.A.P. YODIS, R.D. ECKARDT, J.F. NEWTON. "Determination of microsomal lauric acid hydroxylase. Activity of HPLC with flow-through radiochemical quantitation". *Analytical Biochemistry*, 1988, **170**, 83.
113. H. RAZA, W.G. LEVINE. "Effect of hypolipidemic drugs on the metabolism of lauric acid and dimethylaminoazobenzene by rat liver microsomes". *Biochem. Pharmacol.*, 1987, **36** (5), 774.
114. G.L. PARKER et T.C. ORTON. "Induction by oxyisobutyrate of hepatic and kidney microsomal cytochrome P-450 with specificity towards hydroxylation of fatty acids". *Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450*, Gustafsson et al. eds. Elsevier Press, 1980, 373.
115. S. FOURNEL, J. MAGDALOU, P. PINON et G. SIEST. "Differential induction profile of drug-metabolizing enzymes after treatment with hypolipideamic agents". *Xenobiotica*, 1987, **17** (4), 445.
116. M.A. BACHER et G.G. GIBSON. "Chlorophenoxyacid herbicides induce microsomal cytochrome P-450 IVA1 (P-452) in rat liver". *Chem. Biol. Interactions*, 1988, **65**, 145.
117. B.G. LAKE, W.R. PELS RIJCKEN, T.J.B. GRAY, J.R. FOSTER, et S.D. GANGOLLI. "Comparative studies of the hepatic effects of di and mono-n octyl phthalates, di (2-ethylhexyl) phthalate and clofibrate in the rat". *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1984, **54**, 167.
118. B.G. LAKE, J.M. TREDGER, T.J.B. GRAY, C.R. STUBBERFIELD, K.D. HODDER, S.D. GANGOLLI et R. WILLIAMS. "The effect of peroxisome proliferators on the metabolism and spectral interaction of endogenous substrates of cytochrome P-450 in rat hepatic microsomes". *Life Sci.* 1984, **35**, 2621.

119. E.A. LOCK, M.D. STONARD et C.R. ELCOMBE. "The induction of  $\omega$  and  $\beta$ -oxidation of fatty acids and effects on  $\alpha_2\mu$  globulin content in the liver and kidney of rats administered 2,2,4-trimethylpentane". *Xenobiotica*, 1987, **17** (4), 513.
120. J.K. REDDY et N.D. LALWANI. "Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators : evaluation of the risk of hypolipidaemic drugs and industrial plasticisers to man". *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1983, **12**, 1.
121. M.R. FACINO, M. CARINI, R. BERTULETTI, O. TOFANETTI. "In vitro metabolism of bezafibrate in rat liver". *Pharmacol. Res. Commun.* 1981, **13**, 121.
122. N.D. LALWANI, W.E. FAHL, J.K. REDDY. "Detection of a Nafenopin-binding protein in rat liver cytosol associated with the induction of peroxisome proliferation by hypolipidemic compounds". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, **116** (2), 388.
123. N.D. LALWANI, K. ALVARES, M.K. REDDY, M.N. REDDY, I. PARIKH, J.K. REDDY. "Peroxisome proliferator-binding protein : identification and partial characterization of nafenopin-, clofibrac acid-, and ciprofibrate-binding proteins from rat liver". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, **84**, 5242.
124. M.N. MILTON, C.R. ELCOMBE, G.E.N. KASS, G.G. GIBSON. "Lack of evidence for a hepatic peroxisome proliferator receptor and an explanation for the binding of hypolipidaemic drugs to liver homogenates". *Biochem. Pharmacol.*, 1988, **37** (5), 793.
125. J.M. THORP, W.S. WARING. "Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate". *Nature*, 1962, **194**, 948.
126. J.R. BALDWIN, D.T. WITIAK, D.R. FELLER. "Disposition of clofibrate in the rat. Acute and chronic administration". *Biochem. Pharmacol.*, 1980, **29**, 3143.
127. A. NILSSON, K. PRYDZ, T. RORWEIT, E.N. CHRISTIANSEN. "Studies of the interrelated stimulation of microsomal  $\omega$ -oxidation and peroxisomal  $\beta$ -oxidation in rat liver with a partially hydrogenated fish oil diet". *Biochem. et Biophys. Acta*, 1987, **920**, 114.
128. J. MOUNIE, H. GOUDONNET, A. ESCOUSSE, R.C. TRUCHOT. "Effet de divers hypolipoprotéinémisants sur l'activité des enzymes microsomaux hépatiques". *J. Pharmacol. (Paris)* 1986, **17** (3), 308.
129. A. NILSSON, H. AREY, J.I. PEDERSEN et E.N. CHRISTIANSEN. "The effect of high-fat diets on microsomal lauric acid hydroxylation in rat liver". *Biochem. et Biophys. Acta*, 1986, **879**, 209.

130. G.F. BLANC. "Comparative toxicity and safety profile of fenofibrate and other fibric acid derivatives". *The American Journal of Medicine*, 1987, **83**, suppl.5B), 26.
131. J. SCHMIDT. "Risiko und Nutzen einer Behandlung : das Beispiel clofibrat". *Schweiz. Med. Wschr.* 1987, **117** (20), 773.
132. A. WEIL, J. CALDWELL, M. STROLIN-BENEDETTI. "The metabolism and disposition of fenofibrate in rat, guinea pig and dog". *Drug Metab. Dispos.*, 1988, **16** (2), 302.
133. L.L. FAN, B.S.S. MASTERS, R.A. PROUGH. "Microsomal lauric acid 11- and 12- hydroxylation : a new assay method utilizing high pressure liquid chromatography". *Analytical Biochemistry*, 1976, **71**, 265.
134. T. OMURA. "Microsomes and Drug Oxidations". Academic Press, New York, 1969, 160.
135. A.Y.H. LU, H.W. STROBEL, M.J. COON. "Hydroxylation of benzphetamine and other drugs by a solubilized form of cytochrome P-450 from liver microsomes : lipid requirement for drug demethylation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, **36**, 545.
136. P.E. THOMAS, S. BANDIERA, L.M. REIK, S.L. MAINES, D.E. RYAN et W. LEVIN. "Polyclonal antibodies as probes of rat hepatic cytochrome P-450 isoenzymes". *Federation Proceedings*, 1987, **46** (8), 2563.
137. C.R. WOLF, S. SEILMAN, F. DESCH, R.T. MAYER, H.D. BURKE. "Multiple forms of cytochrome P-450 related to forms induced marginally by phenobarbital". *Biochem. J.* 1986, **240**, 27.
138. P. HLAVICA et M. KEHL. "Studies on the mechanism of hepatic microsomal N-oxide formation. The role of cytochrome P-450 and mixed-function amine oxydase in the N-oxidation of N,N-dimethylaniline". *Biochem. J.* 1977, **164**, 487.
139. R.E. TYNES et E. HODGSON. "Oxidation of thiobenzamide by the FAD-containing and cytochrome P-450 dependant monooxygenases of liver and lung microsomes". *Biochem. Pharmacol.* 1983, **32**, 3419.
140. D.M. ZIEGLER. "Microsome flavin-containing monooxygenase. Oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur compounds". In "Enzymatic Basis of Detoxification" (W.B. JAKOBY, ed.), Academic Press, 1980, 201.
141. P.J. SABOURIN, B.P. SMYSER, E. HODGSON. "Purification of the flavin-containing monooxygenase from mouse and pig liver microsomes". *Int. J. Biochem.* 1984, **16**, 713.

142. T. KIMURA, M. KODAMA, C. NAGATA. "Purification of mixed-function amine oxidase from rat liver microsomes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, **110**, 640.
143. L.L. POULSEN, K. TAYLOR, D.E. WILLIAMS, B.S. SILERMASTERS, D.M. ZIEGLER. "Substrate specificity of the rabbit lung flavin-containing monooxygenase for amines : oxydation products of primary alkylamines". *Molecular Pharmacology*, 1986, **30**, 680.
144. D.E. WILLIAMS, S.E. HALE, A.S. SCOTT MUEHROFF, B.S.S. MASTERS. "Rabbit lung flavin-containing monooxygenase. Purification, characterization and induction during pregnancy". *Mol. Pharmacol.* 1985, **28**, 381.
145. M.E. McMANUS, I. STUPANS, W. BURGESS, J.A. KOENIG, P. DE LA M. HALL, D.J. BIRKETT. "Flavine-containing monooxygenase activity in human liver microsomes". *Drug Metab. Dispos.* 1987, **15** (2), 256.
146. E. ROUER, P. ROUET, M. DELPECH, J.P. LEROUX. "Purification and comparison of liver microsomal flavin-containing monooxygenase from normal and streptozotocin-diabetic rats". *Biochem. Pharmacol.*, 1988, **37** (18), 3455.
147. J.R. CASHMAN et R.P. HANZLICK. "Microsomal oxidation of thiobenzamide. A photometric assay for the flavin-containing monooxygenase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, **98** (1), 147.
148. D.J. ADAMS, S. SEILMAN, Z. AMELIZAD, F. OESCH et C.R. WOLF. "Identification of human cytochrome P-450 analogous to forms induced by phenobarbital and 3-methyl cholanthrene in the rat". *Biochem. J.*, 1985, **232**, 869.
149. D.J. WAXMAN et C. WALSH. "Cytochrome P-450 isoenzyme 1 from phenobarbital-induced rat liver : purification, characterization, and interactions with methyrapone and cytochrome b<sub>5</sub>". *Biochemistry*, 1983, **22**, 4846.
150. M. HANIU, D.E. RYAN, S. IIDA, C.S. LIEBER, W. LEVIN et J.E. SHIVELY. "NH<sub>2</sub>-terminal sequence analyses of four rat hepatic microsomal cytochromes P-450". *Arch. Biochem. Biophys.* 1984, **235** (2), 304.
151. D.J. WAXMAN. "Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c". *J. Biol. Chem.* 1984, **259**, 15481.
152. K.C. CHENG et J.B. SCHENKMAN. "Purification and characterization of two constitutive forms of liver microsomal cytochrome P-450". *J. Biol. Chem.* 1982, **257** (5), 2378.

153. T. KAMATAKI, K. MAEDA, Y. YAMAZOE, T. NAGAI et R. KATO. "Sex difference of cytochrome P-450 in the rat : purification, characterization, and quantification of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats". Arch. Biochem. Biophys. 1983, **225** (2), 758.
154. F.P. GUENGERICH, G.A. DANNAN, S.T. WRIGHT, M.V. MARTIN et L.S. KAMINSKY. "Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isoenzymes isolated from rats treated with phenobarbital or  $\beta$ - naphthoflavone". Biochemistry, 1982, **21** (23), 6019.
155. D.J. WAXMAN, G.A. DANNAN et F.P. GUENGERICH. " Regulation of rat hepatic cytochrome P-450 : age dependent expression hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes". Biochemistry, 1985, **24** (16), 4409.
156. E.T. MORGAN, C. Mc GEOCH et J.A. GUSTAFSSON. "Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid  $16\alpha$  hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in rat". J. of Biol. Chem., 1985, **260** (22), 11895.
157. N. MORISHIMA, H. YOSHIOKA, Y. HIGASHI, K. SOGAWA, Y. FUJII-KURIYAMA. "Gene structure of cytochrome P-450 (M-1) specifically expressed in male rat". Biochemistry, 1987, **26** (25), 8279.
158. A.J. SONDERFAN, M.P. ARLOTTO, D.R. DUTTON, S.K. McMILLEN et A. PARKINSON. "Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450." Arch. of Biochem. Biophys., 1987, **255** (1), 27.
159. A. ASTRÖM et J.W. DEPIERRE. "Rat-liver microsomal cytochrome P-450 : purification, characterization, multiplicity and induction". Biochem. Biophys. Acta, 1986, **853**, 1.
160. A.H. CONNEY. "Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes : the first Bernard B. Brodie Lecture at Pennsylvania State University". Life Sciences, 1986, **39**, 2493.
161. F.J. GONZALEZ, B.J. SONG et J.P. HARDWICK. "Pregnenolone  $16\alpha$ -carbonitrile-inducible P-450 gene family : gene conversion and differential regulation". Mol. Cell. Biol. 1986, **6** (8), 2969.
162. U.K. LAEMMLI. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>". Nature (Lond.) 1970, **227**, 680.

163. H.W. STROBEL, A.Y.H. LU, J. HEIDEMA et M.J. COON. "Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid hydrocarbon and drug hydroxylation". *J. Biol. Chem.* 1970, **245**, 4851.
164. L.M. FORRESTER, M.J. GLANCEY, U. MEYER, D. BLACK, S. BALL et C.R. WOLF. "Isozyme profile of four cytochrome P-450 gene subfamilies in human liver : association with drug metabolism". 12<sup>th</sup> European Drug Metabolism Workshop. Constance, 1988.
165. U.T. MEIER et U.A. MEYER. "Genetic polymorphism of human cytochrome P-450(S)-mephenytoin 4-hydroxylase. Studies with human autoantibodies suggest a functionality altered cytochrome P-450 isozyme as cause of the genetic deficiency". *Biochemistry*, 1987, **26** (25), 8466.
166. J. GUT, U.T. MEIER, T. CATIN, U.A. MEYER. "Mephenytoin-type polymorphism of drug oxydation : purification and characterisation of human liver cytochrome P-450 isoenzyme catalysing microsomal mephenytoin hydroxylation". *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **884**, 435.
167. T. SHIMADA, K.S. MISONO et F.P. GUENGERICH. "Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism". *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 909.
168. P. BEAUNE, P.M. DANSETTE, D. MANSUY, L. KIFFEL, C. AMAR, J.P. LEROUX et J.C. HOMBERG. "Autoantibodies anticytochrome P-450 during autoimmuno hepatitis". *Liver cells and drugs*, Ed. A. Guillouzo. Colloque INSERM, 1988, **164**, 175.
169. S.A. WRIGHTON, P.E. THOMAS, P. WILLIS, S.L. MAINES, P.B. WATKINS, W. LEVIN et P.S. GUZELIAN. "Purification of a human liver cytochrome P-450 immunochemically related to several cytochrome P-450 purified from untreated rats". *J. Clin. Invest.* 1987, **80**, 1017.
170. T. SHIMADA et F.P. GUENGERICH. "Participation of a rat cytochrome P-450 induced by pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile and other compounds in the 4-hydroxylation of mephenytoin". *Molecular Pharmacology*, 1985, **28**, 215.
171. V. ULLRICH. "Cytochrome P-450 and biological hydroxylate reactions". *Top. Curr. Chem.* 1979, **83**, 67.
172. D. MANSUY. "L'activation métabolique des médicaments : effet néfaste ou arme thérapeutique". *Actualité de Chimie Thérapeutique*, 1985, 12<sup>ème</sup> série, 49.

173. D. M. JERINA, J.W. DALY. "Arene Oxydes : a new aspect of drug Metabolism". Science, 1974, **185**, 573.
174. I. TABUSHI et N. KOGA. "P-450 Type oxygen activation by porphyrin-manganese complex". J. Am. Chem. Soc. 1979, **101** (21), 6456.
175. M. PERREE-FAUVET et A. GAUDEMER. "Manganese porphyrin-catalyzed oxydation of olefins to ketones by molecular oxygen". J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1981, 874.
176. I. TABUSHI et A. YAZAKI. "P-450 Type dioxygen activation using H<sub>2</sub>/colloidal Pt as an effective electron donor". J. Am. Chem. Soc. 1981, **103**, 7371.
177. I. TABUSHI et K. MORIMITSU. "Stereospecific, regioselective and catalytic monoepoxidation of polyolefins by the use of a P-450 model, H<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>-TPP-(Mn)-Colloidal platinum". J. Am. Chem. Soc. 1984, **106**, 6871.
178. I. TABUSHI, M. KODERA et M. YOKOYAMA. "Kinetics and mechanism of reductive dioxygen activation catalyzed by the P-450 model system. Iron picket fence as a catalytic center". J. Am. Chem. Soc. 1985, **107**, 4466.
179. D. MANSUY, P. BATTIONI "Alkane functionalization by cytochromes P-450 and by model systems using O<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>" dans "Activation and Functionalization of Alkane", Chap. 6, 195, édité par Craig L. Hill, Wiley and Sons, 1989.
- 179bis. P. BATTIONI, J.F. BARTOLI, P. LEDUC, M. FONTECAVE, D. MANSUY. "A new and efficient biomimetics system for hydrocarbon oxydation by dioxygen using manganese porphyrine, imidazole and zinc". J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1987, 791.
- 179ter. M. FONTECAVE et D. MANSUY. "Monooxygenase-like oxydations of olefins and alkanes catalyzed by manganese porphyrins : comparison of systems involving either O<sub>2</sub> and ascorbate or iodosobenzene". Tetrahedron, 1984, **40** (21), 4297.
180. J.T. GROVES, T.E. NEMO et R.S. MYERS. "Hydroxylation and epoxydation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodoxybenzene". J. Am. Chem. Soc. 1972, **101**, 1032.
181. J.T. GROVES et T.E. NEMO. "Epoxydation reactions catalyzed by iron porphyrins-Oxygen transfer from iodosylbenzene". J. Am. Chem. Soc. 1983, **105** (18), 5786.
182. J.T. GROVES et T.E. NEMO. "Aliphatic hydroxylation catalyzed by iron porphyrin complex". J. Am. Chem. Soc. 1983, **105** (20), 6243.

183. P.S. TRAYLOR, D. DELPHIN et T.G. TRAYLOR. "Sterically protected hemins with electronegative, substituents : efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation", *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1984, 279.
184. T. TAKATA, R. TAJIMA et W. ANDO. "Selective oxidation of sulfide by Ar10-metalloporphyrin system -an enzyme model S-oxidation". *Phosphorus and Sulfur*, 1983, **16**, 67.
185. D. MANSUY, P.M. DANSETTE, F. PECQUET et J.C. CHOTTARD. "Iron-porphyrin catalysis of the oxidative dealkylation of para-nitro-anisole and 7-ethoxycoumarin by cumyl hydroperoxide". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1980, **96**, 433.
186. J.R. LINDSAY-SMITH et P.R. SLEATH. "Model systems for cytochrome P-450 dependent monooxygenases. Part 2. Kinetic isotope effects for the oxidative demethylation of anisole and (Me-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>) anisole by Cyt P-450 dependent monooxygenase and model systems". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1983, 621.
187. J.R. LINDSAY-SMITH et D.N. MORTIMER. "Oxydative N-dealkylation of N,N-dimethylbenzylamines by metalloporphyrin-catalysed. Model systems for cytochrome P-450 monooxygenases". *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1985, 64.
188. C.K. CHANG et F. EBINA. "NIH shift haemin-iodosylbenzene-mediated hydroxylations". *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1981, 778.
189. J.R. LINDSAY-SMITH et P.R. SLEATH. "Model systems for cytochrome P-450 dependent mono-oxygenases. Part 1. Oxydation of alkenes and aromatic compounds by tetramethylporphyrinatoiron (III) chloride and iodosylbenzene". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1982, 1009.
190. J.T. GROVES et D.V. SUBRAMANIAN. "Hydroxylation by cytochrome P-450 and metalloporphyrin models. Evidence for allylic rearrangement". *J. Am. Chem. Soc.* 1984, **106**, 2177.
191. D. MANSUY, J. LECLAIRE, P.M. DANSETTE, M. FONTECAVE et M. MOMENTEAU. "Oxydation of monosubstituted olefins by cytochrome P-450 and heme model : evidence for the formation of aldehydes in addition to epoxides and allylic alcohols". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1984, **119** (1), 319.
192. D. MANSUY, J.F. BARTOLI et M. MOMENTEAU. "Alkane hydroxylation catalyzed by metalloporphyrins : evidence for different active oxygen species with alkylhydroperoxides and iodosobenzene as oxydants". *Tetrahedron Lett.* 1982, **23** (27), 2781.

193. D. MANSUY, J. LECLAIRE, M. FONTECAVE et P. DANSETTE. "Regioselectivity of olefin oxydation of iodosobenzene catalyzed by metalloporphyrins : control by the catalyst". *Tetrahedron* 1984, **40** (15), 2847.
194. J.T. GROVES, R.C. HAUSHALTER, A. MAKAMURA, T.E. NEMO, B.J. EVANS. "High-valent iron-porphyrin complexes related to peroxidase and cytochrome P-450". *J. Am. Chem. Soc.* 1981, **103**, 2884.
195. C.L. HILL et B.C. SHARDT. "Alkane activation and functionalization under mild conditions by a homogenous manganese (III) porphyrin-iodosylbenzene oxidizing system". *J. Am. Chem. Soc.* 1980, **102**, 6374.
196. J.T. GROVES, W.J. KRUPPER et R.C. HAUSHALTER. "Hydrocarbon oxydation with oxometalloporphyrinates. Isolation and reactions of a (porphinato) manganese (V) complexes". *J. Am. Chem. Soc.* 1980, **102**, 6375.
197. J.C. BRUICE, A.J. CASTELLINO. "Intermediates in the epoxidation of alkenes by cytochrome P-450 models. I- Cis-stilbene as a mechanistic probe. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, **110**, 158.
198. J.A. SMEGAL et C.L. HILL. "Hydrocarbon functionalization by the (iodosylbenzene) manganese (IV) porphyrin complexes from the (tetraphenylporphinato) manganese (III)-iodosylbenzene catalytic hydrocarbon oxydation system. Mechanism and reaction chemistry". *J. Am. Chem. Soc.* 1983, **105**, 3515.
199. I. TABUSHI et N. KOGA. "Synergetic combination of catalysis of the phase transfer type for the oxidation of alcohols or hydrocarbons". *Tetrahedron Lett.* 1979, 3681.
200. E. GUILMET et B. MEUNIER. "A new catalytic route for the expoxidation of styrene with sodium hypochlorite activated by transition metal complexes". *Tetrahedron Lett.* 1980, **21**, 4449.
201. B. MEUNIER, E. GUILMET, R.E. DE CARVALHO et R. POILBLANC. "Sodium hypochlorite : a convenient oxygen source for olefin epoxydation catalyzed by (porphyrinato) manganese complexes". *J. Am. Chem. Soc.* 1984, **106**, 6668.
202. D. MANSUY, J.F. BARTOLI, J.C. CHOTTARD et M. LANGE. "Metalloporphyrin-catalyzed hydroxylation of cyclohexane by alkyl hydroperoxide : pronounced efficiency of iron-porphyrins". *Angew. Chem.*, 1980, **19** (11), 909.

203. D. MANSUY, P. BATTIDINI et J.P. RENAUD. "In the presence of imidazole, iron and manganese-porphyrins catalyse the epoxidation of alkenes by alkyl hydroperoxydes". J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1984, 1255.
204. J.P. RENAUD, P. BATTIDINI, J.F. BARTOLLI et D. MANSUY. "A very efficient system for alkene epoxidation by hydrogen peroxyde : catalysis by manganese-porphyrins in the presence of imidazole". J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1985, 888.
205. S. DAE, Y. WATANABE et K. FUJIMORI. "Biomimetic oxydation of organic sulfides with TPPFe(III)Cl/imidazole/hydrogen peroxide". Tetrahedron Lett. 1982, **23** (11), 1189.
206. T. SHIMIDZU, T. IYODA et N. KANDA. "Hydroxylation of phenylalanine by aqueous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of an artificial water-soluble iron porphyrin complex". J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1981, 1206.
207. I. TABUSHI et K. MORIMITSU. "Catalytic hydroxylation on aromatic rings by use of an artificial P-450 system assisted by acid and acid anhydride". Tetrahedron Lett. 1986, **27** (1), 51.
208. P. GOUVINE, Rapport de D.E.A. UA 400. "Hydroxylation de composés aromatiques catalysée par des systèmes modèles du cytochrome P-450", 1987.
209. G.M. LOUDON, A.S. RADHAKRISHNA, M.R. ALMOND, J.K. BLODGETT, R.H. BOUTIN. "Conversion of aliphatic amides into amines with [1-I-bis(trifluoroacetoxy)iido] benzene. I- Scope of the reactions". J. Org. Chem. 1984, **49** (22), 4272.
210. P. GENESTE, J.L. OLIVE, S.N. UNG. "Chloration et S-oxydation du benzo[b]thiophène par l'hypochlorate de tertio-butyle. Mécanisme de la réaction". J. Het. Chem. 1977, **14**, 953.
211. P. GENESTE, J.L. OLIVE, S.N. UNG, M. EL AMOUDI EL FAGHI, J.W. EASTON, H. BIEIRBECK and J.K. SAUNDERS. "Carbon 13 nuclear magnetic resonance study of benzo[b]thiophenes and benzo[b]S-oxides and S,S-dioxides". J. Org. Chem. 1979, **44** (16), 2887.
212. P.M. DANSETTE et D.M. JERINA. "A facile synthesis of arene oxides at the K region of polycyclic hydrocarbons". J. Am. Chem. Soc. 1974, **96**, 1224.
213. W.J.M. VAN TILLBORG. "Improved method for the synthesis of dialkyl-substituted thiophene 1,1-dioxides". Synthetic communications, 1976, **6** (8), 583.

214. R.M.C. DAWSON, D.C. ELLIOTT, W.H. ELLIOTT, K.M. JONES. "pH Buffers and Physiological Media", "Data for Biochemical Research", edited by Oxford University Press, 1968, 593.
215. I. OMURA, R. SATO. "Carbon monoxide binding pigment of livers microsomes". J. Biol. Chem., 1962, **237**, 1375.
216. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL. "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 1952, **193**, 265.
217. R.W. WAGNER, D.S. LAWRENCE, J.S. LINDSEY. "An improved synthesis of tetramesitylporphyrin". Tetrahedron Lett., 1987, **28** (27), 3069.
218. J.S. LINDSEY, H.C. HSU et J.C. SCHREIMAN. "Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions". Tetrahedron Lett., 1986, **27** (41), 4969.
219. A.I. VOGEL. "A text book of practical organic chemistry". Aromatic Compounds, édité par Longman, 1974, 541.
220. F.G. BORDWELL, B.B. LAMPERT, W.H. MCKELLIN. "Thianaphtene Chemistry. III- The reaction of 2,3-Dibromo-2,3-dihydro- and 2-bromo-thianaphtene-1-dioxides with secondary amines". J. Am. Chem. Soc., 1949, **71**, 1702.

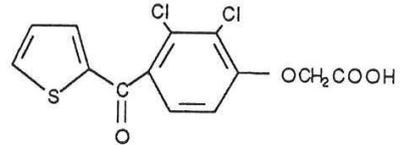
VII- PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

AC	anticorps
ACB	cf. VIII
ACMB	cf. VIII
ACPA	cf. VIII
ACPP	cf. VIII
AL	acide laurique
AT	acide tiénilique, cf. VIII
BT	benzo[b]thiophène
$\beta$ NF	$\beta$ -naphthoflavone
CBT	cf. VIII
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLO	clofibrate
CRE 4316	cf. VIII
DBT	cf. VIII
eq	équivalent
E	coefficient d'extinction molaire
G6PDH	glucose-6 phosphate deshydrogénase
$K_m$	constante de Michaelis
MBT	cf. VIII
NADH	nicotinamide dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide dinucléotide phosphate réduit
PB	phénobarbital
PCN	cyano-16 $\alpha$ prégnénolone
SU	suprofen, cf. VIII
3MC	méthyl-3 cholanthrène
5OHAT	cf. VIII
5OHCBT	cf. VIII
5OHMBT	cf. VIII
5OHSU	cf. VIII



YIII- PRINCIPAUX COMPOSES ETUDIES :  
STRUCTURES ET ABREVIATIONS UTILISEES

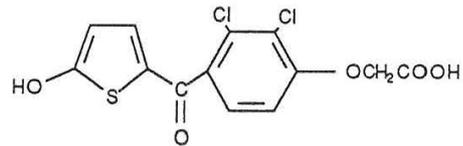
- ACIDE TIENILIQUE



AT

Acide [dichloro-2,3 (thenoyl-2)-4] phenoxyacétique.

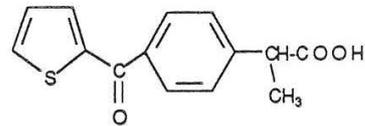
- ACIDE HYDROXY-5 TIENILIQUE



5OHAT

Acide [dichloro-2,3 (hydroxy-5 thenoyl-2)-4] phenoxyacétique.

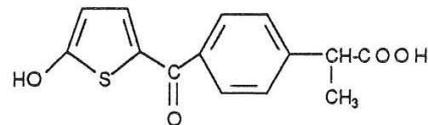
- SUPROFEN



SU

Acide [(thenoyl-2)-4] phényl-2 propanoïque.

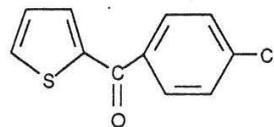
- HYDROXY-5 SUPROFEN



5OHSU

Acide [(hydroxy-5 thenoyl-2) 4] phényl-2 propanoïque

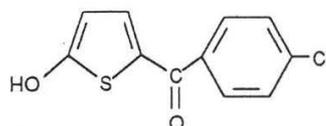
- PARACHLOROBENZOYL-2 THIOPHENE



CBT

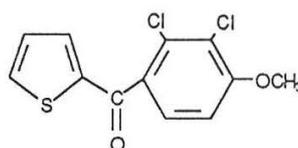


- HYDROXY-5 PARACHLOROBENZOYL-2 THIOPHENE



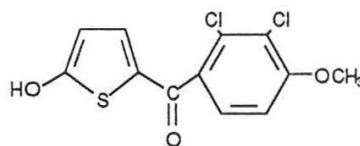
5OHCBT

- (DICHLORO-2',3' METHOXY-4')-BENZOYL-2 THIOPHENE



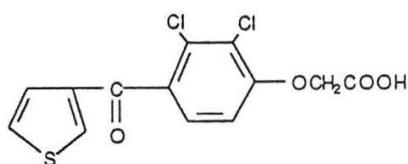
MBT

- HYDROXY-5 ( DICHLORO-2',3' METHOXY-4')-BENZOYL-2 THIOPHENE



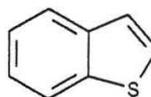
5OHMBT

- Acide [dichloro-2,3 (thényl-3)-4 phénoxy] acétique



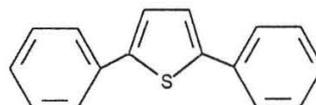
CRE 4316

- Benzo [b] thiophène



BT

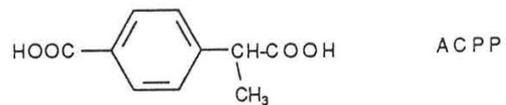
- Diphényl-2,5 thiophène



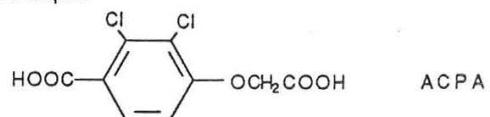
DBT



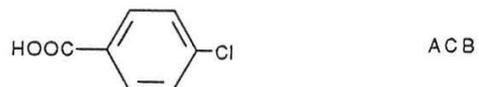
- Acide (carboxy-4') phényl-2 propionique



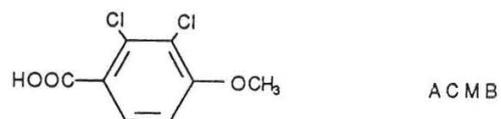
- Acide (carboxy-4' dichloro-2',3') phénoxy acétique



- Acide parachlorobenzoïque



- Acide dichloro-2,3 méthoxy-4 benzoïque





Ce travail a donné lieu à 2 publications :

- Hydroxylation of the thiophene ring : in vitro the 5-hydroxylation of tienilic acid is catalyzed by cytochrome P-450 in rat and human microsomes.

P.M. Dansette, C. Amar, C.B. Smith, E. Neau, C. Pons et D. Mansuy in Cytochrome P-450 : Biochemistry and Biophysics, Edited by I. Schuster, Taylor et Francis, 1989.

- Hydroxylation of the thiophene ring by hepatic monooxygenases : evidence for 5-hydroxylation of 2-aryl-thiophenes as a general metabolic pathway thanks to a simple UV-visible assay.

E. Neau, P.M. Dansette, V. Andronick et D. Mansuy  
Biochemical Pharmacology (en cours de publication).

