



HAL
open science

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : Mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène.

Hamid El Amri

► To cite this version:

Hamid El Amri. Activation métabolique des dérivés thiophéniques : Mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène. . Chimie thérapeutique. Université René Descartes, 1994. Français. NNT : . tel-01534569v2

HAL Id: tel-01534569

<https://hal.science/tel-01534569v2>

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.



Activation métabolique des dérivés thiophéniques : Mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène.

Hamid El Amri

► To cite this version:

Hamid El Amri. Activation métabolique des dérivés thiophéniques : Mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène. . Chimie thérapeutique. Université René Descartes, 1994. Français.

HAL Id: tel-01534569

<https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01534569>

Submitted on 7 Jun 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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
PARIS V**

SPECIALITE : TOXICOLOGIE

présentée par

HAMID EL AMRI

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'université Paris V

**ACTIVATION METABOLIQUE DES DERIVES
THIOPHENIQUES : MISE EN EVIDENCE D'UNE
NOUVELLE CLASSE DE METABOLITES
REACTIFS, LES SULFOXYDES DE THIOPHENE.**

Soutenue le mercredi 21 décembre 1994 devant le jury composé
de :

Monsieur Philippe BEAUNE
Monsieur André PICOT
Monsieur Francis SCHUBER
Monsieur Patrick DANSETTE
Monsieur Daniel MANSUY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Université Paris V
Paris-V - Sorbonne
350, rue de Valenciennes, 75015 PARIS

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques : **URA 400 CNRS**, sous la direction de monsieur le Docteur **DANIEL MANSUY**. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je suis très fier d'appartenir à son équipe et garderai ainsi le souvenir d'avoir travaillé au sein d'un groupe dont la compétence est connue à l'échelon international.

Je remercie vivement et je témoigne ma profonde gratitude à monsieur le Docteur **P.M DANSETTE**, pour son soutien et son amabilité. Son enseignement de qualité dans les domaines les plus variés a été pour moi une grande source d'enrichissement et m'a permis d'aborder le domaine de la recherche sous son meilleur jour.

Je remercie particulièrement, monsieur le Professeur **Ph. BEAUNE**, pour son amabilité que j'ai bien appréciée depuis le premier contact téléphonique alors que j'étais encore au Maroc. Qu'il trouve ici le témoignage de ma grande reconnaissance. Je le remercie également d'avoir bien voulu accepter de présider mon jury de thèse.

Je remercie monsieur le Professeur **F. SCHUBER** et monsieur le Professeur **A. PICOT** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et qui ont bien voulu juger ce travail.

Mes remerciements vont à Pascale Pouzet qui a un très bon esprit d'équipe et dont la synthèse de certains dérivés authentiques a permis la confirmation de la structure des métabolites de mes dérivés thiophéniques. Ils vont également à Madame le Docteur Colette Deschamps pour son aide à la vérification des références bibliographiques.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de l'unité URA 400 CNRS pour leur conseils les plus variés dans le domaine de la recherche.

Je suis reconnaissant à la commission des Communautés Economiques Européennes qui m'a apporté le soutien financier nécessaire à l'accomplissement de cette recherche.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A tous mes confrères vétérinaires de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.

A tous les officiers des Forces Armées Royale et de la Gendarmerie Royale Marocaine.

A ma famille et à tous mes amis

Publications et communications issues de ce travail

PUBLICATIONS

Dansette, P.M; Thang, D.C., El AMRI, H. and Mansuy, D. "Evidence for thiophene S-oxide as a primary reactive metabolite of thiophene *in vivo* : Formation of a dihydrothiophene sulfoxide mercapturic acid". Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol 186, N°3. Pages : 1624-1630, 1992.

El Amri, H., Erdelmeier, I., Rubinstenn, G., Pouzet, P., Thang, D.C., Mansuy, D. and Dansette, P.M.
"Benzothiophene urinary metabolites in the rat : Benzothiophene 1-oxide and Benzothiophene-1 sulfone, as reactive intermediates in the formation of mercapturic acids".
Publication en cours d'écriture.

COMMUNICATIONS

Dansette, P.M., Thang, D.C., El AMRI, H., Castellani, F. and Mansuy, D.
"Evidence for thiophene S-oxide as a primary reactive metabolite of thiophene *in vivo* : Formation of a dihydrothiophene sulfoxide mercapturic acid".

European Society of Biochemical Pharmacology
Thirteenth European Workshop on Drug Metabolism
September 21-25, 1992, Bergamo, Italy.

El Amri, H., Dansette, P.M., Thang, D.C., Erdelmeier, I., Castellani, F., Rubinstenn, G. and Mansuy, D.
"Urinary metabolites of benzothiophene (Thianaphtene) in rat are mercapturic acid of 2,3-dihydrobenzothiophene-S-oxide and S-dioxide".
Fifth European ISSX (International Society for the study of Xenobiotics) Meeting. Tours, France. September 26-29, 1993.

Bonierbale, E., Dansette, P.M., Desfosses, B., El Amri, H., Erdelmeier, I., Girault, J.P., Lopez-Garcia, P., Mansuy, D., Poli, S., Pouzet, P., Thang, D.C et Valadon, Ph.

"Activation métabolique des dérivés du thiophène : Implication dans le mécanisme d'hépatites médicamenteuses de type immunoallergique".

Journée scientifique des laboratoires de recherche de la faculté de médecine René Descartes-Saints-Pères. 1994.

El Amri, H., Dansette, P.M., Erdelmeier, I., Thang, D.C., Rubeinstein, G., and Mansuy, D. "Thiophene -S-oxides are biologically reactive intermediates of thiophenes". Congrès Biologically Reactive Intermediates V, Munich. République d'Allemagne. Janvier 1995.

LISTE DES ABREVIATIONS

AT :	Acide tiénilique
β -NF :	β -naphthoflavone
BZT :	Benzothiophène
BZT- ³ H :	Benzothiophène radioactif
BZT-SO :	Benzothiophène sulfoxyde
BZT-O ₂ :	Benzothiophène sulfone
CLO :	microsomes induits par le clofibrate
CONT :	microsomes controles (non induits)
CPM :	Coup par minute
CuI :	Iodure de cuivre
Cyt.P450 :	Cytochrome P450
DEX :	microsomes induits par la dexamethazone
DMF :	Diméthylformamide
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde
DPM :	Décomposition par minute
DPS :	Décomposition par seconde
DO :	Densité optique
FMO :	Monooxygénase à flavine
GSH :	Glutathion
GSH S-Tr	Glutathions S-Transférases
G6P :	Glucose 6 phosphate
G6P DH :	Glucose 6 phosphate deshydrogénase
HPLC :	High performance liquid chromatography
CHLP	Chromatography liquide haute performance
Ig :	Immunoglobulines
IR :	Infra-rouge
ip :	Intra-péritonéale
IAT :	Isomère de l'acide tiénilique
IE :	Impact électronique
LKM :	Liver Kidney Microsomes (microsomes du foie et du rein)
3MC :	3-méthylcholanthrène
mCi :	millicurie
NADH :	Nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit

NADP(H) :	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (réduit)
NAC :	N-acétyl-L-cystéine
nCi :	nanocurie
nmole :	nanomole
PB :	Phénobarbital
15 :	Le 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène
16 :	Le sulfoxyde du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène
PBZT-O ₂ :	La sulfone du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène
17	Alcool du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène
18	Alcool sulfoxyde du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène
19 :	Le 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène-3-hydroxy
PF :	Point de fusion
PR :	Pouvoir rotatoire
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹ H :	RMN du proton
RMN ¹³ C :	RMN du carbone 13
SM :	Spectre de masse
SG :	Système générateur
SD :	Rats Sprague Dawley
T- ³ H :	Thiophène tritié
TCA :	Acide trichloroacétique
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
tr :	Temps de rétention
Trs/min :	Tours/min
28	Sulfoxyde de 2,5-dihydrothiophène substitué en 2 par le soufre de la N-acétylcystéine.
31	Dimère majoritaire du sulfoxyde de thiophène
UV :	Ultra-violet
μCi :	microcurie

Résumé

L'activation métabolique du benzothiophène, de benzothiophènes substitués et du thiophène lui-même, *in vivo* chez le rat et *in vitro* en présence de microsomes hépatiques de rat, nous a conduit à la découverte d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène.

Le métabolisme *in vivo* du benzothiophène conduit à la formation de deux couples de métabolites majoritaires retrouvés dans les urines : A et A' et B et B' (probablement deux couples de diastéréoisomères) et trois produits minoritaires, D, D' et E. Une analyse spectrale détaillée (UV-visible, RMN ¹H RMN ¹³C, SM, IR) montre que A et A' et B et B' sont des acides mercapturiques correspondant respectivement à un sulfoxyde et une sulfone de dihydro 2,3-benzothiophène, substitués en position 3 par le soufre de la N-acétylcystéine (via la conjugaison avec le GSH). Les métabolites D et D' sont des produits de réduction de A et A' en sulfure. Le métabolite E, retrouvé dans l'urine conservée durant quelques jours à quelques semaines, est un produit de transformation de D et D', par réaromatisation ou par oxydation à l'air.

Le métabolisme *in vivo* et *in vitro* du benzothiophène substitué en 2 par un groupe p-chlorobenzoyl, subit deux réactions de métabolisme primaire : une S-oxydation du noyau thiophène et une réduction de la fonction carbonyle en alcool. Les autres métabolites dérivent de ces deux voies.

Le métabolisme *in vivo* du thiophène lui-même conduit à deux métabolites principaux. Le composé majoritaire **28**, représente 30% de la dose administrée. Le métabolite minoritaire **31**, représente 2% de cette dose. Toutes les études spectroscopiques (UV-visible, RMN ¹H RMN ¹³C, SM, IR) réalisées sur **28** sont en accord avec une structure de type sulfoxyde de 2,5-dihydrothiophène substitué en 2 par le soufre de la N-acétylcystéine. *In vitro*, le métabolisme oxydatif du thiophène conduit à la formation de **31** et son isomère **32**, des dimères du sulfoxyde de thiophène (via une réaction de Diels Alder). La formation *in vivo* de **28** ainsi que celle des dimères **31** et **32** sont deux preuves supplémentaires de la formation des sulfoxydes de thiophène comme métabolites réactifs des dérivés thiophéniques.

La découverte de cette nouvelle classe de métabolites réactifs, permet de remettre en cause les résultats de la littérature sur le métabolisme des dérivés thiophéniques (passage par un époxyde, Bray et coll, 1971) et de montrer que la réaction possible de ces sulfoxydes avec les nucléophiles cellulaires devrait avoir des conséquences importantes en toxicologie.

Summary

The metabolic activation of benzothiophene, 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophene and thiophene itself, *in vivo* in rat and *in vitro* with rat liver microsomes, leads to the discovery of a new class of reactive metabolites, Thiophene sulfoxides.

The *in vivo* metabolism of benzothiophene affords two major couples of metabolites in rat urine : **A**, **A'** and **B**, **B'**, and three minor products **D**, **D'** and **E**. The spectra analysis (UV, NMR ¹H, NMR ¹³C, MS, IR) reveals that **A**, **A'** and **B**, **B'** are mercapturic acid derived from benzothiophene sulfoxide or benzothiophene sulfone. These metabolites are formed by conjugation with glutathione and further processing to 3-S-(N-acetylcysteiny)-2,3-dihydrobenzothiophene sulfoxides or sulfones. The other metabolites **D** and **D'** are derived from **A** and **A'** by non-enzymatic reduction. The last product **E** was found in old urine and resulted from **D** and **D'** by rearomatisation.

The *in vivo* and the *in vitro* metabolism of 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophene undergoes two major pathways : the S-oxidation of the thiophene ring and the reduction of the carbonyl group into an alcohol. The others metabolites are derived from a combination of these two pathways.

The *in vivo* metabolism of thiophene itself leads to two metabolites : the major metabolite **28** represents about 80% of the total radioactivity and 30% of the administered dose. The minor metabolite **31** represents 2% of the administered dose. A detailed analysis of its UV, NMR ¹H, NMR ¹³C, mass and infra-red spectra shows that **28** is a 2-S-(N-acetylcysteiny)-2,5-dihydrothiophene sulfoxide.

In vitro the metabolism of thiophene leads to **31** as the major metabolite, and its isomer **32** (minor metabolite). **31** and **32** are dimers of thiophene sulfoxide resulting from a Diels Alder condensation.

The formation *in vivo* of **A**, **A'**, **B**, **B'** and **28**, and *in vitro* of **31** and **32** provides evidence for the intermediate formation of benzothiophene S-oxides and thiophene S-oxides as reactive metabolites.

This new class of reactive metabolites contradicts the earlier studies of Bray and al (1971) which suggests that thiophene derivatives are metabolized via an epoxide route. The possible reaction of thiophene sulfoxides with cellular nucleophiles should be of great consequences in toxicology.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1

Métabolisme des xénobiotiques et activation toxique :

Cas des dérivés du thiophène.

1- Introduction	1
1-1 Historique	5
1-2 Les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques	7
1-2-1 Les monooxygénases à P450	8
1-2-1-1 Structure et fonction des monooxygénases à P450	9
1-2-1-2 Distribution des monooxygénases à P450	17
1-2-1-3 Induction des monooxygénases à P450	18
1-2-1-4 Multiplicité des monooxygénases à P450	22
1-2-1-5 Spécificité des monooxygénases à P450	26
1-2-1-6 Facteurs de variation des monooxygénases à P450	29
1-2-1-6-1 Facteurs de variation liés à l'âge, sexe, etc.....	30
1-2-1-6-2 Facteurs de variations liés à l'inhibition des P450	31
1-2-2 Présentation des monooxygénases à flavine (FMO)	33
1-2-2-1 Généralité sur les FMO	33
1-2-2-2 Rôle des FMO dans le métabolisme des xénobiotiques	34
1-2-2-3 Cycle catalytique des FMO	34
1-2-2-4 Multiplicité des FMO	36
1-2-2-5 Spécificité des FMO	37
1-2-3 Les enzymes de conjugaison	37
1-2-3-1 La glucuronoconjugaison	39
1-2-3-2 La sulfoconjugaison	39
1-2-3-3 Les glutathions S-Transférases et la conjugaison avec le glutathion: formation des acides mercapturiques	39
1-2-3-4 Les époxydes hydrolases	43
1-3 Activation métabolique des molécules exogènes et toxicité	43
1-3-1 Etude des principaux métabolites réactifs	44
1-3-1-1 Les époxydes d'arènes	44
1-3-1-2 Les quinones imines	45
1-3-2 Fixations covalentes et toxicité	46

1-3-2-1	Intéraction des acides intermédiaires réactifs avec les acides nucléiques : génotoxicité	47
1-3-2-2	Fixations covalentes sur les protéines : cytotoxicité	47
1-3-3	Cas particulier des toxicités du type immunoallergique	47
1-3-3-1	Critères d'identification des toxicités du type immunoallergique	48
1-3-3-2	Mécanismes proposés pour la survenue des toxicités du type immunoallergique	48
1-3-3-3	Les exemples les mieux connus de toxicités du type immunoallergique	52
1-3-3-3-1	Description des principaux types d'antigènes connus	52
1-3-3-3-2	Cas de l'acide tiénilique	53
1-3-3-3-2-1	découverte de l'acide tiénilique (diurétique et uricosurique) et faits observés	53
1-3-3-3-2-2	Résultats et mécanisme général proposé	54
1-4	Métabolisme des dérivés thiophéniques	56
1-4-1	Rappels sur le métabolisme des dérivés soufrés	56
1-4-2	Dérivés du benzothiophène	57
1-4-2-1	Le dibenzothiophène	57
1-4-2-2	Le benzothiophène et dérivés substitués	57
1-4-3	Le thiophène	59
1-4-4	Les dérivés substitués du thiophène	62
1-4-4-1	Cas particulier des dérivés 2-aryyl thiophène	64
-	Cas de l'acide tiénilique	64
-	Le suprofen	68
1-4-4-2	Cas particulier de l'isomère de l'acide tiénilique	68
1-4-4-3	Les différences d'évolution comparées de l'acide tiénilique et de son isomère après oxydation métabolique.	70
1-4-4-4	Autres dérivés thiophéniques	72
1-4-4-5	Question : La formation du thiophène sulfoxyde est-elle un mécanisme général?	73
1-4-5	Etat de nos connaissances sur le thiophène sulfoxyde en chimie	73
1-4-5-1	Synthèse du thiophène sulfoxyde	73
1-4-5-2	Réactivité du thiophène sulfoxyde	76
1-5	Motivations de travail	77

CHAPITRE 2

Métabolisme du benzothiophène <i>in vivo</i> chez le rat	79
2-1 Etude des métabolites urinaires du benzothiophène	80
2-1-1 Identification des métabolites A et A' et B et B'	84
-Métabolites A et A'	84
-Métabolites B et B'	87
2-1-2 Synthèse du sulfoxyde de benzothiophène et de son conjugué avec la N-acétylcystéine	87
2-1-3 -Synthèse de la sulfone de benzothiophène et de son conjugué avec la N-acétylcystéine	88
2-1-4 Comparaison des métabolites A et A' et B et B' avec leurs authentiques de synthèse.	89
2-1-5 Nature des métabolites minoritaires D , D' et E	91
-Métabolites D et D' isolés de l'urine	90
-Synthèse chimique des métabolites D et D'	91
-Métabolite E isolé de l'urine	96
-Synthèse chimique du métabolite E	96
2-2 Métabolites urinaires du sulfoxyde de benzothiophène	97
2-3 Métabolites urinaires de la sulfone de benzothiophène	98
2-4 Métabolites urinaires des composés A et A'	100
2-5 Discussion	100

CHAPITRE 3

Métabolisme des benzothiophènes substitués	107
3-1 Motivations	108
3-2 Métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo (b)thiophène 15 <i>in vitro</i> .	110
3-3 Métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo (b)thiophène 15 <i>in vivo</i> chez le rat.	120
3-4 Etude de l'oxydation métabolique du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène 3-hydroxy 19 <i>in vitro</i> .	127
3-5 Discussion	129

CHAPITRE 4

Métabolisme du thiophène <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> chez le rat	132
4-1 Métabolisme du thiophène <i>in vivo</i> chez le rat.	133
4-2 Métabolisme du thiophène <i>in vitro</i>	142
4-2-1 Analyse des métabolites de la phase aqueuse	144

4-2-2 Préparation d'échantillons authentiques des dimères de sulfoxyde de thiophène	146
4-2-3 Recherche des dimères de sulfoxyde de thiophène dans l'urine de rats traités par le thiophène	152
4-3 Discussion	152
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	157
<u>ETUDE EXPERIMENTALE</u>	163
6-1 Origine des animaux	163
6-2 Origine des produits chimiques	163
6-2-1 Le benzothiophène	164
6-2-2 Le benzothiophène radioactif	164
6-2-3 Synthèse du sulfoxyde de benzothiophène	164
6-2-4 Synthèse de l'adduit du sulfoxyde de benzothiophène avec le mercaptoéthanol	165
6-2-5 Synthèse de l'adduit du sulfoxyde de benzothiophène avec la N-acétylcystéine	166
6-2-6 Synthèse de l'adduit de la sulfone de benzothiophène avec la N-acétylcystéine	167
6-2-7 Synthèse des authentiques des métabolites D et D'	168
6-2-8 Synthèse de l'authentique du métabolite E	168
6-2-9 Les benzothiophènes substitués	169
6-2-10 Le thiophène	169
6-2-11 Synthèse de l'authentique du métabolite 29	170
6-2-12 La β -glucuronidase et la sulfatase	170
6-2-13 Soluène-350	170
6-3 Les appareils de mesure et d'analyse	170
<u>6-4 Etudes <i>in vivo</i></u>	172
6-4-1 Traitement des rats par le benzothiophène	172
6-4-1-1 Isolement des métabolites urinaires	172
6-4-1-2 Isolement des métabolites urinaires du BZT- ³ H	173
6-4-1-3 Traitement des rats et isolement des métabolites urinaires du sulfoxyde de benzothiophène, de la sulfone de benzothiophène et des produits A et A' (sulfoxyde de 2,3-dihydrobenzothiophène substitué en 3 par le soufre	

de la N-acétylcystéine).	173
6-4-2 Traitement des rats par les benzothiophènes substitués	174
6-4-2-1 Passage de l'urine sur Sep Pak	174
6-4-2-2 Hydrolyse de l'urine par la sulfatase et la β-glucuronidase	174
6-4-2-3 Hydrolyse de l'urine par l'acide chlorhydrique et par l'acide trifluoroacétique.	175
6-4-2-4 Extraction des métabolites par le dichlorométhane après hydrolyse de l'urine	175
6-4-3 Traitement des rats par le thiophène radioactif	175
6-4-3-1 Isolement des métabolites urinaires	175
6-4-3-2 Extraction du thiophène radioactif des fécès	176
<u>6-5 Etudes <i>in vitro</i></u>	176
6-5-1 Induction des animaux et préparation de la fraction microsomale du foie de rat	176
6-5-2 Protocole de traitement des rats	177
6-5-2-1 Induction au phénobarbital	177
6-5-2-2 Induction au 3-méthylcholantène	177
6-5-2-3 Induction à la β-naphtoflavone	177
6-5-2-4 Induction au clofibrate	177
6-5-2-5 Induction à la dexaméthazone	177
6-5-2-6 Les microsomes induits par l'acétone	178
6-5-3 Protocole de préparation des microsomes	178
6-5-4 Dosages effectués sur les microsomes	179
6-5-5 Incubations analytiques	180
6-5-6 Préparation des échantillons pour l'analyse par HPLC	180
6-5-7 Incubations préparatives et prépurification sur Sep Pak	181
6-5-8 Réalisation des radioélogrammes et des radiochromatogrammes	181
6-5-9 Métabolisme <i>in vitro</i> des benzothiophènes substitués	181
6-5-10 Métabolisme <i>in vitro</i> du thiophène radioactif	182
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	186

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène

.....

CHAPITRE PREMIER

.....

METABOLISME DES XENOBIOTIQUES ET ACTIVATION TOXIQUE :

.....

1- Introduction

De toutes les relations que nous entretenons avec l'environnement, l'exposition aux xénobiotiques retiendra notre attention dans le travail qui va suivre. Ces molécules, dites xénobiotiques, constituent un grand nombre de substances étrangères qui pénètrent et agressent notre organisme quotidiennement. L'étude de leur élimination révèle que seule une fraction de la dose initiale est retrouvée intacte dans les urines ou les fèces, le reste étant sous forme de métabolites. L'existence de ce métabolisme répond à deux impératifs qui sont la nécessité d'une **élimination** rapide et le besoin d'une **détoxification**; en effet les métabolites plus hydrophiles que leurs parents autorisent une meilleure clairance urinaire (figure 1-1).

Sous le terme de xénobiotiques, on regroupe l'ensemble de substances qui se différencient des composés endogènes de notre organisme (protéines,

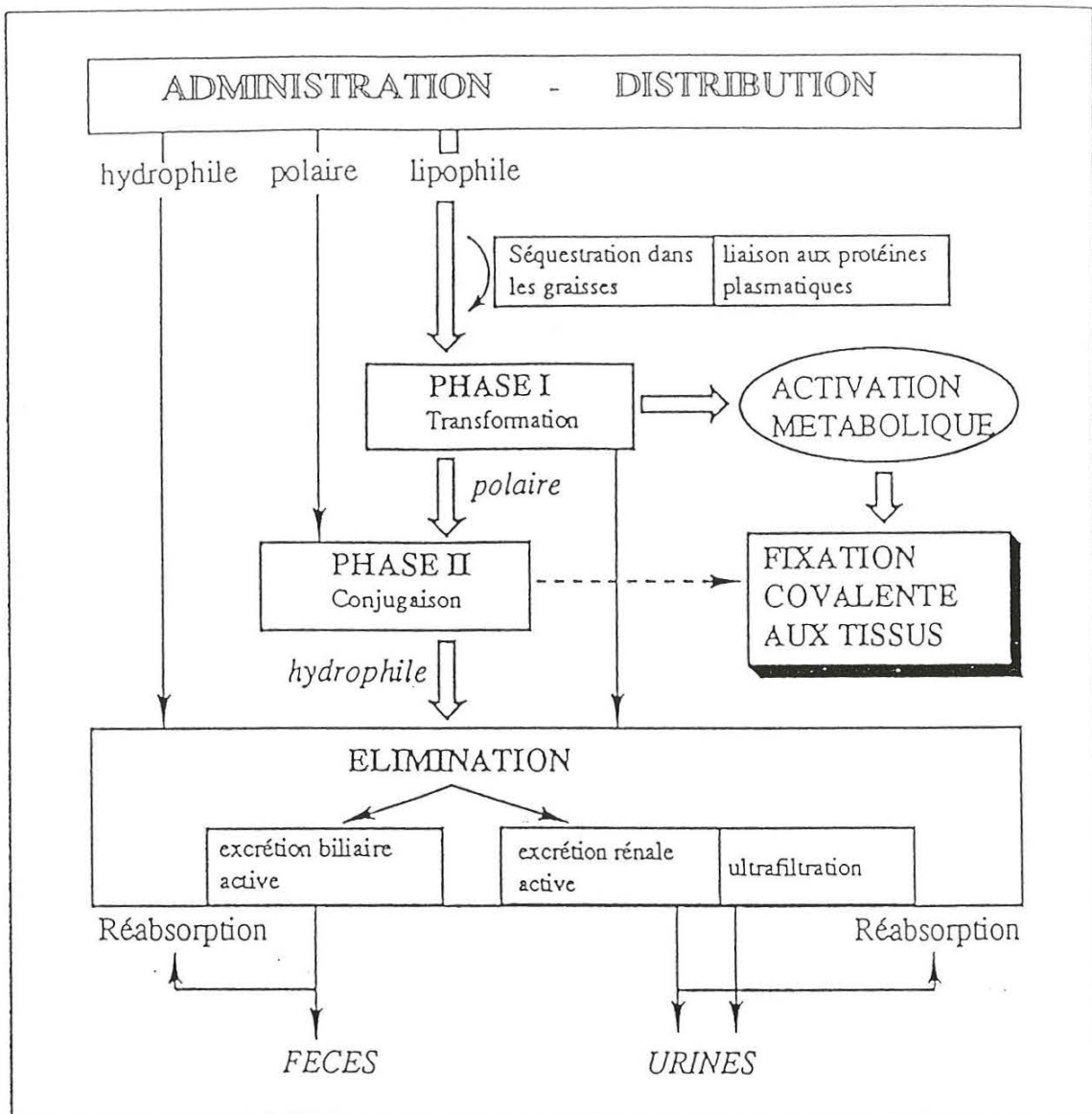


Figure 1-1

Système ADME : Administration-Distribution-Métabolisme et élimination des xénobiotiques

lipides, glucides ou vitamines ubiquitaires...) comme une toxine fongique, un alcaloïde végétal, un alcool issu de la fermentation mais aussi un médicament, un édulcorant, un polluant industriel ou un pesticide. A partir de leur administration, ces molécules étrangères se répandent dans l'organisme et, pour les plus hydrophobes d'entre elles, la membrane cellulaire ne constitue pas une barrière efficace. La cellule réagit à cette intrusion de molécules en faisant intervenir le système multi-enzymatique de détoxification cellulaire. Ce système enzymatique doit prendre en charge une multitude de molécules le plus souvent hydrophobes et peu fonctionnalisées. Il réalise ainsi des biotransformations peu spécifiques. fréquemment au cours de ces processus des entités réactives apparaissent. Elles sont à l'origine du **pouvoir toxicogène**, qu'il s'agisse d'un stress oxydant, d'un vieillissement cellulaire, d'une réponse immune, de tératotoxicité ou d'oncogénèse. On parle d'**activation métabolique**, encore appelée bioactivation ou toxication.

Certains médicaments après leur arrivée sur le marché et malgré une étude toxicologique préalable sérieuse, provoquent parfois des cas de toxicité aiguë chez l'homme. On pense que ces phénomènes sont dus à la formation de métabolites réactifs toxiques dans des conditions métaboliques particulières. Cependant, les médicaments n'ont pas (sauf exception) les caractères génotoxiques (non aigu) mis en évidence pour certains dérivés polycycliques aromatiques. Leur action se situe plus fréquemment sur d'autres cibles moléculaires (protéines, lipides, etc...). L'effet toxique se manifeste alors par des nécroses cellulaires (hépatotoxicité directe, toxicité pulmonaire et rénale, etc...). Parfois l'effet toxique est retardé, dû à un phénomène immunoallergique encore mal compris, bien qu'on pense que l'activation toxique provienne dans ce

cas de la fixation d'un haptène sur un constituant cellulaire qui devient immunogène.

La stratégie d'étude employée est la suivante :

-On recherche les métabolites primaires du médicament et on analyse si, lors de leur formation, il peut exister des intermédiaires réactifs. On étudie la toxicité et l'activité pharmacologique des métabolites ou d'authentiques de synthèse.

-On recherche si le médicament réagit *in vitro* avec les constituants cellulaires, on regarde ses effets sur les cultures cellulaires et enfin on réalise des tests *in vivo*. La démonstration d'une fixation covalente est une preuve de l'existence d'un intermédiaire réactif.

-On étudie *in vivo* et *in vitro* si des modulations des systèmes "d'activation toxique" modifient la toxicité ou la quantité de fixation covalente.

Cette stratégie d'étude a déjà été employée par divers groupes. En particulier, le groupe de Gillette au N.I.H a contribué à fonder les bases avec les études du métabolisme du paracétamol, de la phénacétine et du furosémide (Gillette et coll, 1976).

Dans le cadre d'une étude sur l'hépatite toxique d'origine médicamenteuse et plus particulièrement celle liée à l'acide tiénilique (Di-flurex®), (diurétique et uricosurique, portant dans sa structure un noyau thiophène), nous nous sommes proposés d'étudier le métabolisme des dérivés du thiophène, pour essayer d'établir les différentes voies métaboliques de formation des métabolites réactifs. Notre étude a été menée *in vivo* et *in vitro* et a concerné le benzothiophène, les benzothiophènes substitués et enfin le thiophène lui-même.

1-1-Historique

Dès le 19^{ème} siècle, des chercheurs s'emploient à comprendre et à expliquer de nombreuses réactions du métabolisme des composés exogènes. Comme le rapporte F. P. Guengerich dans une de ses revues (Guengerich, 1990a), c'est en 1784, selon Williams, que Rouelle isole l'acide hippurique (N-benzoylglycine) dans l'urine de bovins (Williams, 1959). En 1842, Keller démontre que ce composé résulte de la conjugaison de l'acide benzoïque ingéré avec la glycine (Keller, 1842). En 1867, Schultzen et Naunyn montrent que chez le chien et chez l'homme, le benzène subit une oxydation en phénol, retrouvé dans les urines (Schultzen et Naunyn, 1867). En 1879, Schmeideberg et Meyer caractérisent un glucuronide excrété. Des études dans les laboratoires de Baumann et Jaffé indiquent la formation d'acides mercapturiques qui, nous le savons à présent, proviennent de la dégradation de produits de conjugaison avec le glutathion (Baumann et Preusse, 1879; Jaffé, 1879). Cependant, les grandes découvertes concernant le métabolisme des xénobiotiques précèdent de loin celles des protéines impliquées dans ces biotransformations. En effet, ce n'est qu'en 1955 que les études d'Axelrod (Axelrod, 1955) et Brodie (Brodie et coll., 1955) révèlent l'existence, dans le réticulum endoplasmique hépatique, d'un système enzymatique capable de convertir différents médicaments et composés aromatiques en produits plus polaires en présence de NADPH, d'ions Mg^{2+} , de glucose-6-phosphate, de glucose-6-phosphate deshydrogénase et d'oxygène moléculaire. La même année (1955), Mason et collaborateurs, Hayaishi et collaborateurs, mettent en évidence l'existence d'enzymes capables d'insérer un ou deux atomes d'oxygène dans des substrats. En 1958, Klingenberg et collaborateurs, Garfinkel et collaborateurs, identifient dans des microsomes hépatiques de cochon et de rat, un pigment réductible par le NADPH et le dithionite et présentant une bande d'absorption dans le

visible à 450 nm après fixation de monoxyde de carbone. Ce pigment est ensuite caractérisé par Omura et Sato en 1964, comme étant une hémoprotéine. Elle est alors appelée cytochrome P450 .

En 1968, l'équipe de Coon purifie avec succès un P450 de lapin impliqué dans l'hydroxylation d'acides gras (Lu et Coon, 1968), l'équipe de Gunsalus isole une forme bactérienne, le P450cam (Katagiri et coll., 1968). Depuis la purification de ces premiers P450s dans les années 1970, le développement rapide de technologies nouvelles et puissantes ces dernières années, comme la biologie moléculaire, ont permis à la recherche dans le domaine des P450s de prendre un essor considérable. Il devint alors possible d'appréhender la complexité de ces enzymes à différents niveaux : multiplicité des isoformes, diversité des mécanismes de catalyse enzymatique, des substrats métabolisés, des mécanismes de régulation, diversité de l'expression et des activités catalytiques. Aujourd'hui, les P450s suscitent l'intérêt croissant de nombreux chercheurs travaillant dans des domaines aussi variés que la toxicologie, la pharmacologie, la chimie, la biologie cellulaire, la génétique moléculaire, l'endocrinologie, l'anesthésiologie, la nutrition, la pathologie, la cancérologie. Pourquoi? Probablement parce que les P450s jouent un rôle majeur dans le métabolisme d'une variété impressionnante de composés. Certains catalysent de manière très spécifique l'oxydation de substances endogènes physiologiquement importantes comme les stéroïdes, les acides gras, les prostaglandines, les leucotriènes, les vitamines lipo-solubles. D'autres catalysent de manière beaucoup moins sélective, celle des xénobiotiques comme les médicaments, les cancérogènes, les anesthésiques, les alcools, les solvants organiques, les pesticides, les antioxydants, les polluants de l'environnement.

Notons que le terme de "cytochrome P450" a désormais été abandonné par le Comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie (Nomenclature des protéines de transfert d'électrons, Recommandations 1989, Eur. J Biochem. (1991), 200: 599-611), la définition appropriée pour ces enzymes est désormais "protéines à hème thiolate".

1-2 Les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques

De nombreux composés exogènes (xénobiotiques) et parmi eux, les médicaments, sont trop souvent hydrophobes pour être facilement éliminés par l'organisme. La plupart des êtres vivants disposent de systèmes enzymatiques de détoxification capables de transformer ces composés en métabolites hydrosolubles, facilement éliminables par la bile ou l'urine.

Le foie est l'organe principal impliqué dans ces mécanismes de détoxification et plus particulièrement l'hépatocyte. Les composés hydrophobes pénètrent à l'intérieur de la cellule hépatique, grâce à leur grande solubilité dans la fraction membranaire lipidique. Une fois rentré dans la cellule, l'agent chimique va subir des processus de détoxification classiquement divisés en deux phases (figure 1-2) :

-Les enzymes de la **phase I**, ou encore dite phase de **fonctionnalisation**. Deux classes majeures d'enzymes interviennent dans la phase I, du processus de détoxification. Ce sont les monooxygénases à P450 (Cf 1-2-1) et les flavines monooxygénases (Cf 1-2-2). Le produit stable de la réaction est généralement plus hydrophile (Hamill et Cooper, 1984) que la molécule de départ et peut être après conjugaison, éliminé plus aisément par l'organisme (Dutton, 1971; Dodsgon, 1977).

-Les enzymes de la **phase II** ou enzymes de **conjugaison**, qui rendent le substrat encore plus hydrophile et donc facile à éliminer, en le couplant à des groupements plus hydrophiles.

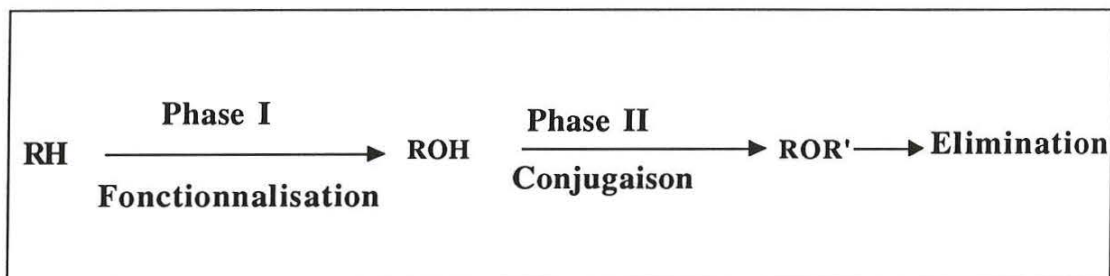


Figure 1-2

Enzymes de phase I et de phase II :

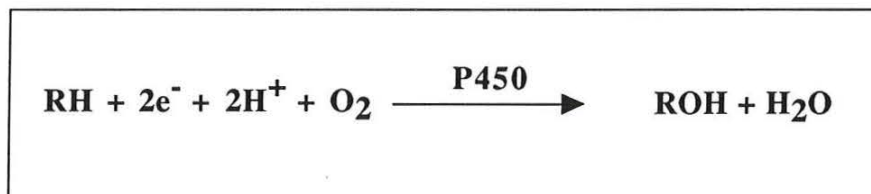
Bilan global de fonctionnalisation, de conjugaison et d'élimination d'un exogène

RH : substrat hydrophobe, ROH : substrat hydroxylé, ROR' : substrat conjugué

1-2-1 Les monooxygénases à cytochrome P450

Les monooxygénases à cytochrome P450 sont des systèmes multienzymatiques qui activent l'oxygène moléculaire et conduisent à l'incorporation de l'un de ses deux atomes au niveau d'un substrat.

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



Le cytochrome P450 doit son nom à la position du pic d'absorption à 450 nm (bande de Soret) qui apparaît sur le spectre UV-Visible du complexe

cytochrome P450 réduit-CO. La nature cytochromique de ce pigment fut démontrée quelques années après la découverte de l'enzyme, de même que sa participation à des réactions monooxygénasiques (Omura et coll, 1964a; 1964b; 1978). Cette caractérisation a été contemporaine d'une autre découverte importante : l'augmentation *in vivo* des activités hydroxylantes des microsomes hépatiques sous l'action de certains agents chimiques inducteurs, comme le phénobarbital et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Conney et coll, 1957; Conney et coll, 1967).

1-2-1-1 Structure et fonction des monooxygénases à cytochrome P450

Les monooxygénases à cytochrome P450, doivent leur activité à quatre éléments essentiels :

-Le cytochrome P450 qui est une hémoprotéine (figure 1-3-A). Il est constitué d'une seule chaîne polypeptidique et d'un groupe prosthétique (Mansuy, 1981). Il existe une très grande analogie structurale dans cette famille d'enzymes. Les isoenzymes diffèrent alors par leur composition en acides aminés. Leur poids moléculaire se situe entre 45.000 et 60.000 Da. La fonction principale consiste à activer l'oxygène moléculaire pour en insérer un atome dans un substrat.

L'hème est constituée d'une protoporphyrine IX de fer (figure 1-3-B) et se trouve dans une cavité de la protéine, isolé du milieu aqueux. Une portion de cette cavité est particulièrement hydrophobe, elle constitue le site actif sur lequel vont se fixer les substrats. Le ligand thiolate constitue une particularité du P450 par rapport aux autres hémoprotéines. Cette particularité semble liée à la fonction de monooxygénation des P450s.

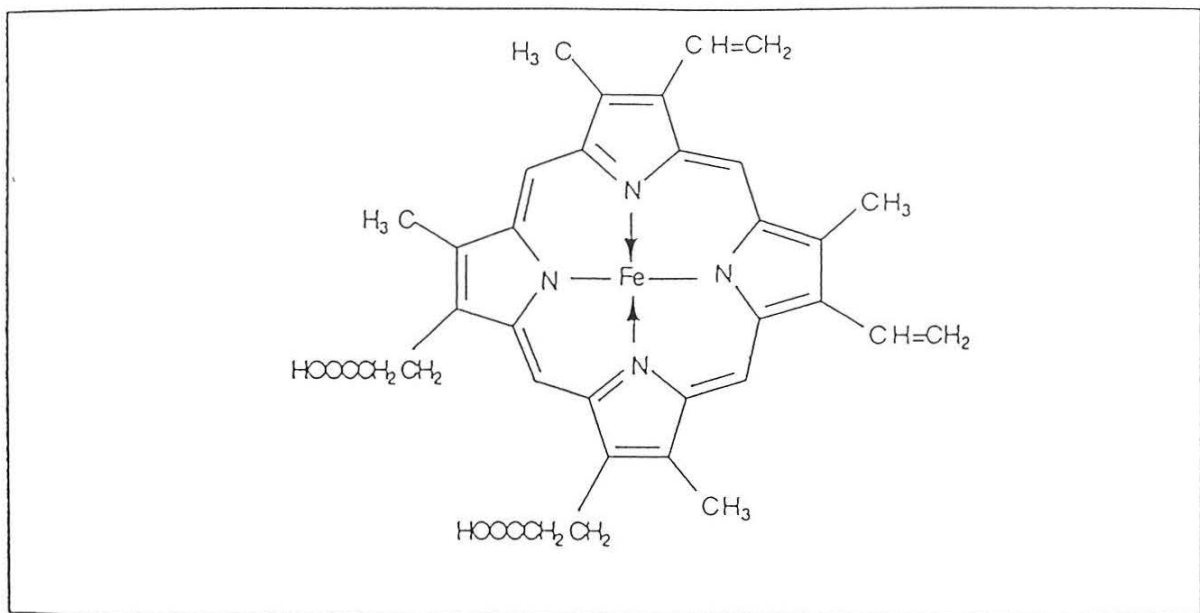
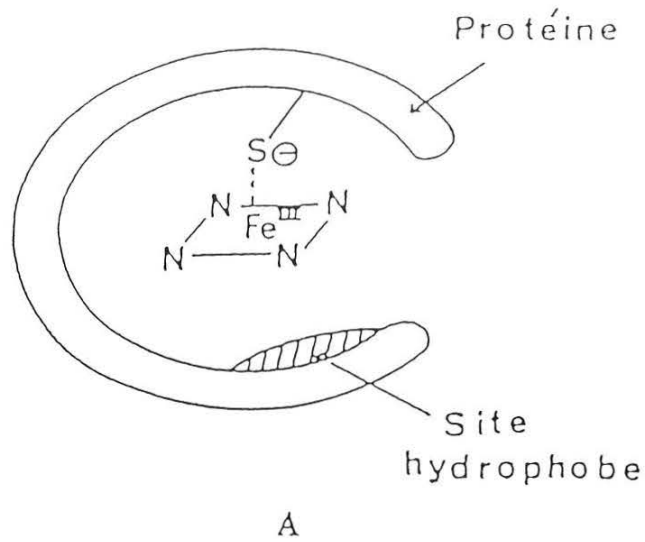


Figure 1-3

Présentation schématique des cytochromes P450S (A) (d'après Mansuy, 1981) et de la protoporphyrine IX du fer (B) (d'après Koch et coll, 1975; White et Coon, 1980)

-Les réductases des monooxygénases à P450 :

-La NADPH cytochrome P450 réductase : un système de transfert des électrons du NADPH au site d'activation de l'oxygène (White et Coon, 1980) (figure 1-4). Il s'agit le plus souvent d'une flavoprotéine, la NADPH cytochrome P450 réductase. C'est une enzyme qui assure le transfert au cytochrome P450 des électrons provenant du NADPH. Au niveau hépatique cette enzyme microsomale est une flavoprotéine d'un poids moléculaire de 80 000 Da. Sa purification à partir du foie et ses propriétés ont été décrites par Strobel et coll. en 1978. Elle ne contient pas de métaux, mais deux cofacteurs flaviniques : la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) (1 mole de chaque cofacteur/mole d'enzyme) (Digman et coll, 1975 (figure 1-4)).

-Le cytochrome b5 : Dans certains cas une deuxième protéine, souvent couplée au cytochrome P450, transfère directement des équivalents réducteurs au P450. Le cytochrome b5 peut être réduit par l'une ou l'autre des deux flavoprotéines, la NADPH cytochrome P450 réductase ou la NADH cytochrome b5 réductase.

Le cytochrome b5 est une hémoprotéine présente dans le réticulum endoplasmique, mais également dans les mitochondries. Sa purification à partir des microsomes de foie ainsi que ses propriétés sont décrites (Strittmatter, 1967). Bien que possédant comme le cytochrome P450 un atome de fer lié aux quatre noyaux pyrrole de l'hème, celui-ci est incapable de fixer des ligands comme l'oxygène ou l'oxyde de carbone. En effet, les deux positions de coordination du fer, contrairement à celles du cytochrome P450, sont occupées par des atomes de la protéine. Il ne possède aucune activité catalytique connue à ce jour et sa concentration cellulaire reste inchangé après traitement par des inducteurs.

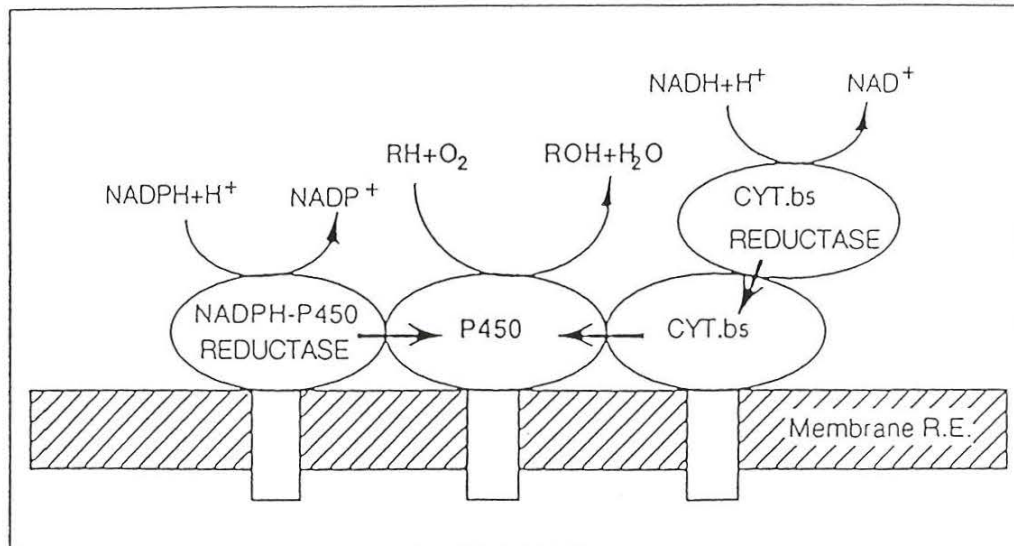


Figure 1-4

Schéma des différentes protéines du complexe monooxygénasique dans la membrane du réticulum endoplasmique hépatique, (d'après White et Coon, 1980).

-Des lipides : Les lipides sont indispensables au fonctionnement catalytique du système oxydatif des microsomes (Lu et coll, 1969a et 1969b). La phosphatidylcholine en est le composant majeur (55%). Bien que le mécanisme de l'effet des lipides sur l'activité du système ne soit pas bien connu, il semble qu'ils facilitent la formation du complexe substrat-cytochrome P450 ainsi que le transport des électrons entre la NADPH-cytochrome P450 réductase et le cytochrome P450 (Strobel et coll, 1970). De plus, il est probable que les lipides aient un rôle protecteur et stabilisateur du cytochrome P450. En effet, lorsque ce dernier est isolé de la membrane microsomale et solubilisé, il peut se dénaturer rapidement en cytochrome P420. Les lipides minimisent cette conversion. Les détergents non ioniques, par leur structure physico-chimique, peuvent lorsqu'ils sont liés au cytochrome P450, jouer ce même rôle protecteur et assurer le fonctionnement catalytique du système oxydatif reconstitué (Lu et coll, 1979). Les lipides modulent aussi la fixation du substrat sur le cytochrome P450 (Coon et coll, 1976).

Cycle catalytique des monooxygénases à P450 (Figure 1-5)

Depuis de nombreuses années, la chimie des P450s a fait l'objet d'intenses recherches dans un grand nombre de laboratoires. Des études mécanistiques réalisées sur le P450cam (Poulos et coll, 1991; Sligar et coll, 1991) et sur des modèles biomimétiques à base de métalloporphyrines (Mansuy et coll, 1987a, 1989) ont permis de mieux comprendre les mécanismes de catalyse des P450s et notamment la caractérisation des complexes intermédiaires du fer impliqués dans l'activation de l'oxygène moléculaire et dans l'oxydation des substrats. Un schéma mécanistique général a pu être proposé pour l'ensemble des réactions catalysées par les P450s (White et coll, 1980; Ortiz de Montellano, 1986; Mansuy et coll, 1989; Guengerich et coll 1992a).

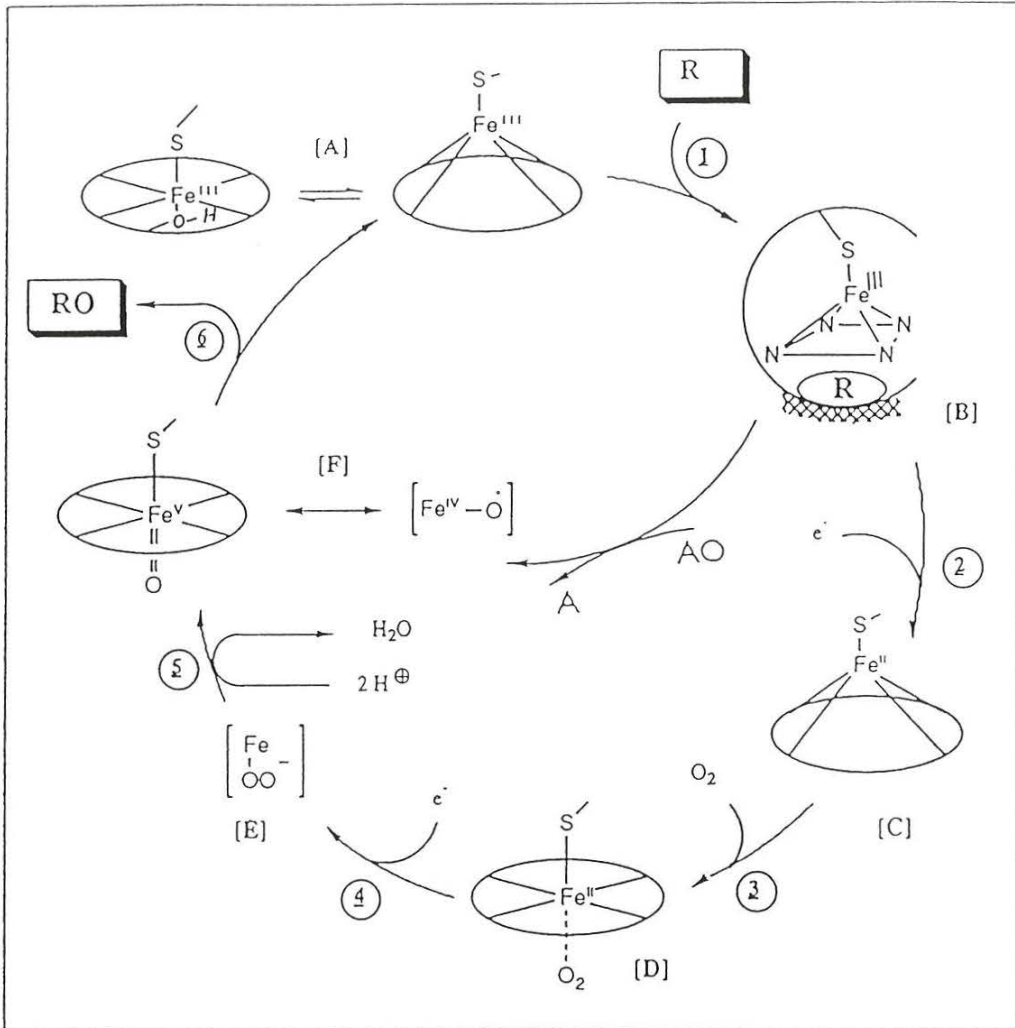


Figure 1-5

Cycle catalytique du cytochrome P450

R est le substrat, RO sa forme oxydée; la poche de l'hème et le site de fixation du substrat sont schématisés dans le complexe (B); Le composé AO est un donneur d'atome d'oxygène dans le cycle court du cytochrome P450, (D'après Mansuy, 1981)

Au repos (A), en absence de substrat, le cytochrome P450 est à l'état oxydé Fe(III) et il est en général en équilibre entre deux formes : la forme bas-spin, correspondant à un complexe hexacoordiné du Fe (III) comportant deux ligands axiaux, le cystéinate et probablement une molécule d'eau. La forme haut-spin correspondant à un complexe pentacoordiné, avec comme unique ligand axial le cystéinate.

L'étape initiale est la fixation du substrat RH sur le site hydrophobe de la protéine. L'interaction du substrat avec la forme bas spin ($S=1/2$) provoque une modification conformationnelle de l'apoprotéine et le passage à l'état spin élevé ($S=5/2$) (B). 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 P450. En effet de la transition bas-spin, haut-spin du Fe(III) de l'hème, résulte un spectre de type I qui présente un minimum à 420 nm et un maximum à 390 nm.

Le complexe B (enzyme-substrat) est alors réduit au cours de cette deuxième étape du cycle catalytique en un complexe pentacoordiné du fer (II) (C).

La troisième étape est la fixation réversible de l'oxygène sur le site de coordination vacant du fer (II) pour former l'oxycytochrome P-450, ou le complexe oxygéné du fer (D) qui peut aussi être décrit comme un complexe superoxo du fer (III) (Collman et coll, 1976). L'arrivée d'un deuxième électron provenant du NADPH (ou NADH si la catalyse se fait par le cytochrome b5), conduit alors à l'entité active du cycle catalytique : un complexe peroxy du fer (III), complexe à oxygène actif (E) qui s'écrit sous les formes suivantes : $P450 \text{ Fe (III)(O}_2^{2-})$ ou $P450 \text{ Fe (III)-O-O}\cdot$. Il est actuellement admis que c'est le Fe (V)=O (F) à haut degré d'oxydation qui transfère son atome d'oxygène sur le substrat, le deuxième atome

d'oxygène est éliminé sous forme de H₂O (Mansuy et coll, 1981). L'insertion d'un atome d'oxygène de l'entité réactive vers le substrat et la dissociation du produit permettent la régénération du P450 natif à l'état initial de fer ferrique (Fe(III)) (étape A). Le mécanisme généralement admis pour l'hydroxylation d'un substrat par le P450 implique l'abstraction d'un atome d'hydrogène ou d'un électron du substrat noté RH, générant un radical et l'insertion de l'atome d'oxygène par recombinaison radicalaire (figure 1-6) :

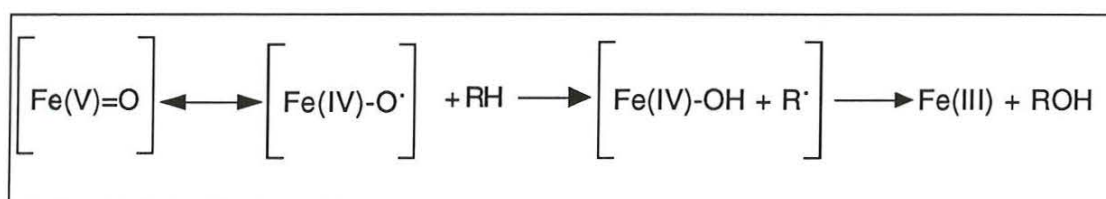


Figure 1-6

Mécanisme général d'hydroxylation d'un substrat par les monooxygénases à P450

Le cycle catalytique du cytochrome P450, peut aboutir à d'autres produits en cas d'absence de molécules de substrat adéquat (Parkinson et coll, 1986); ainsi l'oxygène lié au P450 peut être réduit en superoxyde, en H₂O₂ ou en H₂O. D'autre part, plusieurs travaux ont montré que les diverses oxydations, catalysées par le cytochrome P450, pouvaient être réalisées en remplaçant *in vitro* le système NADPH/O₂ par des agents oxydants donneurs d'atomes d'oxygène, comme par exemple des hydroperoxydes, (ROOH), des peracides (RCOOOH), des anions oxygénés (ClO₂⁻, IO₄⁻) des iodosoarènes(ArIO).

Il existe donc deux cycles catalytiques, au cours desquels se forme la même entité active P450 Fe (V) = O :

-Un cycle court (non physiologique) utilisant *in vitro* un donneur d'atome d'oxygène en absence de NADPH/O₂.

-Un cycle long, qui intervient *in vivo* et également *in vitro*.

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 capable d'hydroxyler toute une gamme de composés, y compris les plus inertes, comme les alcanes.

Dans les conditions biologiques, le complexe cytochrome P450 Fe (II), très enrichi en électrons par le ligand thiolate, lui confère par ailleurs une activité réductrice particulièrement vis à vis des dérivés halogénés, ArNO₂, N-oxydes, etc.....

1-2-1-2 Distribution des monooxygénases à P450.

Les cytochromes P450 se trouvent chez les mammifères, chez les crustacés, les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les insectes (Creaven et coll, 1967; Strittmatter et coll, 1969; Morello et coll, 1971; Pohl et coll, 1974). Ils existent aussi chez les végétaux supérieurs tel que le sorgho et le germe du blé (Murphy et West, 1969; Potts et coll, 1974) et chez les microorganismes tel que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas putida* (Lindenmayer et Smith, 1964). En outre chez les mammifères, il semble s'agir d'une protéine ubiquitaire puisqu' elle a été mise en évidence dans de très nombreux tissus (Ciaccio et Devera, 1976). Le foie est l'organe qui a la concentration la plus élevée en cytochrome P450 : 0,8 à 1,0 nmole/mg de protéines dans les microsomes de foie de rat. Les cytochromes P450 se trouvent répartis à différents niveaux de la cellule : le réticulum endoplasmique lisse et rugueux (microsomes), la membrane nucléaire et les mitochondries. Les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont principalement localisés dans les microsomes. Par contre dans le cortex surrénalien,

certains cytochromes P450 assurant principalement l'hydroxylation des stéroïdes se trouvent dans les mitochondries (Dubois et coll, 1981), ceux assurant principalement le métabolisme des xénobiotiques se trouvent dans les membranes microsomales (Kupfer et coll, 1981).

Les cytochromes P450 sont localisés à des quantités très variables, dans une grande variété d'organes autres que le foie. Ils ont été décrits dans le cerveau, les surrénales, les reins, les testicules, les ovaires, le placenta, l'intestin, le poumon et la peau. Il va sans dire que ces deux derniers organes sont les plus exposés à l'environnement chimique et aux différents agents exogènes.

La concentration en cytochrome P450 des microsomes du cerveau de rat par exemple et de l'ordre de 0,03 nmole/mg de protéines (Marietta et coll, 1980) .

Provenant du reticulum endoplasmique après homogénéisation et centrifugation de la cellule (voir partie expérimentale), de petites particules ont été obtenues pour la première fois par Claude, en 1938 et nommées microsomes en raison de leur petite taille (200 nm en moyenne). Les microsomes sont considérés comme des équivalents biochimiques du reticulum endoplasmique. En plus des cytochromes P450, les microsomes hépatiques renferment un grand nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Les préparations microsomales demeurent un système relativement facile à mettre en oeuvre, pour étudier *in vitro* le métabolisme des xénobiotiques et pour évaluer le pourcentage en cytochrome P450, du contenu protéique total des microsomes hépatiques de rat, traité par un inducteur tel que le phénobarbital par exemple.

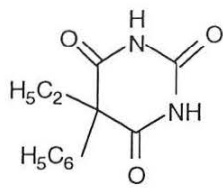
1-2-1-3 Induction des monooxygénases à P450

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.

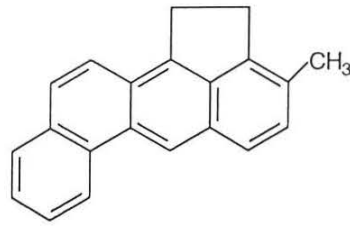
Par un phénomène commun à l'homme et à la bactérie, l'organisme s'adapte aux changements de son environnement en augmentant sélectivement son contenu cellulaire en une ou plusieurs protéines bien déterminées. Ce processus est connu sous le nom d'induction. Le fait que le cytochrome P450 des cellules de mammifères puisse être induit par l'exposition à un xénobiotique a été découvert il y a trente ans (Conney et Remmer, 1967). L'administration à un animal de laboratoire de certaines substances inductrices provoque une augmentation spectaculaire de la biotransformation hépatique avec : une augmentation de la concentration hépatique et une modification des propriétés spectrales et catalytiques des cytochromes P450. En fonction des caractéristiques structurales et des modifications apportées au système des cytochromes P450, cinq grandes classes d'inducteurs ont été identifiées à ce jour (Figure.1-7).

-Le phénobarbital (PB).

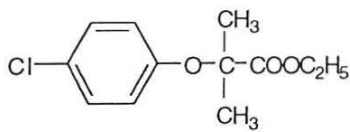
Le phénobarbital et d'autres composés sont capables d'augmenter l'activité des P450s 2A, 2B(2B1, 2B2), 2C6, de rat, mais également celle de certains P450s 3A (3A1, 3A2). Remarquons que d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques comme la NADPH cytochrome P450 réductase, l'aldéhyde déshydrogénase, l'époxyde hydrolase, l'UDP-glucuronyl transférase et plusieurs glutathion S-transférases sont aussi induites.



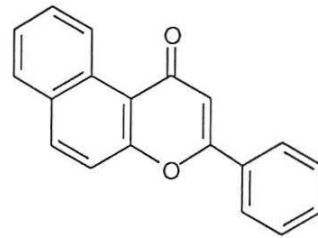
Phénobarbital (PB)



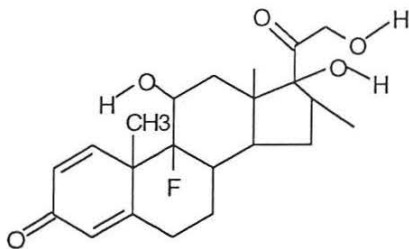
Méthyl-3-cholanthène (3MC)



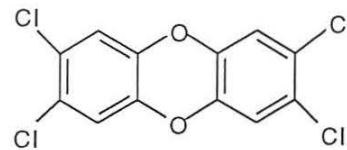
Clofibrate (CLO)



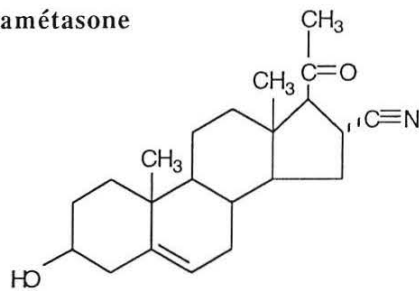
β-naphtoflavone (β-NF)



Dexamétasone



Dioxine (TCDD)



16-α-Cyano-pregnenolone (PCN)

Figure 1-7

Inducteurs classiques des cytochromes P-450 chez L'animal de laboratoire. Certains inducteurs ont servi à la réalisation de ce travail.

-Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA).

Le 3-méthylcholanthrène, le TCDD (2,3,7,8-tétrachlorobenzodioxine), la β -naphthoflavone, le benzo(a)pyrène induisent le P450 1A1 chez le rat et la souris.

-Les stéroïdes et les antibiotiques macrolides

L'induction d'une forme de P450 par la trioleandomycine a été découverte pour la première fois par Pessayre et coll en 1981. Après l'induction de P450s par d'autres glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone et des antiglucocorticoïdes tels que la prégnénolone a été montrée (Wrighton et coll, 1985). Ces P450s induits sont de la famille 3A(3A1 et 3A4,) (Sartori et coll, 1985; Mansuy et coll, 1993). D'autres antibiotiques macrolides comme le triacétate d'oléandomycine, l'érythromycine ou la rifampicine induisent la même forme de P450s (Watkins et coll, 1985).

-Les agents hypolipidémiants

Le clofibrate augmente l'expression des formes de la sous-famille 4A impliquées dans l' ω -oxydation des acides gras. Le rôle du récepteur au proliférateurs de peroxisomes, dans l'induction des P450s 4A, par le clofibrate, a été étudié sur la forme 4A6 de lapin (Muerhoff et coll, 1992) et 4A1 de rat (Gibson, 1992).

-L'éthanol

L'éthanol mais aussi l'acétone, le benzène, l'imidazole (et ses dérivés), l'isoniazide ainsi que le jeûne induisent le P450 2E1. Chez les rongeurs, le P450 2E1 induit est régulé de manière post-transcriptionnelle par un processus de stabilisation de la protéine.

A coté des formes inductibles, d'autres formes (notamment les P450 : 2C8, 2C9 et 2C10 chez l'homme, 2C11, 2C13 chez le rat mâle; 2C12 et

2C13 chez la ratte (Waxman.D.J, et coll, 1985) ne possèdent pas d'inducteurs spécifiques connus à l'heure actuelle.

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 telles que le dosage urinaire du 6 β -hydroxy-cortisol, marqueur du contenu hépatique en P450 3A (Ged et coll, 1989).

1-2-1-4 Multiplicité des monooxygénases à P450 (tableau. 1-1).

Sur la base des résultats d'alignement de sequences protéiques de P450s, Nelson et Strobel proposent en 1987 un arbre phylogénétique à partir duquel un mécanisme d'évolution fût suggéré. Les P450s constituent une famille supergénique et dériveraient d'un gène ancestral commun, datant de 3,5 milliards d'années (Gonzalez, 1991b). Les premiers P450 seraient localisés dans les bactéries, les levures et les plantes, probablement impliqués dans le métabolisme des stéroïdes comme le cholestérol, pour maintenir l'intégrité et la structure des membranes biologiques. Beaucoup plus récemment, apparaissent les enzymes de biotransformation des composés exogènes lors des derniers 100 à 500 millions d'années.

Différents facteurs semblent être responsables de l'émergence ou de la disparition de nouvelles formes des P450s au sein d'une même espèce : les phénomènes de duplication génique et la nécessité pour chacune des espèces de se défendre contre de nouvelles molécules toxiques de l'environnement.

Tableau. 1-1: Nomenclature, classification et multiplicité des gènes des cytochromes P450 de différentes espèces animales.

(Les gènes et les protéines ont la même nomenclature, sauf que celle des gènes est écrite en "*italique*" (d'après Nelson et coll, 1993)).

Désignation des gènes ou des protéines de P450	Espèce animale correspondante
<i>CYP 1A1</i>	Rat, Souris, Lapin, homme
<i>CYP 1A2</i>	Homme, Rat, Souris, Lapin
<i>CYP 2A1</i>	Homme, Chien, Rat
<i>CYP 2A2</i>	Rat
<i>CYP 2A4</i>	Souris
<i>CYP 2A5</i>	Souris
<i>CYP 2A6</i>	Homme
<i>CYP 1B1</i>	Lapin
<i>CYP 1B2</i>	Lapin
<i>CYP 2B1</i>	Rat
<i>CYP 2B2</i>	Rat
<i>CYP 2B4</i>	Lapin
<i>CYP 2B11</i>	Chien
<i>CYP 2C2, 2C3, 2C5</i>	Lapin
<i>CYP 2C6, 2C7</i>	Rat
<i>CYP 2C8, 2C9, 2C18, 2C19</i>	Homme
<i>CYP 2C11, 2C12, 2C13</i>	Rat
<i>CYP 2D6</i>	Homme
<i>CYP 2E1</i>	Homme, Rat, Lapin
<i>CYP 2E2</i>	Lapin
<i>cyp 2F2</i>	Souris
<i>CYP 2G1</i>	Lapin
<i>CYP 3A1, 3A2</i>	Rat
<i>CYP 3A3, 3A4, 3A5, 3A7</i>	Homme
<i>CYP 3A6</i>	Homme, Lapin
<i>CYP 3A8</i>	Singe
<i>CYP 4A1, 4A2, 4A3</i>	Rat
<i>CYP 4A4, 4A5, 4A6, 4A7, 4B1</i>	Lapin

La grande variété de substrats métabolisés par les P450s et le caractère inductible de certains P450s, a permis de postuler l'existence de familles d'isoenzymes qui ont pu être par la suite caractérisées et clonées, et dont la liste continue de s'accroître. Chaque cytochrome P450 est codé par un gène différent (revues Nebert et coll, 1987; 1989; 1991). Durant les cinq dernières années, plus de deux cents ADN complémentaires pleine longueur ont été clonés, dont environ une trentaine chez l'homme. Comme pour chaque champ de recherches et d'activités intenses, plusieurs nomenclatures ont été proposées pendant ces dix dernières années, décrivant toutes des protéines apparemment identiques (Michael et coll, 1990). Récemment, une classification rationnelle a été proposée, dans laquelle les gènes de P450 sont classés en familles et en sous familles, en fonction de leur degré de similitude dans la séquence en amino-acides des protéines codées. Ainsi, les gènes codant pour des protéines possédant moins de 36% d'homologie appartiennent à des familles différentes (tableaux 1-1 et 1-2). A l'heure actuelle, huit familles de protéines différentes sont répertoriées chez l'homme, chacune étant désignée par un chiffre arabe depuis la nouvelle nomenclature de 1991.

Dans chacune des familles 1, 2, 3 et 4, les isoenzymes qui présentent au moins 70% d'homologie, sont classées en sous familles et désignées par une lettre capitale (tableau 1-1). En ce qui concerne la classification et la nomenclature, Nelson et coll, 1993, recommandent pour le gène codant pour le P450 correspondant et l'ADNc, le symbole *CYP* pour l'Homme, *cyp* pour la souris (la nomenclature des protéines est la même que celle des gènes sauf que le symbole "**CYP**" ne s'écrit pas en italique), suivi par un chiffre arabe désignant la famille, une lettre désignant la sous famille (lorsqu'il y a deux ou plus de deux familles) et un chiffre arabe représentant le gène individuel à l'intérieur de la sous famille

Tableau. 1-2 : Homologies entre les cytochromes P450 de foie humain et de rat. (d'après Guengerich, 1987a et 1987b; Nelson et coll, 1993)

Cytochromes P450 humains	Cytochromes P450 de rat
2C8	2C11
	2C12
2C9	2C11
	2C12
2D6	2D1
3A3, 3A4	3A1
1A2	1A2
1A1	1A1

(Tableau.1-1). Par exemple, *CYP 1A1* et *CYP 1A2* sont les gènes individuels 1 et 2 de la famille 1 et de la sous-famille A. On compte actuellement 221 gènes de P450s caractérisés, décrits chez 31 eucaryotes et procaryotes (Nelson et coll, 1993), et l'on estime à plus de 200 000 le nombre de substrats potentiels de ces enzymes (Coon et coll, 1992). Chez l'homme, il existe actuellement plus de 30 formes de P450s, classées en 11 familles et 17 sous-familles (Nelson et coll, 1993). Les familles 1,2,3 et 4 sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, les autres jouent un rôle critique dans les voies métaboliques de biosynthèse des stéroïdes et des acides biliaires.

Dans le but d'extrapoler à l'homme les études du métabolisme des xénobiotiques effectuées chez l'animal (le rat notamment), il semblait intéressant de comparer les différentes formes de cytochromes P450 de foie humain à celles présentes chez le rat. Le tableau 1-2, résume l'état actuel des travaux, (Guengerich, 1987a et 1987b; Nelson et coll, 1993). Les homologues présentes, entre cytochromes P450 de foie humain et de rat, sont basées d'une part sur une réactivité immunologique croisée (reconnaissance d'une forme par des anticorps dirigés contre une autre forme), et d'autre part sur la comparaison des séquences N-terminales. La conjugaison de trois propriétés, multiplicité, inductibilité, spécificité large, alliée au pourcentage élevé des protéines microsomales dans le foie, de l'ordre de 5 à 20%, permet d'expliquer l'énorme capacité métabolique de ces cytochromes aux plans qualitatif et quantitatif.

1-2-1-5 Spécificité des monooxygénases à P450 hépatiques (tableau. 1-3).

La spécificité des monooxygénases à P450 hépatiques réside dans le fait que chaque famille de P450 métabolise des substrats appartenant à un même groupe. Ainsi les P450 de la famille 1, métabolisent des molécules

Tableau. 1-3 : Spécificité, inductibilité et activité oxydante de cytochromes P450 hépatiques de rat (d'après Guengerich, 1987a).

Cytochromes P450	Origine	Activités oxydantes connues
2A1	rat non traité	<u>hydroxylation</u> : testostérone (7 α) androstenedione, progestérone (7 α)
2D1	rat non traité	<u>Hydroxylation</u> : débrisoquine (4) bufuralol (1'), propranolol (4) <u>Oxydation</u> : spartéine (d ⁵) <u>O-déméthylation</u> : encainamide dextrométorphan
2C11	rat mâle adulte non traité	<u>hydroxylation</u> : testostérone (2 α) oestradiol (2 et 4), warfarine (4' et 6), vitamine D3. <u>oxydation</u> : acétaminophène, nifédipine <u>N-déméthylation</u> : éthylmorphine
2C12	rat femelle adulte non traitée	<u>hydroxylation</u> : 5 α -androstane-3 α ,17 β diol 3, 17 disulfate (15b).
2C6	rat non traité ou induit par PB	<u>hydroxylation</u> : warfarine (7) N-oxydation : azoprocabazine
2B1, 2B2	rat induit par PB	<u>hydroxylation</u> : warfarine (4'), testostérone (16a, b, 17b), androstenedione (16b) <u>O-déalkylation</u> : 7-pentoxyrésorufine. <u>N-déméthylation</u> : d-benzphétamine, aminopyrine.
3A1	rat non traité ou induit par PCN, TAO, PB ou DEX	<u>hydroxylation</u> : warfarine (10), testostérone (6 β), oestradiol (2 et 4), méphénytoïne (4) <u>N-déméthylation</u> : éthyl-morphine

1A2	rat induit par ISF ou des hydrocarbures polycycliques	<u>hydroxylation</u> : oestradiol (2 et 4), acétanilide (4) N-oxygénation : amines aromatiques, pyrrolisats d'acides aminés
1A1	rat induit par 3MC, β NF ou des hydrocarbures polycycliques	<u>hydroxylation</u> : hydrocarbures polycyclique, testostérone (6 β), warfarine (6 et 8) <u>N-oxygénation</u> : amines aromatiques <u>O-dééthylation</u> : 7-éthoxyrésorufine
4A1	rat non traité ou induit par CLO	hydroxylation : acide laurique (11 et 12)

Les cytochromes P450 sont répertoriés sous la nomenclature officielle (Nelson et coll, 1993). Les activité oxydantes connues sont indiquées comme suit : activité : substrat (position d'oxydation).

planes et aromatiques (exemple du benzo(a)pyrène). Ceux de la famille 2 métabolisent des molécules globulaires (exemple de l'hexobarbital), ceux de la famille 3, métabolisent des grosses molécules (exemple de la cyclosporine) et enfin ceux de la famille 4, métabolisent les acides gras. Chaque forme de cytochrome P450 est capable d'oxyder un grand nombre de substrats différents. Pour certaines formes cependant, une spécificité relative peut être mise en évidence (substrats préférentiels). Enfin, les spécificités des diverses formes se recouvrent plus ou moins partiellement de sorte que dans l'immense majorité des cas, un substrat peut être oxydé par des formes différentes bien que les vitesses soient différentes. Les types de réactions catalysées sont :

- une oxydation sur un atome de carbone donnant naissance à des composés hydroxylés, que la molécule soit aromatique ou aliphatique (Boyland, 1950; Groves et coll, 1978; Jerina et Daly, 1974).

- une N ou S-oxydation, les amines primaires ou secondaires seront alors transformées en hydroxylamines, les amines tertiaires en N-oxydes, les soufres divalents en sulfoxydes et en sulfones (Weisburger, 1971; Williams, 1971).

- une époxydation sur les doubles liaisons d'alcènes ou de composés aromatiques.

- une désalkylation sur des atomes d'azote, de soufre ou d'oxygène, le groupe éliminé étant remplacé par un hydrogène.

- une déshalogénéation.

1-2-1-6 Facteurs de variation des monooxygénases à P450

Certains facteurs endogènes (polymorphisme génétique, facteurs hormonaux, (âge, sexe (Waxman et coll, 1985))) ou exogènes (induction, inhibition) tendent à moduler l'activité et/ou le niveau d'expression des P450s et expliquent les différences observées entre les espèces mais

également entre les individus d'une même espèce (Guengerich, 1989; Gonzalez, 1991b). Ces variations peuvent favoriser au sein de l'organisme des phénomènes d'interactions médicamenteuses (modifiant l'effet thérapeutique d'un deuxième médicament co-administré) (Ludden, 1985; Mansuy, 1987b). Elles seraient également à l'origine de certaines susceptibilités particulières de certains individus à développer un cancer ou à en être protégé (Guengerich, 1988; Gonzalez et Gelboin, 1991). De plus lorsque l'activité catalytique d'une forme donnée est liée à des fonctions de biosynthèse, des déficiences dues au polymorphisme génétique peuvent avoir des conséquences dramatiques et entraîner l'apparition de maladies extrêmement sévères et parfois fatales comme dans le cas du P450 21A2 impliqué dans le métabolisme des stéroïdes (Wu et coll, 1991; Strumberg et coll, 1992).

1-2-1-6-1 Facteurs de variation de la biotransformation liés à l'âge, le sexe, la maladie, etc... (Casarett et Doull's, 1991).

-Variation de la biotransformation en fonction du sexe

Chez le rat, une différence notable vis à vis des réponses à des effets pharmacologiques ou toxicologiques a été observée chez le mâle et chez la femelle. Par exemple pour une même dose d'hexobarbital, la durée d'anesthésie est plus longue chez la femelle que chez le mâle. En même temps le parathion (insecticide largement utilisé) est approximativement deux fois plus toxique chez la femelle que chez le mâle. L'équilibre hormonal lié au sexe est important dans la détermination de l'activité des P450s.

-Variation de la biotransformation en fonction de l'âge

Chez l'animal, les nouveaux-nés et les foetus ont une capacité de biotransformation des xénobiotiques limitée, ce qui explique la vulnérabilité des jeunes à la toxicité. Chez le rat, l'activité des P450s, augmente pour atteindre une activité maximale à 30 jours. A l'âge de 20 mois, cette activité n'est que de 50 à 60% de la valeur maximale chez l'homme. Chez ce dernier l'activité des P450s durant le deuxième trimestre de grossesse est de 20 à 50% de celle de l'adulte.

-Variation de la biotransformation en fonction de la nutrition

Le facteur nutritionnel influence beaucoup la biotransformation métabolique. Ainsi la déficience en minéraux (calcium, cuivre, etc...), en vitamine (B, C, E, etc...) ou en protéines entraîne une diminution notable de l'activité d'oxydation et de réduction des P450s.

-Variation de la biotransformation en fonction des atteintes hépatiques

Puisque le foie est le principal site de biotransformation des xénobiotiques, n'importe quelle maladie hépatique (d'origine médicamenteuse, parasitaire, etc...) interfère avec le processus de biotransformation métabolique.

-Variation de la biotransformation en fonction des rythmes circadiens

La durée d'éclairage influence beaucoup le métabolisme des xénobiotiques. Cette variation est en corrélation avec celle des fonctions endocriniennes. L'activité des P450s et la concentration hépatique en GSH semblent dépendre des rythmes circadiens.

1-2-1-6-2 Facteurs de variation de biotransformation liés à l'inhibition des monooxygénases à P450

Différents types d'inhibition peuvent entraîner une inactivation réversible

ou irréversible du P450, allant dans certains cas jusqu'à la destruction de l'enzyme (Ortiz de Montellano et Reich, 1986b). Plusieurs situations se présentent:

- Inhibiteurs compétitifs

Les inhibiteurs compétitifs se fixent au niveau du site actif de l'enzyme. Ils empêchent alors la venue du substrat. Par exemple le cas de l' α -naphthoflavone (7,8- benzoflavone) est un inhibiteur compétitif, spécifique, des P450s de la sous-famille 1A (Guengerich, 1990).

- Fixation de l'inhibiteur sur le Fe(II) ou Fe(III) de l'hème

L'inhibiteur se fixe directement sur le Fe(II) de l'hème empêchant alors la fixation de l'oxygène moléculaire et son activation. Le monoxyde de carbone forme un complexe stable avec le fer en présence de réducteur (NADPH ou $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) qui présente une bande d'absorption caractéristique à 450 nm (Omura et Sato, 1964). Certains produits contenant un groupe pyridine ou imidazole comme la métyrapone ou le miconazole complexent le fer (III) du site actif de l'enzyme (Ortiz de Montellano, 1986b).

- Inhibiteurs suicides

Généralement, il s'agit d'un intermédiaire chimique réactif, issu de la métabolisation du substrat. Ce composé réagit avec un élément du site actif de l'enzyme et bloque son activité. Différentes situations peuvent se présenter:

-Fixation sur le fer

Au cours du cycle d'hydroxylation, un intermédiaire radicalaire se complexe avec l'entité réactive ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$). Il en résulte une liaison

irréversible avec le fer. Le fonctionnement de la monooxygénase est alors bloqué (cas du benzodioxole et de ses dérivés tels que le pipéronylbutoxyde ou le safrole) (Mansuy et coll, 1989).

Certains antibiotiques macrolides (l'érythromycine, le triacétate d'oléandomycine), le propoxyphène ou les amphétamines, qui comportent une fonction amine tertiaire, peuvent être oxydés en présence de NADPH et d'oxygène en un nitrosoalcane. Cette espèce forme une liaison très stable avec le Fe (II) du P450. Par ailleurs, la réduction anaérobie de composés nitrés par le P450 en présence de NADPH ou de dithionite peut conduire à la formation du même complexe (Franklin, 1974; Pessayre et coll, 1981; Mansuy, 1987b; Mansuy et Delaforge, 1993). Ce complexe inhibiteur Fe(II)-métabolite peut être mis en évidence par spectroscopie UV-visible différentielle. Il présente en effet une absorption caractéristique à 455 nm. Aussi il peut être déplacé *in vitro* par le monoxyde de carbone ou d'autres ligands classiques de P450s (voir références dans les revues de Mansuy et coll, 1989 et Mansuy et Delaforge, 1993). Il peut par contre redonner le Fe (III), par oxydation douce par du ferricyanure.

- N-alkylation irréversible de l'hème

Les métabolites de composés présentant une double ou une triple liaison terminale, comme l'allyl isopropyl acétamide, le fluroxène, le sécobarbital, l'éthynylestradiol, sont susceptibles d'entraîner une N-alkylation irréversible de l'hème.

1-2-2 Présentation des monooxygénases à flavine (FMO)

1-2-2-1- Généralités

Au cours des deux dernières décennies, différents laboratoires avaient montré l'existence d'une flavoprotéine nécessitant du NADPH et de l'oxygène pour oxyder une large variété de substrats dans de nombreux tissus. Cette enzyme ne fut réellement identifiée et caractérisée qu'en 1979 par Ziegler. Elle a été isolée à partir des microsomes hépatiques de porc. Les flavoprotéines catalysant l'oxydation des xénobiotiques à structure diverse et comportant des hétéroatomes, sont couramment appelées "monooxygénases à flavine" dont l'abréviation est FMO.

1-2-2-2- Rôle des monooxygénases à flavine dans le métabolisme des xénobiotiques

Ces enzymes sont présentes à forte concentration dans le foie, mais également dans d'autres tissus, tels que les reins, les poumons, la peau (Dannan et Guengerich, 1982). elles possèdent une large spécificité de substrats, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle dans l'oxydation des xénobiotiques nucléophiles.

La contribution des FMO dans la métabolisation d'un xénobiotique par rapport à la contribution des P450s peut être étudiée. On utilise une propriété physico-chimique spécifique de la FMO. En effet, certaines FMO présentent la caractéristique d'être thermolabiles. Une incubation à 45 °C, en l'absence de NADPH, détruit totalement la FMO en deux minutes sans altérer les cytochromes P450, beaucoup plus stables (Uehleke, 1973).

1-2-2-3 Cycle catalytique des FMO (figure 1-8)

Le mécanisme d'action a été largement étudié par l'équipe de Ziegler (Poulsen et Ziegler, 1979; Beaty et Ballou, 1980; Beaty et Ballou, 1981a; Beaty et Ballou, 1981b). Les études ont été faites sur la FMO purifiée à

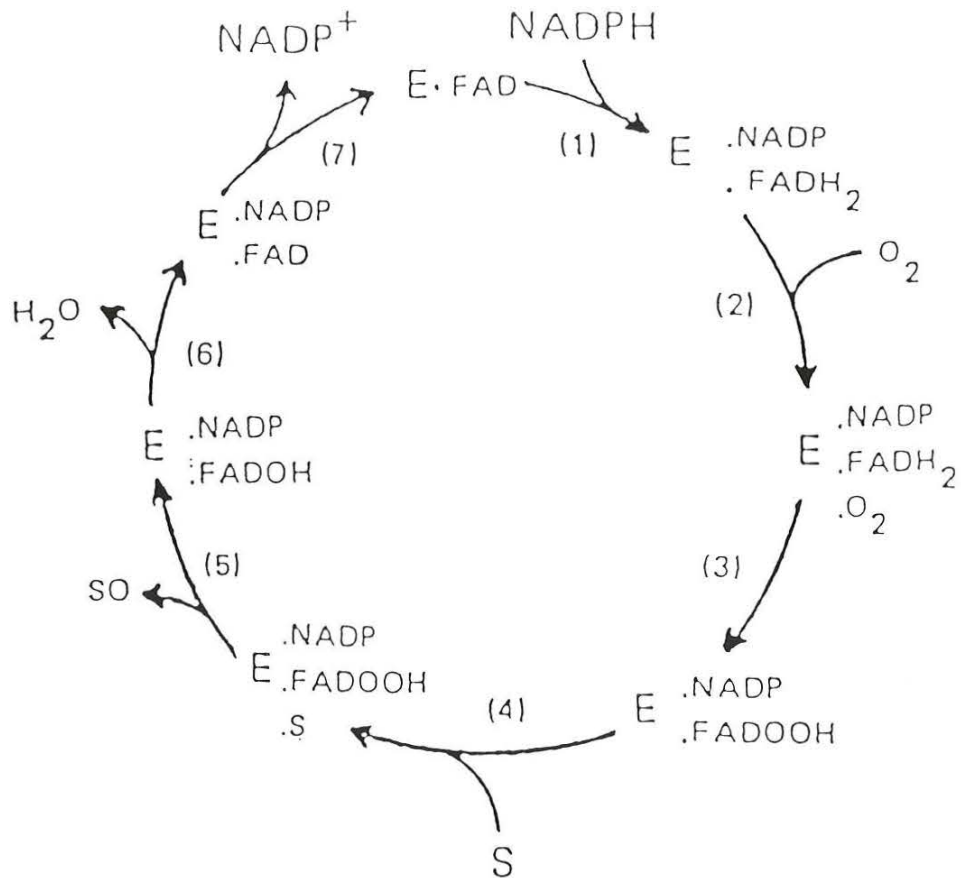


Figure 1-8

Cycle catalytique des flavines monooxygénases (FMO).
 (D'après Ziegler, 1989).

partir de foie de porc. Les étapes majeures de ce cycle catalytique sont résumées dans la figure 1-8.

Des analyses cinétiques (Poulsen et Ziegler, 1979) indiquent que la réduction de la flavine par la NADPH ne dépend pas de la présence du substrat au niveau du site actif de la FMO (étape n°1). La réaction de l'oxygène moléculaire avec la flavine réduite est aussi indépendante de la présence du substrat (étapes n° 2 et n° 3). Une caractéristique remarquable de ce cycle catalytique est la formation d'un intermédiaire relativement stable : la 4 α -hydroperoxyflavine (Poulsen et Ziegler, 1979; Beaty et Ballou, 1980). Cet agent est un oxydant puissant. Dans les étapes n° 4 et n° 5, le substrat se lie à cet intermédiaire. Il est alors oxygéné par l'oxygène de ce composé. Notons que l'activation de l'oxygène se produit avant l'addition du substrat. Ce cycle catalytique présente deux caractéristiques:

- le(s) substrat(s) n'est (ne sont) pas nécessaire(s) à l'activation de l'oxygène en se liant à l'hydroperoxyflavine (étape n° 5).

- Le produit oxygéné est libéré immédiatement et ni le substrat ni le substrat oxydé ne sont essentiels dans les autres étapes du cycle.

1-2-2-4- La multiplicité des FMO

Un argument indirect basé sur la différence de stabilité thermique et de pH optimal, suggère que les rongeurs ont au moins deux formes de FMO (Dixit et Roche, 1984). Des analyses immunochimiques des protéines microsomales (Tynes et Philpot, 1987) ont montré que la même forme de FMO hépatique a été retrouvée dans le rein et le poumon, chez toutes les espèces étudiées, à l'exception du lapin. L'analyse génomique hépatique montre que chez le porc, un seul gène code pour la FMO, cette même protéine a été retrouvée dans le rein et le poumon de cette même espèce (Gasser et coll, 1990). On distingue actuellement cinq formes de FMO.

FMO1 est la forme foetale majeure chez l'homme. Le pourcentage d'homologie avec celle étudiée dans le foie de porc est de 86% (Gasser et coll, 1990; Dolphin et coll, 1991). Chez l'homme adulte, il y a au moins deux formes de FMO : FMO3 est majoritaire (Lomri et coll, 1992), et FMO4 minoritaire (Dolphin et coll, 1992).

1-2-2-5 La spécificité du substrat

Les FMO catalysent les réactions d'oxydation des xénobiotiques contenant des nucléophiles (N, S, P, Se). Elles sont impliquées à la fois dans la détoxification et dans l'activation métabolique (Ziegler, 1990; 1991).

- Les amines et les hydrazines : ce sont de bons substrats. Les xénobiotiques contenant de telles entités chimiques peuvent être des substrats potentiels de la FMO (Prough et coll, 1981).

-Les composés possédant un atome de soufre : l'atome de soufre présent dans différents groupements fonctionnels, peut être oxydé par l'hydroperoxyde et peut être ainsi substrat à la FMO.

-Les thioamides : les thioamides sont également des substrats potentiels (thiourée, phénylthiourée, méthimazole).

1-2-3 Les enzymes de la phase II, ou enzymes de conjugaison

La phase de conjugaison permet de rendre le métabolite encore plus soluble en le couplant à des groupements hydrophiles (Kasper et Henton, 1980; Jacoby et Habig, 1980). Contrairement aux réactions catalysées par les enzymes de la phase I, il n'y a pas de modification du degré d'oxydation du carbone ou de l'azote du substrat lors des réactions catalysées par les enzymes de la phase II.

Les xénobiotiques subissent, selon leur structure chimique, différentes réactions de conjugaison catalysées par les enzymes de la phase II (tableau. 1-4). Quatre de ces réactions seront développées.

Tableau. 1-4 : Enzymes de la phase II et les Principales réactions de conjugaison

REACTION DE CONJUGAISON	FONCTION CONJUGUEE	REACTIF CONJUGANT
Glucuronidation	-OH, -COOH, -NH ₂	UDP glucuronate
Glucosidation	NH, R ₃ N ⁺ , -H, -SH	UDP glucose
Sulfatation	Ar-OH, Ar-NH ₂ , Al-OH	3'-phosphoadénosine-5'phosphosulfate (P. A. P. S)
Méthylation	Ar-OH, -NH ₂ , NH, =N, -SH	S-adénosyl-méthionine
Acétylation	ArNH ₂ , Al-NH ₂ , hydrazides, -SO ₂ , -NH ₂	Acétyl CoA
Synthèse des acides mercapturiques	ArX, Ar-NO ₂ , époxydes d'arene	G-SH
Conjugaison par la glycine et la glutamine	Ar-COOH, Al-COOH	Glycine et glutamine
Epoxyde hydrolase	Epoxydes	H ₂ O

1-2-3-1 La glucuronoconjugaison (Mandel, 1971).

La plupart des xénobiotiques sont éliminés en majorité sous forme de glucuronides. La glucuronidation est une réaction de condensation de l'acide D-glucuronique sur la molécule à éliminer. Elle nécessite une activation de l'acide glucuronique en acide α -Uridine-5'-diphosphoglucuronique (AUDPG). Les molécules glucuronidées sont plus acides que les molécules de départ grâce au groupement carboxylique libre qu'elles acquièrent. Les glucuronides sont de ce fait plus ionisés au pH physiologique. Ce genre de composé traverse difficilement les membranes cellulaires. Ils ne subissent qu'une très faible réabsorption rénale, ce qui accélère leur élimination.

1-2-3-2 La sulfoconjugaison (Mandel, 1971).

Cette forme de conjugaison est moins importante que celle impliquant l'acide glucuronique en raison de la concentration limitée en sulfates dans la cellule. La sulfoconjugaison nécessite d'abord l'activation des sulfates SO_4^{2-} en 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulphate (PAPS) par une série de réactions qui utilisent l'ATP. Le transfert d'un groupement sulfate du PAPS à la molécule réceptrice est catalysé par une sulfokinase. Parmi les molécules sulfoconjuguées figurent les phénols, les alcools et les composés aminés.

1-2-3-3 Les glutathions S-Transférases (GSH S-Tr) et la conjugaison avec le glutathion (GSH) : formation des acides mercapturiques.

Elle concerne les molécules ou intermédiaires électrophiles et conduit à la formation des mercapturates. Le résultat global est l'augmentation de l'hydrophilie de la molécule exogène hydrophobe permettant ainsi son élimination (Dutton, 1978; Caldwell, 1980).

Les glutathion S-Transférases (GSH S-Tr) sont des enzymes jouant un rôle essentiel dans les processus de détoxification. Elles existent aussi bien chez l'animal et l'homme que chez la plante (Ketterer et coll, 1988). Elles catalysent la réaction de conjugaison entre le glutathion (γ -glutamyl-L-cystéinyl glycine) et de nombreux produits portant un centre électrophile (Habig et coll, 1974; Habig et coll, 1975). En plus les GSH S-Tr participent à la transformation de nombreux composés, on peut citer à titre d'exemple le cas de la bilirubine et l'indométacine (Litwack et coll, 1971; Ketley et coll, 1975; Arias, 1976).

L'inhibition des GSH S-Tr peut avoir des effets comparables à ceux d'une déplétion en GSH, comme cela a été observé avec la toxicité liée au paracétamol (Mitchell et coll, 1973). Chez le rat, au moins 11 isoenzymes de GSH S-Tr ont été caractérisées. La nomenclature des isoenzymes est basée sur l'ordre chronologique de caractérisation de l'enzyme (Jacoby et coll, 1984). Une autre nomenclature est basée sur la mobilité électrophorétique des sous unités sur le gel de polyacrylamide SDS (sodium dodécyl phosphate).

Puisque les métabolites électrophiles sont toxiques, la catalyse *in vivo* des réactions du GSH avec les GSH S-Tr présente un intérêt majeur pour les cellules. En effet :

- La réaction spontanée du GSH avec les électrophiles est parfois trop lente pour entrer en compétition avec les nucléophiles cellulaires.

- Le K_m du GSH pour les GSH S-Tr est de l'ordre de 0,1mM (Jacoby et coll, 1976). La catalyse enzymatique ne diminue que lorsque la concentration en GSH s'approche du K_m , situation observée dans des atteintes pathologiques sévères ou alors lors des déplétions en GSH.

- Formation des acides mercapturiques

Lorsqu'on administre à des animaux des hydrocarbures polycycliques, ils sont éliminés dans les urines sous forme de métabolites hydrosolubles : les acides prémercapturiques et les acides mercapturiques (figure 1-9).

Les acides mercapturiques sont des conjugués de la N-acétylcystéine et sont les produits finaux d'un processus important de détoxification par l'organisme, d'un certain nombre de composés électrophiles, potentiellement toxiques (Chasseaud, 1976 et figure 1-9).

L'étape initiale de la biosynthèse des acides mercapturiques comprend la conjugaison des composés électrophiles avec un nucléophile endogène qui est le glutathion (GSH), cette réaction est catalysée par les GSH S-Tr. Il a été montré que le glutathion est la source de la cystéine présente dans les acides mercapturiques. Le glutathion (GSH), grâce à son groupement thiol nucléophile et réducteur et sa forte concentration de l'ordre de 5 mM au sein de la cellule hépatique, joue un rôle majeur dans le contrôle de ces entités réactives formées par les cytochromes P450 ou les flavines monooxygénases. Par exemple, l'acétaminophène (Paracétamol[®]) est hydroxylé en position 3 (en un dérivé non toxique) par les P450 qui réalisent également une oxydation en N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) conjugué rapidement par le glutathion (revue Nelson et coll, 1986 ou Tarloff et coll, 1990). Les conjugués du glutathion sont ensuite éliminés sous forme d'acides mercapturiques dans les urines ou dans les fécès via la bile. Ces dérivés sont l'équivalent d'une conjugaison par la N-acétylcystéine : l'acide glutamique du glutathion est coupé par la γ -glutamyltranspeptidase, la glycine par une glycine peptidase et enfin l'amine libérée est acétylée par une N-acétyltransférase (Revue Tarloff et coll, 1990 et figure 1-9). La N-acétylcystéine peut être utilisée *in vitro* pour piéger l'entité réactive électrophile et accéder au métabolite final de

ce métabolisme; dans le cas de l'intoxication à l'acétaminophène, elle constitue le traitement de première intention avec le lavage gastrique précoce (revue Prescott, 1986).

1-2-3-4 Les époxydes hydrolases (E.H)

Les époxydes hydrolases sont des protéines microsomales (enzymes membranaires du réticulum endoplasmique) et cytosoliques, relativement stables qui permettent d'ajouter une molécule d'eau à des époxydes pour donner des dihydrodiols vicinaux trans (Oesch, 1980). La signification toxicologique des E.H est indiquée par le grand nombre d'époxydes formés à partir des xénobiotiques auxquels l'homme et l'animal sont exposés. On peut citer à titre d'exemple les époxydes du styrène (Vainio et coll, 1976) et du chlorure de vinyle (Guengerich et coll, 1979), les époxydes formés à partir des herbicides (Magdalou et Hammock, 1987) ou des insecticides (Brooks et coll, 1970) ainsi que les époxydes formés à partir des médicaments tels que la phénytoïne (Spielberg, 1984) et la carbamazépine (Bellucci et coll, 1987).

1-3 Activation métabolique des molécules exogènes et toxicité

Le métabolisme des xénobiotiques par le cytochrome P450 conduit le plus souvent à la formation de métabolites pharmacologiquement inactifs. Par ailleurs, certains médicaments ne montrent une activité pharmacologique ou toxicologique qu'après métabolisme par le cytochrome P450 ou par d'autres enzymes du métabolisme (prodrogues). Les métabolites actifs sont souvent formés graduellement après administration de la molécule mère. Le maintien d'une concentration sanguine constante de tels métabolites prolonge leur action et réduit les effets indésirables du médicament administré. L'autre exemple de l'activation métabolique est la formation de différents intermédiaires réactifs (susceptibles de donner des fixations

covalentes et/ou des toxicités), selon la nature de la molécule mère et selon la voie métabolique envisagée.

1-3-1 Etude des principaux métabolites réactifs

1-3-1-1 Les époxydes d'arènes

Il y a souvent enchaînement des deux phases I et II du métabolisme des xénobiotiques. La formation d'un époxyde d'arène à partir d'un composé polycyclique aromatique catalysée par une monooxygénase (phase I) est rapidement suivie de son inactivation par l'époxyde hydrolase (phase II). Dans l'exemple tout à fait remarquable du benzo(a)pyrène, l'action conjuguée du P450 et de l'époxyde hydrolase (Holder et coll, 1974; Oesch et coll, 1985) est responsable d'une activation toxique cancérigène par formation d'un époxyde très électrophile qui se fixe de façon covalente sur les acides nucléiques (figure 1-10).

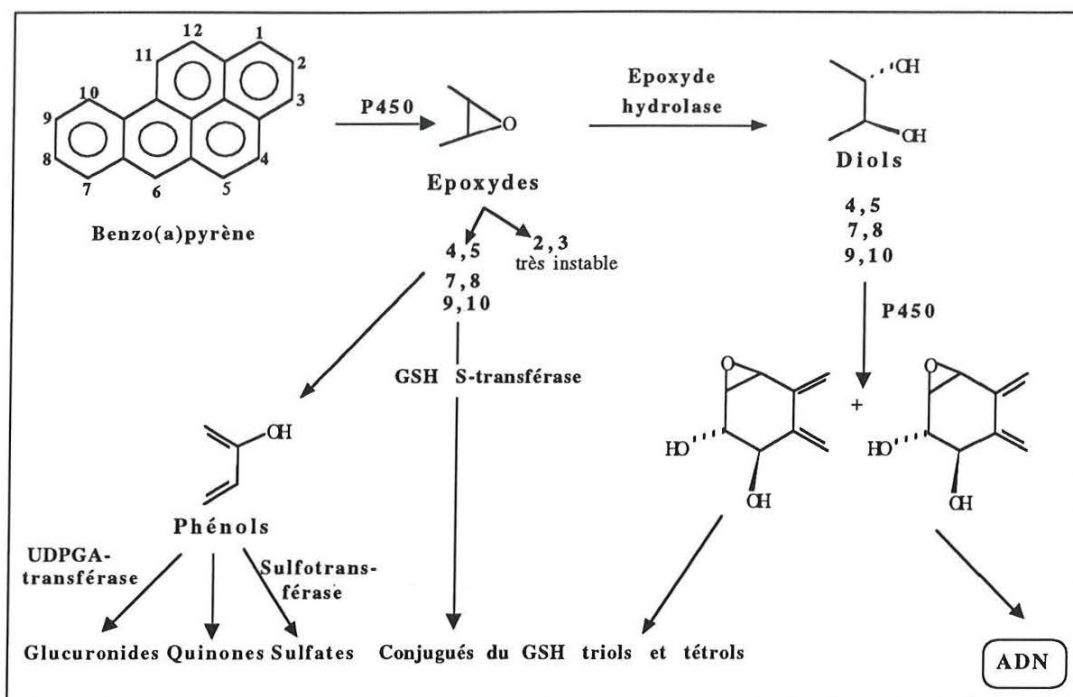


Figure 1-10

Métabolisme du benzo(a)pyrène (selon Holder et coll, 1974)

1-3-1-2 Les quinones-imines

Le meilleur exemple est celui de l'acétaminophène (Paracétamol®), qui activé par le P450, conduit à la formation d'un métabolite réactif, responsable de la nécrose hépatique (Mitchell et coll, 1973; Potter et coll, 1973). Le paracétamol est métabolisé de deux façons par les P450 (figure 1-11). Il peut être hydroxylé en 3, le dérivé formé n'est pas toxique **1a**. Les P450 peuvent aussi l'oxyder en N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) **1b**. Cette espèce est conjuguée avec le glutathion ou bien réagit avec d'autres nucléophiles présents dans la cellule (revue Nelson et coll, 1986 ou Tarloff et coll, 1990) (figure 1-11). Le NAPQI peut alors réagir avec les groupements thiols des cystéines libres des protéines et donner une importante fixation covalente ou encore induire un stress oxydant qui provoquera une nécrose centrolobulaire hépatique irréversible, en 24

heures et des atteintes rénales. Un surdosage de l'acétaminophène, exceptionnel en pratique courante (dose supérieure à 175 mg/kg en une prise soit, plus de 24 comprimés pour un individu de 70 kg), entraîne une déplétion du glutathion.

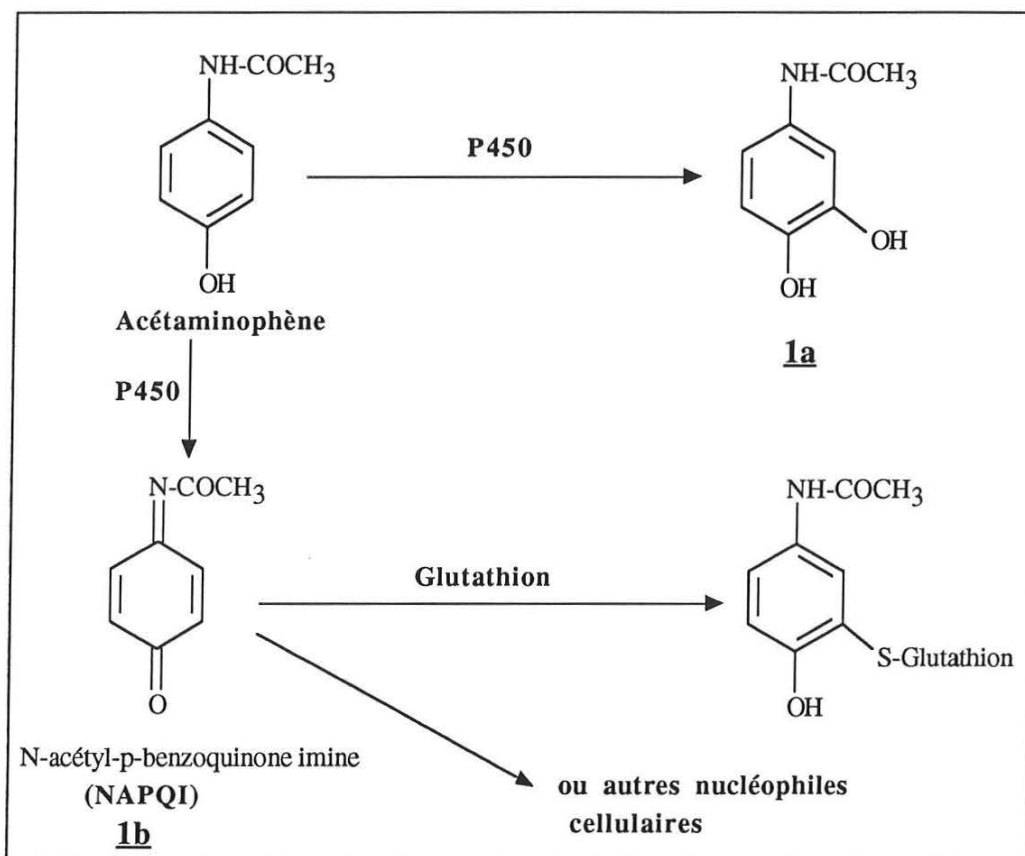


Figure 1-11

Métabolisme de l'acétaminophène

(d'après Nelson et coll, 1986, Tarloff et coll, 1990)

1-3-2 Fixations covalentes et toxicités (Casarett et Doull's, 1991)

Les métabolites réactifs peuvent interagir avec des nucléophiles cellulaires tels que les groupes SH du GSH et de la cystéine et avec les groupements amines et hydroxyles présents dans les acides nucléiques : acide desoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) ou sur les protéines. Cette fixation covalente sur les macromolécules cellulaires est

un élément clé dans la manifestation des effets toxiques, engendrés par les xénobiotiques et/ou leurs produits de transformation. Cet événement se manifeste lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production et la détoxification des intermédiaires réactifs.

1-3-2-1 Interaction des intermédiaires réactifs avec les acides nucléiques : la génotoxicité

Les métabolites réactifs peuvent interagir avec les acides nucléiques. Ces interactions perturbent la structure et l'expression de ces acides nucléiques. On parle de génotoxicité. Une des conséquences de cette génotoxicité peut être le développement de cancers. En effet l'ADN subit des altérations, l'information génétique est modifiée, la cellule se développe anormalement et des tumeurs risquent de se former. Les molécules capables d'induire la formation de cancers sont des carcinogènes chimiques. Dans le cas d'atteinte de l'ADN des cellules germinales, des maladies génétiques sont probables chez la génération suivante.

1-3-2-2 Fixation covalente des intermédiaires réactifs sur les protéines

Il y a deux types de conséquences à la fixation covalente de métabolites réactifs sur des protéines. On peut avoir des effets toxiques directs. La cellule est tuée par la molécule néoformée. On peut aussi avoir des toxicités indirectes. Dans ce cas on a apparition de réactions du type immunoallergiques.

1-3-3 Cas particulier des toxicités médicamenteuses du type immunoallergiques

1-3-3-1 Critères d'identification des toxicités médicamenteuses du type immunoallergique

Une hépatite de type immunoallergique est suspectée à partir des critères suivants (Benhamou, 1988) :

- Une fréquence faible (environ 1 cas sur 10 000).
- Pas de relation effet-dose apparente.
- Une période de sensibilisation (1 à 5 semaines).
- Une association de manifestations d'hypersensibilité extra-hépatiques (fièvre, éruption cutanée, éosinophilie...)
- Une réapparition du trouble après réadministration du médicament responsable.
- La présence d'anticorps anti-tissus dans le sérum de ces malades dans certains cas (Biour et coll, 1988).

-Problème de prédiction des hépatites médicamenteuses du type immunoallergique.

Lors des études toxicologiques chez l'animal, les effets hépatotoxiques secondaires de type immunoallergique d'un médicament ne peuvent être prédits. Les essais de mise au point d'un modèle animal pour reproduire ce type d'hépatotoxicité n'ont pas conduit jusqu'à présent à des résultats satisfaisants (Neuberger et coll, 1987).

1-3-3-2 Mécanismes proposés pour la survenue des toxicités médicamenteuses de type immunoallergique.

Le mécanisme des hépatites médicamenteuses de type immunoallergique a donné lieu à de nombreuses hypothèses et propositions. Nous retiendrons ici la plus communément admise. Elle fait intervenir la formation d'un métabolite réactif (Luciano et coll, 1986, Pessayre et coll, 1988). La figure 1-12, illustre l'hypothèse de formation d'un haptène proposé

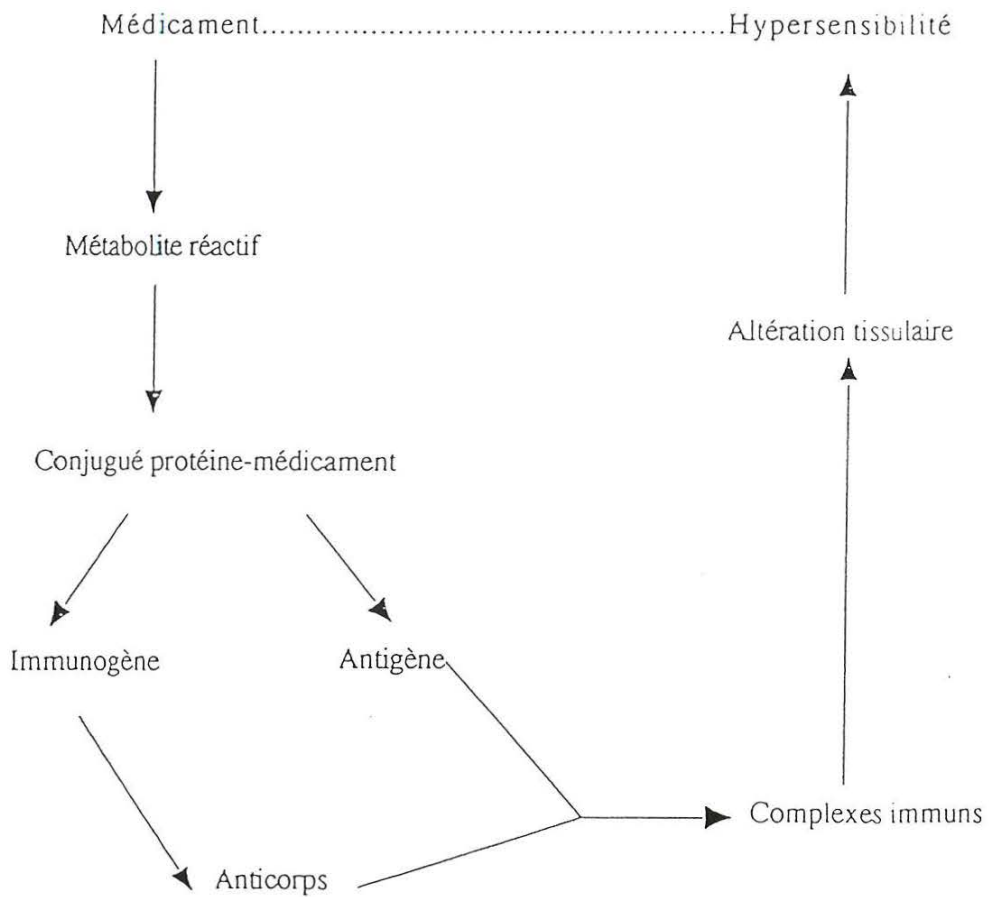


Figure 1-12

Hypothèse de formation d'un haptène dans les réactions d'hypersensibilité induites par les médicaments (d'après Park et coll, 1987).

par Park et coll, 1987. Le médicament responsable est tout d'abord transformé en métabolite réactif. Ce métabolite instable peut réagir sur des protéines présentes et former un conjugué protéine-médicament. Cette protéine modifiée par le médicament devient immunogène. Le système immunitaire produit alors des anticorps qui vont former des complexes immuns avec la protéine antigénique. L'étape finale consiste en une altération tissulaire avec des manifestations d'hypersensibilité.

Ce schéma résulte d'un mécanisme général que l'on va pouvoir adapter ici à la cellule hépatique. L'hépatocyte n'est la cible d'une réaction immunitaire que si l'antigène en cause (protéine modifiée par le médicament) est exprimée à la surface de la cellule. Cette expression membranaire peut résulter d'une migration de l'antigène de la membrane du réticulum endoplasmique (site de production du métabolite réactif), vers la membrane cellulaire, ou bien de la fixation directe du métabolite réactif sur un constituant membranaire. Cette structure protéine-haptène servirait alors de cible au système immunitaire.

Les mécanismes immunitaires capables de lyser l'hépatocyte ont été décrits par Calmus et coll en 1987 et sont résumés sur la figure 1-13. L'anticorps, après interaction avec l'antigène, peut fixer le complément ou être reconnu par des "cellules tueuses". La lyse hépatocytaire peut résulter de deux phénomènes :

- Le premier est une intervention directe des cellules immunitaires (lymphocytes T spécifiques ou cellules "Natural Killer").

- Le deuxième est un dépôt de complexes immuns sur la membrane cellulaire.

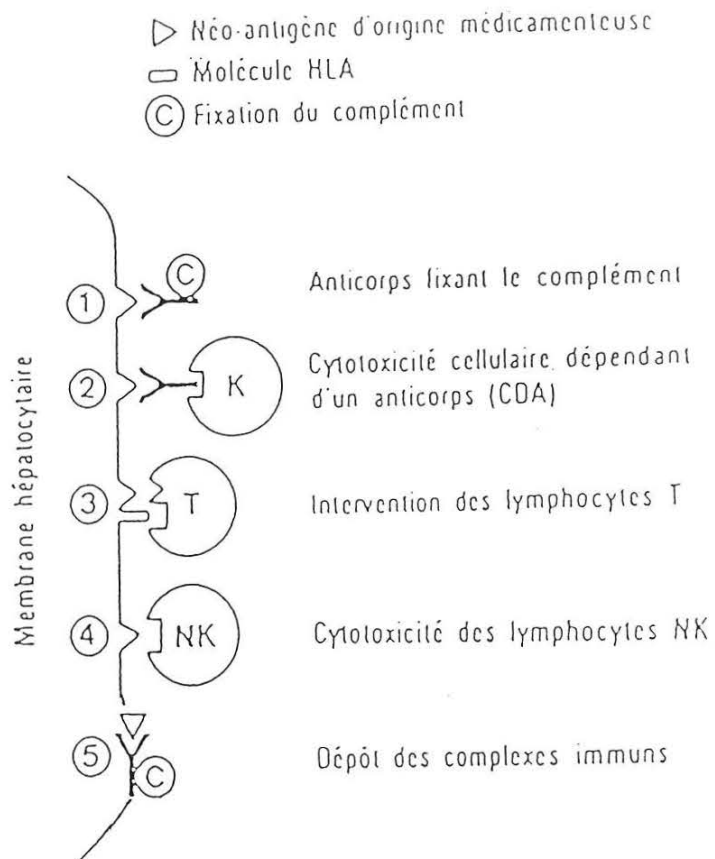


Figure 1-13

Mécanismes immunitaires dans l'hépatotoxicité médicamenteuse de type immuno-allergique (d'après Calmus et coll, 1987).

Ce problème des hépatites médicamenteuses de type immunoallergique est donc complexe. D'après les mécanismes proposés, deux faits importants sont à considérer. D'une part, le médicament ou le xénobiotique est activé et réagit avec des protéines cellulaires. D'autre part, il peut y avoir production d'anticorps anti-tissus.

1-3-3-3 Les exemples d'anticorps et d'antigènes les mieux connus dans les toxicités du type immunoallergique d'origine médicamenteuse.

1-3-3-3-1 Description des principaux types d'antigènes connus

Certains médicaments engendrent des hépatites toxiques. Le tableau clinique est caractérisé par une hépatite aiguë. D'autres n'ayant démontré aucune toxicité sur les modèles animaux conduisent à des effets hépatotoxiques imprévisibles. Elles sont peu fréquentes (1 cas pour 10 000 pour l'acide tiénilique et 1 cas pour 30 000 pour l'halothane) et elles sont quelquefois mortelles. Il s'agit d'un dérèglement du système immunitaire dans lequel on peut mettre en évidence dans le sérum des malades des autoanticorps dirigés contre des constituants de la cellule hépatique (Poupon et coll, 1986). L'immunofluorescence indirecte sur coupes de foie de rat permet d'observer ces autoanticorps consécutifs à la prise de certains médicaments (Calmus et coll, 1987).

On peut distinguer :

-Les anti-LKM₁ (Liver/Kidney Microsomes). Ils sont retrouvés dans le sérum de patients atteints d'hépatite de type immunoallergique consécutive à une exposition à l'halothane (Neuberger et coll, 1981). Ils sont également présents dans certaines hépatites spontanées de l'enfant (Homberg et coll, 1987, Sacher et coll, 1990; Pons et coll, 1991) où ils

reconnaissent le P450 2D6 (Gueguen et coll, 1989; Kiffel et coll, 1989; Manns et coll, 1989)

-Les anti-LKM₂ (Liver/Kidney Microsomes). Ces anticorps sont retrouvés uniquement dans le sérum de patients atteints d'hépatite de type immunoallergique consécutive à la prise d'acide tiénilique (Homberg et coll, 1989, Pons et coll, 1991). Ils sont dirigés contre les cytochromes P450 2C9 humains (Lopez Garcia et coll, 1994; Lecoœur et coll, 1994).

-les anti-M6 (Mitochondrial). Ils sont présents dans le sérum de patients atteints d'hépatites de type immunoallergiques dues à la prise d'isoniazide (Homberg et coll, 1982). Les autoanticorps ont alors pour cible la monoamine-oxydase B (MAO B) (revue Mansuy, 1990).

-Les anti-LM (Liver Microsomes). Ils apparaissent dans le cas d'hépatite de type immunoallergique liée à la prise de dihydralazine. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement le cytochrome P450 1A2 (Bourdi et coll, 1989).

1-3-3-3-2 Cas de l'acide tiénilique :

1-3-3-3-2-1 Découverte de l'acide tiénilique (diurétique et uricosurique) et faits observés.

Fruit de recherche des laboratoires Anphar-Rolland, l'acide tiénilique (AT) est né de l'étude systématique des dérivés de l'acide phénoxyacétique, motif chimique déjà présent dans les premiers diurétiques (certains dérivés mercuriels ou l'acide éthacrynique) (Thuillier et coll, 1974). La dose létale 50 (DL₅₀) chez la souris est en moyenne de 2100 mg/kg per os.

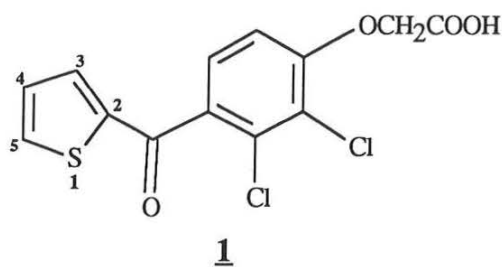


Figure.1-14

Formule de l'acide tiénilique (AT)

L'intérêt de ce composé hétérocyclique réside dans son fort pouvoir uricosurique associé à une forte activité diurétique sans pour cela provoquer d'hyperglycémie et d'hyperazotémie. Sa commercialisation débute en 1976 sous l'appellation de Diflurex®. Ses propriétés diurétiques au niveau rénal en faisaient une indication de choix dans le traitement de l'hypertension artérielle et des rétentions hydrosodées d'origine cardiaque avec en plus une action uricosurique (Doroz, 1989). Alors qu'il est atoxique chez le rat normal et plusieurs autres espèces, peu après son introduction sur le marché américain en 1979, la vente du médicament fut interrompue en 1980, pour son imputabilité dans la survenue de rares hépatites (1 cas d'hépatite sur environ 10 000 traitements en France) d'issue parfois fatale. Cette complication hépatique comportait tous les critères de l'idiosyncrasie : fréquence basse, période de sensibilisation, absence de relation dose-effet, réapparition des symptômes à l'épreuve de la réintroduction. Le diagnostic de l'hépatite de type immunoallergique d'origine médicamenteuse a été retenu.

1-3-3-3-2-2 Résultats et mécanisme général proposé

Les anti-LKM2 sont spécifiques de l'hépatite induite par l'acide tiénilique. Ils reconnaissent des autoantigènes identifiés aux P450 humains de la

famille 2C9 (Lopez Garcia et coll, 1994, Lecoœur et coll, 1994). En effet les P450 2C9 sont inhibés par les anticorps anti-LKM2, ce sont ces mêmes P450 qui sont responsables de la métabolisation de l'acide tiénilique (Beaune et coll, 1987). Dans l'hypothèse "d'activation-fixation-externalisation", l'acide tiénilique est métabolisé par un ou plusieurs cytochromes P450 en une entité électrophile capable de se fixer en retour de façon covalente sur ces mêmes P450s. Le P450 modifié migrerait sur la face externe de la membrane plasmique et induirait une réaction immunitaire. Chez le rat non traité, le P450 2C11 joue le rôle de cible reconnue par les auto-anticorps anti-LKM2 (Pons et coll, 1991).

Les anti-LKM2 inhibent *in vitro* l'activation de l'acide tiénilique (Beaune et coll, 1988) et également d'autres réactions caractéristiques des P450s de la famille 2C comme l'hydroxylation de la méphénytoïne (Meier et coll, 1985) et celle du tolbutamide. Les P450 2C métabolisent l'acide tiénilique en un dérivé 5 hydroxylé mais aussi en une entité électrophile non déterminée capable de se lier aux protéines de façon covalente (Dansette et coll, 1991; Lopez Garcia et coll, 1994; Lecoœur et coll, 1994).

La commercialisation du Diflurex® a continué sur le marché pharmaceutique Français jusqu'en février 1992. Il n'occasionnait plus que de rares accidents, certainement grâce à une pharmacovigilance efficace et à une éducation dans la prescription mais aussi à une diffusion de plus en plus restreinte.

En fait le problème de la prédiction des accidents d'idiosyncrasie dans les phases de développement du médicament vient d'être posé. Il n'existe pas actuellement de modèle prédictif d'autoimmunité spécifique d'organe, d'origine médicamenteuse (Descotes, 1991). Il serait donc intéressant de comprendre les mécanismes par lesquels s'expriment ce type de pathologie et de les prévoir.

1-4 Métabolisme des dérivés thiophéniques

Leur métabolisme est peu connu. Cependant, on peut décrire quelques résultats de la littérature sur ce métabolisme.

1-4-1 Rappels sur le métabolisme des dérivés soufrés

Le soufre, par la variété de ses états d'oxydation, présente une chimie complexe. Son faible degré d'oxydation dans la majorité des xénobiotiques fait de ses doublets libres, un élément privilégié de l'oxydation par les enzymes de la détoxification (figure 1-15). Cette S-oxydation est largement catalysée par les cytochromes P450 et les flavines monooxygénases (Ziegler, 1984).

Notons que la S-méthylation est une autre voie importante de biotransformation des xénobiotiques soufrés (Damani et coll, 1989, volume 2A p.211).

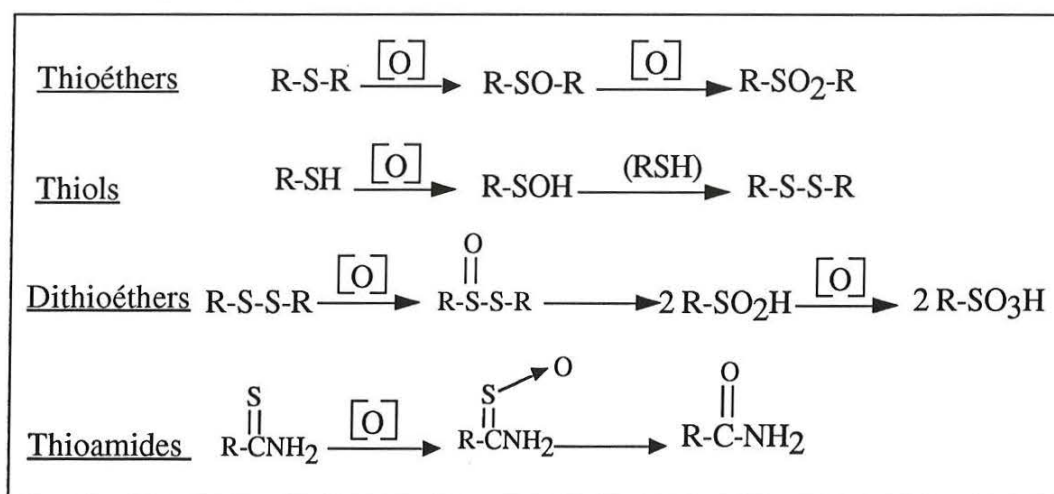


Figure 1-15
Quelques exemples d'oxydation métabolique de dérivés soufrés.

1-4-2 Dérivés du benzothiophène

1-4-2-1 Le dibenzothiophène

Le dibenzothiophène **2** (figure 1-16), est métabolisé par les enzymes microsomiales de rat en sulfoxyde puis en sulfone (Vignier et coll, 1985). Ce type de métabolisme est donc identique à la S-oxydation des dérivés du tétrahydrothiophène **3** (figure 1-16), réalisée par les monooxygénases (Damani et coll, 1989).

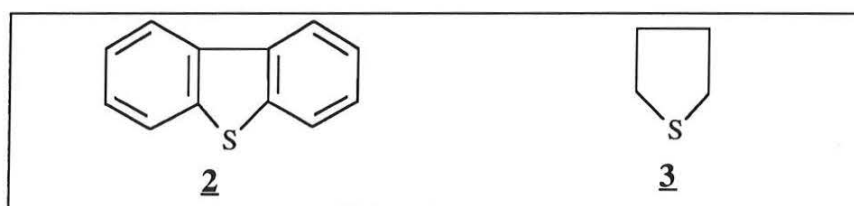


Figure 1-16

Formules du dibenzothiophène (**2**) et du tétrahydrothiophène (**3**)

1-4-2-2 Benzothiophène et dérivés substitués.

Dans le cas du benzothiophène **4** (figure 1-17), plusieurs structures de métabolites ont été proposées : chez le lapin, un dérivé hydroxylé en 2, excrété dans les urines sous forme de glucuronide **4a** et un acide 3-mercaptopurique **4b**. La seule preuve de structure est le spectre de masse (Revue Rance, 1989).

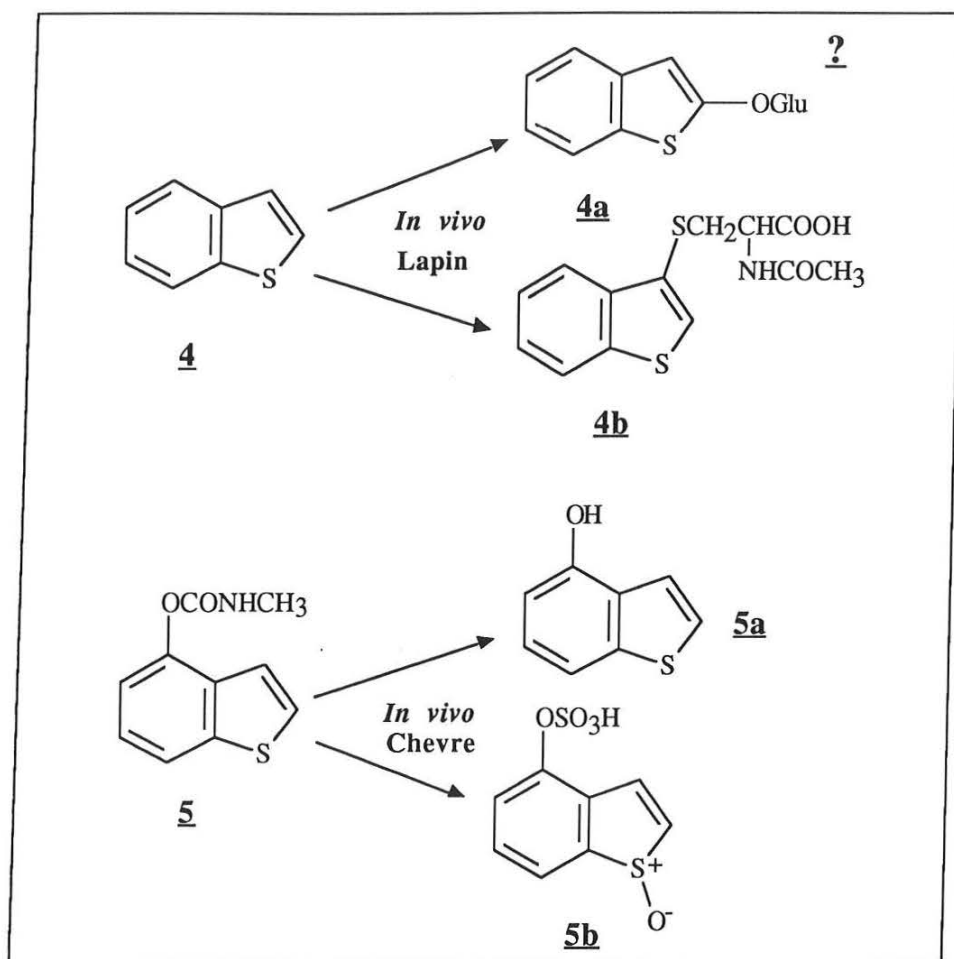


Figure 1-17

Métabolisme proposé pour : le benzothiophène (4) (d'après revue Rance, 1989) **et pour le mobam (5)** (d'après Robbins et coll, 1970).

Parmi les dérivés substitués du benzothiophène, on peut citer un dérivé carbamate, le mobam **5** utilisé comme insecticide. L'administration de ce dérivé marqué au ¹⁴C à la chèvre, a permis d'identifier deux métabolites urinaires majoritaires (90% de la radioactivité administrée) : le premier est formé par hydrolyse de la fonction carbamate **5a**, le second est formé par oxydation du soufre **5b**. Toutefois, il faut noter que la seule preuve de structure publiée est le spectre infra-rouge (Robbins et coll, 1970).

1-4-3 Le thiophène

Il y a très peu de données dans la littérature sur l'activation métabolique des dérivés du thiophène (Rance, 1989; Dansette et coll, 1991) et sur les conséquences toxicologiques de ce métabolisme (Mc Murtry et coll, 1977; Imler et coll, 1987). Les travaux les plus anciens remontent à 1886, date à laquelle Hefter a indiqué que le thiophène donne naissance à un composé soufré neutre dans les urines des animaux traités avec du thiophène (Hefter et coll, 1886). En 1930, Christomanos a proposé que le diéthyle sulfure était un métabolite, formé par rupture du noyau thiophène (Christomanos, 1930). Chilcote en 1945 a montré que des lapins traités avec du thiophène ou du 2-bromo-thiophène formaient des acides mercapturiques (Chilcote, 1945; Barnes et coll, 1959).

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 (Press, 1985). Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur l'oxydation métabolique des noyaux thiophènes. Les mécanismes d'oxydation enzymatiques ou chimiques sont encore ignorés. La connaissance de ces mécanismes serait très importante pour comprendre la formation de métabolites réactifs et, à terme, pour prévoir et interpréter les toxicités observées.

Le métabolisme du thiophène **6** (figure 1-18) a été étudié par H.G. Bray en 1971 chez le rat et le lapin; 30% de la dose administrée est expirée inchangée par les poumons et 40% de la dose est retrouvée dans les urines.

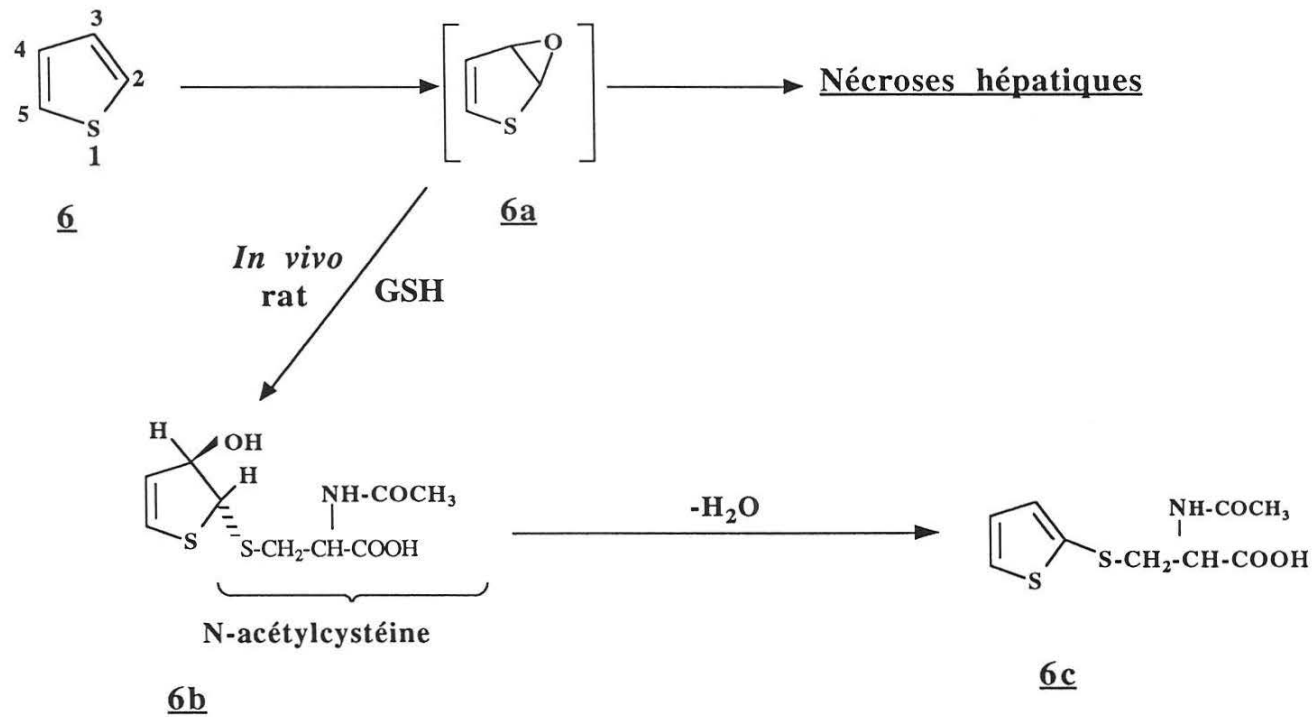


Figure 1-18

Métabolisme oxydatif du thiophène postulé par Bray en 1971

Les métabolites principaux ont été décrits comme étant des acides mercapturiques. La seule preuve de structure est le spectre de masse (Bray et coll, 1971) (Figure 1-18). La structure postulée du composé **6b**, hydroxylé en position 3, a été expliquée par la voie classique d'oxydation métabolique des dérivés aromatiques catalysée par le cytochrome P450 qui passe par la formation d'un époxyde d'arène **6a** et ouverture de ce dernier par le glutathion. Ce GSH conjugué serait ensuite transformé en mercapturate **6b** excrété dans les urines. Le deuxième métabolite formé serait le composé **6c**.

Le thiophène administré chez le rat et la souris à la dose de 250 mg/kg est d'ailleurs responsable de nécroses au niveau hépatique. Le prétraitement des souris par le phénobarbital augmente considérablement cette toxicité. Le blocage du P450 par le piperonyl butoxyde diminue cette toxicité (Mc Murtry et coll, 1977). Très peu de médicaments renfermant le noyau thiophène ont fait l'objet d'études métaboliques. Ainsi on trouve le thiophène (thiophéol[®]) qui est un médicament proposé en France dans le traitement des inflammations des voies respiratoires et considéré comme dénué de tout effet indésirable. Cependant, depuis sa commercialisation en 1959, trois observations d'hépatite au thiophène ont été publiées (Imler et coll, 1987, Pouderoux et coll, 1988), suite à la prise de ce médicament sous forme de suppositoire (100 mg/jour) pendant 10 jours. La recherche d'anticorps anti-tissus s'est révélée négative. Après guérison, les symptômes ont récidivé à la réadministration du produit, ce qui a permis de conclure à une hépatite immunoallergique au thiophène. Un troisième cas d'hépatite a été récemment publié par Hastier et coll en 1993. L'hépatite a été révélée par un ictère, survenu dans un délai de 3 à 10 jours, avec des signes biologiques sévères. Tous les auteurs étaient d'accord sur le fait que l'hépatite cytolytique aigue était imputable au thiophène. Les critères d'imputabilité au médicament décrits par Dannan

et coll en 1991, ont été vérifiés. Il s'agit de : a) la réadministration qui s'est accompagnée d'une récurrence de l'atteinte hépatique; b) une évolution avec une baisse importante de l'ALAT (alanine aminotransférase) dans les 15 jours qui suivent l'arrêt du traitement; c) la normalité échographique et radiologique des voies biliaires; d) l'absence de prises d'autres médicaments hépatotoxiques; e) la négativité des marqueurs viraux des hépatites A, B et C; f) l'absence d'épisode d'hypotension aiguë.

1-4-4 Les dérivés substitués du thiophène

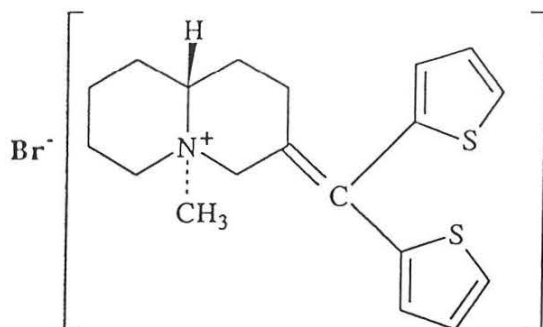
Le métabolisme des dérivés thiophéniques suivants a été étudié *in vivo*.

-Le bromure de tiquizium est un agent anticholinergique (figure 1-19). Chez le rat et chez le chien, ce dérivé est hydroxylé en position 5 sur le noyau thiophène puis il subit une O-glucuronidation (Nishikawa et coll, 1985).

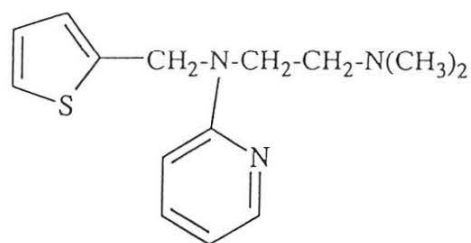
-Le métapyrilène (figure 1-19), est un antihistaminique largement utilisé il y a plus de 35 ans mais abandonné en raison de ses propriétés hépatocarcinogènes chez le rat. Chez le rat ce dérivé est métabolisé sur le noyau pyridine. La formation de dérivé hydroxylé sur le thiophène pourtant recherchée n'a pas été détectée (Kammerer et coll, 1988).

-Le ténoxicaam est un antiinflammatoire non stéroïdien (figure 1-19). 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 (Ichihara et coll, 1984).

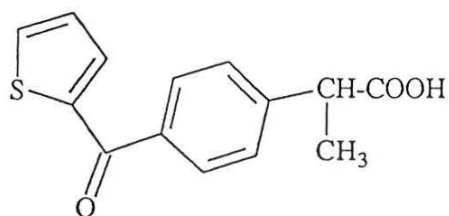
-les anthelminthiques sont largement utilisés aussi bien en médecine humaine qu'en pratique vétérinaire. Les infestations parasitaires



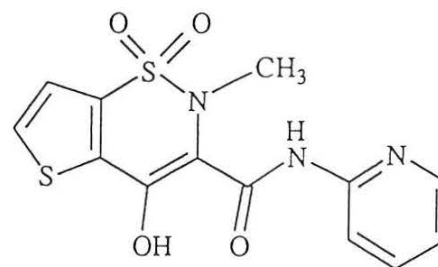
Bromure de tiqizium



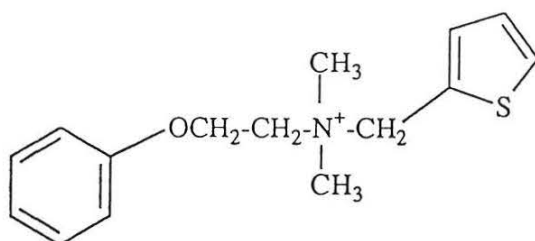
Métapyrilène



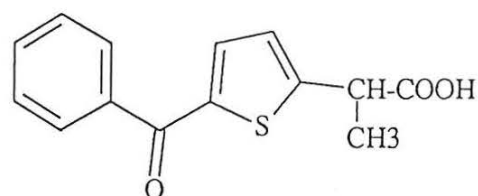
Suprofen



Ténoxicam



Thénium



Acide tiaprofénique

Figure 1-19

Quelques dérivés substitués du thiophène

helminthiques sont très répandues dans le monde entier. Plusieurs centaines de millions d'êtres humains sont infestés par *Schistosoma*, *Ascaris*, *Ankylostoma*, filariose, etc... (Mansur, 1979). La première molécule anthelminthique à noyau thiophène, est le **thenium** (figure 1-19) (Thenato[®], Bancaris[®], Canopar[®]), proposé pour le traitement des ankylostomoses canines. Ce produit a été considéré comme étant hautement nématocide contre les formes adultes et immatures d'*Ankylostoma caninum*, il en est de même pour les larves de 4^{ème} âge (Miller, 1966). Son utilisation a été limitée car elle entraînait des intolérances digestives chez les jeunes chiens. Cependant la littérature ne fournit pas d'information sur les voies métaboliques de cet anthelminthique.

1-4-4-1 Cas particulier des dérivés 2-arylthiophène

La 5-hydroxylation des dérivés 2-aryl-thiophène par oxydation enzymatique, a été suggérée pour la première fois en 1972 comme lors de l'oxydation de l'acide thiophène- 2-carboxylique (Cripps, 1973).

- Cas de l'acide tiénilique

Le laboratoire où s'est déroulé le présent travail (URA 400 CNRS Paris), s'est intéressé très tôt aux problèmes de l'acide tiénilique et de ses dérivés. Le premier dérivé 5-hydroxylé **1a** (figure 1-20) a été mis en évidence sans ambiguïté par Mansuy et coll en 1984. Cette hydroxylation est catalysée par les cytochromes P450 (Mansuy et coll, 1984) et s'est avérée une voie majoritaire de l'oxydation microsomale des dérivés 2-aryl-thiophènes (Mori et coll, 1984; Neau et coll, 1990). Les différents aspects de ce métabolisme, connus à ce jour sont résumés sur la figure 1-20.

La 5-hydroxylation (métabolite **1a**) représente 65% du métabolisme *in vitro* avec des microsomes de foie de rat et 45% du métabolisme *in vivo*

chez l'homme (Mansuy et coll, 1984; Dansette et coll, 1990). La coupure oxydante conduisant au diacide **1b** rend compte de 3% du métabolisme total *in vitro* avec des microsomes de foie de rat , de 10% du métabolisme total de différents animaux de laboratoire (Levron et coll, 1977) et de moins de 1% du métabolisme total chez l'homme (Mansuy et coll, 1984). Une réaction de fixation covalente aux protéines microsomales **1c** a été mise en évidence *in vitro* (30% du métabolisme total en présence de microsomes de foie de rat). Enfin le métabolite **1d**, de réduction de la cétone.

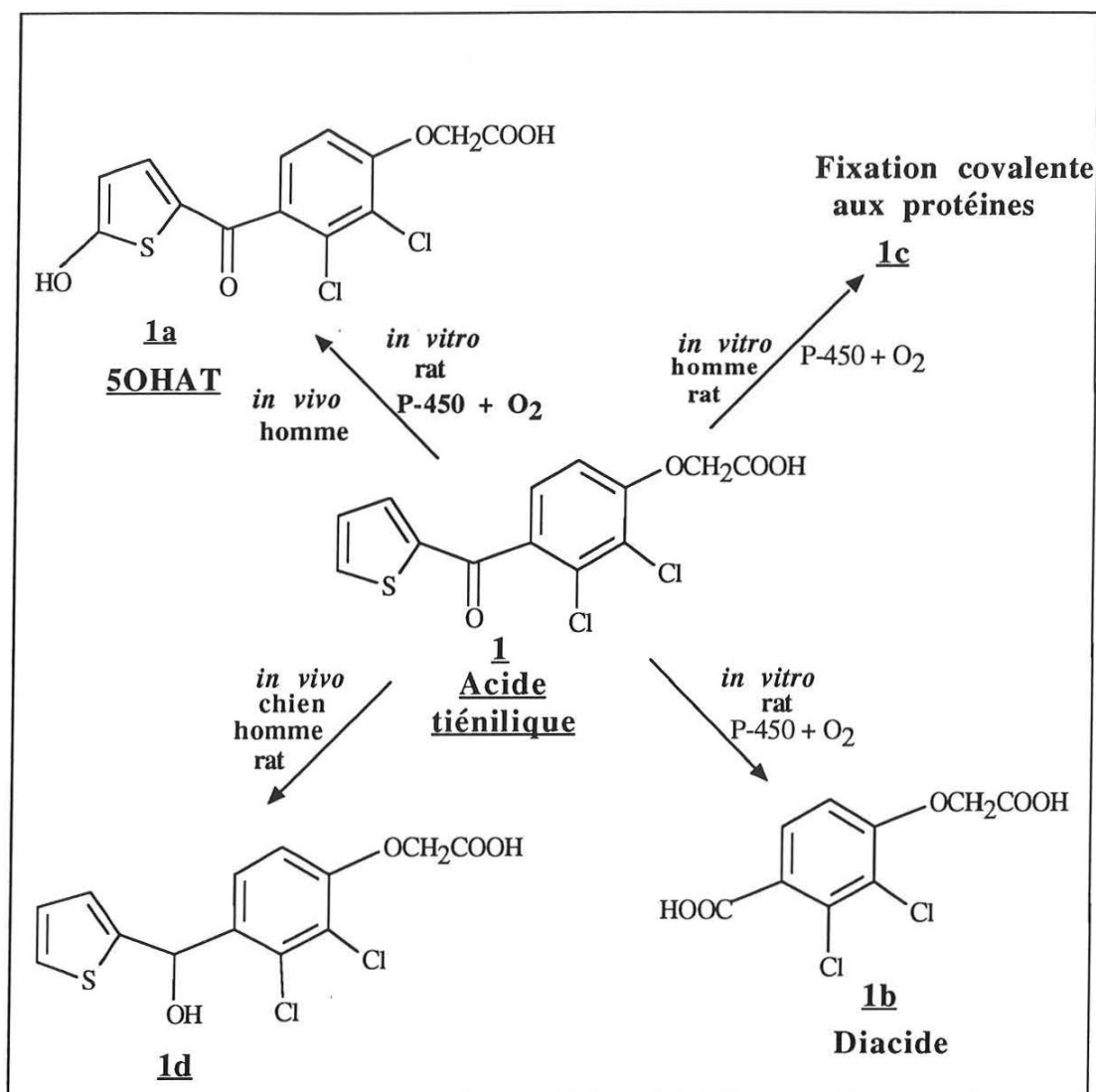


Figure 1-20

Métabolisme de l'acide tienilique

(D'après Mansuy et coll, 1984; Dansette et coll, 1990)

Récemment, il a été démontré que le P450 2C9, l'une des formes majeures de P450 du foie humain (après la forme 3A4), exprimé dans une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'oxyder l'AT (Lopez Garcia et coll, 1993). Les activités observées sont similaires à celles observées dans les microsomes humains ou ceux de rat à savoir :

la 5-hydroxylation comme voie majeure de l'oxydation et la réaction de fixation covalente aux protéines microsomale (Dansette et coll, 1990 et 1991). Il a également été démontré que la perte de l'activité enzymatique du P450 2C9 observée durant l'oxydation de l'AT vérifie tous les critères d'inactivation d'un P450 par un substrat suicide (Lopez Garcia et coll, 1994).

En solution aqueuse à pH 7,4, le dérivé 5-hydroxylé **1a** de l'acide tiénilique existe sous une forme dianionique (le pK de l'hydroxyle est de 2,5) : Figure 1-21.

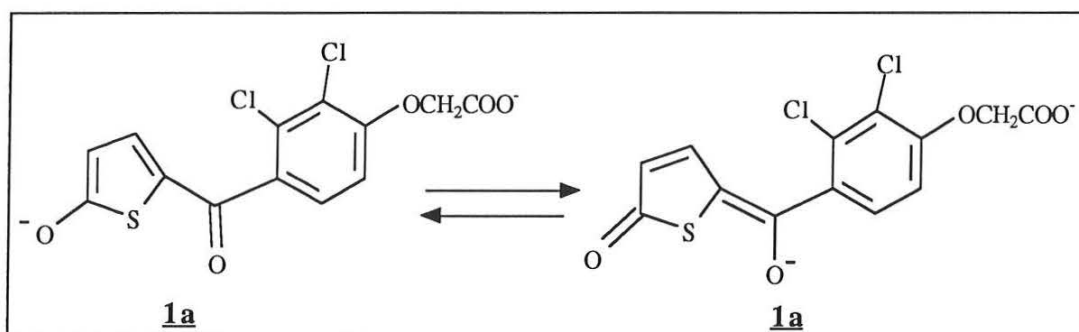


Figure 1-21

Le dérivé 5 hydroxylé de l'AT (1a) en solution aqueuse à pH 7,4

(D'après Neau et coll, 1990)

L'absorption intense de ce dianion à 390 nm est à la base d'une quantification de la 5-hydroxylation de l'AT, par spectroscopie d'absorption UV, qui est aussi applicable à l'ensemble des dérivés 2-aroyle-thiophènes (Neau et coll, 1990).

Depuis, la littérature s'est enrichie de nombreux exemples de 5-hydroxylation, soit de dérivés 2-aroyle-thiophènes soit de thiophènes ayant un système π -accepteur en 2 (Damani 1989, volume 1B p.223).

-Le suprofen **7** est un anti-inflammatoire non stéroïdien (figure 1-22) apparenté au kétoprofen et par ailleurs isomère de l'acide tiaprofénique (Surgam[®]). Le métabolisme du suprofen a été étudié *in vivo* chez l'homme, chez le rat et chez le chien (Mori et coll, 1983; Mori et coll, 1984; Mori et coll, 1985). Selon les espèces, on trouve dans les urines : des produits de conjugaison de la fonction acide avec l'acide glucuronique ou la taurine et (sauf chez le chien) un produit **7a** hydroxylé en position 5 sur le noyau thiophène.

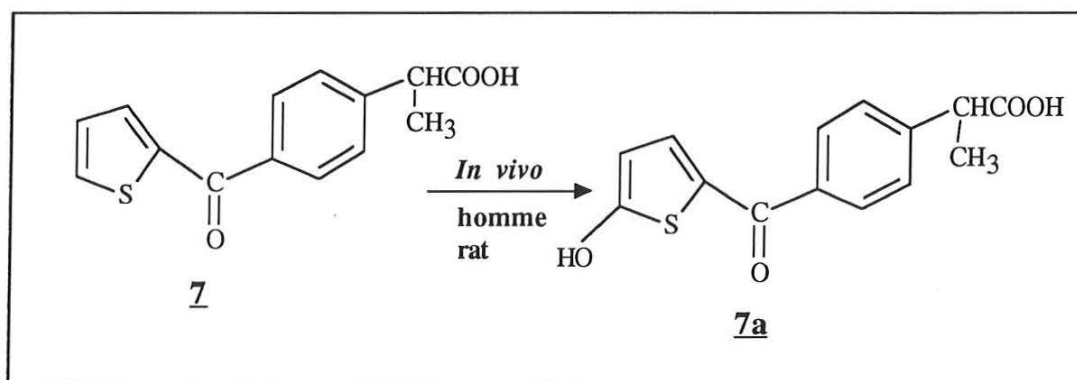


Figure. 1-22

Métabolisme proposé pour un dérivé 2-aryylthiophène autre que l'acide tiénilique : hydroxylation du suprofen (**7**) en position 5

1-4-4-2 Cas particulier de l'isomère de l'acide tiénilique (IAT)

L'isomère de l'acide tiénilique (IAT) **9** (figure 1-23), était une impureté présente dans les premières préparations commercialisées d'acide tiénilique. La dose létale 50 (DL₅₀) de l'IAT est de 900 mg/kg per os chez la souris alors que celle de l'acide tiénilique est en moyenne de 2100 mg/kg per os (Thuillier et coll, 1974 et Sellman et coll, 1982).

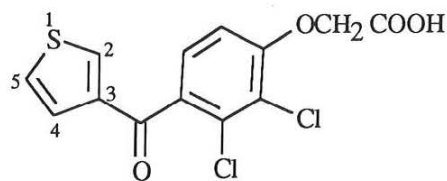


Figure 1-23 **9**
Formule de l'isomère de l'acide thiénique (IAT)

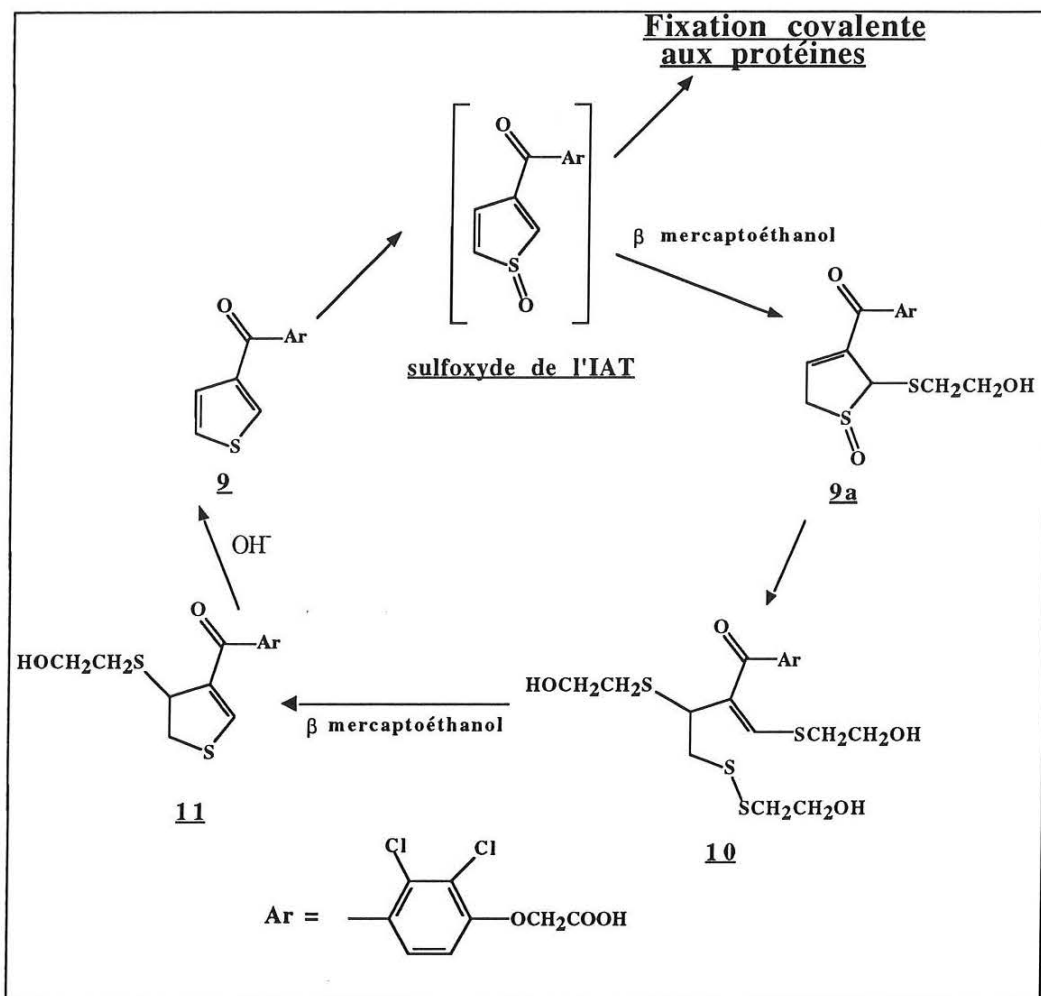


Figure 1-24
Métabolisme microsomal hépatique de l'IAT chez le rat. Formation d'un sulfoxyde de thiophène, pouvant se lier aux protéines ou évoluant en présence de mercaptoéthanol (D'après Mansuy et coll, 1991).

L'IAT est métabolisé par le même cytochrome P450 2C9, métabolisant l'AT, en une entité électrophile se liant de façon beaucoup plus importante aux protéines que l'AT (Dansette et coll, 1991).

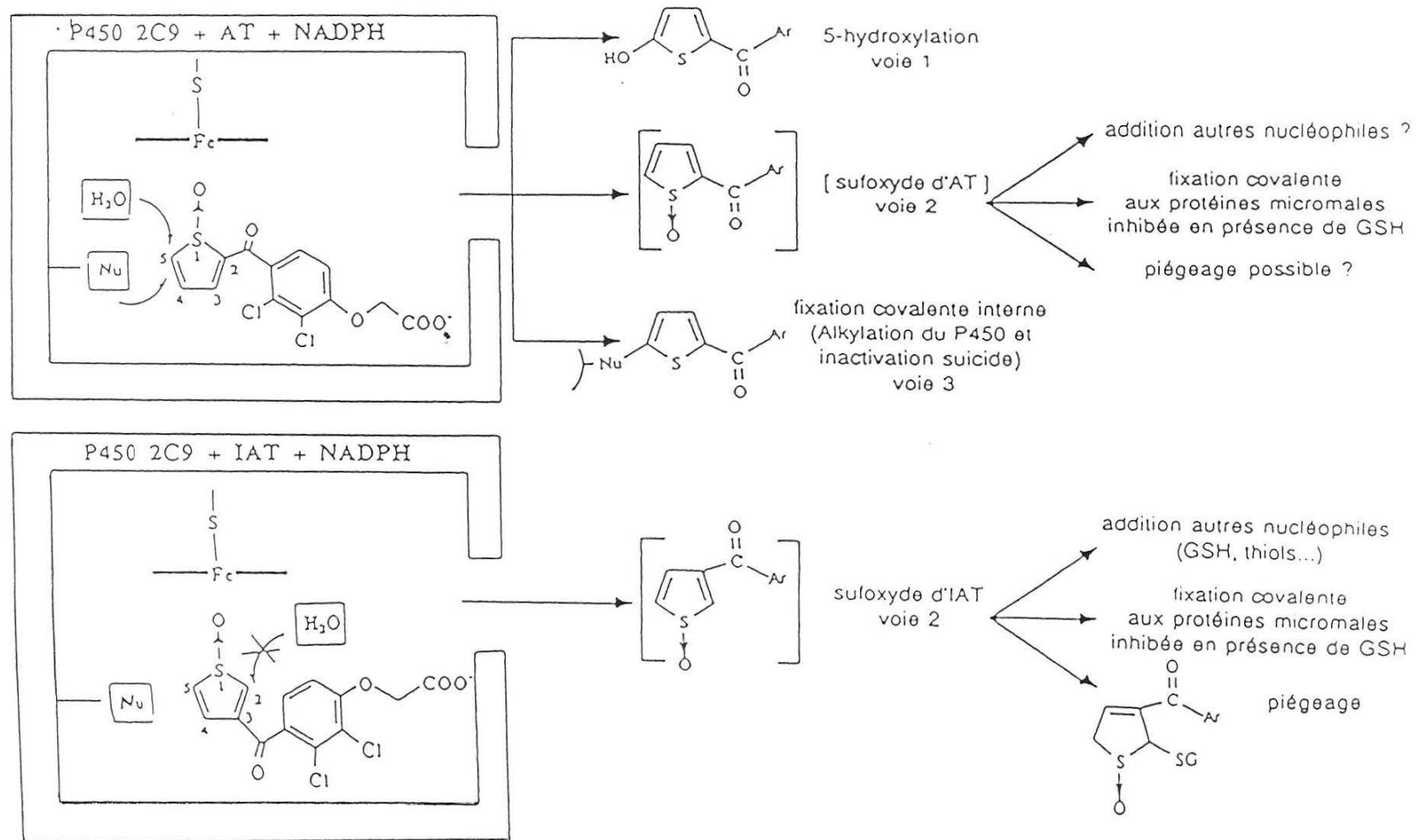
Des études récentes menées au laboratoire (Mansuy et coll, 1991; Valadon, Thèse en 1992) sur le métabolisme de **9** *in vitro* avec des microsomes hépatiques de rat, en présence de mercaptoéthanol, ont permis de définir le schéma métabolique présenté sur la figure 1-24. Avec de faibles concentrations de mercaptoéthanol, on peut piéger le métabolite réactif, un sulfoxyde de thiophène, sous forme de deux sulfoxydes de dihydrothiophène diastéréoisomères **9a**. La concentration de ces deux composés est maximale pour une concentration de mercaptoéthanol de 100µM. Pour une concentration du piègeur nucléophile de 1 mM, on isole principalement le métabolite **10** et une quantité plus faible du métabolite **11**. Le métabolite **10** correspond à la forme ouverte du noyau thiophène ayant fixé trois molécules de mercaptoéthanol. Le métabolite **11** dérive de la réduction du métabolite **10** par le mercaptoéthanol. Avec 5mM de mercaptoéthanol, le métabolite **11** devient majoritaire par rapport à **10**. Le métabolite réactif de l'IAT n'inactive pas le P450 2C9 mais se fixe covalamment aux protéines microsomales (Lopez Garcia et coll, 1994).

1-4-4-3 Les différences d'évolution comparées de l'acide tiénilique et de son isomère après oxydation métabolique.

L'AT est un inhibiteur suicide du cytochrome P450 2C9, alors que l'IAT ne l'est pas. Par contre ce dernier donne environ 10 fois plus de fixation covalente que l'AT car sa métabolisation conduit de façon plus importante à la formation de métabolites réactifs (figure 1-25). Il va sans dire que les

Figure 1-25

Les différences d'évolution comparées de l'acide tiénilique et de son isomère après oxydation métabolique (d'après Lopez Garcia et coll, 1993; 1994)



conséquences toxicologiques de la métabolisation de l'IAT seront importantes. On aura une toxicité directe lors de la fixation covalente avec les protéines autres que les P450. Par contre avec l'AT ce sont les effets immunoallergiques qui prédominent, compte tenu de l'alkylation de l'enzyme qui est à l'origine du métabolisme (Lopez Garcia et coll, 1994; Lecoecur et coll, 1994)

1-4-4-4 Autres dérivés thiophéniques

Les composés de type 2-allyl-thiophène seraient oxydés préférentiellement en α de la chaîne latérale, aboutissant à une coupure oxydante libérant soit de l'acide thiophène-2-carboxylique, soit du 2-hydroxyméthylthiophène (Damani et coll, 1989, volume 1B, P. 226).

Le pyrantel **8**, est un anthelminthique métabolisé également en dérivé 5-hydroxylé **8a** (figure 1-26). L'étude *in vivo* du métabolisme de son analogue méthylé en 3, le morantel (Rumatel[®]) qui est utilisé pour traiter les infestations parasitaires gastrointestinales dues aux nématodes chez la vache, retrouve un premier métabolite qui est le dérivé 5-hydroxylé, un deuxième dérivé non caractérisé qui pourrait provenir d'un piégeage d'une entité réactive par le glutathion et enfin un dernier métabolite issu de l'oxydation du noyau tétrahydropyrimidine (Lynch et coll, 1987).

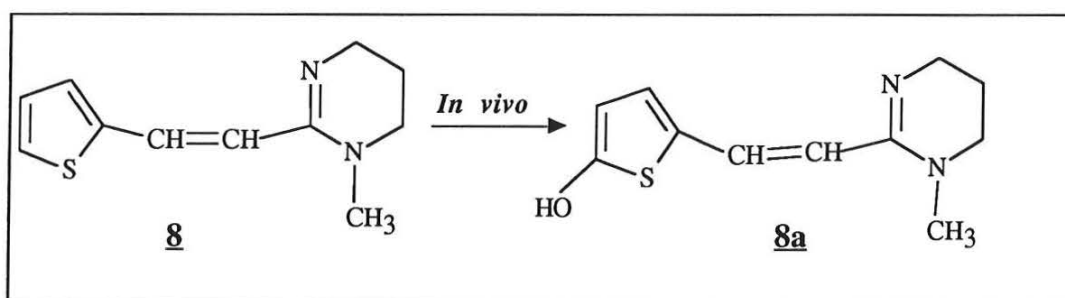


Figure 1-26

Métabolisme proposé pour le pyrantel (8).

In vitro, ce métabolisme a été reproduit et un époxyde en positions 4 et 5 a été proposé comme intermédiaire réactionnel de l'oxydation du noyau thiophène, avec une possibilité de réarrangement à l'image des époxydes d'arènes en dérivés 5-hydroxylé.

La littérature ne fournit aucune donnée sur les dérivés 3-aryyl-thiophènes en dehors de la fixation covalente aux protéines hépatiques de l'isomère en 3 de l'acide tiénilique. Les autres exemples se résument dans les grandes voies présentées précédemment, montrant la pauvreté de nos connaissances sur le métabolisme des dérivés thiophéniques de plus en plus utilisés dans la synthèse de nouveaux principes actifs.

1-4-4-5 Question : La formation de sulfoxydes de thiophènes est-elle générale ?

Compte tenu des résultats du métabolisme de l'IAT et le passage par un intermédiaire réactif de type **sulfoxyde de thiophène** obtenus tout à fait au début de ce travail de thèse (Mansuy et coll, 1991). Nous avons repris l'étude métabolique du benzothiophène, de benzothiophènes substitués et enfin du thiophène lui même, pour essayer de savoir si la S-oxydation des dérivés thiophéniques était la voie majeure de leur métabolisme ?

1-4-5 Etat de nos connaissances sur les sulfoxydes de thiophènes et de benzothiophènes en chimie

Dans le but de comprendre les mécanismes de formation et les conséquences biologiques de sulfoxydes de thiophènes et de benzothiophènes, il était nécessaire de bien connaître la structure chimique et la réactivité de ces entités.

1-4-5-1 Synthèse chimique de sulfoxydes de thiophène et de benzothiophènes.

Les sulfoxydes de thiophène sont en général instables et peu connus en chimie (Kellogg et coll, 1984; Raach et coll, 1985). Seulement deux de ces sulfoxydes de thiophène, substitués en position 2 et 5, ont été préparés par oxydation chimique des thiophènes correspondants, avec des rendements faibles. Ces sulfoxydes de thiophène ont été caractérisés en solution par spectroscopie UV et par RMN (Mock, 1970). En effet Mock a isolé deux sulfoxydes de thiophène bisubstitués. L'oxydation du 2,5-di-tert-butylthiophène **12** avec un équivalent d'acide métachloroperbenzoïque en présence de chlorure de méthylène a conduit avec un rendement de 5% au sulfoxyde 2,5-di-tert-butylthiophène **13**, ainsi qu'à la formation du 2,5-bi-tert-butylthiophène sulfone **14** et d'autres produits. Le schéma réactionnel de cette oxydation est le suivant:

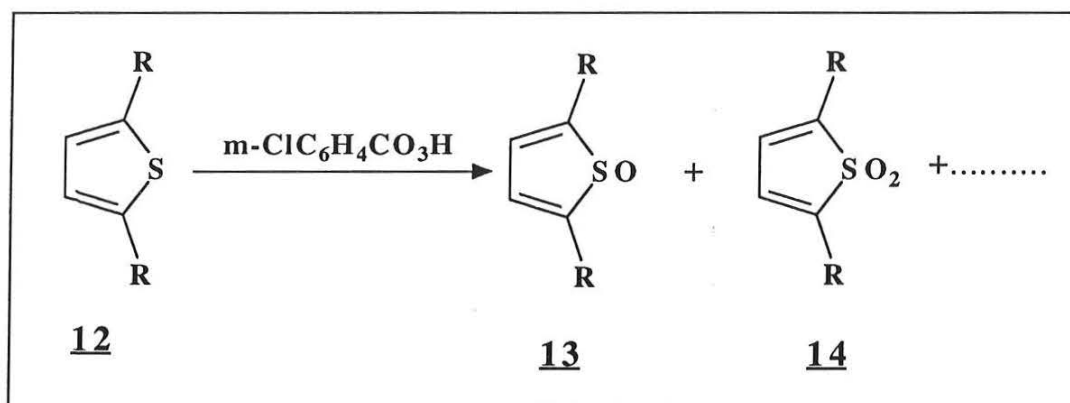


Figure 1-27

Schéma de synthèse de sulfoxyde de thiophène à partir du 2,5-di-tert-butylthiophène (12). (d'après Mock, 1970)

D'autres sulfoxydes de thiophène, très instables, ont été caractérisés uniquement au niveau de leur produits de réaction de Diels Alder (Kellogg, 1984) ou de leurs complexes métalliques (Skaugset, 1990). Ces réactions de Diels Alder ont été déjà décrites dans la littérature. En effet,

il est possible de faire réagir des thiophènes sulfoxydes formés in situ même si on ne peut pas les isoler. Torsell en 1976, indiquait que le sulfoxyde de thiophène est un intermédiaire réactif très instable et décrivait l'addition de sulfoxyde de thiophène et de sulfone de thiophène sur des quinones (Torsell, 1976 et figure 1-28).

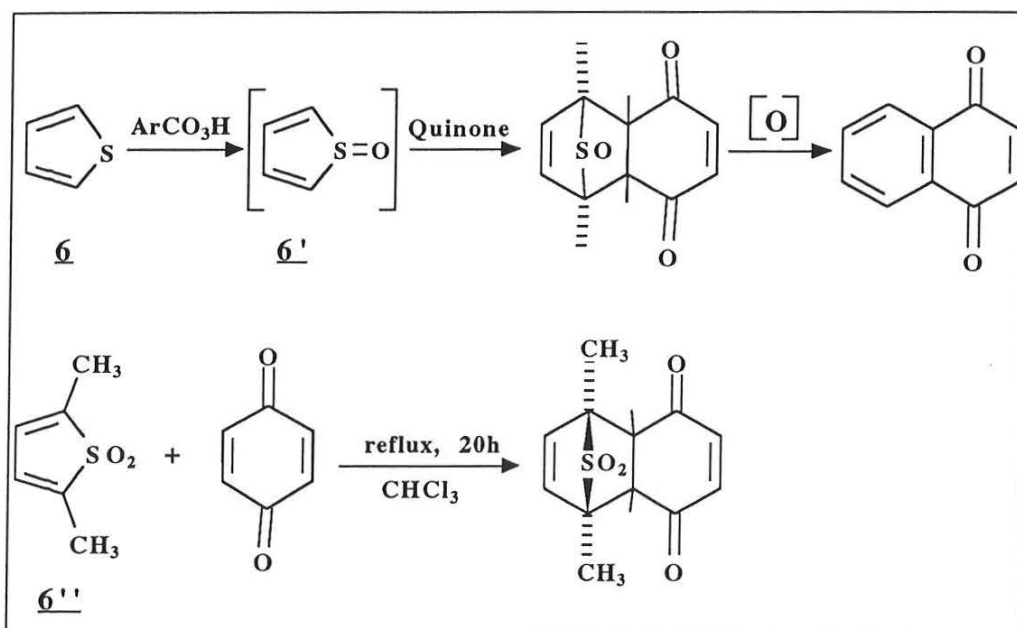


Figure 1-28

Réactions d'addition de sulfoxyde (6') et de la sulfone (6'') de thiophène, formés in situ, avec des quinones (d'après Torsell, 1976).

En ce qui concerne les sulfoxydes de benzothiophène, les meilleurs travaux sur la question ont été menés par P. Geneste et ses collaborateurs en 1977. Ils concluent que le meilleur réactif capable de transformer sélectivement des benzothiophènes en sulfoxydes correspondants est l'hypochlorite de tertio-butyle utilisé dans le méthanol. Les autres réactifs d'oxydation comme l'acide p-nitroperbenzoïque ne donnent que des mélanges sulfoxyde/sulfone dans lesquels le sulfoxyde est minoritaire (Geneste et coll, 1977b). Les benzothiophènes oxydés efficacement par cette méthode sont essentiellement des benzothiophènes substitués en position 2 ou 3 par des groupements électroattracteurs.

D'autre part, dans le cas particulier du benzothiophène non substitué, l'hypochlorite de tertio-butyle ne donne pas de sulfoxydes de benzothiophène, mais un mélange de sept produits dans lequel le benzothiophène sulfoxyde formé est substitué en 2 par un atome de chlore (Geneste et coll, 1977a). Les autres techniques décrites dans la littérature, qu'elles soient catalytiques (Blanchard et coll, 1975; Chien et coll, 1985) ou électrochimiques (Srogl et coll, 1978) ne décrivent pas la formation de sulfoxyde de benzothiophène mais des produits d'oxydation ultérieure (sulfone, cétone, etc....). Cependant des travaux réalisés au laboratoire, par le docteur I. Erdelmeier, montrent que l'on peut oxyder sélectivement et avec de bons rendements le benzothiophène en sulfoxyde de benzothiophène, par H_2O_2 en présence du CF_3COOH à $0^\circ C$ pendant 40 min.

1-4-5-2 Réactivité des sulfoxydes de thiophènes et de benzothiophènes.

En général, les sulfoxydes de thiophène subissent facilement la réaction de dimérisation de Diels Alder (Kellogg, 1984 et figure 1-29).

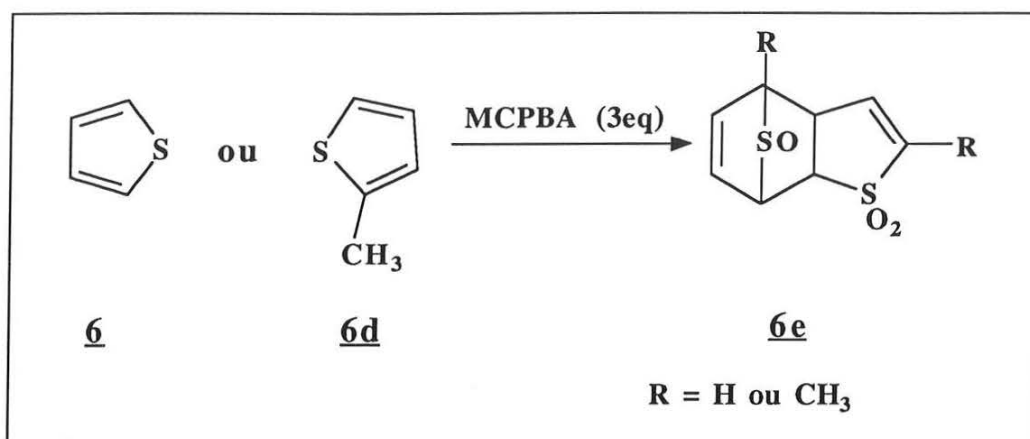


Figure 1-29

Oxydation du thiophène (6) et du 2-méthylthiophène (6d) :

mise en évidence de la réaction de Diels-Alder (6e) (d'après Kellogg, 1984).

La réactivité de sulfoxydes de benzothiophènes n'est pas décrite dans la littérature. Dans notre laboratoire I. Erdelmeier a synthétisée et a étudié les adduits de Michael (il s'agit d'une addition nucléophile sur une double liaison en α d'un groupement attracteur du type cétone, sulfoxyde, sulfone...) d'un nucléophile sur le sulfoxyde de benzothiophène. L'addition a pu être réalisée en position 3, avec MeOH, Cl^- et avec le mercaptoéthanol; dans ce dernier cas, le rendement était de 89%. De point de vue réactivité le sulfoxyde de benzothiophène est donc un bon accepteur de Michael vis à vis des nucléophiles.

1-5 Motivations du travail

Nous avons montré dans cette introduction l'importance particulière des dérivés thiophéniques largement répandus en thérapeutique vétérinaire et humaine, mais aussi en pharmacologie et en toxicologie.

Dans le but de présenter les dérivés thiophéniques et leur transformation chez l'homme et l'animal, il nous a été nécessaire de parler des différentes enzymes du métabolisme des xénobiotiques et des méthodes d'études

utilisées actuellement. Nous avons volontairement décrit les résultats de la littérature jusqu'en 1994. Cependant au début de ce travail de thèse un sulfoxyde de thiophène très électrophile a pu être isolé et piégé *in vitro* au cours du métabolisme de l'IAT (Mansuy et coll, 1991). Cette découverte a permis d'apporter des éléments de réponse aux toxicités observées dans le cas de l'AT après sa mise sur le marché.

Le but de notre travail a donc été de savoir si :

-la S-oxydation des dérivés thiophéniques était en générale la voie majeure de leur métabolisme?

-Cette S-oxydation des dérivés thiophéniques a-t-elle lieu *in vivo* ?

Ceci nous a conduit à étudier le métabolisme du benzothiophène, de benzothiophènes substitués (principalement le 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène)) et du thiophène lui même. Les différentes études métaboliques ont été réalisées *in vivo* chez le rat et *in vitro* avec des microsomes hépatiques de rat.

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène

.....

CHAPITRE DEUXIEME

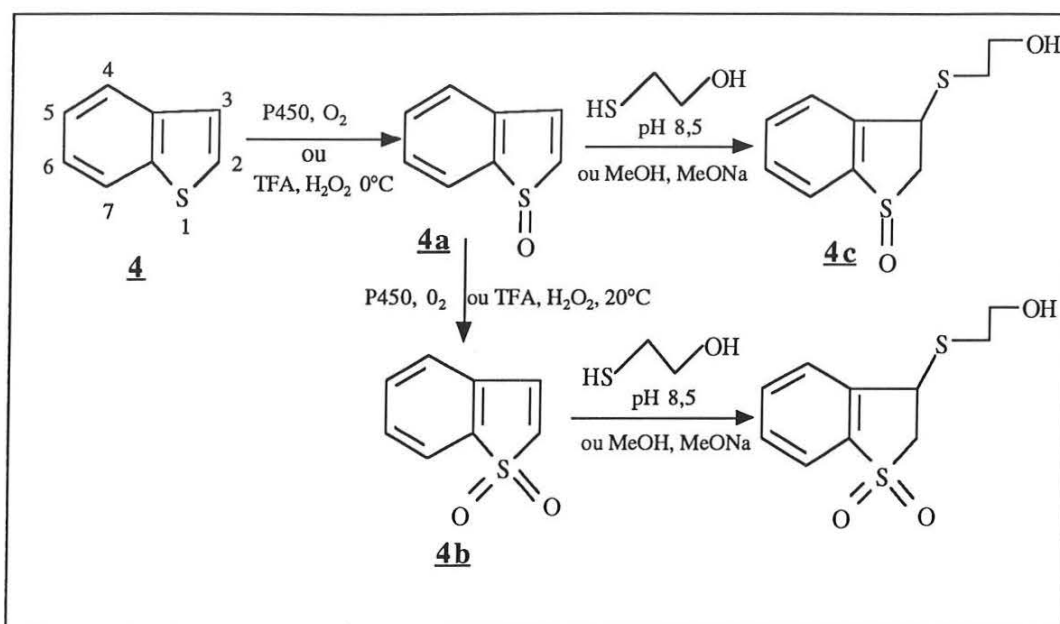
.....

METABOLISME DU BENZOTHIOPHENE :

MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION D'UN SULFOXYDE ET D'UNE SULFONE DE BENZOTHIOPHENE *IN VIVO*

.....

Le benzothiophène **4** est le prototype d'une structure qu'on retrouve dans un certain nombre de pesticides et de composés pharmacologiquement actifs. Les métabolites urinaires du benzothiophène chez le rat ont été décrits par Bray et coll comme étant des dérivés mercapturiques avec très peu de preuves de structure (Bray et coll, 1968, 1971). L'oxydation métabolique du benzothiophène par des microsomes de foie de rat a été étudiée par Mansuy et coll en 1991 et a conduit à un métabolite majoritaire, le sulfoxyde de benzothiophène **4a** et une faible quantité de sulfone de benzothiophène **4b**.



Métabolisme du benzothiophène par des microsomes de foie de rat

(d'après Mansuy et coll, 1991)

En présence de pièges nucléophiles soufrés, il ne se forme aucun adduit, sauf si on augmente le pH à 8,5 auquel cas il se forme en présence du mercaptoéthanol des quantités détectables de l'adduit **4c**.

Ce dernier résultat nous a conduit à réétudier le métabolisme du benzothiophène *in vivo*. Dans le présent travail, les métabolites urinaires majoritaires et minoritaires ont été isolés et identifiés. La cinétique de leur formation a été établie.

2-1 Etude des métabolites urinaires du benzothiophène

Le benzothiophène radioactif (BZT-³H), marqué en position 2, a été synthétisé par lithiation de 280 mg de BZT avec le butyl lithium, dans 20 ml de THF puis une réaction avec 20 µl de ³H₂O (1Ci/ml), suivi par 100 µl de H₂O, pour donner après extraction à l'éther et lavage à l'eau, environ 270 mg de BZT-³H (5Ci/mole). Le rendement radioactif est de

50%. Des rats traités avec du benzothiophène tritié (100 mg/kg) en intrapéritonéale excrètent deux couples de métabolites majoritaires dans les urines : **A** et **A'** et **B** et **B'** et un couple minoritaire **D** et **D'** comme le montre la figure 2-1:A et la figure 2-2 (spectres UV de ces métabolites). L'HPLC analytique des fractions urinaires collectées à des intervalles de temps successifs, montre qu'initialement, les métabolites **A** et **A'** sont excrétés en premier. Six heures après le traitement des rats, le mélange **B** et **B'** croit (figure 2-1:C et tableau 2-1). Après 33 heures, l'excrétion urinaire des métabolites du benzothiophène n'augmente plus. Les quantités de **A** et **A'** et de **B** et **B'** sont à peu près identiques et correspondent à peu près à 19% de la dose administrée. D'autres produits radioactifs représentent 1,5% environ de la radioactivité totale à 33h (tableau 2-1).

Les métabolites **A** et **A'** et **B** et **B'** ont respectivement le même spectre UV et sont probablement des diastéréoisomères. L'isolement et la purification des métabolites ont été réalisés grâce au traitement des rats avec 250 mg/kg de benzothiophène. Après extraction sur SepPak, les métabolites ont été isolés par HPLC préparative comme cela a été décrit dans la partie matériels et méthodes.

Puisqu'il nous a été difficile de séparer les diastéréoisomères **A** et **A'** d'une part et **B** et **B'** d'autre part, la spectrométrie de masse et l'analyse par RMN ont été réalisées directement sur les mélanges.

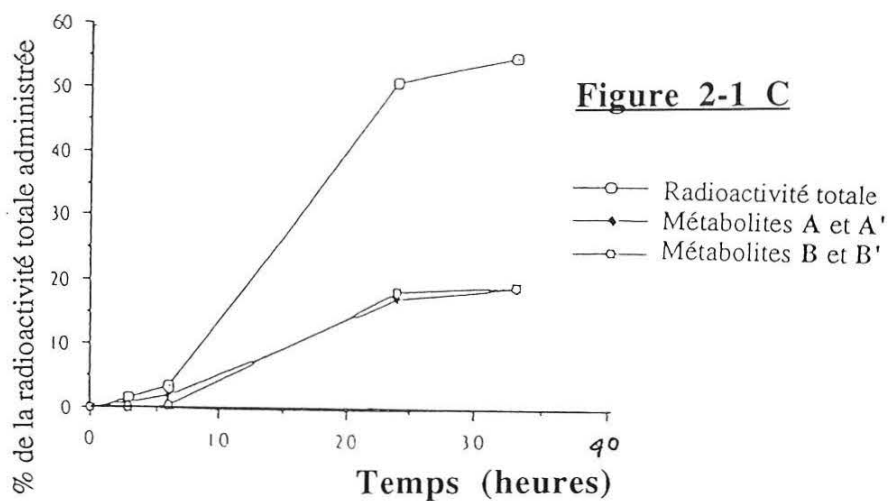
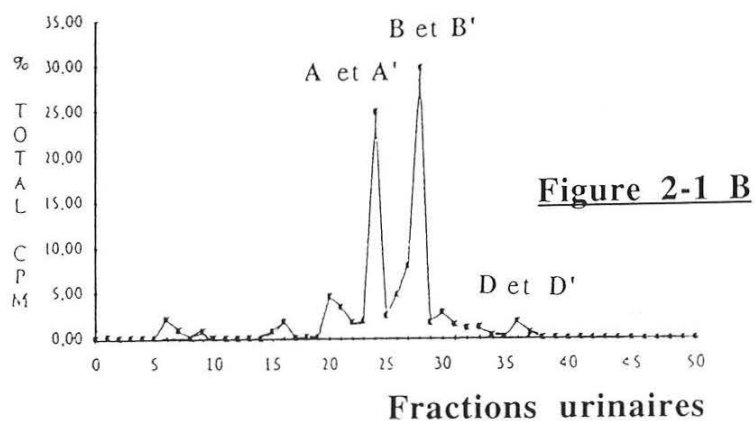
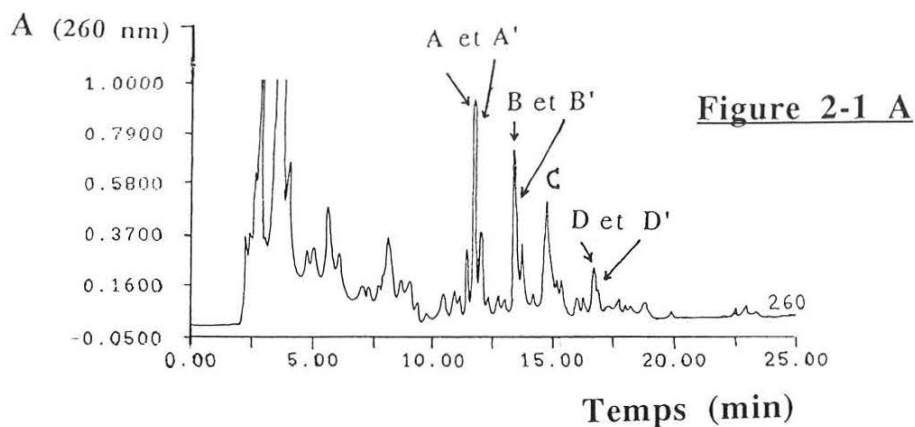


Figure 2-1

Métabolites urinaires du benzothiophène tritié, excrétés par le rat entre 9 et 24 heures : HPLC analytique (2-1 : A), radioélogramme (2-1 : B) et cinétique d'excrétion (2-1 : C) entre 0 et 33 heures.

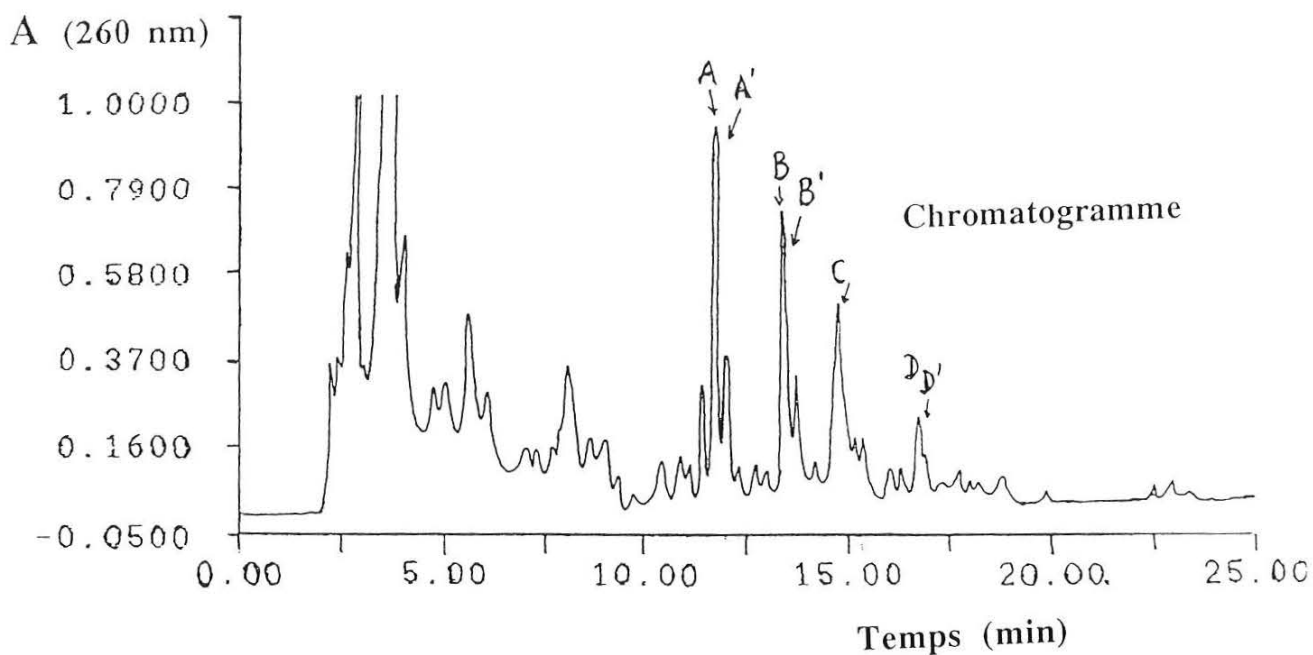
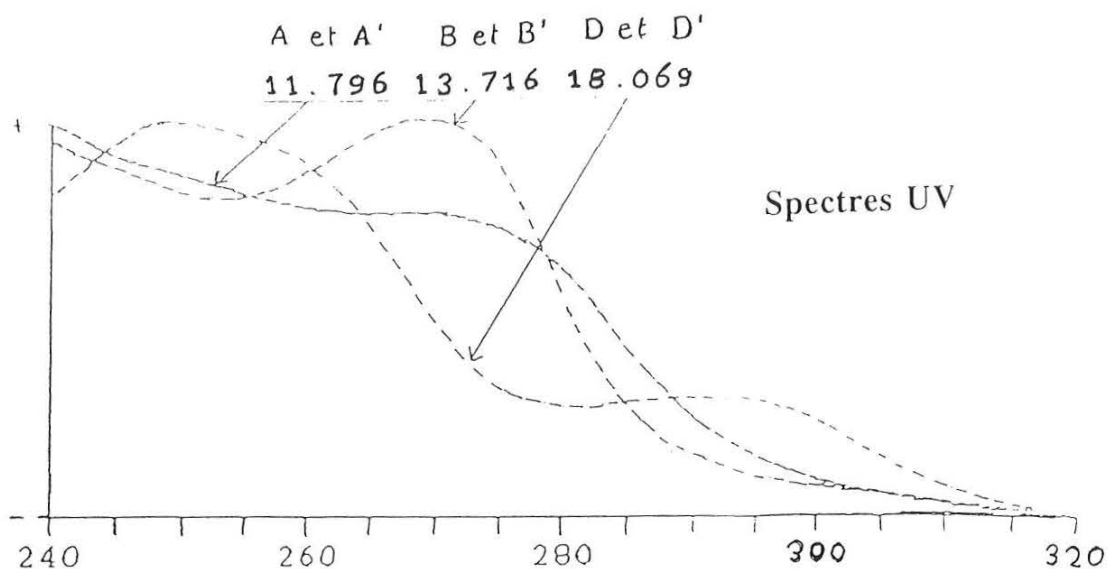


Figure 2-2

HPLC analytique des urines de 9-24 heures, de rat traité avec du benzothiophène (250 mg/kg en ip).

Conditions d'HPLC:

Solvant A = $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1M pH 4,6

Solvant B = CH_3CN 50%. En gradient 0 à 100% de B en 20 min.

Tableau 2-1

Cinétique d'excrétion urinaire et fécale des métabolites du benzothiophène tritié entre 0-24h et 24-33h.

La radioactivité totale injectée est de 43,2 μCi

Urines (heures)	Radioact- ivité(μCi)	Pourcentage de la radioactivité totale injectée				
		Total	A et A'	B et B'	D et D'	T ₂ O
Métabolites urinaires						
0-3h	0,7	1,6	0,8	0,14	0	0,02
3-6h	0,9	2	1,2	0,4	0,06	0,06
9-24h	20,5	47,3	15,5	18	0,9	1,4
24-33h	1,5	3,5	1,5	0,7	-	0,28
Total 0-33h	23,5	54,5	19	19,24	1	1,76

Fécès : 3,6% de la radioactivité totale injectée a été retrouvée entre 0 et 33 heures.

2-1-1 Identification des métabolites A et A' et B et B'.

- Les métabolites A et A'

Analysés par HPLC les métabolites A et A' ont un temps de rétention de 11,79 et 12 min, un maximum d'absorption en UV à 240 nm et un point d'inflexion à 280 nm (figure 2-2). Le rapport A/A' est de 4/1, indiquant que A est majoritaire et A' est minoritaire. Le spectre de masse des composés A et A' présente un pic moléculaire à $M = 313$ correspondant à l'addition de la N-acétylcystéine au benzothiophène plus un atome d'oxygène (tableau 2-2). L'analyse par RMN dans CD_3OD (figure 2-3) montre les signaux de la N-acétylcystéine, quatre protons aromatiques et un complexe ABX appartenant au noyau dihydrobenzothiophène

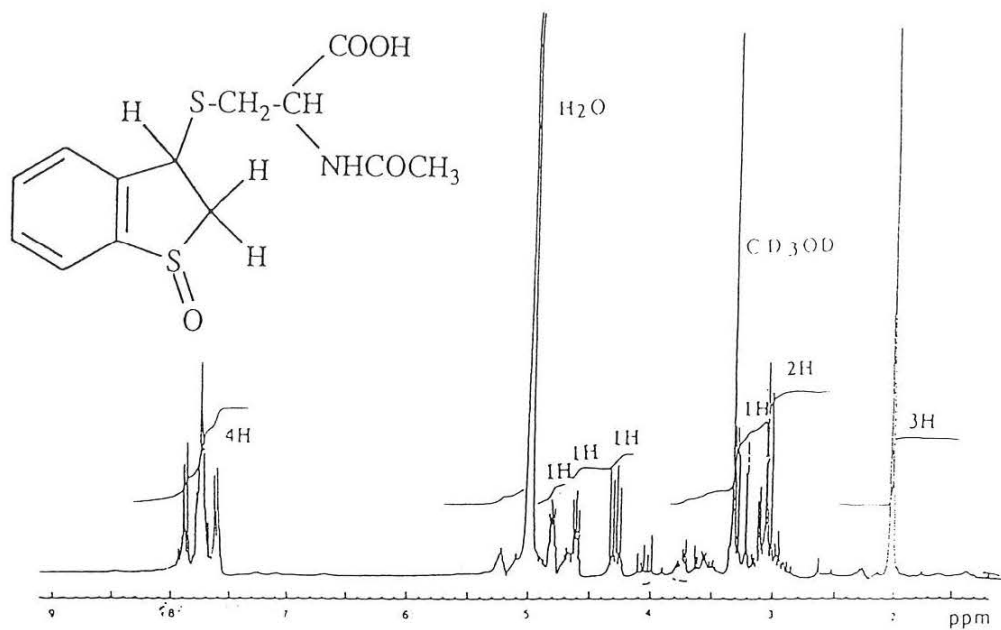


Figure 2-3

Spectre RMN du proton des métabolites A et A' et de leur authentiques 4A et 4A', dans le méthanol deutérié (CD₃OD).

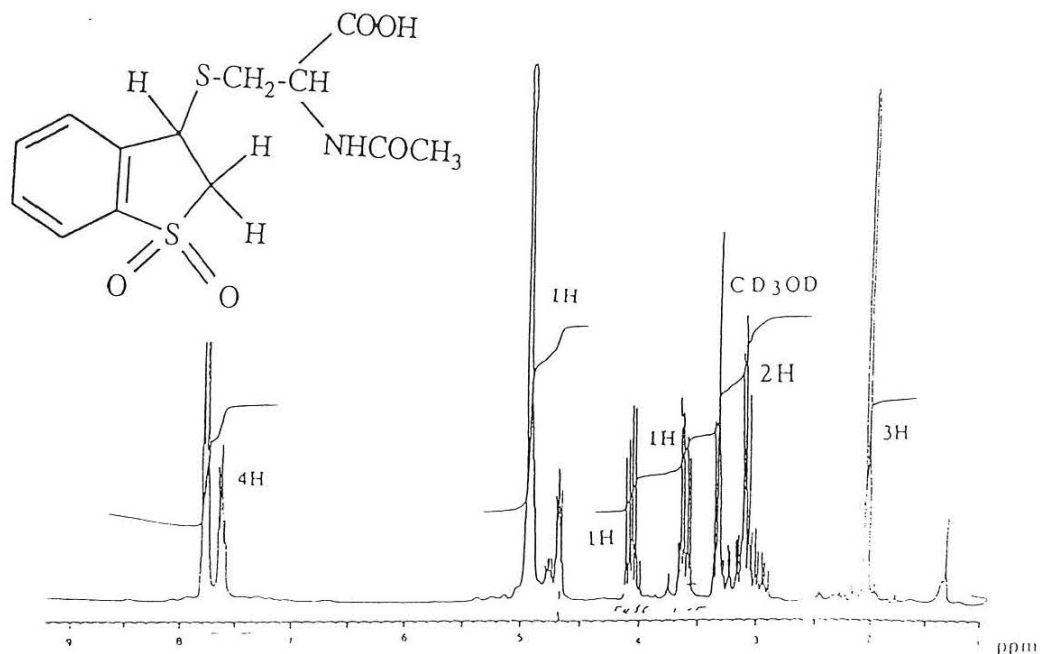


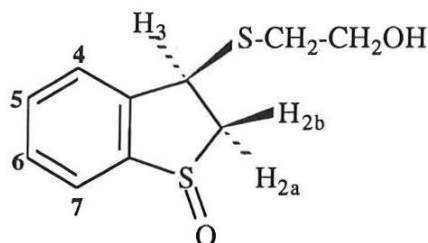
Figure 2-4

Spectre RMN du proton des métabolites B et B' et de leur authentiques 4B et 4B', dans le méthanol deutérié (CD₃OD)

ressemblant à celui d'un composé synthétisé antérieurement et correspondant à l'addition du mercaptoéthanol sur la position 3 du sulfoxyde de benzothiophène (tableau 2-3).

La synthèse de l'adduit du sulfoxyde du benzothiophène avec le mercaptoéthanol est réalisée dans le méthanol, en présence du méthylate de sodium et du mercaptoéthanol (Mansuy et coll, 1991; Ginderow et coll, 1992). Un produit cristallin blanc a été obtenu. La structure aux rayons X montre la formation du sulfoxyde de 2,3-dihydrobenzothiophène substitué en 3 par le soufre du mercaptoéthanol. La RMN de proton dans CDCl_3 a montré les signaux suivants :

$\delta = 2,64-2,73$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}-$), 3,44 (dd, $J = 15$, $J = 4,5$ Hz, 1H, H_{2a}), 3,45-3,69 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4,05 (dd, $J = 15$, $J = 8$ Hz, 1H, H_{2b}), 4,63 (dd, $J = 8$, $J = 4,5$ Hz, 1H, H_3), 7,49 (m, 1H, 6H), 7,56-7,73 (m, 2H, $\text{H}_{4,5}$), 7,79 (m, 1H, H_7).



Ainsi la structure des composés A et A' correspond probablement au sulfoxyde de 2,3-dihydrobenzothiophène substitué en 3 par le soufre de la N-acétylcystéine. Les composés A et A' ont été cristallisés dans l'acétate d'éthyle et il sont stables après purification. Cependant les métabolites A et A', en présence d'agents réducteurs, comme la N-acétylcystéine ou le mercaptoéthanol se transforment en nouveaux composés D et D' avec un spectre UV caractéristique.

- Les métabolites **B** et **B'**

L'HPLC analytique des métabolites **B** et **B'** montre un temps de rétention de 13,71 et 13,85 min avec un spectre UV ayant pour $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm (figure 2-2). Le rapport **B/B'** est aussi de 4/1, indiquant que **B** est majoritaire et **B'** est minoritaire.. La masse de ces composés est de 329 correspondant à l'addition de la N-acétylcystéine sur le benzothiophène plus deux atomes d'oxygène (tableau 2-2). Le spectre RMN du proton dans CD₃OD montre les signaux de la N-acétylcystéine, quatre protons aromatiques et un complexe ABX correspondant au dihydrobenzothiophène dioxyde substitué en 3 par la N-acétylcystéine (figure 2-4 et tableau 2-3).

Les données spectrales de **A** et **A'** suggéraient la structure de **4A** et **4A'** (figure 2-5) et celles de **B** et **B'** la structure de **4B** et **4B'** (figure 2-6). Pour confirmer cette hypothèse nous avons préparé ces composés par les méthodes décrites ci-dessous.

Les études de synthèse réalisées au laboratoire par I. Erdelmeier et G. Rubinsteen ont permis d'obtenir les produits suivants :

2-1-2 Synthèse du sulfoxyde de benzothiophène et de son conjugué avec la N-acétylcystéine

Le sulfoxyde de benzothiophène a été synthétisé par oxydation directe du benzothiophène par H₂O₂ dans l'acide trifluoroacétique, à basse température et en un temps de réaction court, ce qui permet d'obtenir du sulfoxyde de benzothiophène pur qui peut être conservé en solution à -20°C.

L'adduit du sulfoxyde de benzothiophène avec la N-acétylcystéine a été synthétisé par la réaction dans le méthanol en présence de méthylate de sodium en un mélange 50/50 de deux diastéréoisomères (**4A** + **4A'**) qui

n'ont pas pu être séparés de façon préparative (figure 2-5). Analysé par HPLC, ces composés avaient des propriétés spectrales et un temps de rétention identiques aux métabolites A et A'. La RMN est très similaire à celle du mélange A et A'. La comparaison des deux mélanges 4/1 et 1/1 (métabolique ou synthétique) permet d'attribuer les signaux de chaque spectre RMN, malgré la non séparation des isomères (tableau 2-3 page 95)

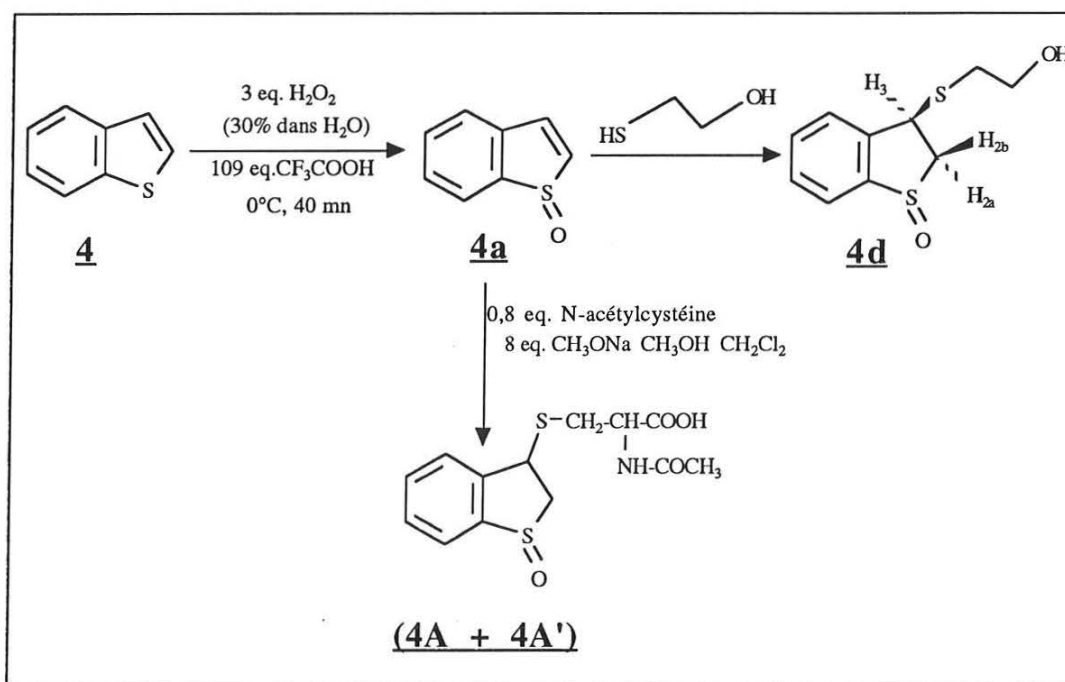


Figure 2-5

Schéma de synthèse du sulfoxyde de benzothiophène et de ses adduits avec le mercaptoéthanol et avec la N-acétylcystéine.

2-1-3 Synthèse de la sulfone de benzothiophène et de son conjugué avec la N-acétylcystéine

La réaction de la sulfone de benzothiophène commerciale avec la N-acétylcystéine dans le méthanol en présence du méthylate de sodium est rapide et permet d'obtenir un mélange 1/1 de deux diastéréoisomères (4B + 4B') difficiles à séparer par HPLC. Leurs spectres UV, IR et de masse et leur temps de rétention HPLC sont identiques à ceux des métabolites B

et **B'**. Les données du spectre de masse sont indiquées dans le tableau 2-2 et celles de la RMN dans le tableau 2-3, page 95.

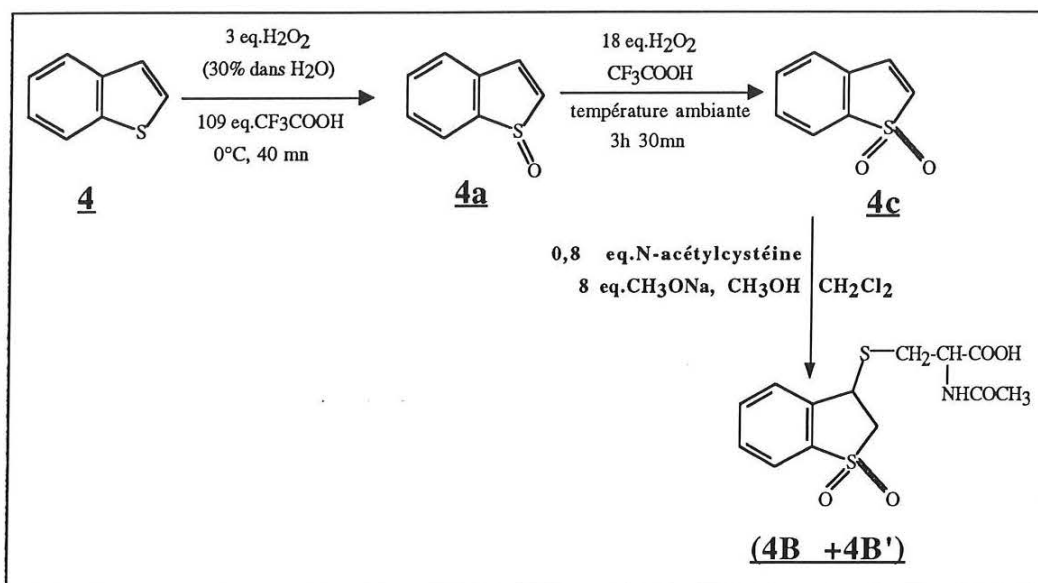


Figure 2-6

Schéma de synthèse de la sulfone de benzothiophène et de son adduit avec la N-acétylcystéine

2-1-4 Comparaison des métabolites A et A' et B et B' avec leur authentiques de synthèse, respectivement (**4A + 4A'**) et (**4B + 4B'**).

-Spectres de masse

Les composés **A** et **A'** ont les mêmes spectres de masse que les authentiques de synthèse **4A + 4A'** comme le montre le tableau 2-2, correspondant au produit d'addition de la N-acétylcystéine sur le sulfoxyde de benzothiophène (figure 2-5).

Les composés **B** et **B'** ont les mêmes spectres de masse que les authentiques de synthèse **4B + 4B'** comme le montre le tableau 2-2 et la

figure 2-6, correspondant au produit d'addition de la N-acétylcystéine sur la sulfone de benzothiophène .

-RMN ^1H

La figure 2-3 montre des signaux identiques pour A et A' et 4A + 4A' mais avec des proportions différentes. Il en est de même pour les composés B et B' et 4B + 4B' (figure 2-4).

-Spectres UV, IR et temps de rétention

Les composés A et A' et 4A + 4A' ont montré le même spectre UV et le même temps de rétention. Ils ont montré une bande large à 1070 cm^{-1} dans leur spectre IR, ce qui est caractéristique d'un sulfoxyde. Les composés B et B' et 4B + 4B' ont montré également les mêmes spectres UV, RMN ^1H , de masse et le même temps de rétention.

Les spectres UV, RMN, IR, de masse et le temps de rétention HPLC confirment l'hypothèse postulée à savoir : **les métabolites A et A' sont respectivement identiques aux authentiques 4A et 4A' et que les métabolites B et B' sont aussi respectivement identiques aux authentiques de synthèse 4B et 4B'.**

Métabolite C.

Dans l'urine des rats traités au benzothiophène, un composé C non présent dans l'urine témoin et moins polaire que A et A' et B et B' a été partiellement purifié. Cependant, ce composé n'est pas radioactif et est peu abondant, ce qui ne nous permet pas d'être certain que c'est un métabolite du benzothiophène. Nous nous en parlerons plus par la suite.

2-1-5 Nature des métabolites minoritaires D, D' et E

Lorsque les urines sont conservées à température ambiante ou au congélateur pour une longue période, le rendement en D et D' croît et il y a apparition d'un nouveau produit que nous avons appelé E.

-Métabolites D et D'

-Les métabolites D et D' isolés de l'urine

Les métabolites **D** et **D'** sont présents en quantité non négligeable dans l'urine vieillie (urine conservée au congélateur durant quelques jours à quelques semaines), ils ont un temps de rétention de 17,74 et de 18 min en HPLC, un spectre UV caractéristique avec une bande large centrée à 246 nm, un large épaulement à $\lambda = 295$ nm (figure 2-7). Le spectre de masse montre une masse de 297 ((298 ((M + H)⁺), 315 ((M + NH₄)⁺)) (tableau 2-2) correspondant au benzothiophène plus la N-acétylcystéine. Le spectre RMN du proton montre les protons de la N-acétylcystéine, quatre protons aromatiques et un système ABX correspondant au 2,3 dihydrobenzothiophène substitué en position 3 par la N-acétylcystéine (figure 2-8 et tableau 2-3).

-Les métabolites D et D' synthétisés par voie chimique

Les métabolites **D** et **D'** ont été synthétisés par voie chimique par chauffage du mélange de synthèse **4A** + **4A'** et du mercaptoéthanol dans l'acide acétique dilué, entraînant la réduction du sulfoxyde (figure 2-9). Il semble qu'il y ait un seul diastéréoisomère du métabolite **D** ou probablement la coexistence de deux diastéréoisomères **D** et **D'** qui sont suffisamment proches l'un de l'autre de telle façon que l'HPLC n'a pu les séparer. Nous avons vu une fois une amorce de séparation en HPLC, mais n'avons pas pu la reproduire. Les métabolites **D** et **D'** sont stables sous forme cristallisée et à l'abri de l'air. Cependant dans le méthanol et en présence d'air, la solution devient rapidement rose. Analysée par HPLC, cette solution contient le nouveau produit **E**. Ce métabolite est aussi retrouvé en traces dans l'urine vieillie.

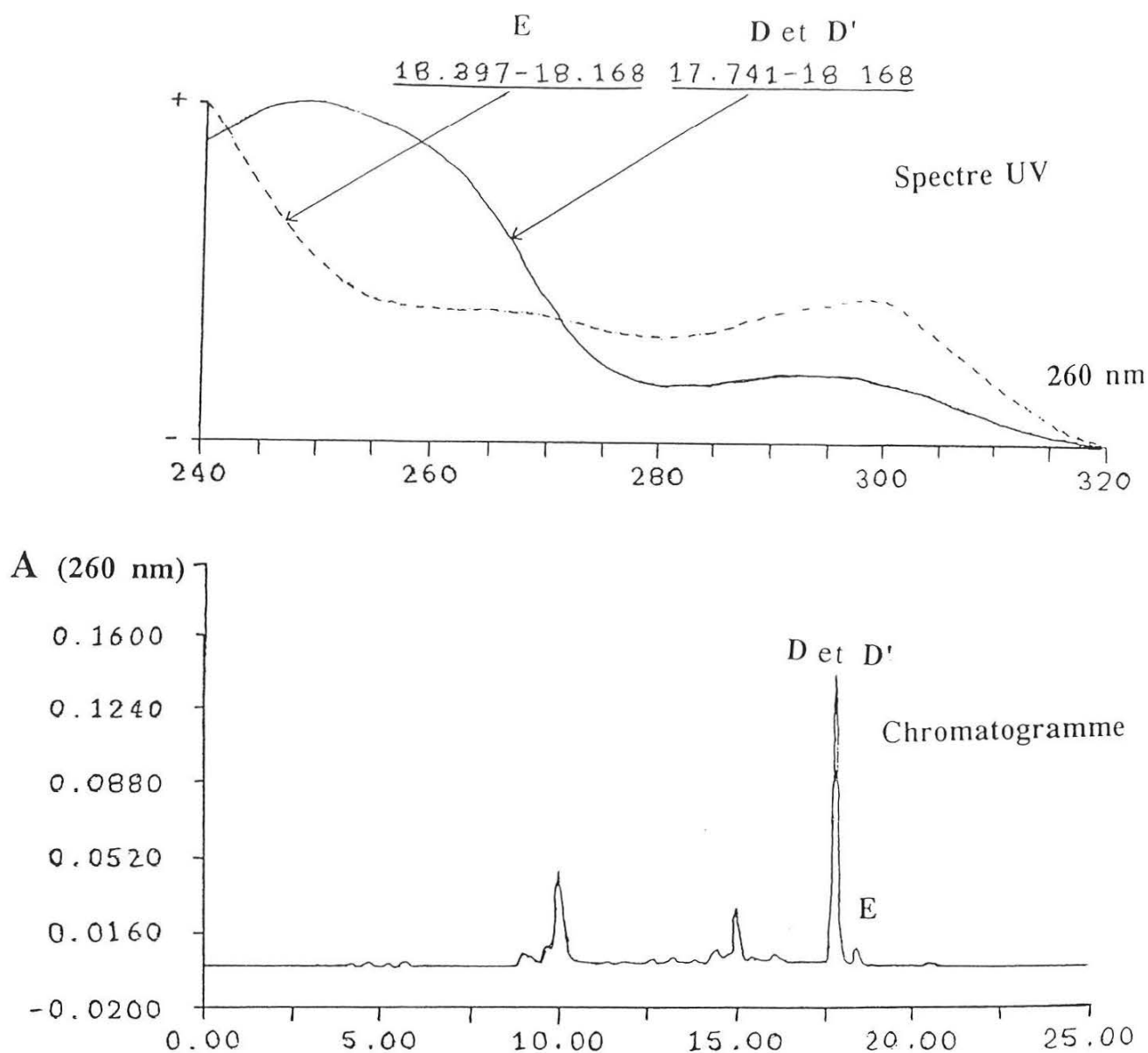


Figure 2-7

HPLC analytique des urines de rat, conservées au congélateur pendant quelques jours à quelques semaines. Mise en évidence des composés D et D' (produits de réduction de A et de A') et celle du produit aromatisé E.

Conditions d'HPLC:

Solvant A = $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1M pH 4,6

Solvant B = CH_3CN 50%. En gradient 0 à 100% de B en 20 min.

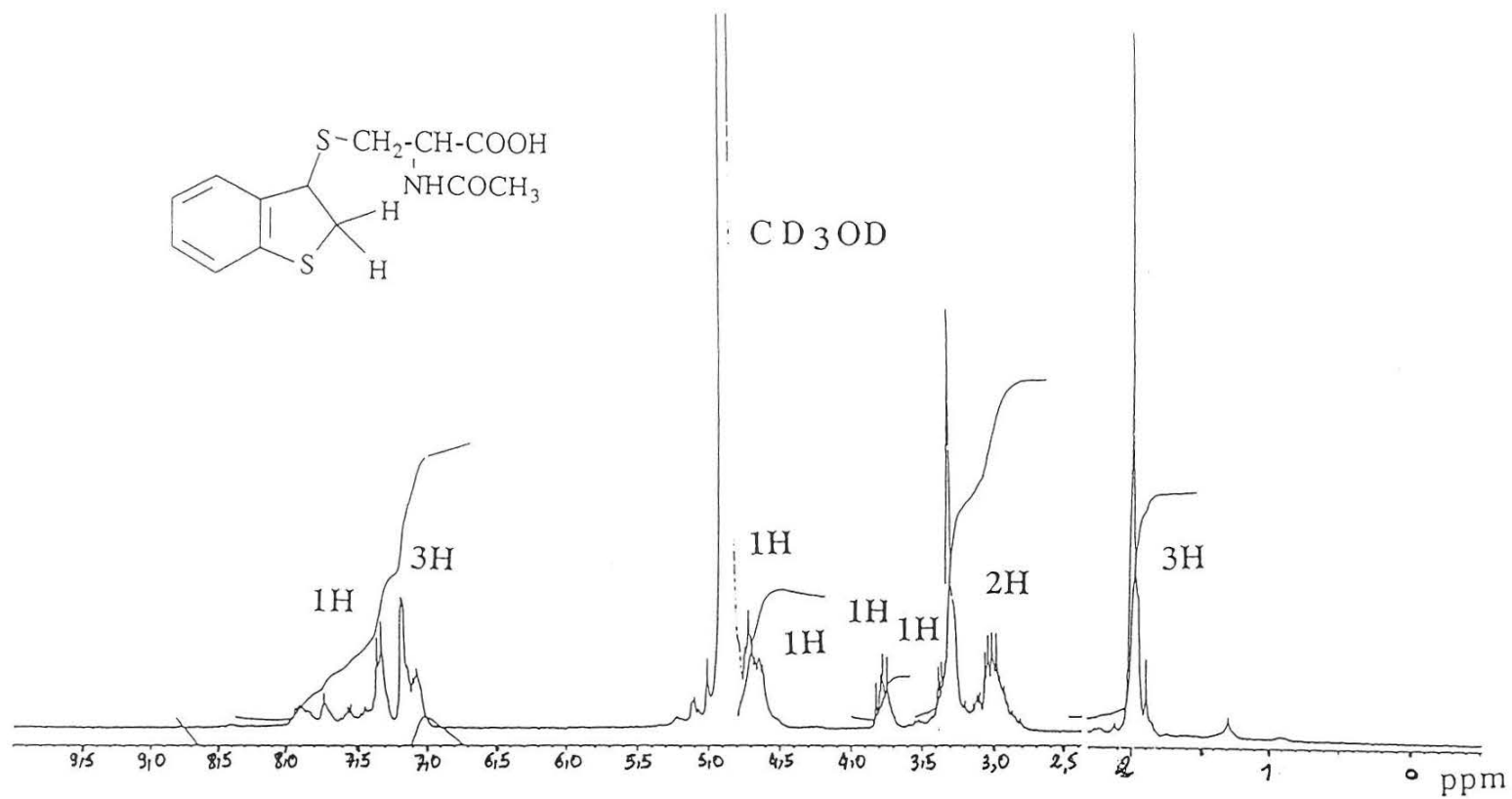


Figure 2-8

Spectre RMN du proton des composés D et D' (produits dérivés de la réduction dans les urines de A et de A'), dans le méthanol deutérié (CD₃OD)

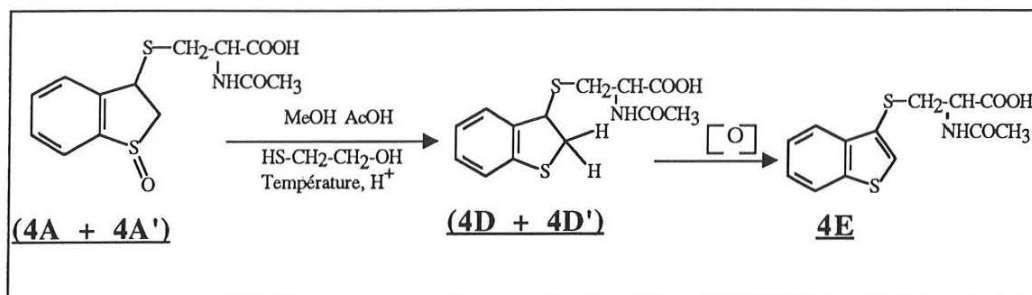


Figure 2-9

Schéma de synthèse des métabolites 4D + 4D' et de leur produit d'oxydation 4E

Preuves de structure des métabolites D et D'

le tableau 2-2 montre bien que les composés D et D' et 4D et 4D' ont la même masse. Ils ont également les mêmes spectres UV et de RMN ^1H . Les temps de rétention sont identiques. Ainsi on peut dire que les métabolites D et D' et leurs authentiques 4D et 4D' ont la même structure.

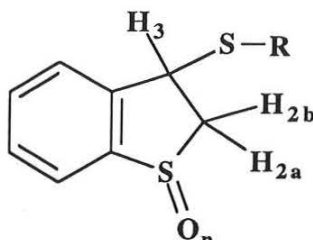
Tableau 2-2

Les données de masse des métabolites urinaires du benzothiophène et de leurs authentiques correspondants

Métabolites/ Authentiques	Masses : ionisation chimique (NH ₃)
(A et A')/(4A + 4A')	314 ((M+H) ⁺ , 100%); 331 ((M+NH ₄) ⁺ , 30%) 168 (60%); 151 (90%); 134 (95%)
(B et B')/(4B + 4B')	330 ((M+H) ⁺ , 100%); 347 ((M+NH ₄) ⁺ , 25%) 186 (40%); 150 (25%); 134 (85%)
(D et D')/(4D + 4D')	298 ((M+H) ⁺ , 100%); 315 ((M+NH ₄) ⁺ , 25%) 186 (75%); 164 (45%); 134 (80%)

Tableau 2-3

Comparaison en RMN ^1H des signaux ABX
correspondants aux protons cycliques 2 et 3
des composés ayant les structures ci-dessous



Protons du système ABX Produits	H _{2a}	H _{2b}	H ₃
n=1, R=CH ₂ -CH ₂ OH (CDCl ₃)	$\delta=(3,44; \text{dd})$ $J=(4,5; -14,5)$	$\delta=(4,05; \text{dd})$ $J=(8; -14,5)$	$\delta=(4,63; \text{dd})$ $J=(4,5; 8)$
n=1 R= $\begin{array}{l} \text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{-CH} \\ \text{NHCOCH}_3 \end{array}$ (CD ₃ OD)	A : $\delta=3,29$ $J=(4,7; -15)$ A' : $\delta=3,33$	A : $\delta=4,28$ $J=(8, -15)$ A' : $\delta=4,26$	A : $\delta=4,81$ $J=(4,7; 8)$ A' : $\delta=4,90$
n=2, R=CH ₂ -CH ₂ OH (CDCl ₃)	$\delta=3,54$ $J=(-13,8; 5,9)$	$\delta=3,93$ $J=(-13,8; 7,8)$	$\delta=4,76$ $J=(5,9; 7,8)$
n=2 R= $\begin{array}{l} \text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{-CH} \\ \text{NHCOCH}_3 \end{array}$ (CD ₃ OD)	B : $\delta=3,36$ $J=(-13; 4,7)$ B' : $\delta=3,39$	B : $\delta=3,83$ $J=(-13; 7,7)$ B' : $\delta=3,87$	B : $\delta=4,76$ $J=(4,7; 7,8)$ B' : $\delta=4,8$
n=0 R= $\begin{array}{l} \text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{-CH} \\ \text{NHCOCH}_3 \end{array}$ (CD ₃ OD)	D et D' $\delta=3,30$ $J=(-13,7; 7)$	D et D' $\delta=3,80$ $J=(-13,7; 7)$	D et D' $\delta=4,73$ $J=(-13,8; 7)$

-Métabolite E.

-Le métabolite E isolé de l'urine

Le métabolite E est le moins polaire de tous les métabolites du benzothiophène isolés de l'urine. Son spectre UV ressemble beaucoup à celui du benzothiophène (figure 2-7). Son spectre de masse montre une masse de 295 (296 (M + H)⁺), 313 ((M + NH₄)⁺) correspondant au benzothiophène plus la N-acétylcystéine moins deux hydrogènes. Son spectre RMN ¹H montre les signaux de la N-acétylcystéine plus cinq protons aromatiques. Il s'agit probablement d'un benzothiophène substitué en position 3 par le soufre de la N-acétylcystéine.

-Le métabolite E synthétisé par voie chimique

La structure du métabolite E isolé de l'urine a été confirmée sans ambiguïté par synthèse de l'authentique à partir du 3-bromo-benzothiophène en présence de l'iodure de cuivre comme catalyseur et de la N-acétylcystéine dans le DMF (Hickman et coll, 1985; Dansette et coll, 1992).

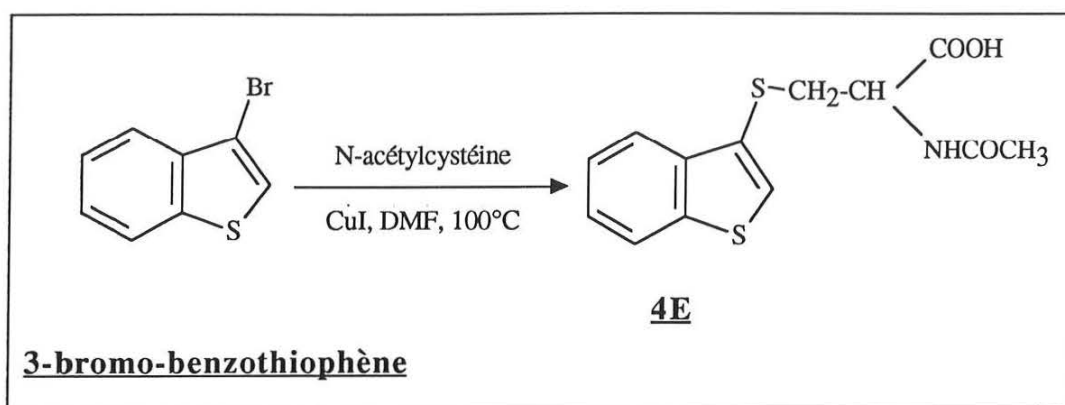


Figure 2-10

Schéma de synthèse du métabolite E

Preuves de structure du métabolite E

Le métabolite E et l'authentique de synthèse 4E ont les mêmes spectres de masse. En plus, leurs spectres UV et leur temps de rétention en HPLC sont les mêmes. Il nous est possible alors de conclure que le métabolite E isolé de l'urine et son authentique de synthèse 4E ont la même structure.

2-2 Métabolites urinaires du sulfoxyde de benzothiophène

Le sulfoxyde de benzothiophène a été administré chez le rat à raison de 100mg/Kg en ip; les urines de 24 heures ont été collectées. La cinétique d'excrétion a été suivie par HPLC analytique et la quantification a été faite par intégration des surfaces des pics après avoir standardisé l'HPLC avec des concentrations connues des produits de synthèse purs (4A + 4A'), (4B + 4B') et (4D + 4D'). L'analyse a montré que les métabolites A et A', B et B' et D et D' sont formés à partir du sulfoxyde de benzothiophène. La quantité des métabolites excrétée dans l'urine de 24 heures est représentée dans le tableau 2-4. Les métabolites A et A' sont formés majoritairement, B et B' sont aussi formés mais en quantité inférieure. Le rendement urinaire en métabolites du benzothiophène est d'environ 50% de la dose totale administrée. La perte qui est à peu près la

moitié de la dose administrée est probablement due à une élimination fécale, chose qui n'a pu être déterminée étant donné que le benzothiophène sulfoxyde n'était pas marqué.

Tableau 2-4:

Métabolisme *in vivo* du sulfoxyde de benzothiophène, de la sulfone de benzothiophène et des métabolites A et A' :

pourcentage de la dose administrée et rapport des produits.

(Le résultat est la moyenne de deux expériences, durée 24 heures)

Produit administré en ip	Pourcentage de la dose administrée		
	Rapport des produits		
	Métabolites A et A'	Métabolites B et B'	Métabolites D et D'
Sulfoxyde de benzothiophène 100mg/kg	35 ± 5 4/1	10 ± 2 4/1	2 ± 0,5 -
Sulfone de benzothiophène 100mg/kg	-	30 ± 2 2/1	-
Métabolites A et A' 10 mg/rat	5 ± 1 4/1	42 ± 4 4/1	7 ± 5 -

2-3 Métabolites urinaires de la sulfone de benzothiophène .

La benzothiophène sulfone a été administrée chez le rat à raison de 100mg/Kg, en ip, les urines de 24 heures ont été collectées. L'analyse a montré que seuls les métabolites **B** et **B'** sont formés à partir de la sulfone de benzothiophène . Le produit de départ, la sulfone de benzothiophène a été retrouvée dans les dernières excréctions urinaires (au delà de 16h), ceci

représente probablement un indice de saturation de la voie de conjugaison. Seulement le 1/3 de la dose administrée a été récupéré dans les urines (représenté exclusivement par **B** et **B'**) (tableau 2-4). Il n'est pas impossible qu'une partie du produit soit éliminée dans les fécès ce qui n'a pas pu être déterminé car la sulfone de benzothiophène n'est pas marquée. la cinétique d'excrétion urinaire de la sulfone de benzothiophène est représentée dans le tableau 2-5.

Tableau 2-5 :

Cinétique du métabolisme *in vivo* de la sulfone benzothiophène

% de la dose temps (en heure)	B	B'	B/B'	B + B'	BZT-O ₂
1-2h	3,3	3,3	1	6,6	0
2-4h	3,9	1,3	3	5,2	0
4-6h	0,4	0,1	4	0,5	0
6-8h	1,93	0,32	6	2,2	0,1
8-24h	13,4	2,6	6	16	1,2
Total : 0-24h	20	10,6	2	30,5	1,3

deux rats ont été traités avec 100mg/Kg de la sulfone de benzothiophène. L'excrétion des métabolites est quantifiée par HPLC.

Le tableau 2-5 montre qu'au début de la cinétique la formation des adduits **B** et **B'** se fait sans stéréospécificité et que plus le temps passe plus la stéréospécificité augmente en faveur du produit **B** le plus polaire. D'autre part en fin de cinétique il y a aussi excrétion de la sulfone inchangée.

2-4 Métabolites urinaires des composés A et A'.

Dans le but de savoir si les métabolites A et A' sont des précurseurs des métabolites B et B'. Le mélange A et A' purifié à partir des urines (4/1) a été administré chez un rat (10 mg, ip). Les métabolites B et B' sont formés majoritairement. Une partie non négligeable des métabolites réduits D et D' sont également retrouvés. Le tableau 2-4, montre qu'environ 55% de la dose administrée a été récupérée dans les urines de 24h. Puisqu'il y a une perte de 45% environ du produit de départ, probablement une partie est éliminée dans les fécès ou la durée de 24h de collection urinaire n'a pas été suffisante pour récupérer l'essentiel de la dose de départ. Il se peut aussi qu'une partie du produit ait été dégradée en divers composés dont la structure est inconnue ou ayant une polarité non compatible avec le système HPLC utilisé.

2-5 Discussion

L'étude du métabolisme oxydatif du benzothiophène *in vivo* chez le rat nous a permis de montrer l'existence de deux mercapturates majoritaires A et A' et B et B' qui dérivent formellement de la réaction du sulfoxyde et de la sulfone du benzothiophène avec le glutathion. Dans la littérature, il a été montré que le benzothiophène est oxydé en sulfoxyde et en sulfone *in vitro* (Mansuy et coll, 1991). Il a été également postulé que le mobam (dérivé de benzothiophène), un pesticide est oxydé en sulfoxyde, la seule preuve de structure était le spectre infra-rouge (Robbins J.D et coll, 1970).

Les différentes voies métaboliques *in vivo* du benzothiophène sont résumés dans la figure 2-11. La structure de tous les métabolites a été confirmée par la préparation au laboratoire des authentiques de synthèse (figure 2-12). La formation de tels métabolites implique la réaction de dérivés de conjugaison de la N-acétylcystéine (via le GSH) à un métabolite réactif de benzothiophène mono- ou bi-oxygéné. Les métabolites A et A'

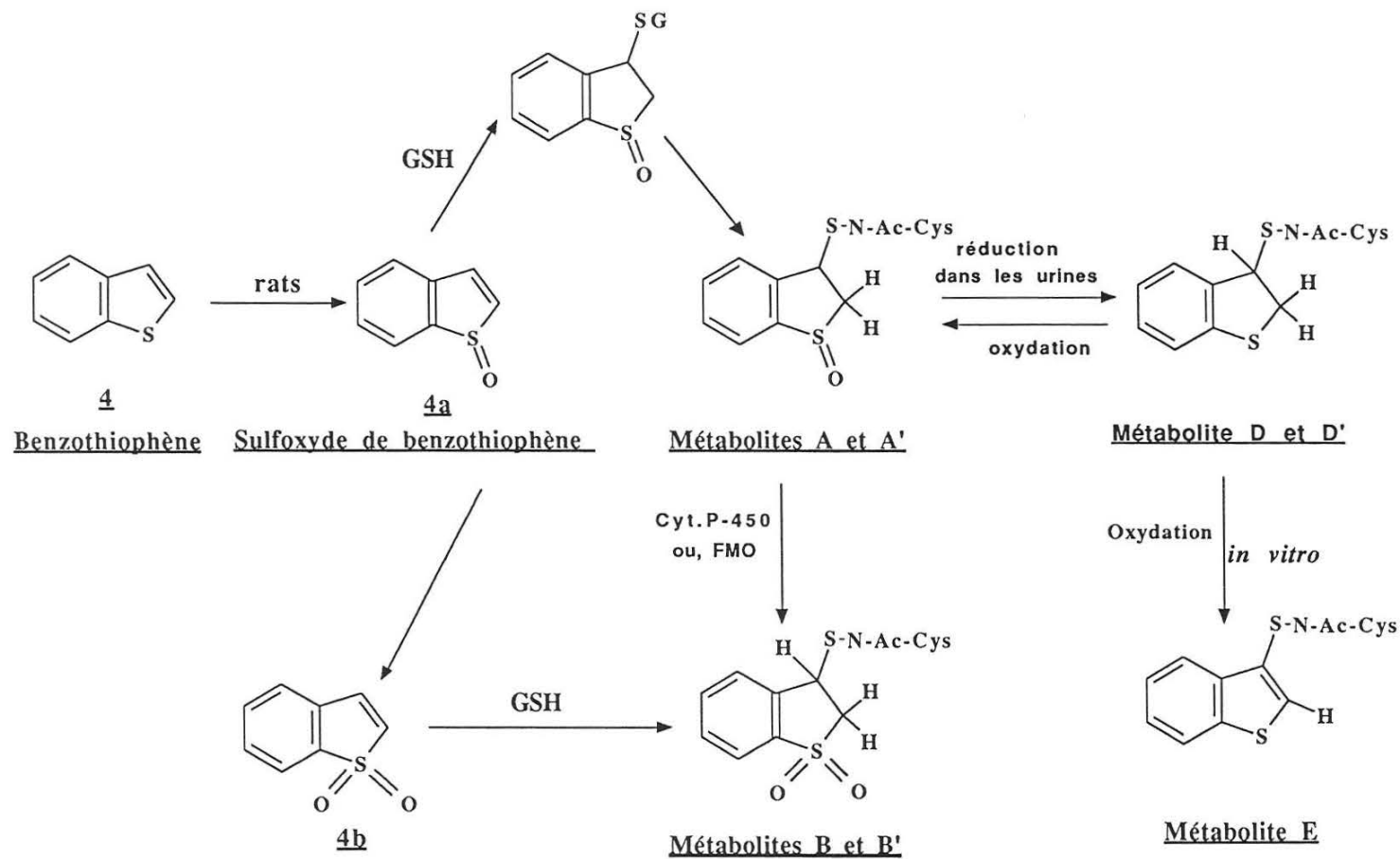


Figure 2-11

Métabolisme du benzothiophène *in vivo* chez le rat.

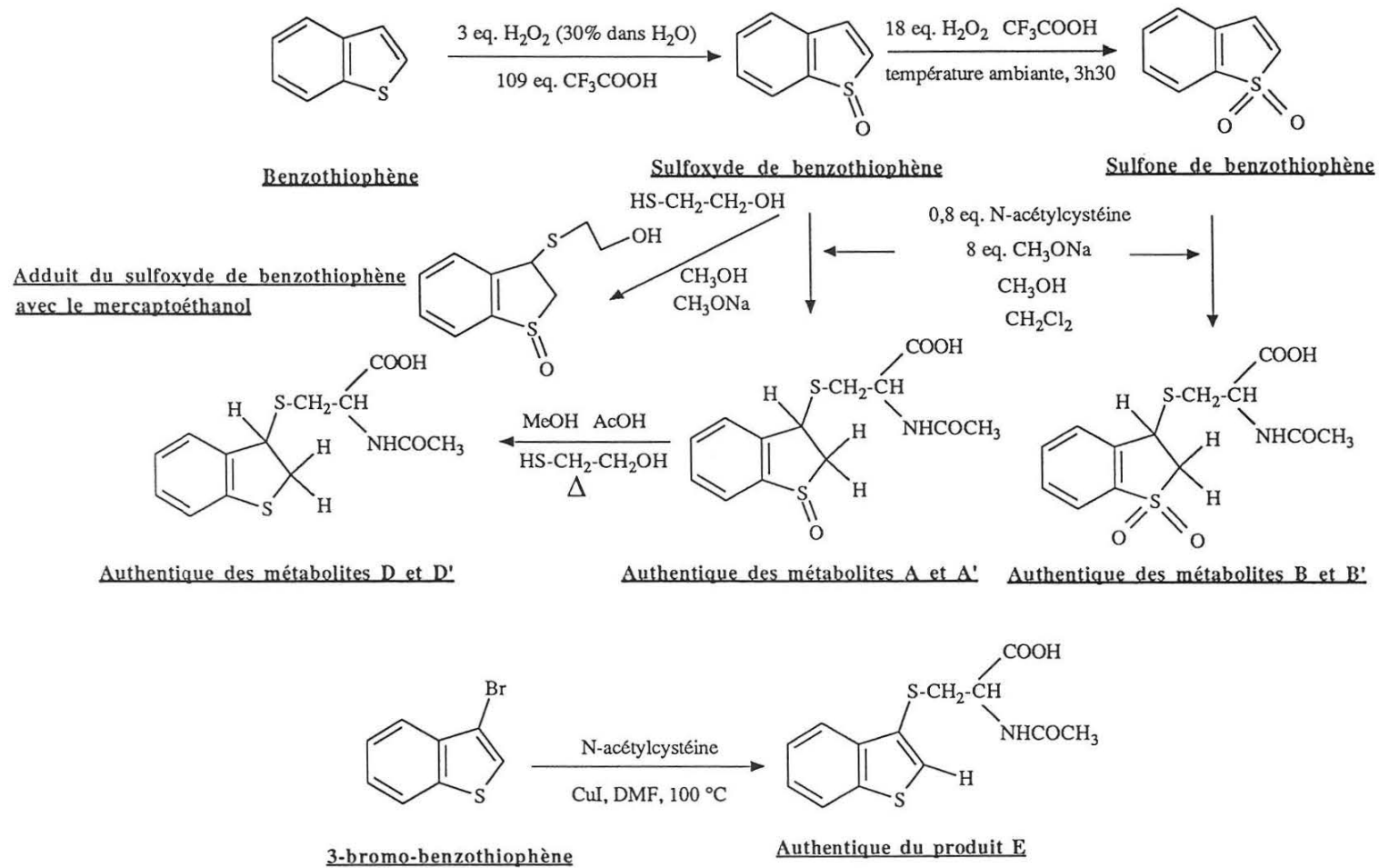


Figure 2-12

Synthèse des authentiques des métabolites du benzothiophène, réalisée par

I. Erdelmeier et G. Rubinstenn. (La Synthèse de l'authentique de E a été réalisée par DoCa Thang)

ont 3 centres d'asymétrie (le soufre du benzothiophène, le carbone 3 du cycle et le carbone α de la L-cystéine fixé), ce qui implique la présence possible de 4 diastéroïsomères. Il s'agit de deux diastéroïsomères en "cis" et deux diastéroïsomères en "trans" (les positions du sulfoxyde et du soufre de la N-acétylcystéine). Les propriétés spectrales et chromatographiques de **A** et **A'** impliquent que seuls deux de ces quatre diastéroïsomères sont formés. En se basant sur le fait que le produit de réaction majoritaire du mercaptoéthanol sur le benzothiophène sulfoxyde est de stéréochimie "cis" comme l'a montré la structure cristallographique obtenue par diffraction des rayons X (Ginderow et coll, 1992). Il est probable qu'ici aussi les diastéroïsomères en "trans" sont très minoritaires et n'ont pas pu être observés.

Par analogie avec le mécanisme démontré pour la formation du sulfoxyde de l' IAT (Mansuy et coll, 1991), un mécanisme comparable pour la formation de **A** et **A'** et de **B** et **B'** peut être envisagé :

Le benzothiophène est transformé en premier lieu par les cytochromes P450 via une oxydation en sulfoxyde de benzothiophène (avec les microsomes, Mansuy et coll, 1991). Le sulfoxyde de benzothiophène réagit ensuite avec le glutathion pour donner deux diastéroïsomères qui sont des conjugués de glutathion en position 3 qui seront transformés ultérieurement en acides mercapturiques (métabolites **A** et **A'**).

Deux mécanismes possibles permettent d'expliquer la formation des métabolites **B** et **B'** :

-Le premier mécanisme concerne l'oxydation des composés **A** et **A'** (ou de leur GSH-conjugués) en dérivés de sulfone (métabolites **B** et **B'**).

-Le deuxième mécanisme peut être une oxydation du sulfoxyde de benzothiophène, tout d'abord en sulfone qui réagit ensuite avec le

glutathion. Ainsi si le sulfoxyde de benzothiophène peut être oxydé en sulfone la conjugaison au glutathion conduit à la formation des métabolites **B** et **B'**. Cependant le traitement des rats avec les composés **A** et **A'** (4/1) ou avec le benzothiophène ou encore avec le sulfoxyde de benzothiophène, conduit à l'excrétion des métabolites **B** et **B'** dans des proportions similaires (4/1). Or les proportions de **B** et **B'** chez le rat traité avec la sulfone de benzothiophène particulièrement au début de la cinétique (1/1) sont très différentes de celles de rat traité avec le benzothiophène ou avec les composés **A** et **A'** ou avec le sulfoxyde de benzothiophène. Si l'on admet le premier mécanisme par lequel la première voie de formation de **B** et de **B'** est possible et qu'on suppose que l'oxydation n'est pas stéréosélective, il faut noter que dès la formation du glutathion conjugué du sulfoxyde ou de **A** et **A'**, la stéréochimie sur le carbone 3 du cycle est fixée et ne change plus lors de l'oxydation, donc il y aura la formation de **B** et de **B'** dans les mêmes proportions que leurs précurseurs glutathion-conjugués du sulfoxyde ou celles de **A** et de **A'**.

Dans le cas du deuxième mécanisme, une étude directe du métabolisme *in vivo* de la sulfone de benzothiophène a montré qu'au début de la cinétique, la formation des adduits **B** et **B'** se fait sans stéréospécificité et que plus le temps passe plus la stéréospécificité augmente en faveur du produit **B** le plus polaire. D'autre part en fin de cinétique il y a aussi excrétion de la sulfone inchangée. On sait que les vinyles sulfones sont d'excellents accepteurs de Michael et en plus dépléteurs de glutathion. On a aussi pu montrer que la sulfone de benzothiophène réagit spontanément avec le glutathion à pH supérieur à 7 (étude faite en spectrométrie UV). *In vitro*, la catalyse par les glutathion-transférases existe mais elle est difficile à mesurer précisément à cause des taux très élevés de réaction spontanée. Au début de la cinétique, il pourrait y avoir réaction spontanée avec le glutathion à forte concentration (effet de masse), en compétition avec une

réaction enzymatique peu efficace et au fur et à mesure de la déplétion en glutathion, la réaction enzymatique deviendrait plus efficace et conduirait à une meilleure stéréosélectivité.

Lors des études chimiques de synthèse de l'adduit du sulfoxyde avec la N-acétylcystéine, on a montré que l'addition de Michael nécessite un milieu basique et ne se fait pas en milieu neutre. Il est donc probable que la réaction enzymatique est catalysée par des glutathion-S-transférases dont le rôle est à la fois de mettre en contact le substrat et le glutathion et aussi d'abaisser le pK apparent du thiol du GSH qui réagit comme un thiolate. On peut donc penser que la voie sulfoxyde de benzothiophène, métabolites **A** et **A'** (ou conjugués de glutathion) puis métabolites **B** et **B'** prédomine sur la voie métabolique sulfoxyde de benzothiophène, sulfone de benzothiophène puis métabolites **B** et **B'**. Un autre argument contre la formation de la sulfone comme intermédiaire est que ce composé n'est pratiquement pas synthétisé "*in vitro*" avec les microsomes de foie de rat témoin même à partir du sulfoxyde comme substrat.

La transformation de **A** et **A'** en **D** et **D'** a lieu dans les urines vieilles à température ambiante, mais aussi dans les urines conservées à froid au congélateur. Cette transformation correspond à la réduction du S-oxyde en sulfure qui peut être obtenue par divers réducteurs et en particulier par les dérivés de thiols dans un milieu acide. Ainsi les produits **D** et **D'** ne sont pas de vrais métabolites mais des produits de réduction non enzymatique. En outre le produit aromatique **E**, décrit par Bray (Bray et coll, 1968) est un produit de transformation de **D** et **D'** par réaromatisation. En effet un certain nombre de méthodes connues ont été testés pour déshydrater les dihydrothiophènes sulfoxydes (H^+ , Ac_2O , Al_2O_3) sur le mélange **A** et **A'** sans succès (Mansuy et coll, 1991). Par contre la succession de deux étapes réduction plus oxydation se fait

facilement dans des conditions douces pour donner les métabolites **D** et **D'** puis **E**.

L'urine vieillie contient des quantités importantes des produits **D** et **D'** et des quantités très faible de **E**. Cependant les métabolites **D** et **D'** sont très sensibles à l'oxydation dans les solvants organiques. Ceci peut expliquer pourquoi Bray et coll, qui purifiaient les métabolites par plusieurs chromatographies sur papier ont obtenu le métabolite **E** comme un produit majoritaire. Les trois autres métabolites contenant le ^{35}S décrits et non identifiés dans la publication de Bray (Bray et coll, 1968) sont probablement les métabolites **A** et **A'**, **B** et **B'** et **D** et **D'**.

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène

.....

CHAPITRE TROISIEME

.....

BENZOTHIOPHENES SUBSTITUES :

par un groupe p-chlorobenzoyl

.....

Le métabolisme de deux benzothiophènes substitués a été étudié *in vivo* chez le rat. Diverses incubations de ces mêmes benzothiophènes substitués ont été réalisées en présence de microsomes hépatiques de rats témoins et induits et de système générateur de NADPH. La composition du milieu réactionnel a été analysée en fin de réaction. Les protocoles expérimentaux sont décrits dans la partie expérimentale (chapitre 5).

L'étude métabolique de ces dérivés a été menée en parallèle avec une étude chimique en vue, d'une part de préparer des authentiques de synthèse et, d'autre part de comparer les résultats du métabolisme et de l'oxydation chimique des benzothiophènes substitués.

Le métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène **15** *in vivo* et *in vitro* et du 2-(4-chlorobenzoyl)-3-hydroxy-benzo(b)thiophène **19** *in vitro* a été étudié.

Dans une première partie nous avons essayé de mettre en évidence *in vitro* une S-oxydation par différents types de microsomes de foie de rats,

d'isoler le ou les métabolites formés et enfin de les identifier à fin d'établir leur structure.

Dans une deuxième partie, nous avons procédé à la recherche des métabolites dans les urines recueillies, après traitements des rats avec des benzothiophènes substitués.

3-1 Motivations

Nous venons de voir (chapitre 2) que le métabolisme du benzothiophène conduit à la formation du sulfoxyde de benzothiophène comme métabolite primaire *in vitro* et *in vivo* (figure 3-1).

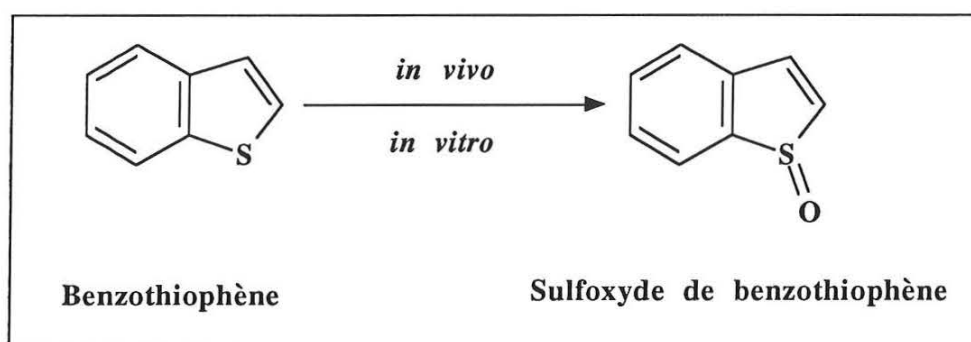


Figure 3-1

Métabolisme *in vivo* et *in vitro* du benzothiophène : passage par un sulfoxyde de benzothiophène

Dans le cas de l'acide tiénilique, le mécanisme proposé pour la 5-hydroxylation suppose le passage par un sulfoxyde de thiophène (figure 3-2)

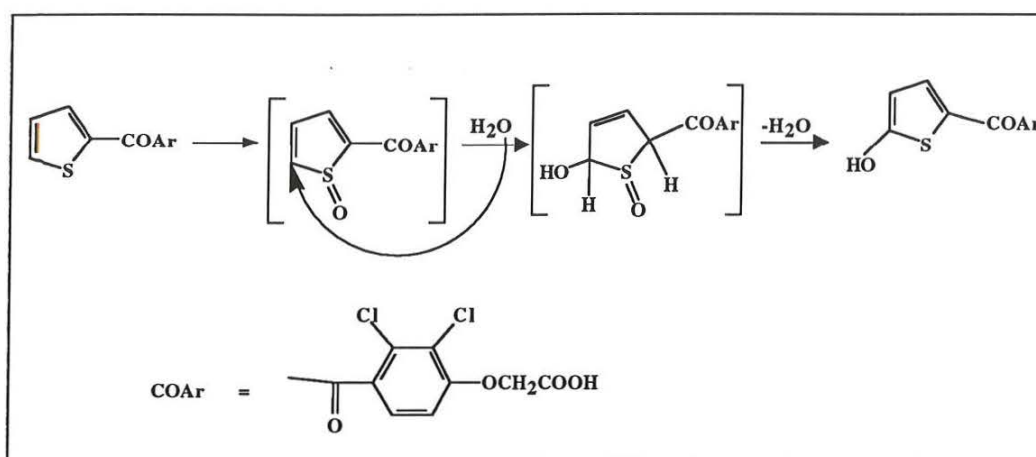


Figure 3-2

Mécanisme proposé pour la 5-hydroxylation de l'acide thiénylique

Or, il est difficile de prouver ce mécanisme, car le sulfoxyde de l'AT doit être très instable; on ne peut pas le préparer pour prouver ce mécanisme. Une réaction analogue où le sulfoxyde intermédiaire devrait être plus stable pourrait avoir lieu avec un benzothiophène substitué en 2 par un groupe COAr (figure 3-3):

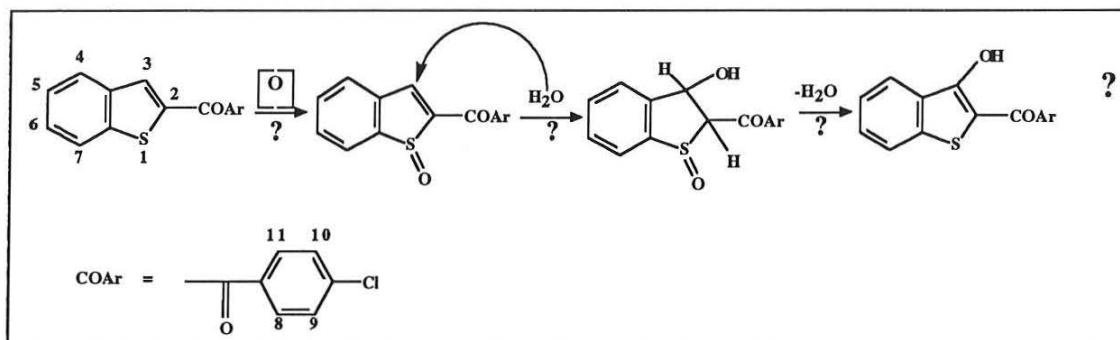


Figure 3-3

Hypothèse de formation d'un sulfoxyde de benzothiophène substitué en 2 par un groupe attracteur COAr

La véracité de ce schéma a été démontrée au laboratoire par P. Pouzet (figure 3-4) :

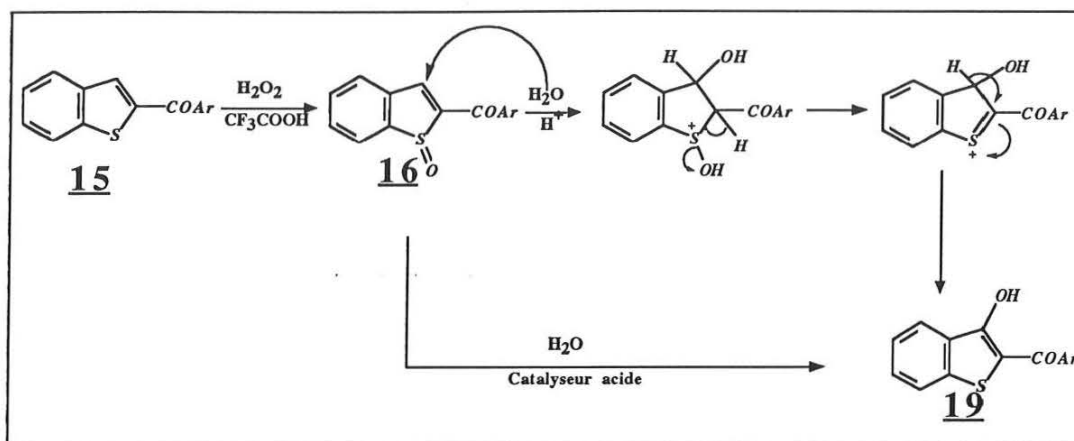


Figure 3-4

Oxydation chimique du composé 15 : passage par un sulfoxyde et formation du composé 19.

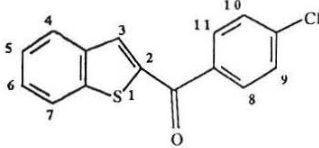
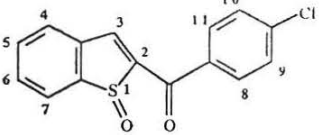
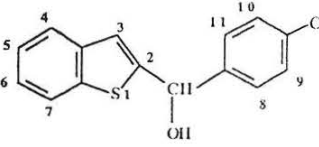
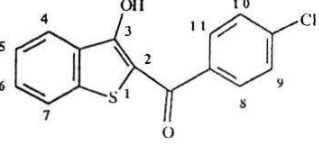
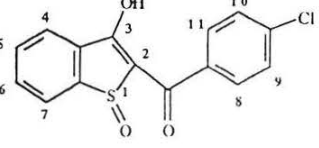
Ceci a été possible car le sulfoxyde intermédiaire dans la formation du composé 19 est isolable et complètement caractérisable. Nous avons voulu voir si cette S-oxydation et cette formation de 19 avaient lieu au cours du métabolisme *in vivo* et *in vitro*. Ceci nous a conduit à l'étude du métabolisme du composé 15, ainsi que de certains de ses dérivés.

3-2 Métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène 15 *in vitro*.

Les composés authentiques ont été préparés et complètement caractérisés par P. Pouzet au laboratoire.

Tableau 3-1

RMN ^1H (dans le DMSO D6) et RMN ^{13}C des composés authentiques (**15**, **16**, **17**, **19** et **20**). (δ en ppm par rapport au signal de $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, J en Hertz).

Les authentiques de synthèse	RMN ^1H	RMN ^{13}C
15 	8,13 (s, 1H) : H ₃ 8,07 (m, 2H) : H ₄ , H ₇ 7,53 (m, 2H) : H ₅ , H ₆ 7,93 (d, J=9Hz, 2H) : H ₈ , H ₁₁ 7,67 (d, J=9Hz, 2H) : H ₉ , H ₁₀	C tertiaires : 132,0; 130,6 (2C); 128,8 (2C); 127,5; 126,0; 127,1; 122,8. C quaternaires : 142,6 (2C); 138,9 (2C); 136,0. C carbonyle : 188,1 (dans CDCl_3)
16 	8,18 (s, 1H) : H ₃ 8,11 (m, 1H) : H ₇ 7,87 (m, 1H) : H ₄ 7,72 (m, 2H) : H ₅ , H ₆ 7,97 (d, J=9Hz, 2H) : H ₈ , H ₁₁ 7,66 (d, J=9Hz, 2H) : H ₉ , H ₁₀	C tertiaires : 141,7; 132,9; 131,9; 130,9 (2C); 129,4 (2C); 128,0; 126,8. C quaternaires : 152,0; 146,9; 140,0; 135,7; 135,5. C carbonyle : 187,5 (dans CD_2Cl_2)
17 	7,80 (d, J=7,5Hz, 1H) : H ₄ , H ₇ 7,7 (d, J=7,5Hz, 1H) : H ₄ , H ₇ 7,20-7,60 (m, 6H) : H ₅ , H ₆ , H ₈ , H ₉ , H ₁₀ , H ₁₁ 7,15 (s, 1H) : H ₃ 6,10 (d, J=3,5Hz, 1H) : CH-OH 2,75 (d, J=3,75Hz, 1H) : OH échangé avec D ₂ O	C tertiaires : 129,0 (2C); 128,2; 124,8 (2C); 124,0; 122,7 (2C); 121,7. C quaternaires : 148,8; 141,7; 140,2; 139,7; 134,1. CHOH : 72,5 (dans CD_2Cl_2)
19 	13,36 (s, 1H) : échangé avec (OH) ₃ 8,03 (d, J=8Hz, 1H) : H ₄ 8,00 (d, J=9Hz, 2H) : H ₈ -H ₁₁ 7,77 (d, J=8Hz, 1H) : H ₇ 7,59 (t, J=8Hz, 1H) : H ₆ 7,52 (d, J=9Hz, 2H) : H ₉ -H ₁₀ 7,45 (t, J=8Hz, 1H) : H ₅	C tertiaires: 131,0 (C6) 130,3 (C7' et C3'), 129,4 (C4' et C6') 125,5 (C5); 124,4 (C4); 123,6 (C7) C quaternaires : 166,1 (C3)*; 141,2(C8); 139,4 (C5'); 137,7 (C9); 136,9 (C2'); 109,8 (C2). C carbonyle : 190,6 (C1) * Attribution faite par corrélation courte distance proton / carbone. (dans CD_2Cl_2)
20 	7,47-7,82 (m, 3H) 7,66 (d, J=8Hz, 2H) : H ₈ -H ₁₁ 7,55 (m, 3H) : H ₄ , H ₅ , H ₆ 7,37 (d, J=8,5Hz, 2H) : H ₉ -H ₁₀ Le proton hydroxy non identifié avec précision. (dans CD_2Cl_2)	-

Le composé **15** (100µM) a été traité avec des microsomes hépatiques de rats non traités (CONT) ou traités par différents inducteurs (PB, 3MC, β-NF, CLO et DEX) en présence de système générateur de NADPH. Les incubations témoins ne contiennent pas le système générateur de NADPH.

-Métabolisme du composé 15 par les microsomes de rats non traités.

En présence de système générateur de NADPH, le composé **15** est bien métabolisé en partie en un métabolite majoritaire **17** (tr = 17,78 min) et en cinq autres métabolites minoritaires que nous avons appelé **16**, **18**, **19**, **20** et **21** dont les temps de rétention (tr) respectifs sont 15,77 min, 16,19 min, 14,8 min, 12,32 min et 15,30 min (figure 3-5). Notons que le composé **19** a été détecté en traces avec les microsomes 3-MC, β-NF et CLO (tableau 3-2).

En absence de système générateur de NADPH, le composé **15** n'est pratiquement pas métabolisé. Le tableau 3-2 résume la nature des métabolites formés en présence de microsomes de rats témoins et induits.

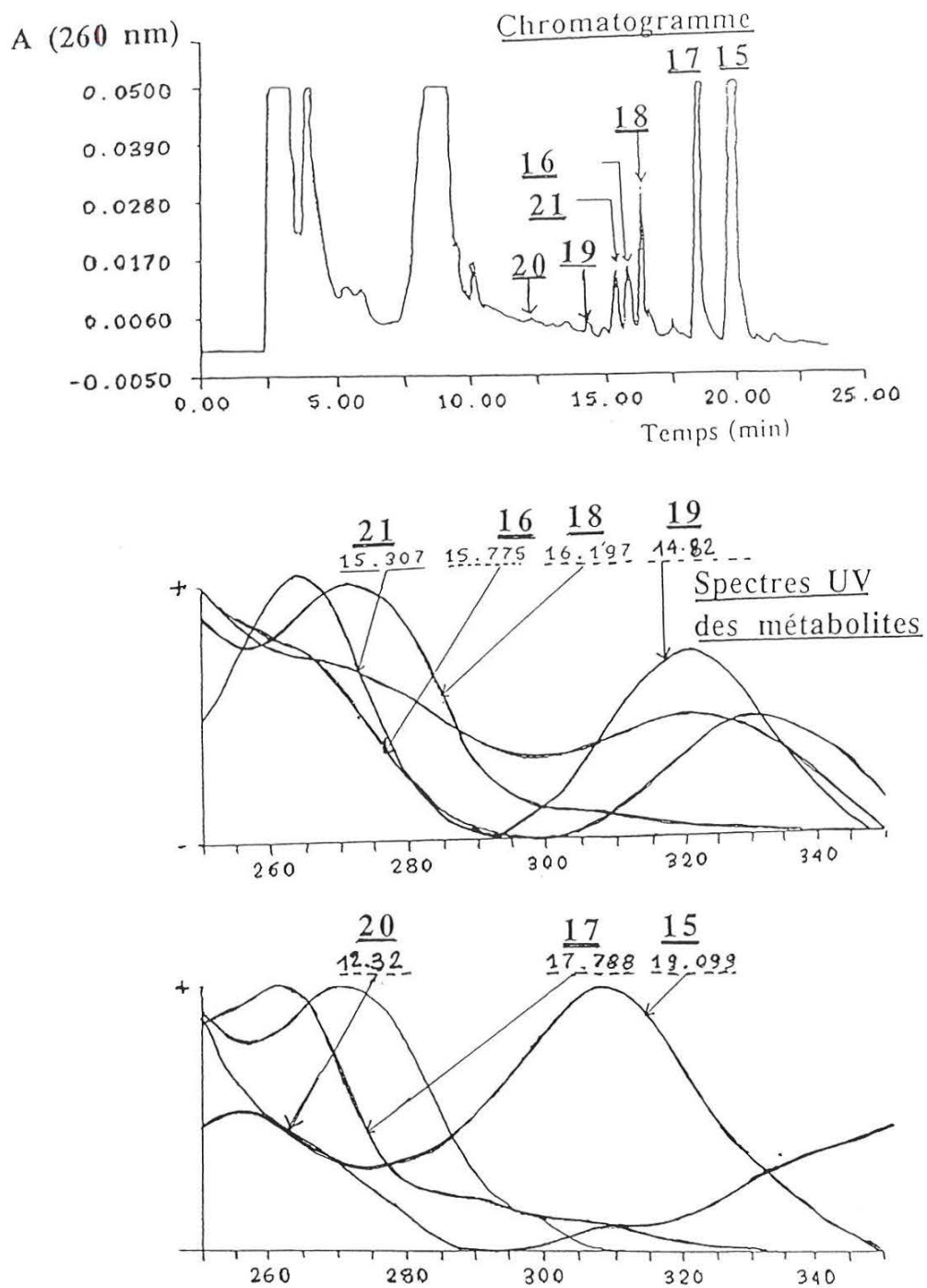


Figure 3-5

Métabolisme *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène **15**, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rat témoin.

HPLC analytique des incubations:

Solvant A = CH₃COONH₄ 0,1M pH 4,6

Solvant B = CH₃CN 90%. En gradient 0 à 100% de B en 15 min.

Tableau 3-2

Métabolisme *in vitro* du composé 15 et nature des métabolites formés en présence de différents inducteurs.

(Le pourcentage de chaque métabolite correspond à la valeur du produit formé par rapport à la quantité du composé 15 incubée). Faute du marquage de 15 les pourcentages des métabolites n'ont pas été déterminés avec précision et sont donc approximatifs et donnés à titre indicatif.

<u>15</u> <i>in vitro</i>	CONT	PB	3MC	β -NF	CLO	DEX
+ NADPH						
Métabolites						
<u>16</u>	8%	6%	5%	9%	9%	2%
<u>17</u>	14%	7%	14%	12%	15%	19%
<u>18</u>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<u>19</u>	0%	0%	(traces)	(traces)	(traces)	0%
<u>20</u>	0%	0%	6%	5%	7%	0%
<u>21</u>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
- NADPH	0%	0%	0%	0%	0%	0%

NQ = non quantifié. NI = non identifié

- Identification des différents métabolites d'après la spectroscopie UV-visible, RMN ^1H , RMN ^{13}C , la spectrométrie de masse et la comparaison avec des authentiques de synthèse.

Six métabolites majeurs ont été mis en évidence dont cinq ont été isolés et complètement caractérisés.

-Le sulfoxyde : **16**

-L'alcool de réduction : **17**

-L'alcool sulfoxyde : **18**

-Le métabolite hydroxylé en 3 : **19**

-Le sulfoxyde hydroxylé en 3 : **20**

-Le métabolite **21** : n'est pas encore identifié

Les composés **16**; **17** et **20** ont été identifiés aussi en plus de la spectroscopie UV-visible, RMN ^1H , RMN ^{13}C et de la spectrométrie de masse, par comparaison avec des authentiques de synthèse correspondants dont on donnera la synthèse par la suite.

-Le métabolite 16.

L'étude spectrale UV-visible, RMN ^1H et spectrométrie de masse de ce métabolite a présenté les mêmes caractéristiques spectrales que celles de l'authentique (tableau 3-1). Ce métabolite **16** correspond au sulfoxyde de 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène.

-Le métabolite 17

Le métabolite **17** est majoritaire avec la plupart des microsomes utilisés. Il a été purifié et analysé par une étude spectrale. Son spectre de masse par impact électronique (IE, figure 3-6) montre un pic à 274 (correspondant à la masse de **15** réduit au niveau de la fonction cétone) et par ionisation chimique(NH_3 , figure 3-7), un pic à 290, correspondant à $((\text{M} + \text{NH}_4)^+)$.

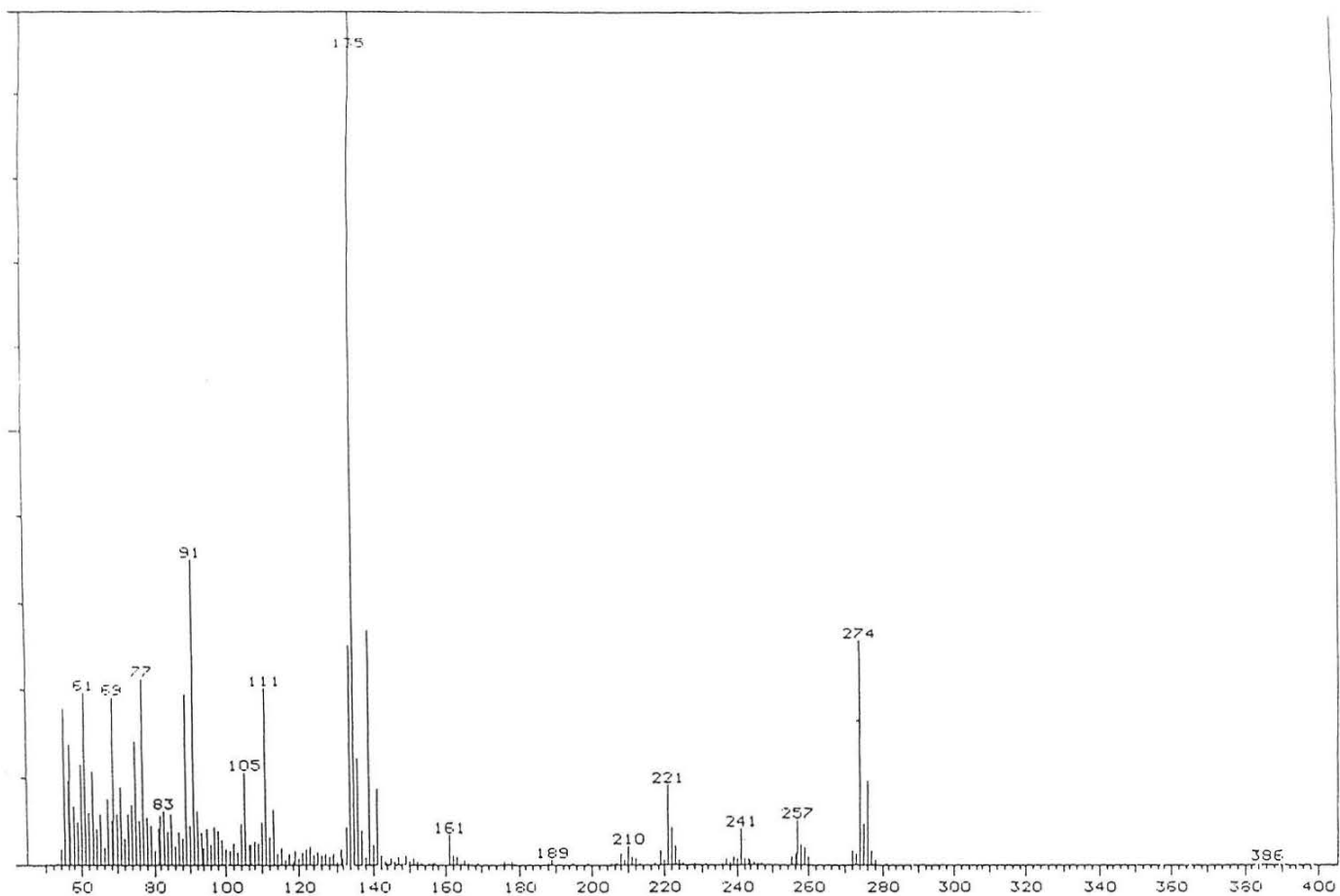


Figure 3-6

Spectre de masse (impact électronique) du métabolite 17, dérivé du métabolisme *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène 15, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rat témoin.

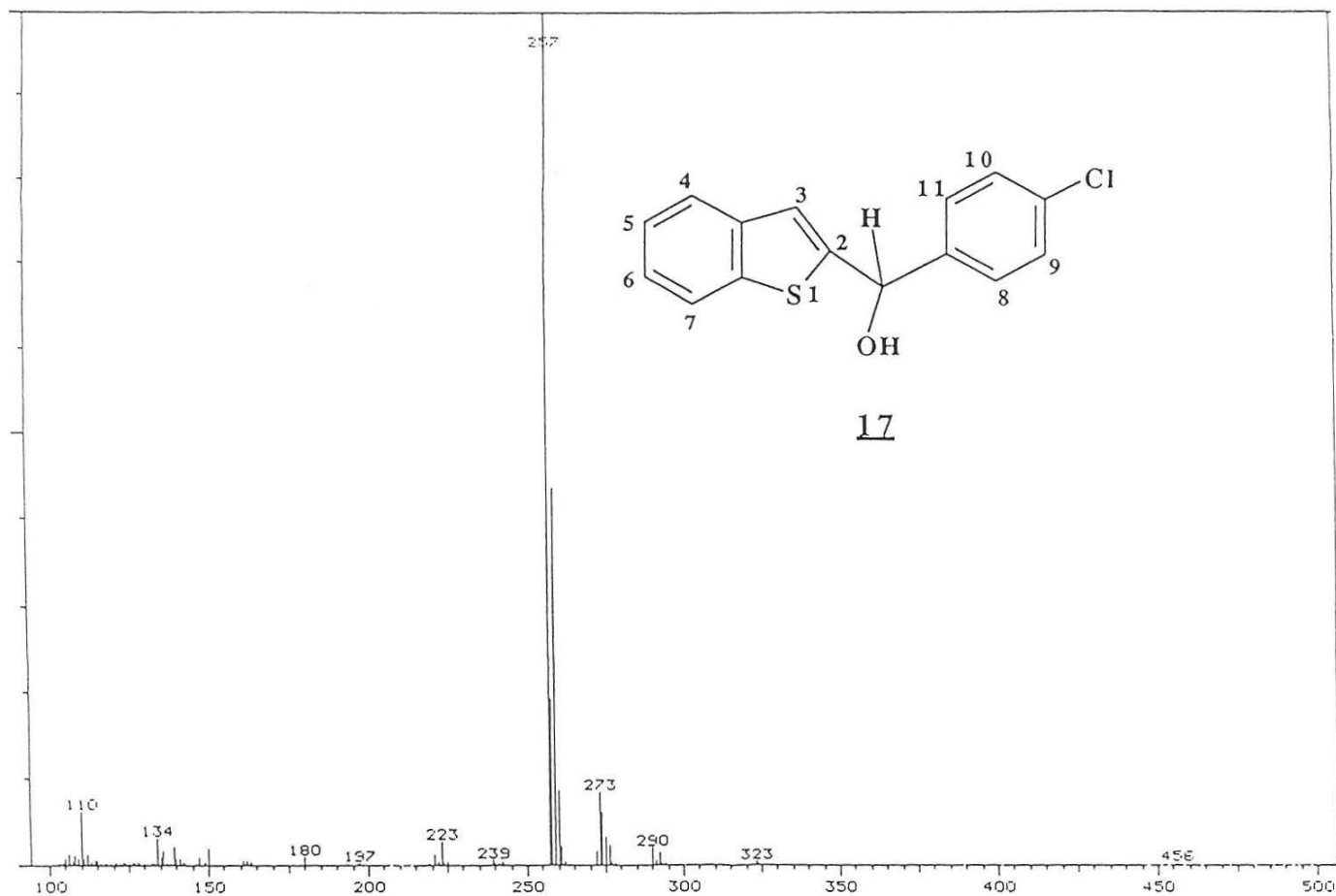


Figure 3-7

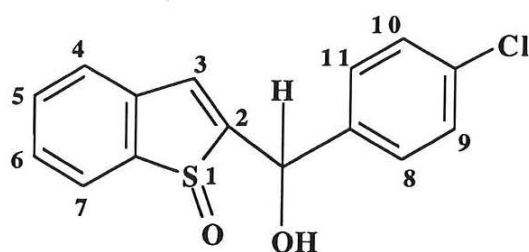
Spectre de masse (ionisation chimique (NH_3)) du métabolite **17**, dérivé du métabolisme *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rat témoin.

Le spectre RMN ^1H du métabolite **17** dans CD_2Cl_2 montre les mêmes signaux que ceux de son authentique, représentés dans le tableau 3-1.

17 est donc un métabolite provenant de la réduction de la fonction cétone de **15** par les microsomes de foie de rat (probablement par une réductase microsomale). Des réductases microsomales capables de réduire les fonctions carbonyles de la metyrapone ou de stéroïdes ont été décrits (Maser et coll, 1991). L'étude spectrale UV-visible, RMN ^1H et spectrométrie de masse de ce métabolite a présenté les mêmes caractéristiques spectrales que celles de l'authentique dont on donnera la synthèse par la suite.

-Le métabolite **18**

Le spectre de masse (impact électronique) (figure 3-8) présente un pic moléculaire à 290. Le spectre de masse (ionisation chimique (NH_3)) présente un pic à 308 : $(290 + 18)$ correspondant à $((\text{M} + \text{NH}_4)^+)$. Dans ce cas nous ne disposons pas d'authentique de synthèse. Le spectre de masse montre la perte d'un oxygène ce qui conduit à 274 (masse de **17**), puis perte de 17 caractéristique d'un alcool benzylique (ion benzyl). Nous avons conclu à un métabolite de nature **alcool sulfoxyde** correspondant à une réduction de la fonction cétone (à l'image de ce qui se fait pour le métabolite **17**) et une oxydation du soufre, ce qui fait le bilan suivant :
masse de **15** $(272) + \text{O} + 2\text{H} = 290$.



Métabolite 18

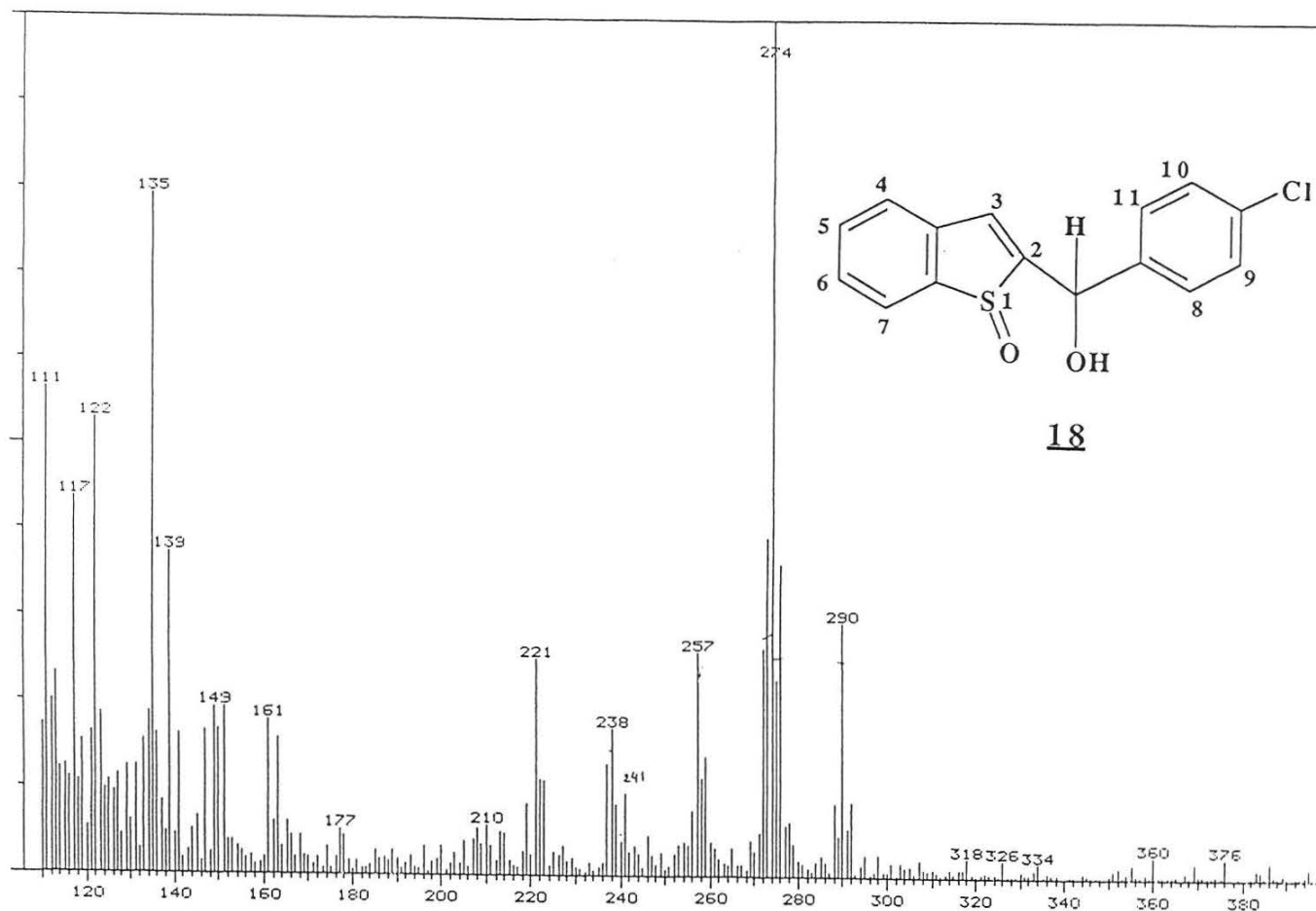


Figure 3-8

Spectre de masse par impact électronique du métabolite **18**, dérivé du métabolisme *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rat témoin.

-Le métabolite 19

Nous avons pu également mettre en évidence la présence des traces du métabolite 19 avec les microsomes de rats traités par la β -NF, le 3MC ou le CLO. Ce composé présente les mêmes caractéristiques en HPLC (même tr, même spectre UV-visible) et mêmes caractéristiques après coinjection avec l'authentique 19 (tableau 3-1). Il correspond au 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène hydroxylé en 3.

-Le métabolite 20

Nous avons pu également mettre en évidence la présence en faible proportion (de l'ordre de 5%) du métabolite 20 avec les microsomes de rats traités par la β -NF, le 3MC ou le CLO. Son spectre de masse (impact électronique) montre un pic à 304 et en ionisation chimique (NH_3 , figure 3-9) un pic à 322 correspondant à $((M + \text{NH}_4)^+)$. La masse M serait donc celle de 15 + 2 O. Le spectre RMN ^1H du métabolite 20 dans CD_2Cl_2 montre les mêmes signaux que ceux de son authentique de synthèse (tableau 3-1).

-Le métabolite 21

Le pic chromatographique du métabolite 21 a toujours été observé juste avant celui du métabolite 16, mais lors de sa purification il s'est avéré qu'il était très instable et par conséquent nous n'avons pas pu l'identifier. Il est difficile de disposer de l'authentique de synthèse de produit dont on ne connaît pas la structure.

3-3 Métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène 15 *in vivo* chez le rat.

Etant donné que le composé 15 n'est pas une molécule marquée, il nous a été difficile d'identifier tous les pics chromatographiques (figure 3-10).

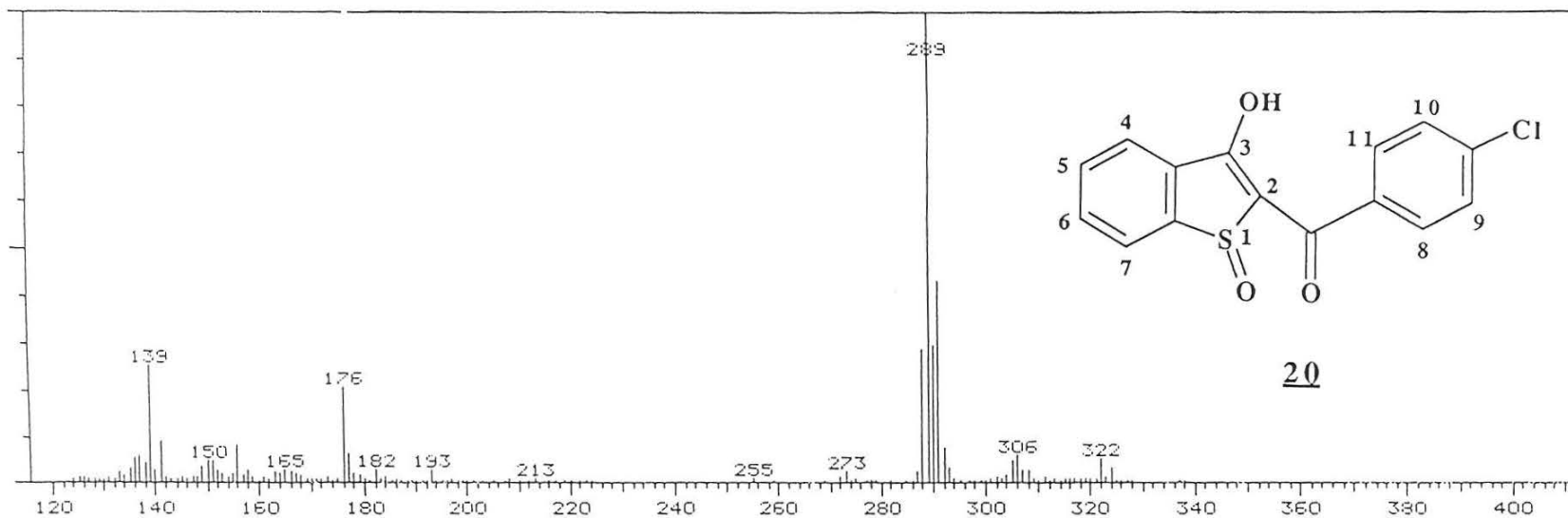


Figure 3-9

Spectre de masse (ionisation chimique (NH₃)) du métabolite **20**, dérivé du métabolisme *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rat induit par la β -naphthoflavone.

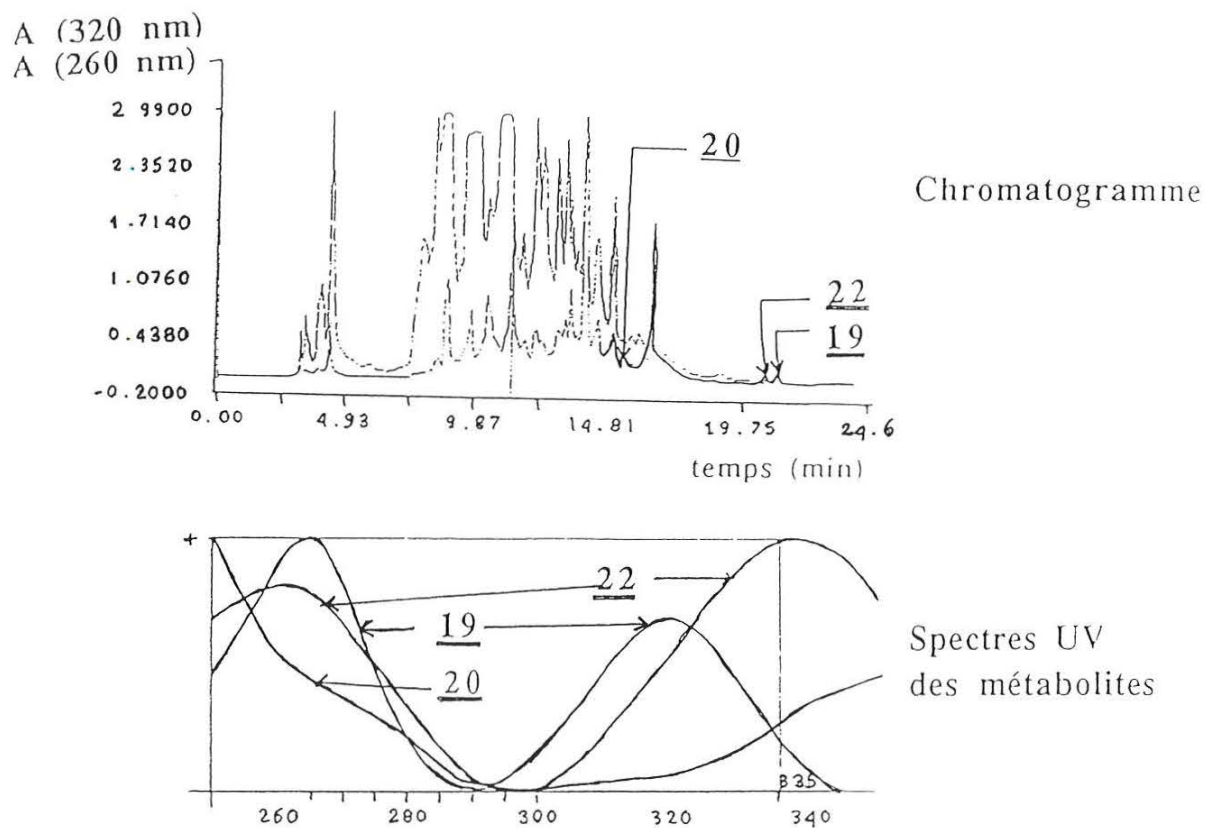


Figure 3-10

Métabolisme *in vivo* chez le rat du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène.

HPLC analytique : Solvant A = CF₃COOH 0,1%.

Solvant B = CH₃CN 90%. En gradient 0 à 100% de B en 20 min.

Seuls, ont été analysés les pics dont les spectres UV-visibles correspondent aux métabolites dérivés du composé **15**. Néanmoins trois pics minoritaires ont été identifiés (figure 3-10). Le premier a les mêmes caractéristiques spectrales (UV-visible, RMN ^1H) et de masse que le métabolite **20**. Le deuxième a les mêmes caractéristiques spectrales (UV-visible, RMN ^1H) et de masse que **19** lui-même. Le troisième est un nouveau produit que nous avons appelé **22**.

-Identification des métabolites : **19**, **20** et **22** :

L'identification a été réalisée par spectroscopie UV-visible, RMN ^1H , par spectrométrie de masse et par comparaison avec des authentiques de synthèse.

Le métabolite **20** n'est autre que le sulfoxyde de **19**, décrit précédemment.

Le métabolite **19**, a les mêmes caractéristiques (UV-visible, RMN ^1H) et de masse que l'authentique **19** (tableau 3-1).

Le métabolite **22** présente un spectre de masse (impact électronique) qui comporte un pic à 304 correspondant à l'ion moléculaire M (figure 3-11) et en ionisation chimique (NH_3 , figure 3-12) un pic à 322, correspondant à $((\text{M} + \text{NH}_4)^+)$. La masse du métabolite **22** serait celle de **15** + 2(O).

Le spectre RMN ^1H du métabolite **22** dans CD_2Cl_2 montre les signaux suivants : δ en ppm par rapport au signal de $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, J en Hertz. s=singulet, d=doublet, t=triplet.

7,10 (d, J = 8 Hz, 2H) : H₉, H₁₀. 7,67 (d, J = 5 Hz, 1H) : H₆. 7,56 (d, J = 8 Hz, 2H) : H₈, H₁₁. 7,44 (s, 1H) : H₄. 7,21 (d, J=5Hz, 1H) : H₇.

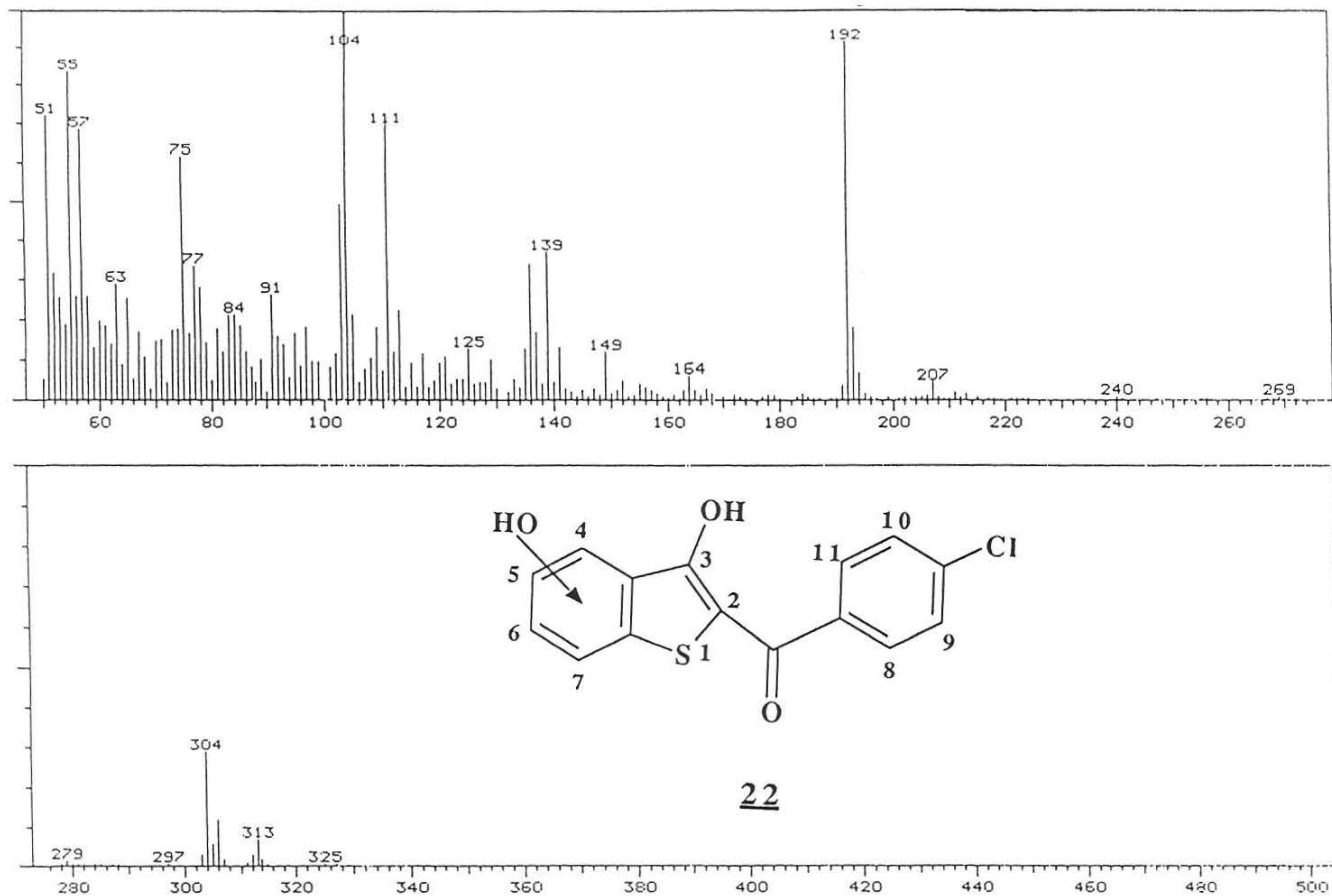


Figure 3-11

Spectre de masse (impact électronique) du métabolite **22**, dérivé du métabolisme *in vivo* chez le rat du 2-(4-chlorobenzoyl) benzo(b)thiophène **15**.

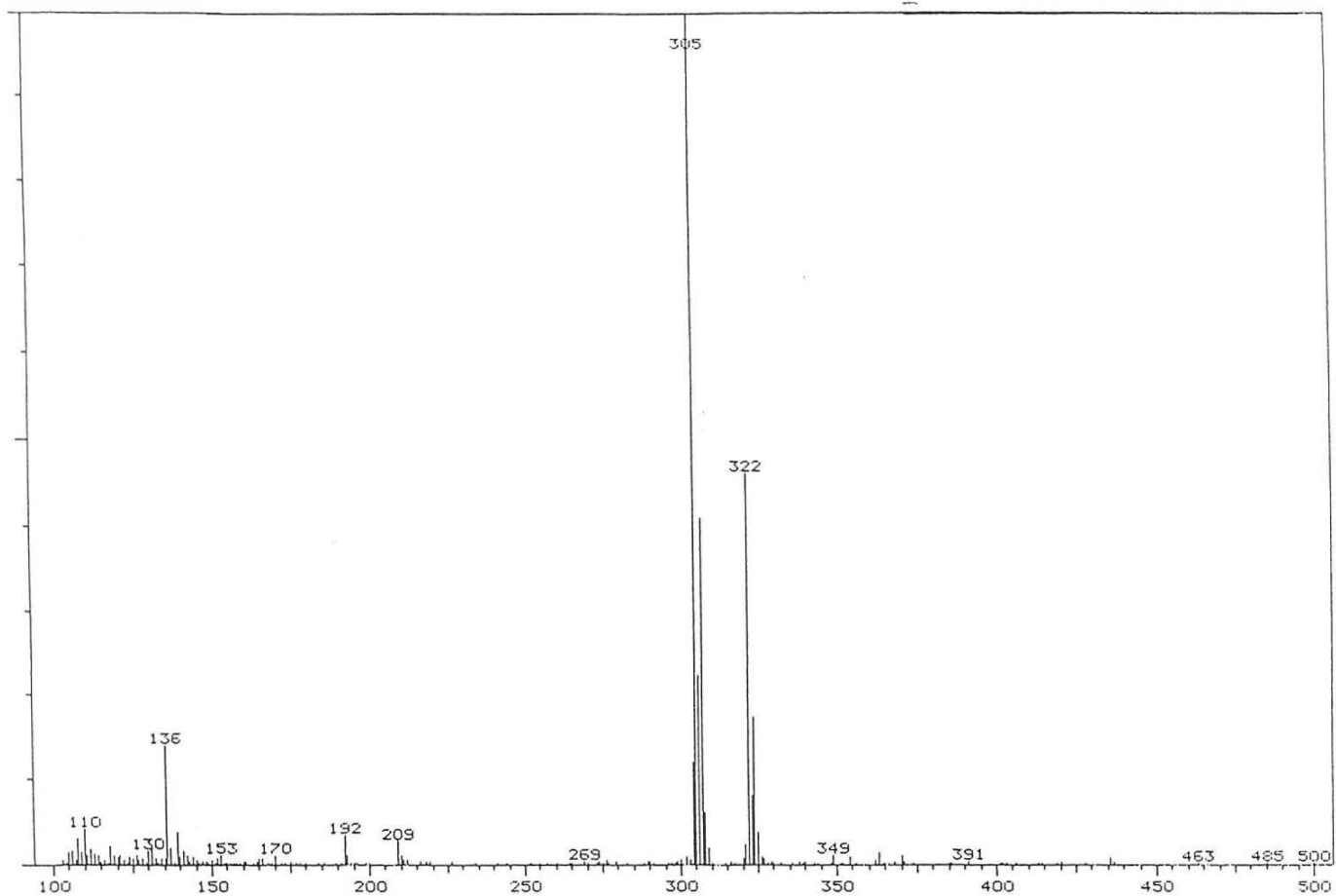


Figure 3-12

Spectre de masse (ionisation chimique, NH_3) du métabolite 22,
dérivé du métabolisme *in vivo* chez le rat du
2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène 15.

L'étude spectrale du métabolite **22** suggère une structure qui correspond à celle du composé **19** portant un groupement hydroxyle sur le phényle plus probablement en position 5 pour des raisons électroniques (figure 3-13).

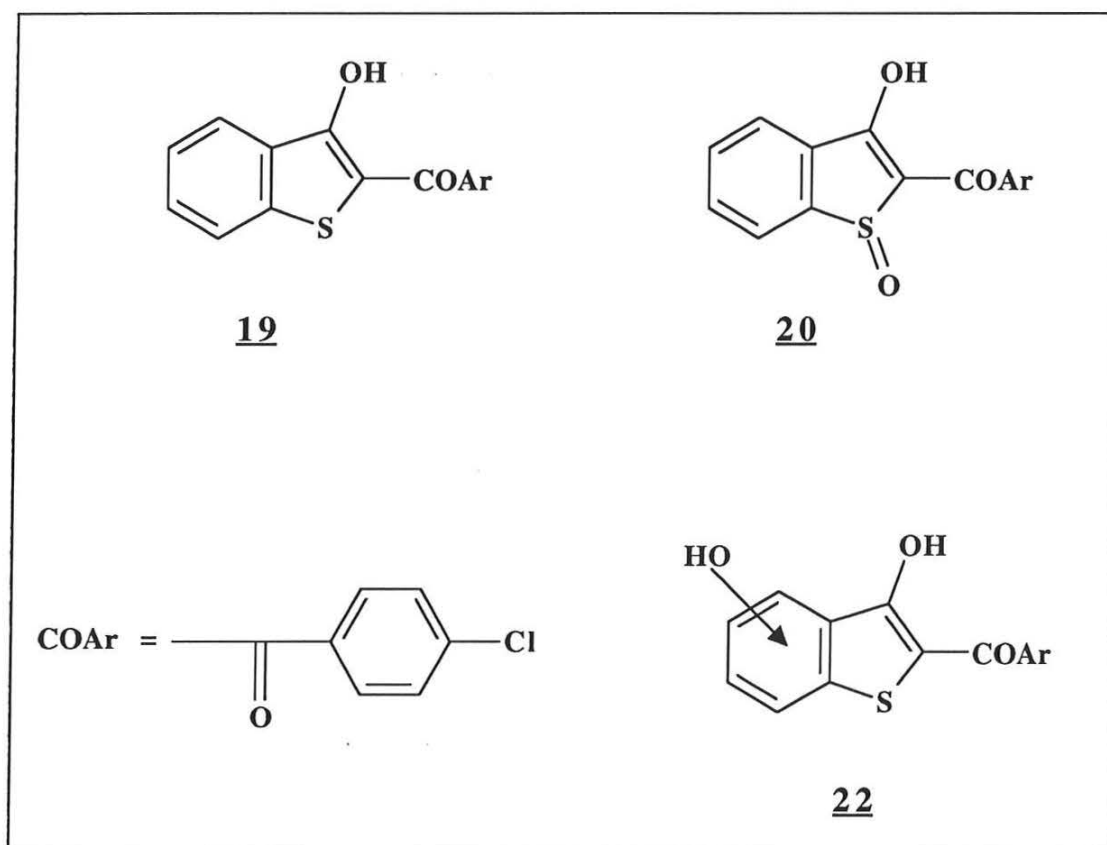


Figure 3-13

Métabolites 19, 20 et 22, retrouvés dans l'urine

de rat traité avec le composé 15

Ces résultats montrent qu'il y a bien sulfoxydation *in vivo* comme *in vitro*. Notons que le composé **19** lui-même n'est pas isolé en quantités appréciables (en traces *in vitro*). Par contre les produits d'oxydation ultérieure sur le phényle ou sur le soufre sont isolés *in vivo*.

Question : Le composé 19 ne serait-il pas rapidement oxydé par les enzymes microsomales dès sa formation ?

3-4 Etude de l'oxydation Métabolique *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl)-3-hydroxy-benzo(b)thiophène 19.

Le composé **19** (100µM) a été traité par des microsomes hépatiques de rats non traités (CONT) ou traités par différents inducteurs (PB, 3MC, β-NF, CLO et DEX) en présence de système générateur de NADPH.

Les incubations témoins ne contiennent pas le système générateur de NADPH.

Les deux métabolites **20** et **22** identifiés précédemment comme deux métabolites du composé **15** *in vivo* ont été retrouvés lors de cette oxydation métabolique *in vitro* du composé **19**.

Après 10 min d'incubation le composé **19** est métabolisé en deux métabolites **20** (13% de la quantité de **19** incubée) et **22** (9% de la quantité de **19** incubée) (les pourcentages sont approximatifs) dont les temps de rétention et λ_{max} respectifs sont de (11,79-12,3 min), λ_{max1} = 260 nm, λ_{max2} = 338 nm et 21,29 min, λ_{max1} = 260, λ_{max2} = 350 nm (figure 3-14). Le pic chromatographique relativement large du métabolite **20** présente deux isomères de même chromophore dont la séparation a été difficile par HPLC.

La formation des métabolites **20** et **22** avec les microsomes β-NF, paraît la meilleure en terme de rendement en métabolites, comparé aux autres microsomes. C'est pourquoi nous avons utilisé les microsomes β-NF tout au long de la purification de ces métabolites.

Les métabolites **20** et **22** ont été purifiés et complètement caractérisés par une étude spectrale UV-visible, RMN ¹H et par spectrométrie de masse. Ils correspondent exactement aux composés **20** et **22** décrits dans le métabolisme *in vitro* et *in vivo* du composé **15**.

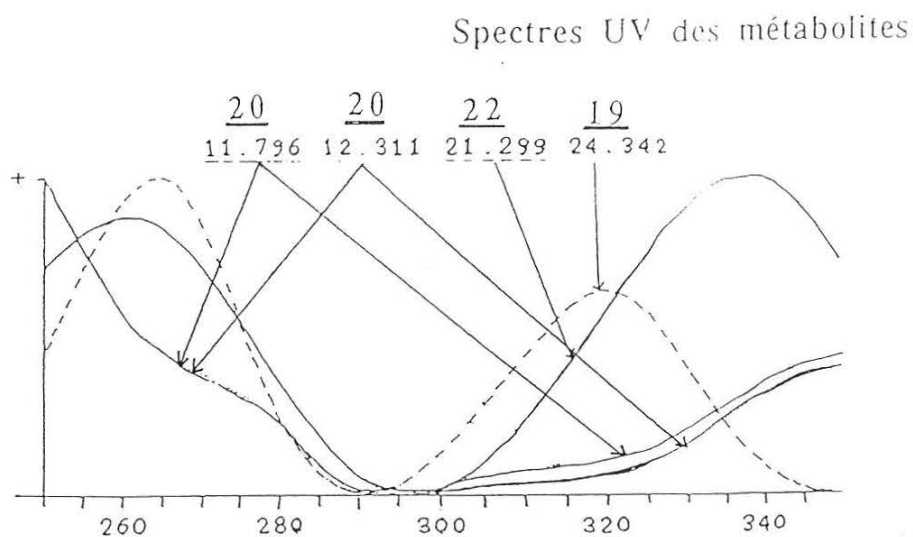
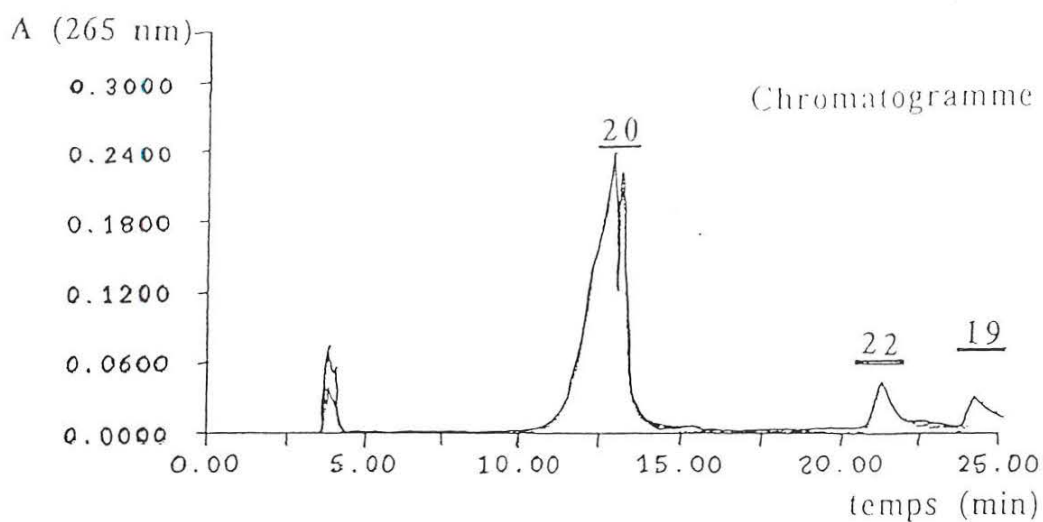


Figure 3-14

Métabolisme *in vitro* du 2-(4-chlorobenzoyl)-3-hydroxy benzo(b)thiophène 19.

HPLC analytique : Solvant A = CH₃COONH₄ pH 4,6.

Solvant B = CH₃CN 90%. En gradient 0 à 100% de B en 20 min.

Il résulte de ce qui précède que le composé **19** est rapidement transformé par S-oxydation et hydroxylation du noyau benzène par les enzymes microsomales.

3-5 Discussion

Le 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène subit deux réactions de métabolisme primaire :

-Une S-oxydation qui conduit à la formation du métabolite **16**

-Une réduction du carbonyle qui conduit à la formation du métabolite **17**

Les autres métabolites dérivent de ces deux voies (figure 3-15) :

-Le dérivé réduit peut subir une S-oxydation ce qui conduit à la formation du métabolite **18**.

-Le dérivé **16** doit pouvoir subir des réactions ultérieures. Une transformation en **19** puis une oxydation ultérieure sur le cycle pour donner le métabolite **22** ou une S-oxydation pour donner le métabolite **20**
Nous pouvons donc expliquer l'ensemble de nos résultats sur le métabolisme des benzothiophènes substitués en faisant intervenir deux réactions :

1) La réduction du carbonyle en alcool qui a des précédents dans la littérature avec la métyrapone et les stéroïdes.

2) La S-oxydation qui pourrait être suivie d'une isomérisation en **19**. Les produits **16** et **19** subissent alors des oxydations ultérieures pour conduire aux autres métabolites isolés **20** et **22**.

Un résultat est en faveur de ce mécanisme : la très rapide suroxydation de **19** par les microsomes hépatiques de rat. Toutefois, il est difficile de comprendre pourquoi on isole *in vitro* aussi peu de **19** à partir de **15**. La formation d'un sulfoxyde joue un rôle clé dans le métabolisme oxydatif des composés **15** et **19**.

Le schéma de synthèse des authentiques est représenté dans la figure 3-16.

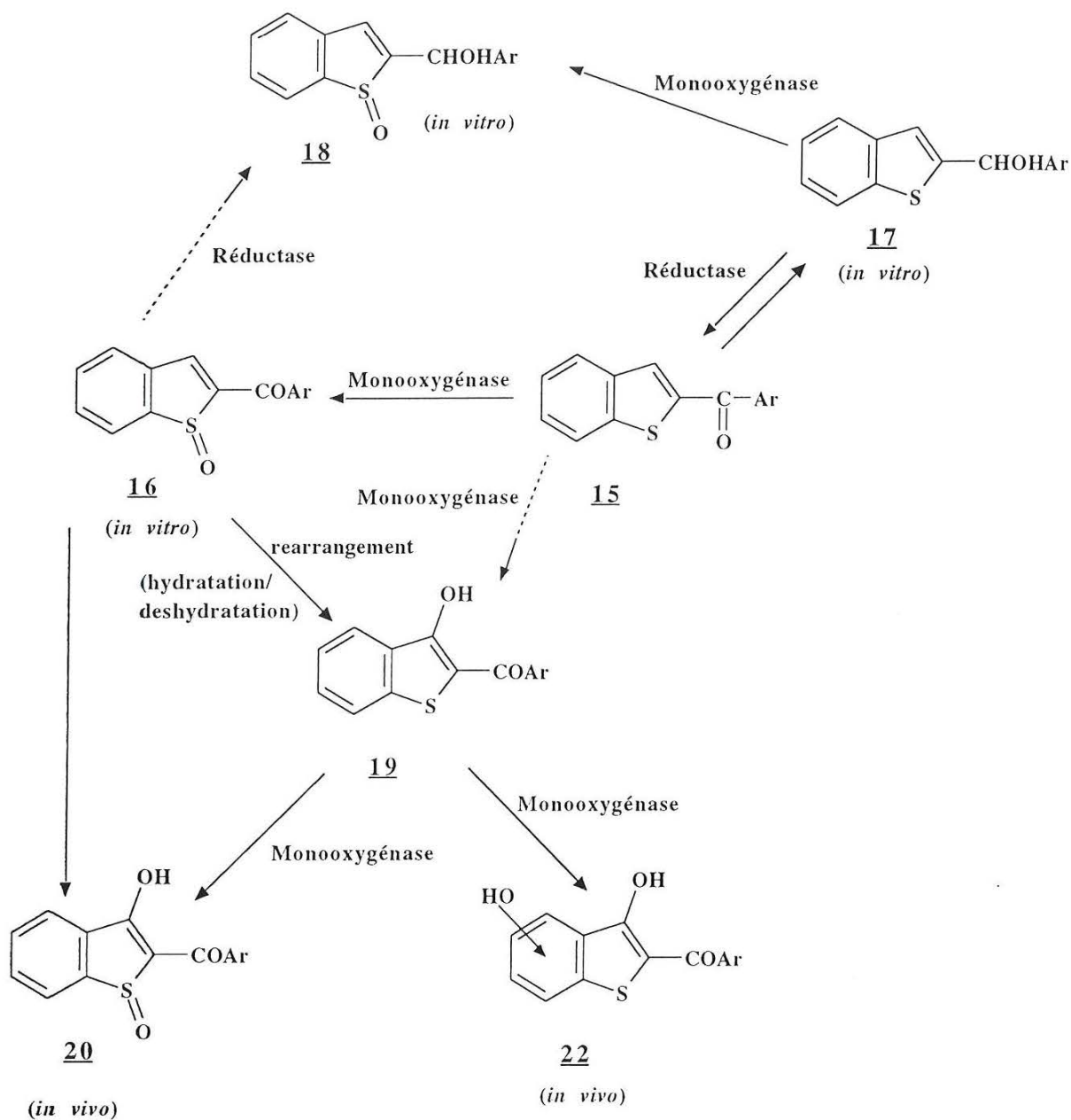


Figure 3-15

Métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène *in vivo* et *in vitro* et évolution des métabolites formés.

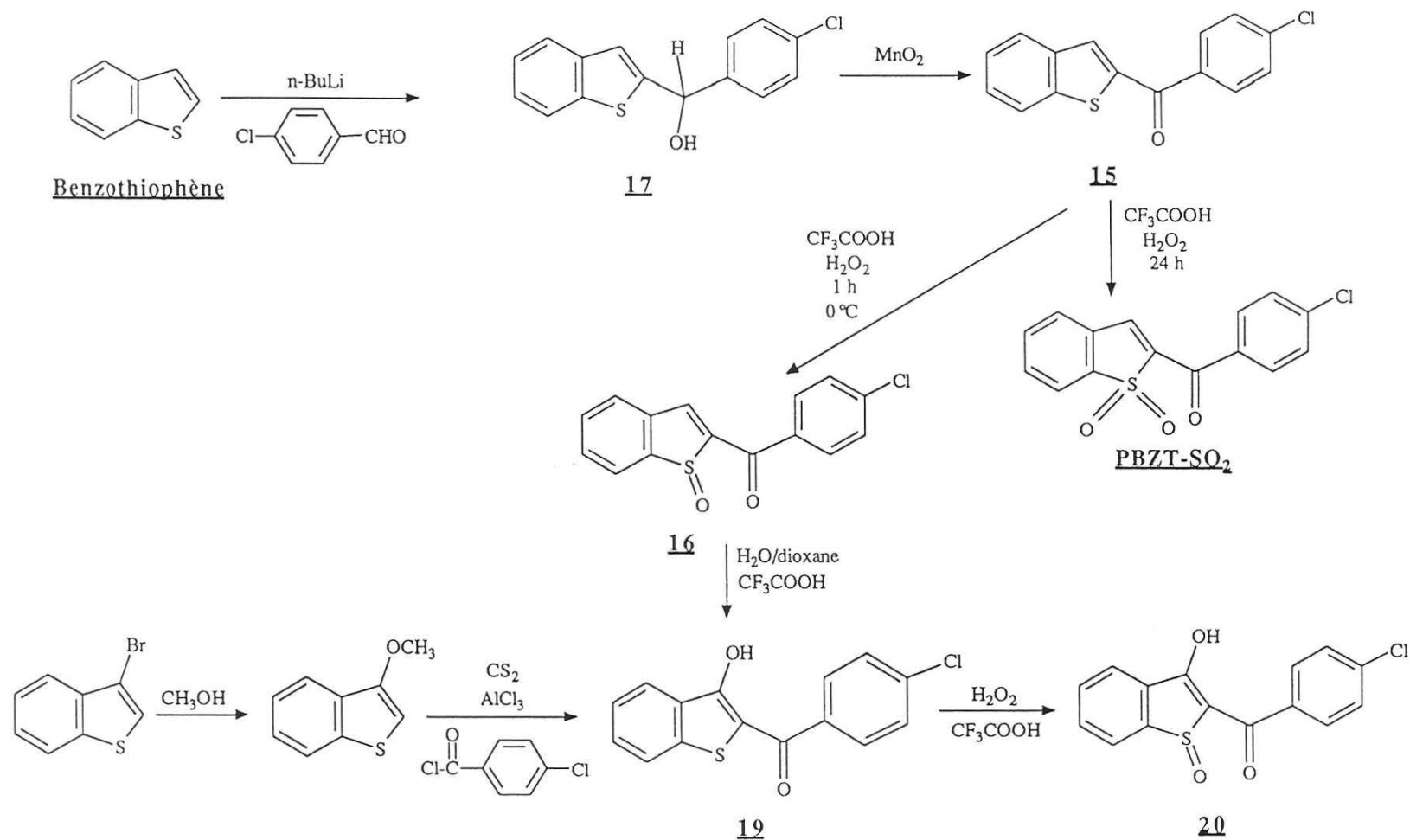


Figure 3-16

Schéma de synthèse des authentiques de benzothiophènes substitués synthétisés au laboratoire par Pascale Pouzet.

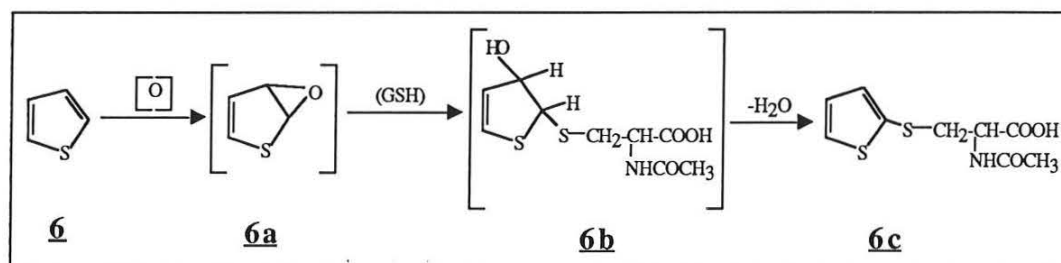
(La synthèse du PBZT-3OH à partir du 3-bromo-benzothiophène, a été réalisé par Do Cao Thang)

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène

.....
CHAPITRE QUATRIEME
.....

METABOLISME DU THIOPHENE

Une étude du métabolisme du thiophène chez le rat (Bray et coll, 1968; 1971) avait conduit à l'isolement de deux métabolites urinaires de type mercapturates. En fonction de la structure du deuxième métabolite **6c** obtenu par aromatisation du premier **6b** et des éléments spectroscopiques dont disposaient les auteurs à l'époque (masse , IR), la structure **6b** avait été proposée. Cette dernière suggérait le piégeage par le glutathion d'un époxyde intermédiaire.



Les résultats de Mansuy et coll en 1991, sur le métabolisme de l'IAT et du benzothiophène *in vitro*, ainsi que notre récent résultat sur le métabolisme *in vivo* du benzothiophène, nous ont conduit à réétudier le métabolisme *in vivo* et *in vitro* du thiophène.

4-1 Métabolisme du thiophène *in vivo* chez le rat.

Afin de pouvoir détecter les métabolites urinaires du thiophène, cette molécule a été marquée par tritiation des positions 2 et 5 avec un échange facile de H₂ et H₅ du thiophène sous des conditions acides (Ostman et coll, 1960). Un mélange de 1 ml de thiophène, 0,2 ml d'anhydride trifluoroacétique et 10 µl de l'eau tritiée (1 Ci.g⁻¹) a été chauffé pendant 16h à 30°C. Après une dilution avec 2 ml de H₂O et 4 ml d'huile de maïs et plusieurs extractions avec H₂O jusqu'à l'élimination totale de la radioactivité de la phase aqueuse, la solution huileuse a été séchée sur Na₂SO₄ et centrifugée. La solution de thiophène tritié obtenue dans l'huile a une radioactivité spécifique de 0,4 mCi par ml (0,16 mCi par mmol). L'analyse par HPLC montre que cette solution présente une pureté radiochimique de plus de 98%.

Après traitement des rats avec le thiophène tritié (0,2g (400µCi) par kg), 31% et 4% de la radioactivité totale ont été excrétés dans les urines respectivement entre 0 et 15 heures et entre 15 et 33 heures (figure 4-1). L'HPLC analytique a montré la formation d'un petit nombre de métabolites radioactifs. Le métabolite majoritaire **28** représente plus de 90% de la radioactivité totale retrouvée dans les urines entre 0 et 33 heures (figure 4-1) et plus de 20% de la radioactivité totale administrée (figure 4-2 A). Ce métabolite **28** a été isolé par HPLC préparative des urines de rats traités par du thiophène radioactif. Il s'agit d'un produit blanc cristallisé. En solution dans l'eau, ce métabolite présente un spectre

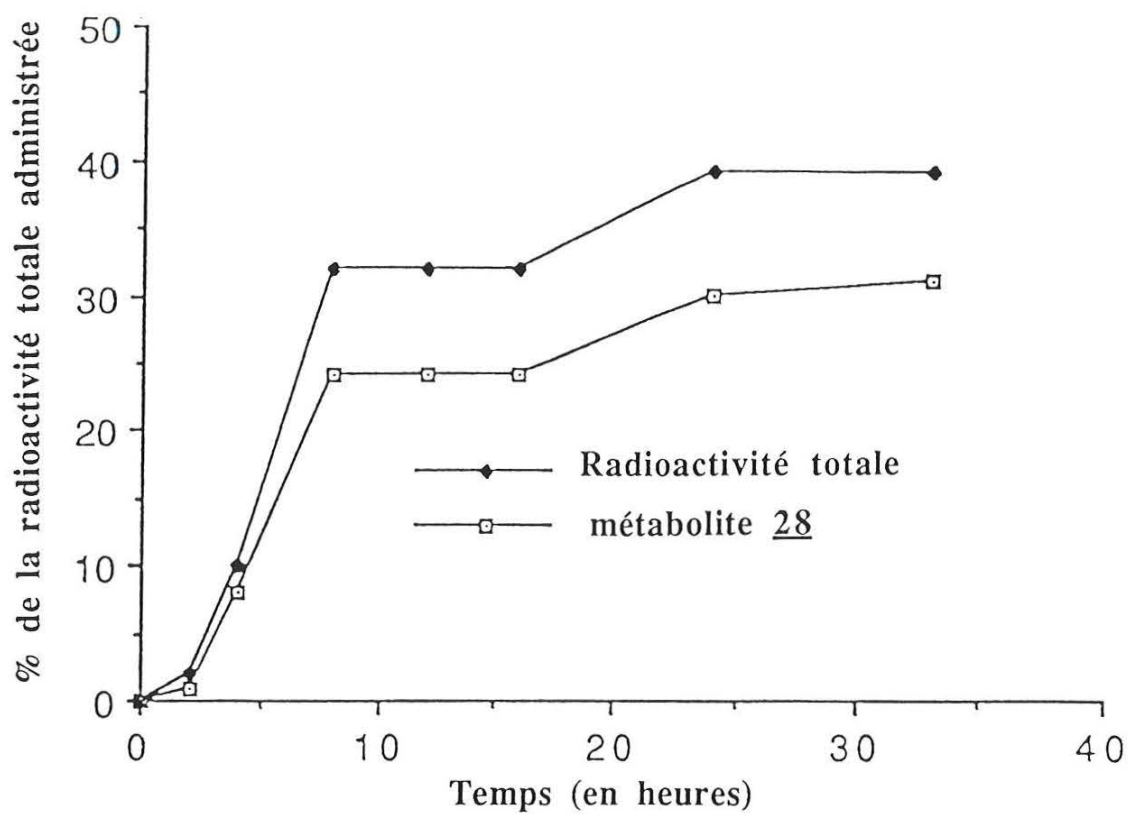


Figure 4-1

Représentation graphique de la cinétique d'excrétion entre 0 et 33 heures des métabolites urinaires du thiophène radioactif et de son métabolite majoritaire 28.

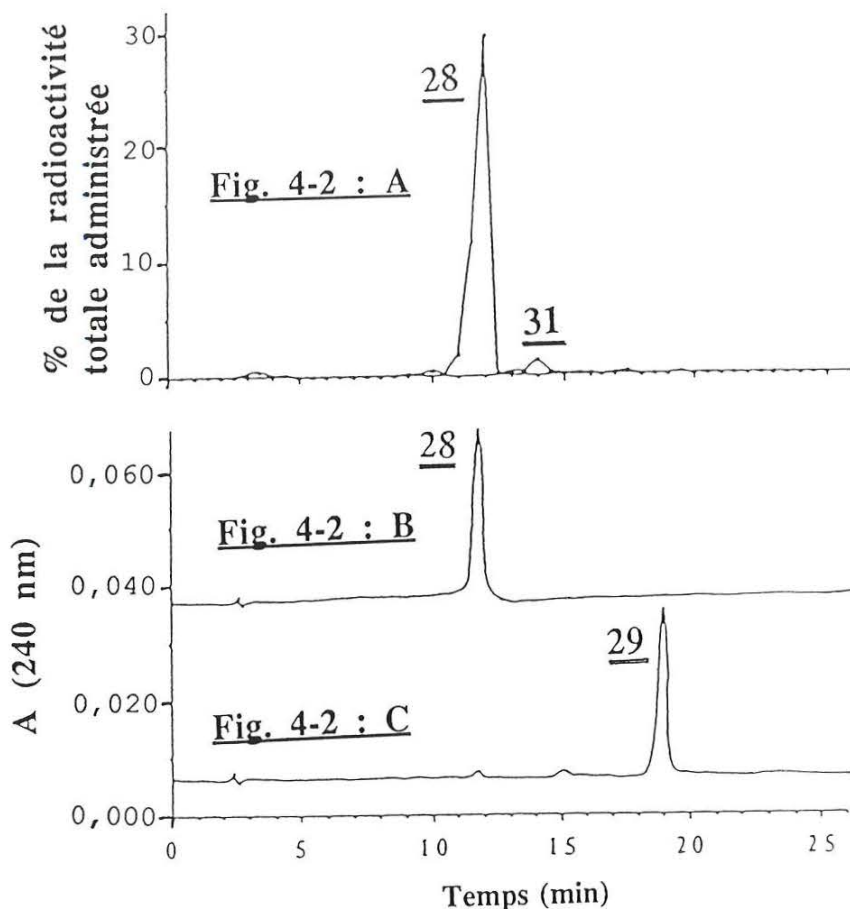


Figure 4-2

HPLC analytique de l'urine de rat traité au thiophène et celle des métabolites 28, 29 et 31.

Fig. 4-2 : A : Radiochromatogramme de l'urine (0-24h) de rat traité avec le thiophène tritié (0,2g (400 μ Ci) par kg).

Conditions d'HPLC : Solvant A = CF₃COOH 0,1%

Solvant B = CH₃CN 50%. En gradient 1 = 0 à 100% de B en 20 min.

Fig. 4-2 : B : Profil d'HPLC obtenu après isolement du métabolite majoritaire.

Conditions de purification par HPLC :

Solvant A = CH₃COONH₄ 0,1M pH 4,6

Solvant B = CH₃CN 50%. En gradient 2. 0 à 100% de B en 20 min. puis en isocratique, utilisant un mélange CH₃CN (75/25), v/v) contenant 1% de CH₃COONH₄ pH 4,6.

Fig. 4-2 : C : Profil d'HPLC (détection à 240 nm) d'une solution dans l'eau obtenue après chauffage de 28 au point de fusion (F = 126°). L'élution a été réalisée à l'aide du gradient 1 ci-dessus.

UV avec un maximum d'absorption à 197 nm et une activité optique (angle de déviation de la lumière polarisée (α)_D = 13°). Son spectre de masse (ionisation chimique, NH₃), présente un pic à 281 ((M + NH₄)⁺) et un pic à 264 ((M + H)⁺) (figure 4-3) avec M correspondant à la masse du thiophène + O + N-acétylcystéine, comme cela avait été décrit antérieurement par Bray et coll, en 1971. Ce résultat confirme que le métabolite **28** est bien un mercapturate, dérivé formellement de l'addition de la N-acétylcystéine (via le GSH) sur un métabolite réactif monooxygéné du thiophène. Cette structure est en accord avec le spectre de masse de l'ester méthylique du métabolite **28**, obtenu par traitement du **28** par CH₂N₂, qui montre deux pics à 295 ((M + NH₄)⁺) et à 278 ((M + H)⁺).

Le spectre RMN ¹H de **28** dans D₂O montre bien les signaux attendus pour la N-acétylcystéine et 5 signaux pour le reste de la molécule (5H). Toutes les corrélations et les constantes de couplage (tableau 4-1) entre ces 5 protons ont été déterminées en utilisant des expériences de double irradiation et de 2D Cosy. Les résultats obtenus montrent clairement l'existence du système -CH₂-CH=CH-CH- structure incompatible avec celle antérieurement postulée par Bray, mais qui correspond bien à la structure **28** (figure 4-4).

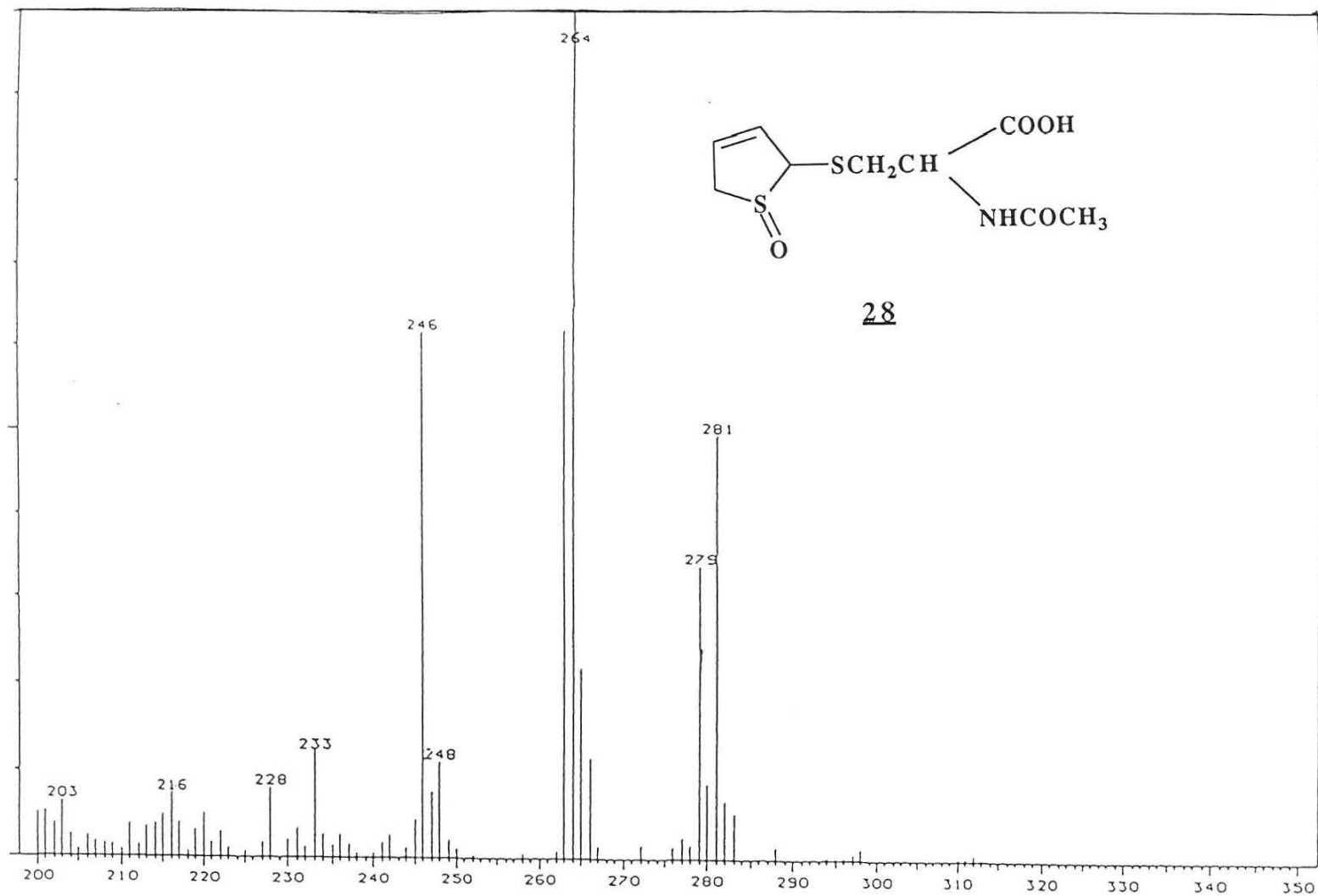


Figure 4-3

Spectre de masse (ionisation chimique, (NH₃)) du métabolite **28**, majoritaire, dérivé du métabolisme du thiophène *in vivo* chez le rat.

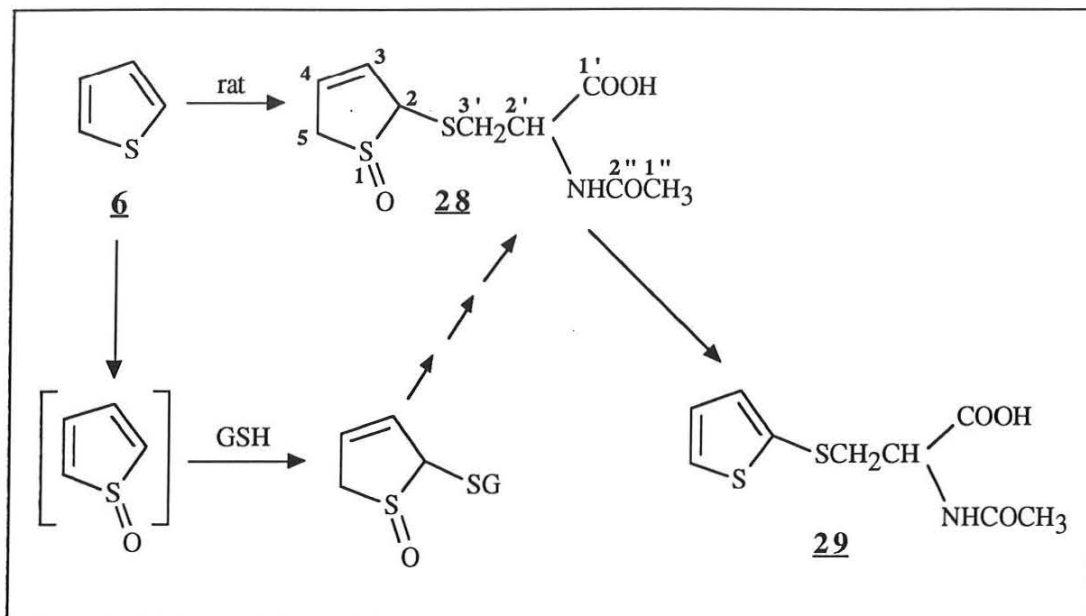


Figure 4-4 Métabolisme *in vivo* du thiophène chez le rat

Une analyse similaire par RMN ^1H de l'ester méthylique du métabolite **28** dans CDCl_3 conduit à l'obtention de signaux analogues, en accord avec la structure proposée (tableau 4-1).

Le spectre RMN ^{13}C de **28** montre 9 signaux dont 5 dues à la N-acétylcystéine (figure 4-5). Les quatre autres signaux correspondent à deux carbones vinyliques (CH) et aux autres carbones (CH) et (CH_2) du cycle. Toutes ces données sont en parfait accord avec la structure **28** (figure 4-4). Le spectre infra-rouge (KBr) du métabolite **28** possède deux petites bandes fines à 1020 et 1040 cm^{-1} (figure 4-6) et celui de son ester méthylique (film dans NaCl), une large bande centrée à 1030 cm^{-1} qui d'après la littérature correspond à la vibration S-O.

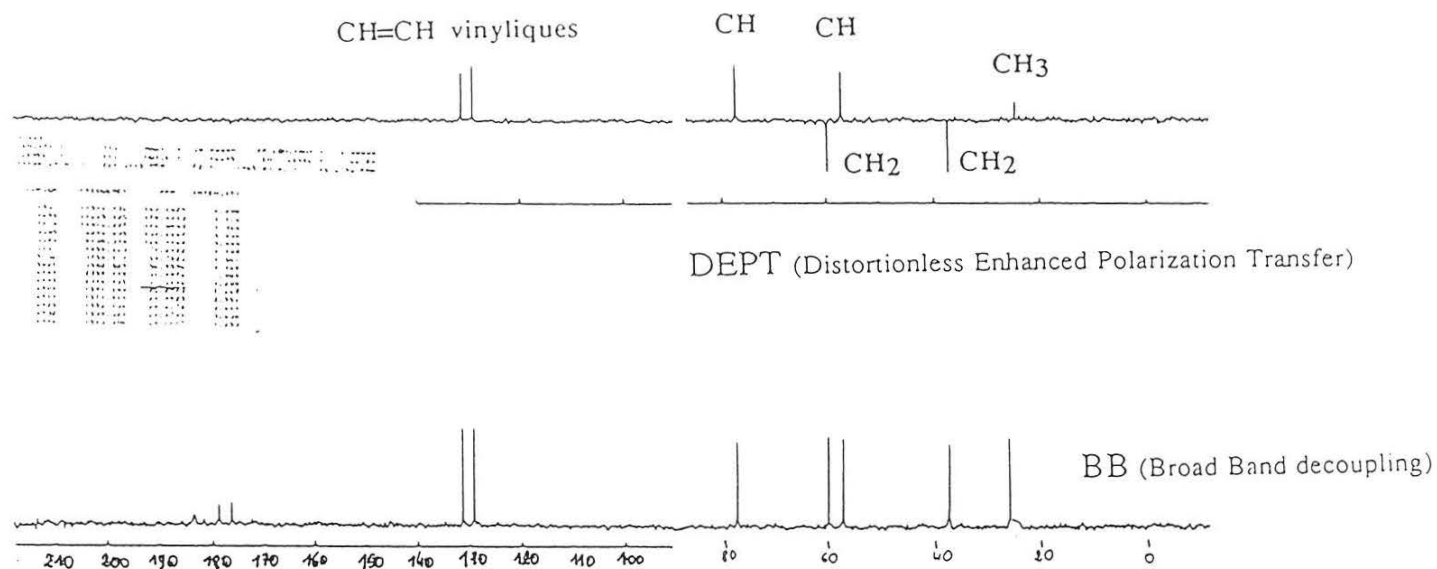


Figure 4-5

Spectre RMN ^{13}C du métabolite 28, majoritaire, dérivé du métabolisme du thiophène *in vivo* chez le rat.

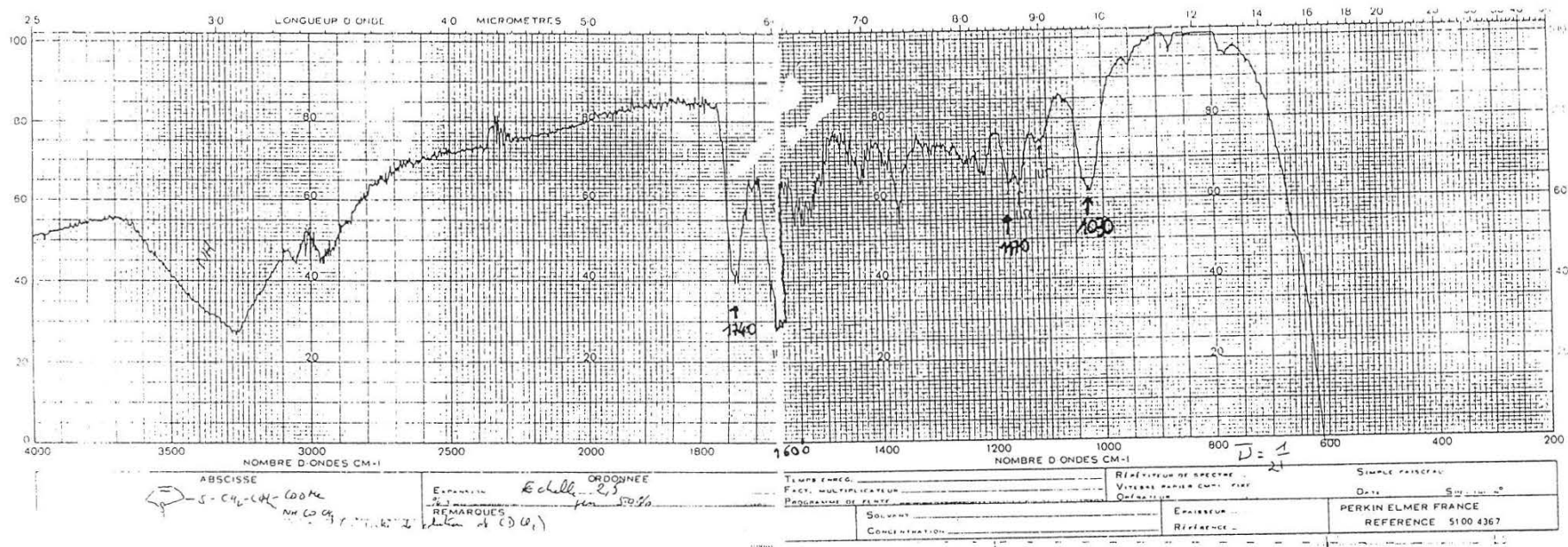


Figure 4-6

Spectre infra-rouge du métabolite 28 (méthylé), majoritaire, dérivé du métabolisme du thiophène *in vivo* chez le rat.

Tableau 4-1 : RMN ¹H et ¹³C du métabolite 28

Position (voir, figure 4-4)	RMN du ¹ H (a)		RMN du ¹³ C (b)
	Métabolite 28 Ester méthylique de 28		Métabolite 28
1''	1,96 (3H, s)	2,05 (3H, s)	24,5 (CH ₃)
2'	4,35 (1H, t) J _{2'3'} =5,5	4,9 (1H,dt) J _{2'3'} =5,5; J _{2'NH} =7	56,9 (CH)
3'	3,08 (2H,d) J _{3'2'} =5,5	3,24 (2H,d) J _{3'2'} =5,5	37,3 (CH ₂)
2	4,95 (1H, d) J ₂₃ =3,3	4,64 (1H, dd) J ₂₃ =3; J _{25b} =1,5	77,2 (CH)
3	6,02 (1H, ddd) J ₃₄ =5,5; J ₃₂ =3,3 J _{35a} =2	5,98 (1H, ddd) J ₃₄ =5; J ₃₂ =3 J _{35a} =1,5	128,9 (CH)
4	6,1 (1H, ddd) J ₄₃ =5,5; J _{45b} =3 J _{45a} =1,5	6,08 (1H, ddd) J ₄₃ =5; J _{45a} =2,5 J _{45b} =3	131,1 (CH)
5	4,15 (1H, ddd) J _{5a5b} =18; J _{5a4} =1,5 J _{5a3} =1,5	4,07 (1H, ddd) J _{5a5b} =18; J _{5a4} =2,5 J _{5a3} =1,5	59,7 (CH ₂)
	3,48(1H, ddd) J _{5b5a} =18; J _{5b4} =3 J _{5b2} =1,5	3,45 (1H, ddd) J _{5b5a} =18; J _{5b4} =3 J _{5b2} =1,5	

(a) métabolite **28** (sel de NH₄⁺) dans D₂O pH 4,6; son ester méthylique dans CDCl₃. δ en ppm relatif à Si (CH₃)₄. s = singulet, d = doublet, t = triplet, J en Hz. δ_{NH} et δ_{OCH₃} de l'ester méthylique à 6,35 et 3,8 ppm.

(b) δ en ppm; nombre de protons liés à chaque carbone déterminé par la RMN DEPT ¹³C et indiqué entre parentèse. Les signaux CONH et COOH à 176 et 178,5 ppm.

Après chauffage de **28** jusqu'à son point de fusion (126°C), le métabolite **28** est transformé en un nouveau composé plus hydrophobe **29** (figure 4-2 : C) ayant un spectre UV caractérisé par un maximum à 236 nm et un épaulement à 265 nm. Le point de fusion (162°C) et le spectre RMN ¹H dans D₂O du métabolite **29** sont identiques à ceux d'un authentique de synthèse de la N-acétyl-S-(2-thienyl)-L-cystéine synthétisée comme cela a été décrit antérieurement par Hickman et coll en 1985. La transformation du métabolite **28** en **29** (figure 4-4) a été aussi constaté après chauffage de l'urine de rat contenant le métabolite **28** à 80 °C pendant 16 heures (rendement = 86%). En fait, une solution de **28** dans CH₃OH à température ambiante pendant 10 jours, contient environ 2% du métabolite **29**. La formation de **29** à partir de **28** est une réaction de déshydratation bien connue pour les sulfoxydes de dihydrothiophènes (Cava et coll, 1966; Raash, 1985). Cette réaction a déjà été observée dans le cas du métabolite de type sulfoxyde de dihydrothiophène dérivé de l'isomère de l'acide tiénilique (Mansuy et coll, 1991).

4-2 Métabolisme du thiophène radioactif *in vitro*

Le but de cette étude métabolique, était de chercher une activité des différents types de microsomes, sur le thiophène radioactif (T-³H). Nous avons essayé au départ de chercher une activité enzymatique transformant le thiophène en un produit soluble dans l'eau. Le thiophène n'ayant pas réagi est extrait avec l'isooctane. Cette activité a été recherchée au départ avec le S9 (surnageant 9000 g) et S100 (surnageant 100 000 g) de foie de rat témoin. Nous avons noté une activité relativement faible, la présence ou l'absence de GSH ne modifie en rien cette activité. Ceci indique que les métabolites polaires de la phase aqueuse ne sont probablement pas des conjugués au GSH. En revanche l'absence ou la présence de système

générateur de NADPH influe beaucoup sur cette activité. Cette dernière est presque nulle en absence de système générateur de NADPH. Il s'agit donc bien d'une réaction enzymatique NADPH dépendante.

La phase aqueuse renferme pratiquement la totalité de la radioactivité, la part fixée par les protéines est très faible (1,3% environ de la radioactivité totale initiale). Le tableau 4-2 compare les activités d'oxydation du thiophène par divers microsomes de foie de rats pretraités par divers inducteurs.

Tableau 4-2 :

Différentes activités de microsomes de rats soit non traités soit traités par divers inducteurs sur la transformation du thiophène marqué.

Nature des microsomes (ou S9)	Nombre de nanomoles de T- ³ H transformé en métabolites hydrosolubles / nanomole de P450 / minute (ou pour S9/mg de protéine)
S9	0,17
CONT	0,50
PB	0,54
3MC	0,62
β-NF	0,62
CLO	0,67
DEX	1,08

S9 = surnageant 9000g; CONT = microsomes de foie de rats témoins; PB, 3MC, β-NF, CLO, DEX sont respectivement les microsomes de foie de rats induits par le phénobarbital, le 3-methylcholanthrene, la β-naphtoflavone, le clofibrate et la dexametasone

On note que les microsomes DEX présentent la meilleure activité dans ce métabolisme (un peu plus d'une nanomole de T-³H / nmole de P450 / min). Ces microsomes seront donc retenus dans la suite de l'étude métabolique (incubations analytiques et préparatives).

4-2-1 Analyse des métabolites de la phase aqueuse

Lors de l'étude par HPLC analytique, les différentes fractions ont été collectées et comptées. Le radioélogramme montre qu'on a trois métabolites dont un est majoritaire. Ce dernier représente environ 50 % de la radioactivité dans la phase aqueuse (figure 4-7 : A). Cette analyse a montré trois pics chromatographiques radioactifs en plus du thiophène (marqué) lui-même (figure 4-7 : B) dont les temps de rétention et les λ max respectifs sont les suivants :

- métabolite **31**, majoritaire : $t_r = 13,76$ min; λ max = 206 nm
- métabolite **32** : $t_r = 13,99$ min; λ max : 206 nm
- métabolite **33** : $t_r = 15,91$ min; λ max = 209 nm
- produit **34** $t_r = 24,5$ min. λ max = 230 nm. Ce produit correspond au thiophène lui-même (produit de départ).

La prépurification des trois métabolites a été réalisée avec les mêmes solvants et les mêmes conditions d'HPLC. Par la suite les métabolites **31** et **32** ont été purifiés avec le gradient suivant : $T_0 = 0$ min % du solvant B = 0 %; $T_1 = 2$ min, %B 10 % en 10 min. Le métabolite **33** a été purifié selon le gradient suivant : $T_0 = 0$ min % du solvant B = 0 %; $T_1 = 2$ min, % du solvant B = 20 % en 20 min.

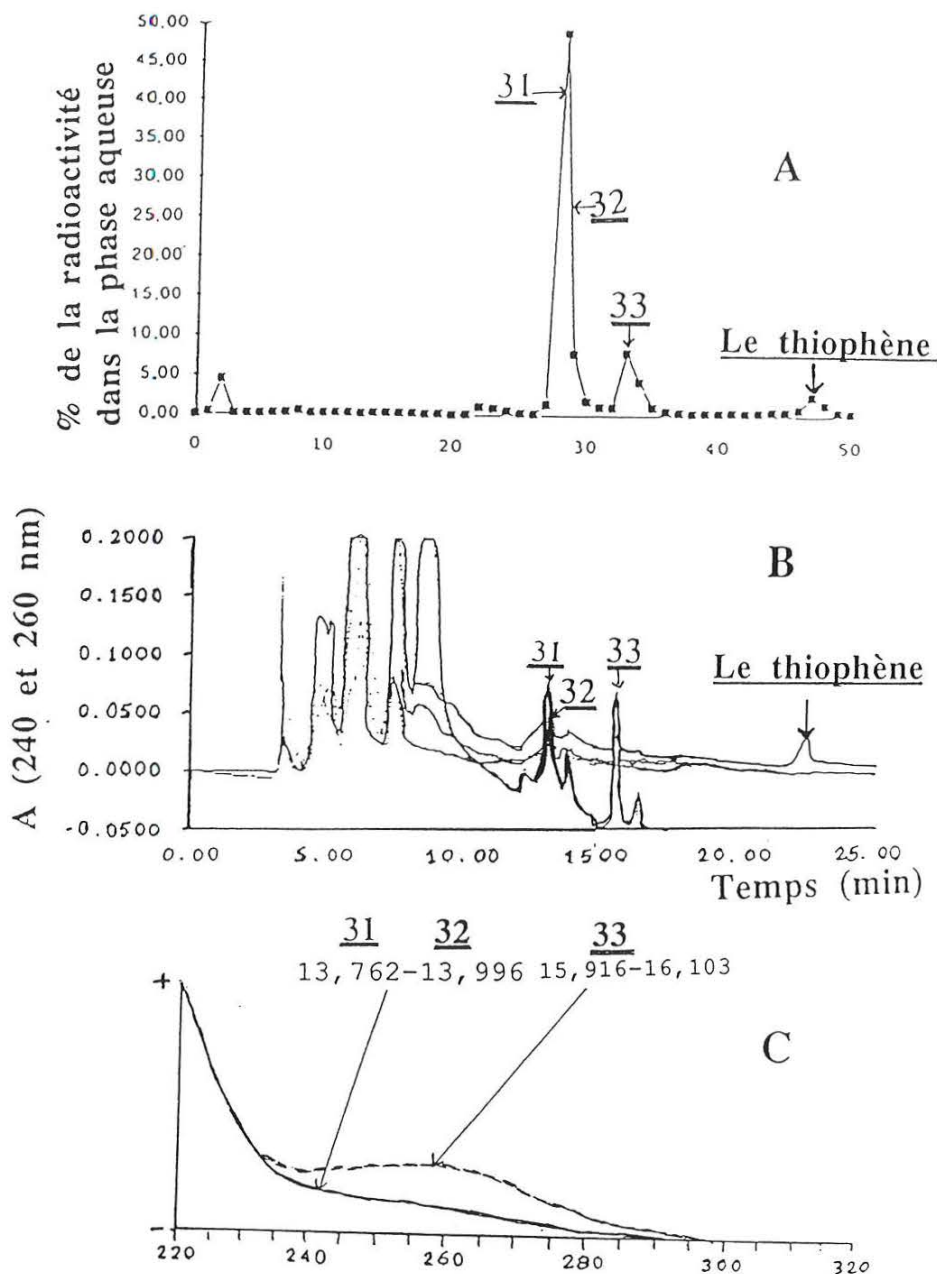


Figure 4-7

Métabolisme *in vitro* du thiophène radioactif par des microsomes de foie de rats induits par la dexaméthasone, en présence de glutathion et de système générateur de NADPH.

A = Radioélogramme. **B** = chromatogramme ($\lambda = 240$ et 260 nm).

C = spectre UV du métabolite majoritaire. Le produit 34 est le thiophène lui même.

Conditions d'HPLC : Solvant A = CF_3COOH 0,1%.

Solvant B = CH_3CN 90%. En gradient : $t_0 = 0$ min, %B = 0; $t_1 = 5$ min, %B = 60% en 12 min; $t_2 = 17$ min, %B = 100% en 2 min.

Le métabolite majoritaire **31** purifié par HPLC préparative dans les mêmes conditions d'HPLC que ci-dessus, mais en isocratique (5% du solvant B) a un temps de rétention de 7,2 min et un maximum d'absorption de 206 nm. Les métabolites **31** et **32** ont des spectres UV et des temps de rétention proches.

Le spectre de masse du produit majoritaire (impact électronique) (figure 4-8) montre un pic à 200 correspondant à l'ion moléculaire M^+ . Son spectre de masse (ionisation chimique, NH_3 , figure 4-9 et tableau 4-3) présente deux pics à 201 ($(M + H)^+$) et 218 ($(M + NH_4)^+$). Le métabolite **32** a un spectre de masse très proche de celui de **31**. Ce sont probablement deux diastéréoisomères. Le résultat de l'étude spectrale présentée ci-dessus est en faveur d'une structure du métabolite majoritaire de nature dimère de sulfoxyde de thiophène. Ce composé présente plusieurs isomères en fonction de la stéréochimie des sulfoxydes dans le cycle. La formation de dimères de sulfoxyde de thiophène avait été décrite par (Davies et coll, 1954, Mock, 1970; Torsell, 1976; Merril et coll, 1977; Kellog, 1984).

Le spectre de masse du métabolite **33** (impact électronique) présente un pic à 216 correspondant à l'ion moléculaire M^+ et en ionisation chimique (NH_3), un pic à 234 correspondant à $(M + NH_4)^+$ (tableau 4-3).

4-2-2 Préparation d'échantillons authentiques des dimères de sulfoxyde de thiophène

Les authentiques de synthèse ont été préparés par le Dr. P.M Dansette selon une méthode originale, par oxydation chimique du thiophène par le système CF_3COOH/H_2O_2 (0,2 à 0,3 équivalents) à $-5^\circ C$ dans le chlorure

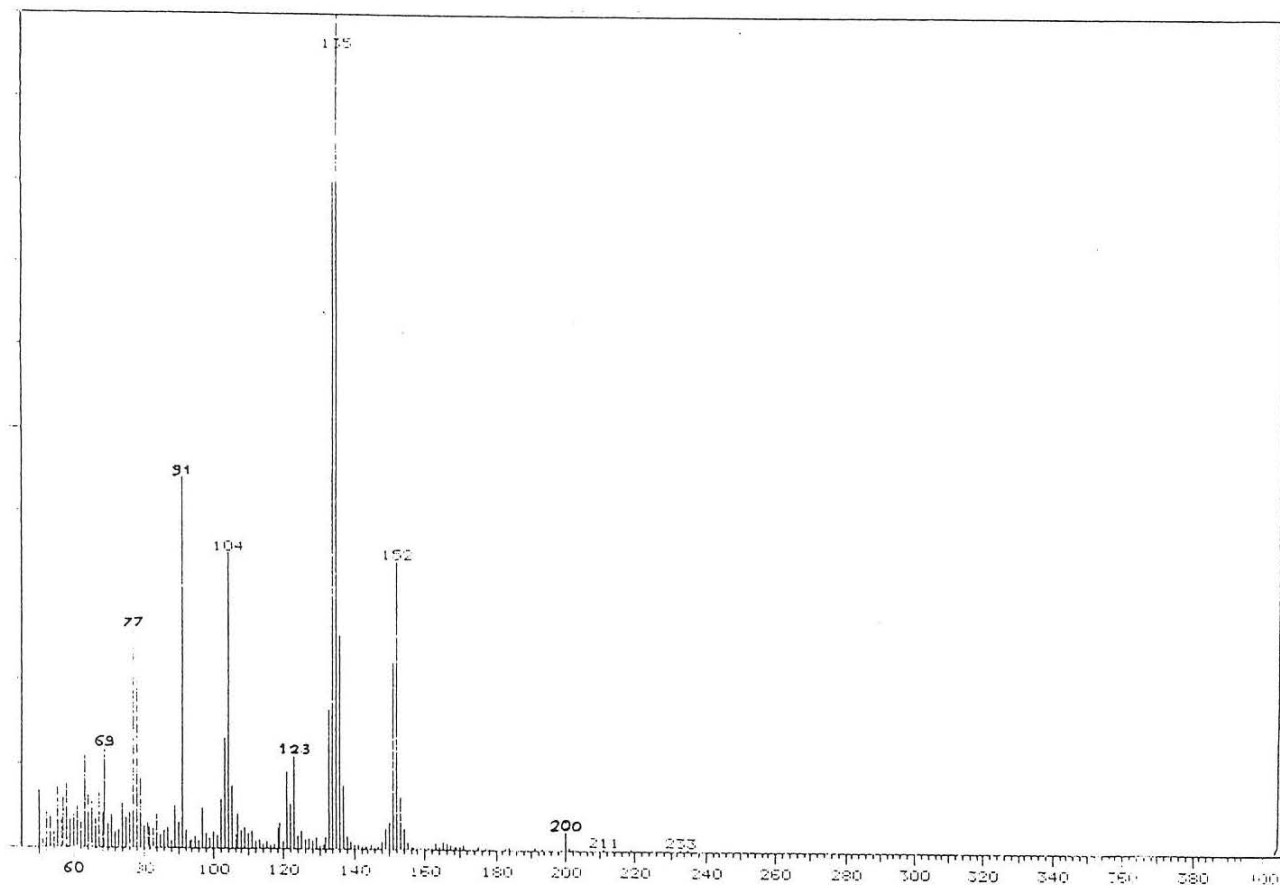


Figure 4-8

Spectre de masse (impact électronique) du métabolite 31, produit majoritaire, dérivé du métabolisme *in vitro* du thiophène radioactif, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rats induits par la dexaméthasone.

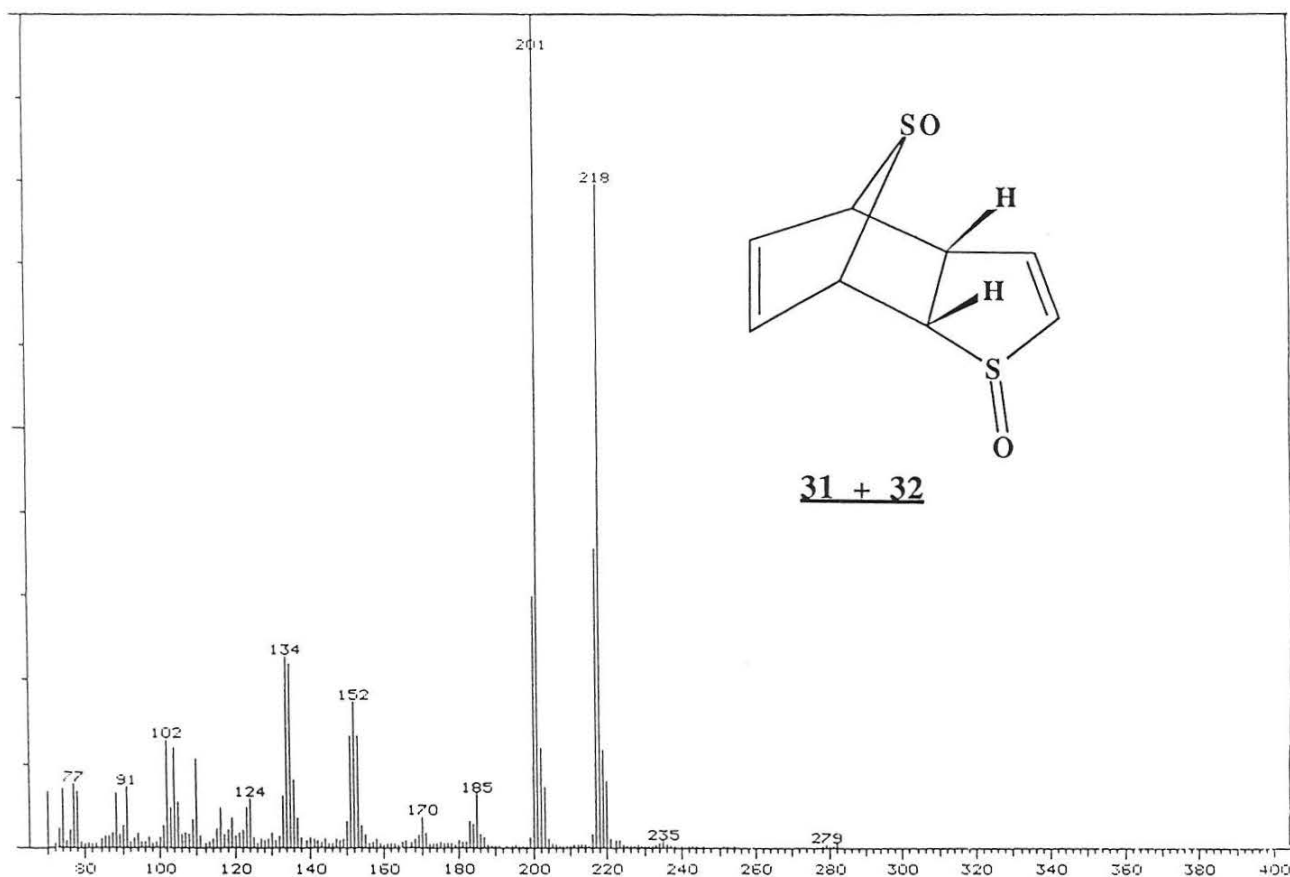


Figure 4-9

Spectre de masse (ionisation chimique (NH₃)) du métabolite 31, produit majoritaire, dérivé du métabolisme *in vitro* du thiophène radioactif, en présence de système générateur de NADPH et de microsomes de foie de rats induits par la dexaméthasone.

de méthylène. Cette réaction donne trois produits qui ont été isolés et caractérisés : il s'agit des produits **34**, **35** et **36** (figure 4-10).

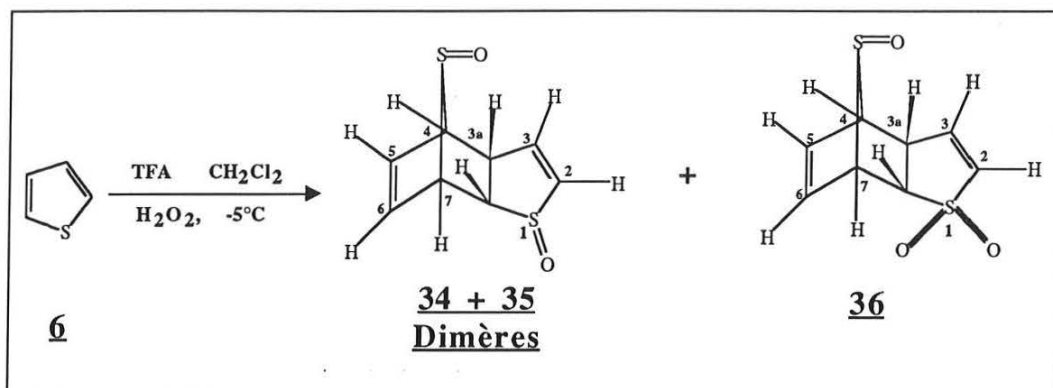
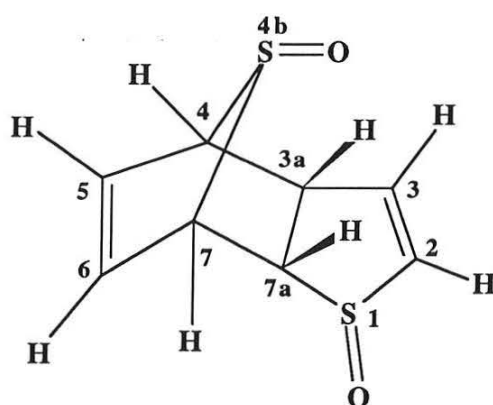


Figure 4-10

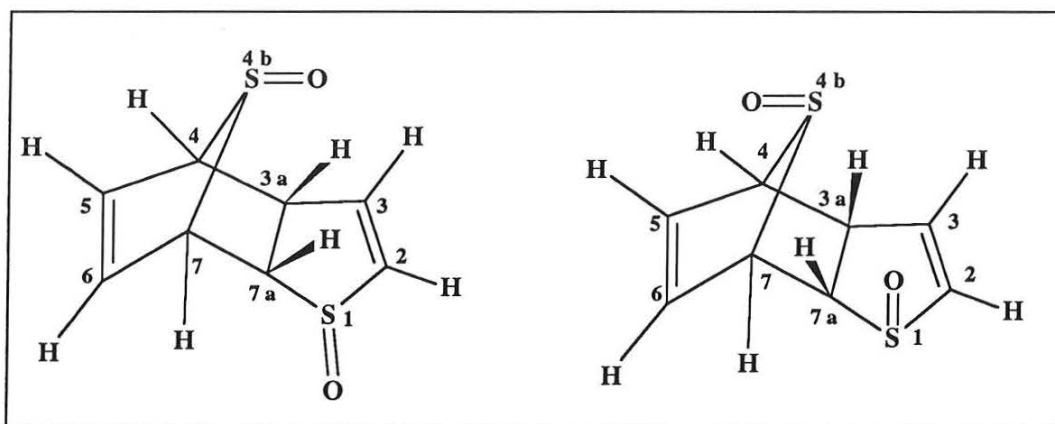
Schéma de synthèse des dimères de sulfoxyde de thiophène (**34** + **35**), authentiques des métabolites majoritaire et minoritaire (**31** + **32**) isolés *in vitro*.

L'un de ces produits, avait déjà été décrit (Davies et coll, 1954, Prochazka, 1965; Merrill et coll, 1977); il s'agit du composé **36**, "le sesquioxyde", retrouvé *in vitro*. D'après les spectres UV-visible, RMN ^1H , RMN ^{13}C , les deux autres composés **34** et **35** sont identiques aux métabolites **31** et **32**.



31 + 32 : Métabolites
et
34 + 35 : Authentiques

La structure ci-dessus présente deux formes possibles "endo" et "exo" et possède six centres asymétriques : deux sulfoxydes et quatre carbones asymétriques (**3a**, **4**, **7** et **7a**). Cependant lorsqu'on fixe le centre **3a** le nombre de diastéréoisomères possible est de $2^5 = 32$. D'après la littérature et les règles de Diels Alder la forme "endo est favorisée" (Barry et coll; 1984). La configuration des autres carbones en découle, donc le nombre de centres asymétriques est 2 (sulfoxyde 1) x 2 (sulfoxyde 4b) x 2 (C**3a**) x 2(endo/exo) = 16 diastéréoisomères possibles. On ne peut pas différencier ni par HPLC en phase inverse ni par RMN des énantiomères, et que l'un ou les sulfoxydes sont peut être en équilibre rapide. La RMN ne permet pas de trancher entre les différents S-O possibles, mais il est probable que les protons H**3a** et H**7a** (en fonction de leur déplacements chimiques) voient au moins l'oxygène d'un sulfoxyde. Nous favorisons mais sans preuves les deux structures endo suivantes :



Le tableau 4-3, résume les données de la RMN ^1H et de la masse des métabolites obtenus *in vitro* et de leurs authentiques de synthèse, obtenus par oxydation chimique du thiophène.

Tableau 4-3

Les données de la RMN ^1H et de la spectrométrie de masse des métabolites du thiophène, obtenus *in vitro* et de leurs authentiques de synthèse correspondants.

Métabolite et son authentique	RMN ^1H	Masses
		Ionisation chimique (NH_3) $((\text{M} + \text{NH}_4)^+)$
<u>31 et 34</u>	6,50 (dd, J=6Hz, J=2Hz, 1H):H ₂ 6,39 (dd, J=6Hz, J=2Hz, 1H):H ₃ 6,29 (dd, J=7Hz, J=6Hz, 1H):H ₆ 5,93(dd, J=7Hz, J=6Hz, 1H):H ₅ 4,73 (dd, J=8Hz, J=4Hz, 1H):H _{7a} 4,40-4,27 (m, 1H):H _{3a} 4,11-3,91 (m, 2H):H ₄ , H ₇ (Dans D ₂ O)	201((M+H) ⁺ , 100%). 218((M+NH ₄) ⁺ , 80%). 134 (50%) 123 (50%) 110 (100%)
<u>32 et 35</u>	6,62 (dd, J=6Hz, J=3Hz, 1H):H ₂ 6,49 (dd, J=6Hz, J=2Hz, 1H):H ₃ 6,21 (dd, J=7Hz, J=4Hz, 1H):H ₆ 6,09(dd, J=4Hz, J=3Hz, 1H):H ₅ 4,9-4,8 (m,1H):H _{7a} 4,39 (dd, J=7Hz, J=4Hz,1H):H _{3a} 4,04(dd, J=4,5Hz, J=3,5Hz 1H):H ₄ 3,98(dd, J=7Hz, J=3,5Hz 1H):H ₇₁ (Dans CD ₃ CN)	201((M+H) ⁺ , 100%). 218((M+NH ₄) ⁺ , 80%). 134 (50%) 123 (50%) 110 (100%)
<u>33 et 36</u>	6,67 (dd, J=6Hz, J=2Hz, 1H):H ₂ 6,57 (dd, J=6Hz, J=3Hz, 1H):H ₃ 6,21 (dd, J=7Hz, J=5Hz, 1H):H ₆ 6,10(dd, J=7Hz, J=5Hz, 1H):H ₅ 4,54-4,43 (m, 1H):H _{3a} 4,34-4,20 (m, 2H):H ₇ , H _{7a} 4,97 (dd, J=5Hz, J=1Hz, 1H):H ₄ (Dans CD ₃ CN)	217((M+H) ⁺ , 30%). 234((M+NH ₄) ⁺ , 100%). 186 (55%) 150 (50%) 134 (20%)

4-2-3 Recherche des dimères de sulfoxyde de thiophène dans l'urine de rats traités par le thiophène.

Dans le but de savoir si ces dimères de sulfoxyde de thiophène **31** et **32** se formaient aussi *in vivo*, nous avons recherché la présence de **31** et **32** dans l'urine de rats traités par le thiophène. L'analyse par HPLC de l'urine (figure 4-2) de rat traité au thiophène tritié a permis d'une part de confirmer la présence du métabolite majoritaire **28** mais également a montré l'existence d'un pic radioactif minoritaire (environ 2% de la dose administrée) dont le spectre UV et le temps de rétention sont identiques à ceux du métabolite **31** isolé *in vitro* ainsi qu'à ceux de l'authentique de synthèse **34 + 35** préparé comme le montre la figure 4-10. Le composé minoritaire observé *in vivo* a été purifié et coinjecté en HPLC avec l'authentique **34** et le produit **31** isolé *in vitro*. Les spectres UV et de masse ainsi que les temps de rétention de ces trois produits sont identiques. Il est probable que le produit **32** existe aussi mais la radioactivité représente moins de 0,5% des métabolites et nous n'avons pas cherché à l'isoler.

Il nous a donc été possible de conclure qu'un dimère de sulfoxyde de thiophène se forme aussi *in vivo* mais de façon minoritaire.

4-3 Discussion

Nous avons montré que le métabolisme du thiophène *in vivo* chez le rat conduit à deux métabolites principaux retrouvés dans l'urine. Le composé majoritaire **28** représente 30% de la dose administrée; le métabolite minoritaire **31** représente 2% de cette dose. De plus, il avait déjà été décrit qu'une partie importante du thiophène (32%) était éliminée sans transformation par voie pulmonaire. Toutes les études spectroscopiques réalisées sur le métabolite **28** (UV-Visible, RMN ^1H et ^{13}C ,

spectrométrie de masse) sont en accord avec une structure de type sulfoxyde de 2,5-dihydrothiophène substitué en 2 par le soufre de la N-acétylcystéine. Elles permettent aussi d'exclure tout à fait la structure **6b** proposée par Bray et coll, 1971. Le composé **28** possède trois centres asymétriques dont le carbone asymétrique de configuration connue de la N-acétylcystéine. Il possède donc quatre isomères. La structure fine des spectres RMN ¹H et RMN ¹³C du métabolite isolé indique qu'un seul de ces isomères est formé *in vivo* (en particulier ni le C₂ ni le CH₂ β ne sont dédoublés)

Un mécanisme très probable pour la formation de **28** *in vivo* est indiqué dans la figure 4-11. Il implique les étapes suivantes :

- a) Une S-oxydation du thiophène, probablement catalysée par un cytochrome P450, conduisant à la formation du sulfoxyde du thiophène, un métabolite réactif électrophile. La formation d'un tel métabolite réactif de type sulfoxyde de thiophène a été déjà démontrée dans le cas du métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique (IAT).
- b) Un piégeage du sulfoxyde de thiophène par le glutathion, correspondant à une addition de type Michael du soufre du GSH en position 2 du sulfoxyde de thiophène. Cette réaction peut être catalysée par une glutathion transférase. Une réaction analogue de piégeage du sulfoxyde de l'IAT par des nucléophiles soufrés avait été décrite auparavant (chapitre 1: figure 1-24).
- c) L'évolution habituelle des conjugués du GSH *in vivo* avec la formation finale du mercapturate (conjugué avec la N-acétylcystéine) correspondant. La formation d'un seul diastéréoisomère de **28** *in vivo* suggère que la réaction du GSH sur le sulfoxyde de thiophène est catalysée par une enzyme, vraisemblablement une glutathion transférase.

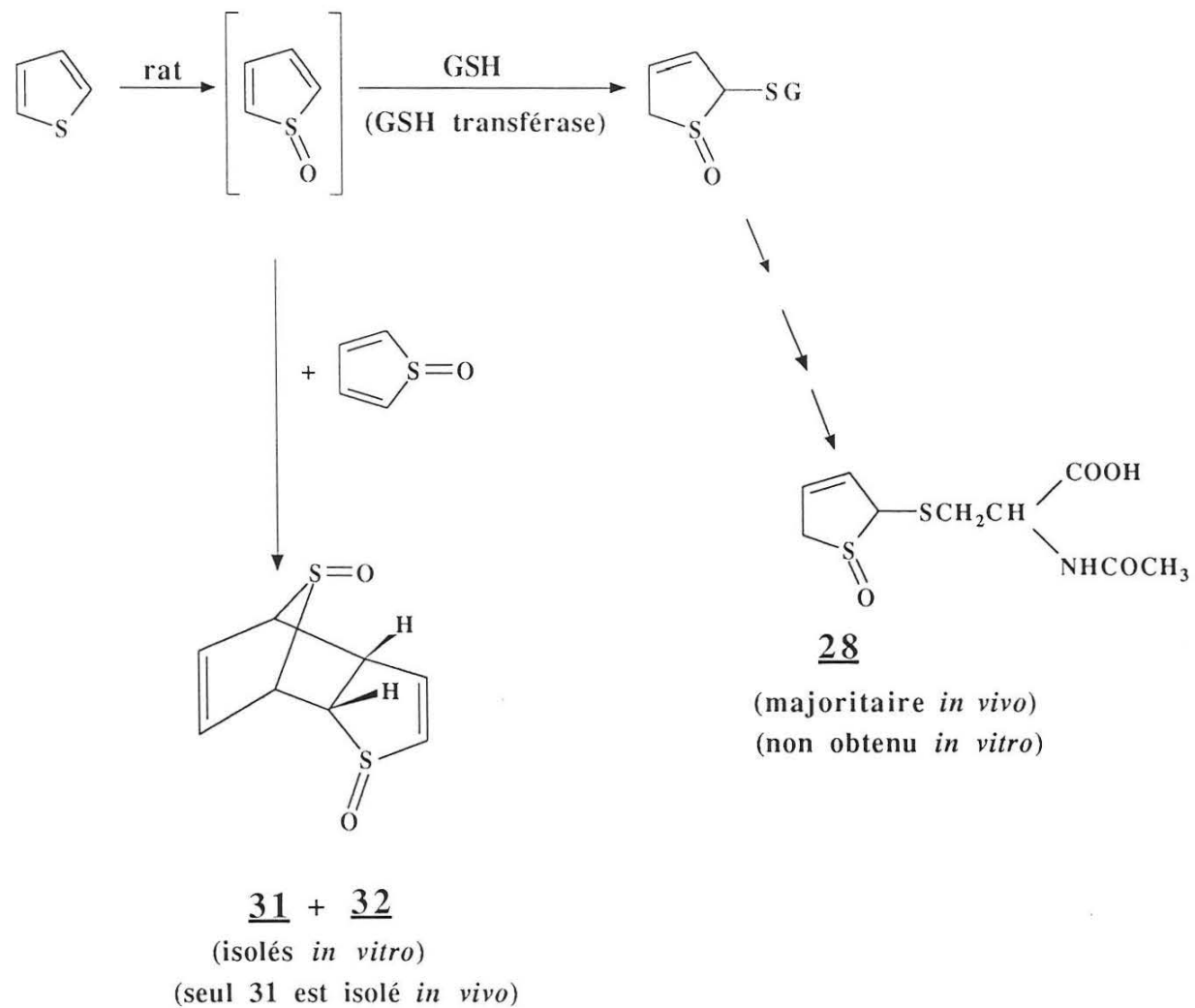


Figure 4-11

Métabolisme du thiophène *in vivo* chez le rat et *in vitro* avec des microsomes hépatiques de rat

La structure du métabolite minoritaire formé chez le rat traité par le thiophène (2% de la dose administrée) a été établie par comparaison des spectres RMN ^1H et de masse avec ceux d'un authentique préparé par oxydation chimique du thiophène par $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CF}_3\text{COOH}$. La formation du sulfoxyde du thiophène au cours d'oxydations chimiques du thiophène a été proposée à plusieurs reprises (Mock, 1970; Torsell, 1976; Kellog, 1984). Ce sulfoxyde n'a jamais pu être isolé, mais il a pu être piégé par réaction de Diels Alder sur lui même (dimérisation) ou avec d'autres piègeurs de Diels Alder. La formation de dimères du sulfoxyde de thiophène lors de l'oxydation chimique ($\text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}_2$) et du métabolisme oxydatif du thiophène *in vitro* conduisent en fait seulement à deux diastereoisomères, l'un d'entre eux étant très majoritaire (**31**). La formation de ces dimères *in vitro* et *in vivo* ne peut guère s'expliquer que par la S-oxydation du thiophène, vraisemblablement par un P450, suivie par une dimérisation de ce métabolite réactif par une réaction de Diels Alder. Il semble donc que le sulfoxyde de thiophène ait deux évolutions possibles *in vivo* (figure 4-11) :

- i) Un piégeage par le GSH (vraisemblablement catalysé par une GSH transférase)
- ii) Une réaction de Diels Alder sur lui même conduisant aux dimères **31** et **32**.

Lors du métabolisme du thiophène par des microsomes de foie de rats, seule la formation des dimères **31** et **32** a pu être observée, même en présence de GSH. Le métabolite **28** n'est pas formé dans ces conditions. Au contraire, *in vivo*, le métabolite **28** est très majoritaire, les dimères **31** et **32** n'étant formés qu'en très petites quantités. Cette différence de résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* peut s'expliquer aisément si l'on admet que l'addition du GSH au sulfoxyde de thiophène n'a pas lieu en l'absence de GSH transférase. Nous avons essayé de favoriser cette réaction *in vitro*

en utilisant de l'homogénat de foie de rat, ou en rajoutant aux microsomes des glutathions transférases semi purifiées de foie de rat mais sans succès. Une explication possible est que la glutathion transférase impliquée soit extrêmement fragile, soit qu'elle n'existe pas dans le foie mais seulement dans un autre organe (rein, poumon). *In vivo*, du fait de la présence d'une telle enzyme, la très grande majorité du sulfoxyde de thiophène est piégé par le GSH grâce à l'action de cette GSH transférase. Par contre, *in vitro*, cette GSH transférase n'est pas présente dans les microsomes hépatiques et la seule évolution possible du sulfoxyde est une réaction sur lui même conduisant à **31** et **32**.

La formation *in vivo* de **28** ainsi que celle des dimères **31** et **32** sont deux preuves supplémentaires de la formation des sulfoxydes de thiophène comme métabolites réactifs des dérivés thiophéniques.

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'étudier le métabolisme *in vitro* et *in vivo* de plusieurs composés thiophéniques afin de savoir si la sulfoxydation du noyau thiophène constatée dans le cas de l'isomère de l'acide tiénilique était un phénomène général.

L'étude du métabolisme du benzothiophène *in vivo* chez le rat a montré la formation majeure de deux mercapturates : les diastéréoisomères **A** et **A'** qui dérivent de la réaction du glutathion avec le sulfoxyde de benzothiophène, et les diastéréoisomères **B** et **B'** qui proviennent de la réaction du glutathion avec la sulfone de benzothiophène ou après oxydation de **A** et **A'** (ou de leurs précurseurs (conjugués de glutathion du sulfoxyde de benzothiophène)). Les structures de tous ces métabolites ont été établies de façon non ambiguë par comparaison avec des composés authentiques obtenus par synthèse chimique.

Les proportions **A/A'** et **B/B'** (#4/1) observées sont pratiquement identiques. De plus l'administration au rat du mélange **A + A'** conduit majoritairement à un mélange de métabolites **B + B'** avec une proportion **B/B'** égale à **A/A'** de départ. Par contre, l'administration de la sulfone du

benzothiophène au rat conduit à un mélange de métabolites **B + B'** avec un rapport proche de 1 (au moins pour les urines de 0-2 heures). D'autre part, la réaction purement chimique d'addition nucléophile de la N-acétylcystéine sur la sulfone du benzothiophène conduit aussi à un mélange **B + B'** avec un rapport **B/B'** égal à 1.

L'ensemble de ces résultats montre que les métabolites **A, A', B et B'** proviennent tous d'un métabolite primaire commun, le sulfoxyde de thiophène, dont la réaction avec le glutathion, catalysée par une glutathion transférase, conduit aux précurseurs des métabolites **A et A'** finalement excrétés dans l'urine.

L'intervention d'une glutathion transférase dans cette réaction est suggérée par la proportion **A/A'** des métabolites nettement différente de celle obtenue lors de la réaction purement chimique de la N-acétylcystéine avec le sulfoxyde de thiophène (~1). Les métabolites **B et B'** doivent provenir majoritairement d'une S-oxydation ultérieure de **A et A'** catalysée par un cytochrome P450 ou une monooxygénase à flavine.

Des métabolites minoritaires, **D, D' et E** du benzothiophène ont aussi été mis en évidence; leur importance croît dans l'urine vieillie. **D et D'** dérivent d'une réduction de la fonction sulfoxyde; **E** provient d'une aromatisation par déshydratation de **D et D'**. Là aussi la structure de ces produits a été prouvée par comparaison avec des composés authentiques préparés par synthèse.

L'étude réalisée dans un deuxième temps sur le 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène et ses dérivés avait pour but d'essayer de comprendre le mécanisme de la 5-hydroxylation des 2-arylothiophènes. Chez le rat *in vivo* et *in vitro* avec les microsomes de foie de rat, le 2-(4-chlorobenzoyl)benzothiophène est transformé en deux métabolites primaires : le sulfoxyde correspondant **16**, et l'alcool **17**

dérivent d'une réduction du groupe carbonyle. Le métabolite attendu, et qui correspondrait à une isomérisation du sulfoxyde **16** (ou à une attaque nucléophile de H₂O en 3 suivie d'une déshydratation comme ce qui est proposé pour la 5-hydroxylation des 2-aryylthiophènes) en dérivé hydroxylé en 3, **19** a pu être détecté. Il semble formé seulement en faibles quantités. Toutefois nous avons montré qu'il est très rapidement transformé par les microsomes hépatiques avec formation de deux métabolites correspondant à une oxydation ultérieure sur le soufre, **20** ou sur le noyau phényl, **22**. Ces deux métabolites **20** et **22** sont d'ailleurs retrouvés lors du métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl)benzothiophène chez le rat.

Ces résultats montrent que le métabolisme du 2-(4-chlorobenzoyl)benzothiophène passe majoritairement aussi par une S-oxydation. L'isomérisation du sulfoxyde correspondant en dérivé 3-hydroxylé par les enzymes microsomale n'a pas pu être démontrée sans ambiguïté. Toutefois la nature des métabolites formés qui dérivent d'une oxydation du produit de départ (et pas d'une réduction de la fonction carbonyle) peut s'interpréter par un schéma faisant intervenir une telle isomérisation de **16** en **19**, suivie d'oxydations ultérieurs soit sur le soufre soit sur le noyau phényl.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié le métabolisme du thiophène lui même chez le rat. Nous avons pu montrer que le métabolisme du thiophène *in vivo* conduit à deux métabolites majeurs. Le métabolite urinaire le plus important (environ 30% de la dose administrée) a été isolé et complètement caractérisé par spectroscopie UV-visible, RMN ¹H, RMN ¹³C et spectrométrie de masse. Il a pu être établi sans ambiguïté que ce métabolite est le sulfoxyde du 2,5-dihydrothiophène substitué en 2 par le soufre de la N-acétylcystéine **28**. Un seul des quatre

isomères possibles de ce composé semble être formé. Un mécanisme très probable pour sa formation implique :

-Une S-oxydation du thiophène, probablement catalysée par un cytochrome P450

-Une addition nucléophile du glutathion en position 2 du thiophène sulfoxyde, probablement catalysée par une glutathion transférase dans la mesure où un seul isomère (sur les quatre possibles) semble se former.

-La transformation habituelle de ce conjugué au glutathion en mercapturate correspondant.

L'étude de l'oxydation du thiophène par les microsomes de foie de rat a permis d'établir la structure du métabolite minoritaire (2%) observé *in vivo* chez le rat.

En effet, l'oxydation *in vitro* du thiophène ne conduit qu'à deux métabolites isomères l'un de l'autre, **31** et **32**. Ces métabolites sont des dimères du sulfoxyde de thiophène obtenus par une réaction de Diels Alder du sulfoxyde sur lui même.

Le métabolite majoritaire *in vitro*, **31** est identique au métabolite minoritaire détecté dans l'urine des rats traités par le thiophène.

La structure des composés **31** et **32** a pu être établie par comparaison à des authentiques préparés chimiquement par oxydation du thiophène par le système $H_2O_2 + CF_3COOH$. Cette structure est en accord avec les spectres UV-visible, RMN 1H , RMN ^{13}C et de masse des métabolites et des authentiques.

Ces résultats établissent la formation du sulfoxyde de thiophène comme métabolite majeur du thiophène *in vitro* et *in vivo*. L'évolution de ce sulfoxyde est différente *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, il réagit efficacement avec le glutathion (addition nucléophile en position 2) vraisemblablement grâce à une glutathion transférase, ce qui aboutit à la formation du métabolite majoritaire **28** qui représente à lui seul 30% de la dose

administrée. En absence de cette glutathion transférase c'est à dire, dans les conditions *in vitro*, cette réaction n'a pas lieu (même en présence du glutathion) et la dimérisation du sulfoxyde par réaction de Diels Alder conduit aux seuls métabolites observés.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail met clairement en évidence l'importance majeure de la formation de sulfoxydes de thiophène dans le métabolisme *in vivo* et *in vitro* de trois dérivés thiophéniques : le thiophène lui même, le benzothiophène et le 2-(4-chlorobenzoyl)benzothiophène. Ils confirment et généralisent les résultats publiés précédemment sur la formation d'un sulfoxyde de thiophène démontrée dans le cas de l'isomère de l'acide tiénilique, et suggérée dans le cas de l'acide tiénilique lui même. Ils confirment aussi la grande réactivité de la plupart de ces sulfoxydes de thiophène vis à vis des nucléophiles qui explique l'importance de la formation de métabolites du type mercapturates. La réaction possible de ces sulfoxydes avec les nucléophiles cellulaires devrait avoir des conséquences importantes en toxicologie, comme ceci a été montré pour l'acide tiénilique et l'isomère de l'acide tiénilique.

Perspectives ouvertes par ce travail

Dans la continuité de ce travail, nous proposons une étude métabolique des dérivés thiophéniques étudiés dans ce travail, sur des organes isolés perfusés (foie, rein) ou sur des tranches de ces mêmes organes, pour essayer de comprendre dans quel organe, se fait *in vivo* la conjugaison du glutathion au sulfoxyde de thiophène intermédiaire. Ces études peuvent permettre aussi de comprendre pourquoi *in vitro*, l'étude métabolique avec des microsomes de foie de rat ne conduisait pas à la formation des

adduits de glutathion (absence probable de glutathion transférase dans les microsomes).

Il serait aussi très intéressant de mener en parallèle des études chimiques et métaboliques sur d'autres dérivés du thiophène, substitué en 2 ou en 3 par différents groupements donneurs ou accepteurs et de voir comment la nature des substituants pourrait influencer sur la réactivité de ces sulfoxydes de thiophène (attaques nucléophiles ou dimérisation de type Diels Alder).

Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène

.....
CHAPITRE CINQUIEME
.....

ETUDE EXPERIMENTALE

6-1 Origine des animaux.

Des rats mâles, de souche Sprague Dawley (origine : IFFA-Credo), pesant 200 à 250 g environ, ont été utilisés pour les différentes études. Ces animaux sont répartis de façon aléatoire. Ils ont été hébergés en caisson avec renouvellement d'air filtré à une température constante, dans des conditions hygrométriques stables et avec un éclairage de rythme nyctéméral. La nourriture (AOA, UAR, 91-Epinay sur Orge) et l'eau de boisson ont été données "ad libitum".

6-2 Origine des produits chimiques et des enzymes.

La numérotation du benzothiophène, du sulfoxyde de benzothiophène, de la sulfone de benzothiophène et de leurs adduits avec la N-acétylcystéine est représentée dans la figure 6-1.

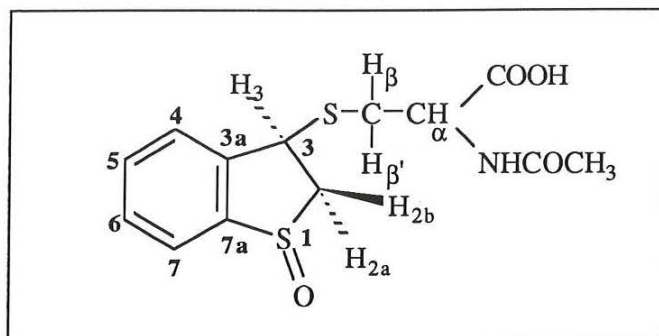


Figure 6-1

Exemple de numérotation de l'adduit du sulfoxyde de benzothiophène avec la N-acétylcystéine

6-2-1 Le benzothiophène

Le benzothiophène, C_8H_6S , 97%, de masse moléculaire 134,2; de densité 1,1490, est commercialisé par Aldrich Chemical Compagny et Janssen. Il porte le nom de "Thianaphène."

6-2-2 Le benzothiophène radioactif (BZT- 3H)

Le benzothiophène radioactif (BZT- 3H), marqué en position 2, a été synthétisé par lithiation de 280 mg de BZT avec le butyl lithium, dans 20 ml de THF puis une réaction avec 20 μ l de 3H_2O (1Ci/ml), suivi par 100 μ l de H_2O , pour donner après extraction à l'ether et lavage à l'eau, environ 270 mg de BZT- 3H (5mCi/mole). Le rendement radioactif est de 50%.

6-2-3- Synthèse du sulfoxyde de benzothiophène

Le benzothiophène sulfoxyde a été synthétisé par I.Erdelmeier par oxydation de 500 mg de benzothiophène dans 17 ml de CF_3COOH , et 1,27 ml de H_2O_2 30%, à 0°C pendant 1 heure. 400 ml de solution saturée de $NaHCO_3$ sont ajoutés à 0°C. Il est extrait par 100 ml de CH_2Cl_2 puis lavé avec $NaHCO_3$ jusqu'à la neutralité. La solution de 5 mg/ml est stable et est

conservée à -20°C . La RMN ^1H dans CD_2Cl_2 présente les caractéristiques suivantes ((J en Hertz, δ en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$), s=singulet, d=doublet)) : 7,07 ppm (d, J = 6,8Hz) : H₂; 7,24 ppm (d, J = 6,8Hz) H₃; 7,89 ppm (d, J = 7,4Hz) : H₄ ; 7,5 ppm (m) : H₅, H₆, H₇

Les rats ont été traités avec une solution huileuse, obtenue par concentration du chlorure de méthylène et addition du dixième du volume initial d'huile puis évaporation du reste de CH_2Cl_2 pour donner 50 mg/ml de produit. Cette solution est instable et polymérise lentement en cristaux blancs.

6-2-4 Synthèse de l'adduit du sulfoxyde de benzothiophène avec le mercaptoéthanol

La synthèse de cet adduit a été réalisée par I.Erdelmeier en présence de méthylate de sodium et du mercaptoéthanol dans le méthanol. Un produit cristallin blanc a été obtenu. La structure aux rayons X montre la formation du sulfoxyde de 2,3-dihydrobenzothiophène substitué en 3 par le soufre du mercaptoéthanol en cis par rapport à l'oxygène du sulfoxyde. La structure a été établie par la RMN ^1H , RMN ^{13}C et la spectroscopie infra-rouge. ((J en Hertz, δ en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$), s=singulet, d=doublet)) :

La RMN ^1H (dans CDCl_3) :

2,64-2,73 ppm (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}-$), 3,44 ppm (dd, J = 15Hz, J = 4,5 Hz, 1H) : H_{2a}, 3,45-3,69 ppm (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4,05 ppm (dd, J = 15Hz, J = 8 Hz, 1H) : H_{2b}, 4,63 ppm (dd, J = 8, J = 4,5 Hz, 1H) : H₃, 7,49 ppm (m, 1H) : H₆, 7,56-7,73 ppm (m, 2H) : H₄; H₅, 7,79 ppm (m, 1H) : H₇.

RMN ^{13}C (dans CDCl_3) :

33,2 ppm (SCH_2), 60,1-61,5 ppm (C_2 , CH_2O), 126,4-126,9 ppm (C_6 , C_7), 129,4 ppm (C_4), 132,6 (C_5), 142,1 ppm (C_{3a}), 143,8 (C_{7a}).

IR (KBr) cm^{-1} : 1055 (S-O).

6-2-5- Synthèse de l'adduit du sulfoxyde du benzothiophène avec la N-acétylcystéine

L'adduit avec la N-acétylcystéine a été synthétisé par réaction dans le méthanol, en présence de méthylate de sodium et de N-acétylcystéine, à 0°C pendant 45 min. Il y a formation d'un mélange 50/50 de deux diastéréoisomères **4A** et **4A'**. La structure est établie par une étude spectrale (RMN ¹H, RMN ¹³C, masse, IR). ((J en Hertz, δ en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (Si(CH₃)₄), s=singulet, d=doublet, q= carbone quaternaire)

RMN ¹H (dans CD₃OD) :

4A : 2,02 ppm (s, 3H, CH₃), 3,05 ppm (m, 2H) : H_β, H_{β'}, 3,23 ppm (dd, J=4,7Hz; J=14Hz, 1H) : H_{2a}, 4,23 ppm (dd, J=7,7Hz; J=14Hz, 1H) : H_{2b}, 4,61 ppm (dd, J=5Hz; J=7,5Hz 1H) : H_α, 4,79 ppm (dd, J=4,7Hz; J=7,7Hz, 1H) : H₃, 7,55 ppm (s, 1H) : H₄, 7,7 ppm (m, 2H) : H₅, H₆, 7,85 ppm (d, J=8Hz 1H) : H₇

4A' : 2,03 ppm (s, 3H, CH₃), 2,9 ppm (m, 2H) : H_β, H_{β'}, 3,20 ppm (dd, J=5Hz; J=14Hz, 1H) : H_{2a}, 4,20 ppm (dd, J=8,7Hz; J=14Hz, 1H) : H_{2b}, 4,68 ppm (dd, J=7,5Hz; 1H) : H_α, 4,79 ppm (dd, J=4,7Hz; J=7,7Hz, 1H) : H₃, 7,55 ppm (s, 1H) : H₄, 7,7 ppm (m, 2H) : H₅, H₆, 7,85 ppm (d, J=8Hz 1H) : H₇

RMN ¹³C (dans CD₃OD) : 34-34,5 ppm (2s, CH, C_β), 48-48,2 ppm (2s, C₃), 54-54,3 ppm (2s, CH, C_α), 60,5 (s élargi, CH₂, C₂), 65 ppm (s, CH₃), 127,6 ppm (s, CH, C₇), 128,3 ppm (s, CH, C₆), 130,7 ppm (s, CH, C₄), 134 ppm (s, CH, C₅), 144 ppm (s, C_q, C_{3a}), 145 ppm (s, C_q, C_{7a}), 170,9 ppm (s, C_q, COOH), 171,9 ppm (s, C_q, COOH)

Masse : (ionisation chimique, NH₃) : 314 ((M + H)⁺, 100%), 331 ((M + NH₄)⁺, 30%)

IR : SO (1020, bande large) (1070, s)

6-2-6- Synthèse de l'adduit de la sulfone du benzothiophène avec la N-acétylcystéine

La sulfone de benzothiophène utilisée est celle commercialisée par Lancaster sous le nom de "Thianaphtene 1,1-dioxide". La réaction de la sulfone de benzothiophène et de son adduit avec la N-acétylcystéine, a été réalisée par G. Rubinstenn, en présence de méthylate de sodium et de N-acétylcystéine dans le méthanol. La réaction est rapide et permet d'obtenir un mélange 1/1 de deux diastéréoisomères **4B** et **4B'**. La structure est établie par une étude spectrale (RMN ^1H , RMN ^{13}C , masse, IR). ((J en Hertz, δ en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$), s=singulet, d=doublet, q=quaternaire)) :

RMN ^1H (dans CD_3OD) :

4B : 2,02 ppm (s, 3H, CH_3), 3,1 ppm (m, 2H) : H_β , $\text{H}_{\beta'}$, 3,65 ppm (dd, $J=5,5\text{Hz}$; $J=14\text{Hz}$, 1H) : H_{2a} , 4,1 ppm (dd, $J=7,5\text{Hz}$; $J=14\text{Hz}$, 1H) : H_{2b} , 4,67 ppm (dd, $J=5,5\text{Hz}$; $J=7,5\text{Hz}$, 1H) : H_α , 4,91 ppm (dd, $J=5,5\text{Hz}$; $J=7,5\text{Hz}$, 1H) : H_3 , 7,60 ppm (s, 1H) : H_4 , 7,75-7,85 ppm (m, 3H) : H_5 , H_6 .

4B' : 2,04 ppm (s, 3H, CH_3), 2,85 ppm (m, 2H) : H_β , $\text{H}_{\beta'}$, 3,67 ppm (dd, $J=5,5\text{Hz}$; $J=14\text{Hz}$, 1H) : H_{2a} , 4,05 ppm (dd, $J=7,5\text{Hz}$; $J=14\text{Hz}$, 1H) : H_{2b} , 4,67 ppm (dd, $J=5,5\text{Hz}$; $J=7,5\text{Hz}$, 1H) : H_α , 4,85 ppm (dd, $J=5,5\text{Hz}$; $J=7,5\text{Hz}$, 1H) : H_3 , 7,60 ppm (s, 1H) : H_4 , 7,75-7,85 ppm (m, 3H) : H_5 , H_6 .

RMN ^{13}C (CD_3OD) : 23,5 ppm (2s, CH_3 , CO-CH_3), 34-34,5 ppm (2s, CH_2 , C_β), 42-42,43 ppm (2s, CH , C_3), 52,4-52,9 ppm (2s, CH , C_α), 58,7 ppm (s, CH_2 , C_2), 121,5 ppm (s, CH , C_7), 128,4 ppm (s, CH , C_6), 130,5 ppm (s, CH , C_4), 134,5 ppm (s, CH , C_5), 139-140,5 ppm (s, C_q , C_{3a}), 145 ppm (2s, C_q , C_{3a} , C_{7a}), 170,9 ppm (s, C_q , COOH), 171,5 ppm (s, C_q , CO).

Masse : (ionisation chimique, NH₃) : 330 ((M + H)⁺, 100%), 347 ((M + NH₄)⁺, 30%)

IR : SO₂ (1300, s) (1100, s)

6-2-7- Synthèse des authentiques des métabolites D et D'

(3-N-acétylcystéine-2,3-dihydro-benzothiophène)

La synthèse a été réalisée par G.Rubinstenn. Ces authentiques ont été obtenus par la réduction de l'adduit du sulfoxyde de benzothiophène (4A et 4A'), par chauffage en présence de méthanol, d'acide acétique et de mercaptoéthanol. Il y a formation de deux produits difficiles à séparer 4D et 4D'. La structure a été déterminée par une étude spectrale (RMN ¹H, RMN ¹³C, masse). ((J en Hertz, δ en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (Si(CH₃)₄), s=singulet, d=doublet, q=quaternaire) :

RMN ¹H (dans CD₃OD) : 2,0 ppm (s, 3H, CH₃), 3,1 ppm (m, 2H) : H_β, H_β', 3,4 ppm (dd, J=5,5Hz; J=12Hz, 1H) : H_{2a}, 3,8 ppm (dd, J=7,5Hz; J=12Hz, 1H) : H_{2b}, 4,65 ppm (m, 1H) : H_α, 4,75 ppm (dd, J=5,5Hz; J=7,5Hz, 1H) : H₃, 7,1 ppm (m, 1H) : H₄, 7,25 ppm (m, 2H) : H₅, H₆, 7,36 (d, J=7,5Hz, 1H, H₇)

RMN ¹³C (dans CD₃OD) : 22 ppm (s, CH₃, CO-CH₃), 33,5 ppm (s, CH₂, C_β), 41 ppm (s, CH₂, C₂), 53 (s, CH, C₃), 54 ppm (s, CH, C_α), 123-125 ppm (s, CH, C₇, C₆), 126-129 ppm (s, CH, C₄, C₅) 173,3 ppm (s, C_q, COOH), 173,5 ppm (s, C_q, CO).

Masse : (ionisation chimique, NH₃) : 298 ((M + H)⁺, 100%), 315 ((M + NH₄)⁺, 25%)

6-2-8 Synthèse de l'authentique du métabolite E (l'acide benzothiényl-3-mercapturique)

La synthèse a été réalisée par DoCao Thang. Cet authentique a été obtenu par la réaction de la N-acétylcystéine sur le 3-bromo-benzothiophène, en chauffant à 100 °C, en présence de CuI dans le DMF, selon la méthode

d' Hickman utilisée pour le composé mercapturique dérivé du thiophène (Hickman et coll, 1985; Dansette et coll, 1992).

RMN ^1H : (DMSO d_6), (δ en ppm par rapport au signal du $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, J en Hertz, s = singulet, d = doublet, m = multiplet) : 1,83 ppm (s, 3H) : CH_3 , 3,07-3,27 (m, 2H) H_β : 4,33 ppm (dd, 1H) : H_α , 7,4-7,5 ppm (m, 2H) : H_5 , H_6 , 7,83 ppm (dd, J = 7,2 Hz, J = 2Hz) : H_4 , 7,80 (s, 1H) H_2 : 8,03 ppm (J = 7,2 Hz) : H_7 , 8,35 ppm (dd, J = 7,5 Hz) : NH.

Masse : m/z, (%), IE, 295 (M^+ , 3), 277 (0,5), 236 (4), 166 (100), 134 (33), 121 (55). IC, NH_3 , 313 ($(\text{M} + \text{NH}_4)^+$, 40), 296 ($(\text{M} + \text{H})^+$, 75), 278 (25), 182 (45), 166 (65), 147 (100), 130 (63).

6-2-9 Les benzothiophènes substitués.

Ils ont été synthétisés au laboratoire par Pascale Pouzet et Do Cao Thang (voir chapitre 3).

6-2-10 Le Thiophène.

Le Thiophène, $\text{C}_4\text{H}_4\text{S}$, 99%, de masse moléculaire 84.14, de densité 1.0510, est commercialisé par Prolabo (tubes scellés de 100 ml) ou Janssen (flacon de 500 ml). Nous avons aussi utilisé le thiophène radioactif comme traceur pour détecter les métabolites dans les urines. Ce produit a été préparé au laboratoire par P.M. Dansette. La tritiation des positions 2 et 5 est effectuée par échange facile de H_2 et H_5 en milieu acide ($\text{CF}_3\text{COO}^3\text{H}$) selon une méthode décrite dans la littérature (Ostman et coll, 1960). Un mélange de 1 ml de thiophène, 0,2 ml d'anhydride trifluoroacétique et 10 μl de l'eau tritiée (1 Ci.g $^{-1}$) a été chauffé pendant 16h à 30°C. Après une dilution avec 2 ml de H_2O et 4 ml d'huile de maïs et plusieurs extractions avec H_2O jusqu'à l'élimination totale de la radioactivité de la phase aqueuse, la solution huileuse a été séchée sur Na_2SO_4 et centrifugée. La solution de thiophène tritié obtenue dans l'huile a une radioactivité spécifique de 0,4 mCi par ml (0,16 mCi par mmol). Les rats sont traités avec (0,2g, 400 $\mu\text{Ci/kg}$)

6-2-11 Synthèse de l'authentique du métabolite 29

L'authentique de synthèse du métabolite 29 a été réalisé au laboratoire par Do Cao Thang selon une méthode décrite dans la littérature (Hickman et coll, 1985). Le 2-iodothiophène (Aldrich) dans 12,5 ml DMF est maintenu à 100°C au bain marie, sous argon. On ajoute une solution de 0,81g de N-acétylcystéine plus 0,15 de l'iodure de cuivre dans 12,5 ml de DMF. On chauffe pendant 72 heures. La solution est centrifugée, le surnageant est ajouté dans l'eau glacée (75 ml) et ajusté à pH 2 à l'aide de l'HCl. Il y a formation d'un précipité qu'on sépare par centrifugation. On extrait le surnageant par CHCl₃ (4X25 ml), on sèche sur MgSO₄. Après concentration sous vide on obtient 0,43g de produit brut. Après chromatographie sur silice et élution par un mélange acétate d'éthyle, chloroforme, acide formique 6/4/1, on obtient un produit jaune pale (0,35g) 28%. On recristallise dans l'acétate d'éthyle. PF = 160-160,5°C. RMN (D₂O/NaOH) (δ en ppm par rapport au signal du Si(CH₃)₄, m = multiplet) : 1,95 ppm (COCH₃), 2,9-3,2 ppm (m, CH₂ β), 4,1-4,3 (m, CH α), 6,9-7,5 ppm (m, 3H, 2 thiényl). Masse : 245 (6%, M⁺), 186 (36%, M-NH₂COCH₃), 130 (58%, M-S-thienyl) , 71 (62%), 45 (49%, HCO₂), 43 (100%, COCH₃).

6-2-12 La β -glucuronidase et la sulfatase.

Les deux enzymes sont commercialisées par SIGMA, sous l'appellation : β -glucuronidase from Helix Pomatia.

6-2-13 SOLUENE-350 (Solubilisateur des tissus).

6-3 Appareils de mesure et d'analyse.

-HPLC : Appareil Touzart et Matignon 380, équipé de pompes A110, d'un programmeur Altex 320, d'un détecteur UV Spectrafocus de

Spectraphysics et d'un collecteur de fraction LKB. Le traitement de données est réalisé à l'aide du logiciel Focus (Spectraphysics) sur un IBM-PS2.

Les séparations analytiques ont été obtenues à l'aide d'une colonne Hypersil MOS, 5 μ , (250 x 4,6 mm) (SFCC Shandon). Les séparations préparatives ont été réalisées à l'aide d'une colonne semi-préparative Hypersil MOS 5 μ (250 x 7,5 mm) (SFCC Shandon).

-RMN : Les spectres RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker WM, opérant à 250 MHz, équipé d'un ordinateur Aspect 2000 ou sur un AMX 500 MHz.

-UV : Les spectres d'absorption UV-Visible ont été enregistrés sur un appareil KONTRON 820.

-IR : Les spectres d'absorption infra-rouge ont été réalisés sur un appareil Nicolet NIC 5DX (pastille KBr) ou sur un Perkin IR (nujol).

-PR : Polarimètre Perkin Elmer.

-PF : Le point de fusion des métabolites a été mesuré sur un banc Koeffler ou en tube capillaire sur un appareil Büchi.

-SM : Les spectres de masse ont été réalisés par Nicole Morin, au laboratoire de chimie de l'Ecole Normale Supérieure, à l'aide d'un Spectromètre NERMag R10-10C, opérant aussi bien en mode impact électronique (70 eV) qu'en ionisation chimique (NH₃). Les résultats sont exprimés en pourcentage du pic de base (100%).

-Comptage de la radioactivité : Packard Tri - Carb 300, scintillant Pico - Fluor TM 40, avec correction de quenching par la méthode du rapport des canaux ou du standard externe.

6-4 Etudes *in vivo*

6-4-1 Traitement des rats par le benzothiophène.

6-4-1-1 Traitement des rats et isolement des métabolites urinaires du benzothiophène.

Des rats de 200 à 250 g, ont été traités par 50 mg environ de benzothiophène (200 mg/kg), en solution dans 250 µl d'huile de maïs, en intrapéritonéale. On collecte les urines dans une cage à métabolisme pendant 24 à 33 heures. L'échantillon urinaire est filtré sur coton de fibres de verre, acidifié à pH 4 avec de l'acide acétique (20 µl/ml d'urine) et injecté dans des colonnes SepPak C18 (préalablement préparés avec du méthanol (5ml) et de l'eau millipore (20ml)). Ensuite le SepPak est lavé avec 2 ml d'eau. L'élution se fait avec 2 ml d'un mélange CH₃OH/H₂O 60% et ensuite 2ml du méthanol pur. Les deux éluats sont concentrés et centrifugés à 3000 Trs/min et analysés par HPLC. Les produits polaires passent dans le volume mort et dans les premiers lavages à l'eau acidulée. Les produits plus hydrophobes sont élués par du méthanol (2 ml). Les séparations analytiques sont obtenues en utilisant un gradient à partir du solvant A = CH₃COONH₄ 0,1M pH 4,6 pendant une minute, puis de 0 à 100% à partir du solvant B = CH₃CN 50% en 20 min.

La méthode de purification préparative consiste en deux étapes : une chromatographie en gradient acétate d'ammonium qui permet de séparer les divers produits puis une repurification en CF₃COOH, en isocratique qui permet d'isoler la forme acide des métabolites. Suivant les produits, des concentrations variables en solvant B ont été utilisées. Ainsi, nous avons utilisé des conditions particulières d'HPLC, en fonction du temps de

rétenion de chacun des métabolites du benzothiophène. Les différents métabolites ont été purifiés par des mélanges éluants de solvant A = CF₃COOH/H₂O (1/1000, v/v) et de solvant B = CH₃CN/H₂O (50/50, v/v) en isocratique. On utilise 28%, 50%, 60% et 70% du solvant B, respectivement pour les métabolites (A et A'), (B et B'), (D et D') et E. Les métabolites ainsi purifiés sont lyophilisés ou évaporés à sec au Rotavapor sous vide et à froid. Les produits obtenus ont été ensuite étudiés par diverses méthodes physiques (UV, IR, RMN, Masse) .

6-4-1-2 Traitement des rats et isolement des métabolites urinaires du benzothiophène radioactif (BZT-³H).

Des rats mâles Sprague-Dawley, ont été traités avec du benzothiophène marqué ((BZT-³H, 200 mCi/mole (200mg/kg, soit 50mg ou 65µC/rat)) en ip. L'urine est récoltée à des intervalles de temps variables. Les différentes analyses ont été réalisées de la même manière que ci-dessus (méthode analytique). La cinétique d'élimination des métabolites radioactifs a été réalisée grâce au comptage des fractions collectées après analyse par HPLC.

6-4-1-3 Traitement des rats et isolement des métabolites urinaires du sulfoxyde de benzothiophène, de la sulfone de benzothiophène et des produits A et A'

Le sulfoxyde et la sulfone de benzothiophène ont été administrés en ip, dans l'huile, à la dose de 100 mg/kg. Les produits A et A' (adduits du sulfoxyde de benzothiophène avec la N-acétylcystéine, purifiés à partir des urines) ont été administrés à la dose de 10 mg/rat. L'urine a été récoltée pendant de 24 heures et chaque fraction ainsi que le total des fractions urinaires ont été analysés par HPLC.

6-4-2 Traitement des rats par les benzothiophènes substitués

30 à 40 mg de benzothiophènes substitués en solution dans l'huile de maïs ont été administrés à des rats de 200 à 250 g, en ip. Les urines de 24 heures ont été collectées et traitées par les méthodes suivantes :

6-4-2-1 Passage de l'urine sur SepPak

L'échantillon urinaire est filtré sur coton de fibre de verre, acidifié à pH 4 avec l'acide acétique (20 µl/ml d'urine) et injecté dans des colonnes SepPak C18 (après les avoir préparées avec du méthanol (5 ml) et de l'eau Millipore (20 ml)). Ensuite le SepPak est lavé avec 2 ml d'eau. L'élution se fait avec 2 ml d'un mélange CH₃OH/H₂O 60% puis avec 2ml de méthanol pur. Les deux fractions sont mélangées, concentrées, centrifugées à 13000 Trs/min et enfin analysées par HPLC. Les séparations analytiques ont été faites en utilisant un gradient à partir du solvant A = CH₃COONH₄, 0,1M pH = 4,6 pendant une minute puis un gradient linéaire pendant 15 min de 0 à 100% du solvant B = CH₃CN 90% dans l'eau. Les séparations préparatives ont été faites en utilisant un gradient à partir du solvant A = CF₃COOH, 0,1% dans l'eau pendant une minute puis un gradient linéaire pendant 20 min de 0 à 100% du solvant B = CH₃CN 90% dans l'eau.

6-4-2-2 Hydrolyse de l'urine par la sulfatase et la β-glucuronidase.

1 ml d'urine est dilué dans 1 ml de tampon acétate 0,1M pH 5,2. On ajoute 420 unités de β-glucuronidase et 9 unités de sulfatase. L'ensemble est incubé à 37°C, pendant 2 heures puis centrifugé à 4°C, 3000 Trs/min pendant 15 min. Le but de ce protocole est d'hydrolyser les glucuronides et les sulfates urinaires, de rendre les métabolites moins polaires et donc de les faire passer plus facilement dans les solvants organiques. Par conséquent, si les métabolites sont sous forme de glucuronides ou de sulfates, le chromatogramme sera simplifié. Les métabolites du composé **15**, le 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène ont été quantifiés en préparant exactement des solutions de 1 mg/ml pour chaque authentique

de synthèse. 20 µl du produit (soit 20 µg) est alors analysé par HPLC. Dans chaque cas la hauteur du pic est mesurée et servira à quantifier les produits formés. La quantification des métabolites du composé **19**, le 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène-3-Hydroxy est réalisée en faisant appel à la méthode des intégrations des surfaces des pics chromatographiques, en utilisant un étalon interne qui est le composé **15**. Grâce à la courbe d'étalonnage il nous a été facile de déterminer la surface des pics correspondant aux métabolites et de les quantifier par la suite.

6-4-2-3 Hydrolyse de l'urine par l'acide chlorhydrique et par l'acide trifluoroacétique.

Un aliquot d'urine de 300 µl est acidifié à pH 1 par CF₃COOH ou par HCl, puis incubé à 37°C pendant deux heures. L'échantillon est enfin analysé par HPLC.

6-4-2-4 Extraction des métabolites par CH₂Cl₂ après hydrolyse de l'urine

Les incubations sont arrêtées avec 1 ml de CH₃CN et 3 ml de CH₂Cl₂. On centrifuge; le culot est éliminé; les phases aqueuses et organiques sont séparées, évaporées à sec puis reprises dans un mélange de solvant (H₂O/CH₃CN ou H₂O/CH₃OH) et enfin analysées par HPLC.

6-4-3 Traitement des rats par le thiophène radioactif et isolement des métabolites urinaires.

6-4-3-1 Isolement des métabolites urinaires

La cinétique et l'élimination des métabolites radioactifs du thiophène ont été obtenues, en traitant des rats, par une injection intrapéritonéale, avec la solution de thiophène radioactif (décrite ci-dessus), dans l'huile de tournesol (1 µl /g de rat). On récupère les urines de 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-12 h, 12-16 h, 16-24 h et de 24-33 h.

L'échantillon urinaire est filtré sur coton de fibre de verre, acidifié à pH 4 avec l'acide acétique (20 µl/ml d'urine) et injecté dans des colonnes

SepPak C18 (après les avoir préparées comme avant (Cf 6-4-2-1). Ensuite le SepPak est lavé avec 2 ml de H₂O et élué avec 2 ml d'un mélange CH₃OH/H₂O 20%. L'éluat est concentré et centrifugé à 13000 Trs/min et enfin analysé par HPLC. Les séparations analytiques ont été faites en utilisant un gradient à partir du solvant A = CH₃COONH₄ 0,1 M pH 4,6 pendant une minute puis un gradient linéaire pendant 20 min de 0 à 100% à partir du solvant B = CH₃CN 50% dans l'eau ou un autre gradient à partir de CF₃COOH 0,1% dans l'eau pendant une minute, puis un gradient de 0 à 100% de CH₃CN 50% dans l'eau pendant 20 min. L' HPLC préparative est réalisée en isocratique, 94% de CF₃COOH 0,1% dans l'eau + 6% de CH₃CN 50% dans l'eau. Le spectre UV est obtenu par scanning du Focus de 220 à 320 nm ou de 195 à 300 nm.

6-4-3-2 Extraction du thiophène tritié des fécès.

Les fécès de rat (0-33h) sont déposés dans un ballon de 250 ml, lyophilisés pendant 24h, broyés sous la hotte, à l'aide d'un mortier. Ensuite dans un flacon de 25 ml, on met 80 mg de fécès, 200 µl d'eau millipore et 1 ml de soluène-350 (solubilisateur de tissus). L'ensemble est porté à une température de 60 °C pendant 24h jusqu'à solubilisation.

10 ml de scintillant (Toluène Scintillant) sont ensuite ajoutés et l'on procède au comptage de la radioactivité.

6-5 Etudes *in vitro* utilisant des microsomes de foie de rat

6-5-1 Induction des animaux et préparation de la fraction microsomale de foie de rat.

Un protocole d'induction spécifique de 3 jours est institué. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis exsanguinés, par section carotidienne. Le foie est immédiatement prélevé et la fraction microsomale est préparée. Les microsomes témoins (CONT) sont préparés à partir de foie de rats qui ne reçoivent aucun traitement préalable. Le

taux de cytochromes P450s est en moyenne inférieur à 0,8 nanomoles de P450/mg de protéines.

6-5-2 Protocole de traitement des rats

6-5-2-1 Induction au phénobarbital (PB).

On pratique une injection journalière à la dose de 80 mg/kg de PB dans du sérum physiologique. Pour un rat de 200g on administre 500 μ l, par jour, pendant trois jours, en ip d'une solution à 32 mg/ml. Le taux de cytochromes P450s est en moyenne de 2,5 nanomoles de P450/mg de protéines.

6-5-2-2 Induction au 3-méthylcholanthrene (3MC).

La dose utilisée est de 20 mg/kg/jour de 3MC, pendant trois jours, en ip, dans l'huile. Pour un rat de 200g on administre 500 μ l, par jour, pendant trois jours, en ip d'une solution à 8 mg/ml. Le taux de cytochromes P450s est en moyenne de 2,2 nanomoles de P450/mg de protéines.

6-5-2-3 Induction à la β -naphthoflavone (β -NF).

La dose utilisée est de 20 mg/kg/jour de β -NF, pendant trois jours, en ip, dans l'huile. Pour un rat de 200g on administre 500 μ l, par jour, pendant trois jours, en ip d'une solution à 8 mg/ml. Le taux de cytochromes P450s est en moyenne de 1,5 nanomoles de P450/mg de protéines.

6-5-2-4 Induction au clofibrate (CLO).

La dose utilisée est de 500 mg/kg/jour de CLO dilué dans l'huile, pendant trois jour. On prépare une solution à 200mg/ml dans l'huile et on administre au rat 250 μ l matin et soir, en ip (soit 100 mg de CLO/rat de 200g/jour). Le taux de cytochromes P450s est en moyenne de 1,5 nanomoles de P450/mg de protéines.

6-5-2-5 Induction à la dexaméthasone (DEX).

La dose utilisée est de 100 mg/kg/jour, pendant trois jours, dans l'huile. On prépare une solution à 40mg/ml dans l'huile et on administre au rat 500 μ l en ip (soit 20 mg de DEX/rat de 200g/jour). Le taux de

cytochromes P450s est en moyenne de 1,6 nanomoles de P450/mg de protéines.

6-5-2-6 Induction à l'acétone (Ace).

L'acétone est administrée en intragastrique (2,5 à 5 ml/kg d'une solution d'acétone à 25%). Le taux d'induction est en moyenne de 1,8 nanomoles de P450/mg de protéines. Afin d'éviter les irritations gastriques, la dose calculée est répartie en deux administrations, à une heure d'intervalle. Les rats sont ensuite maintenus à jeûn pendant 4 à 12 heures, ce qui permettra de potentialiser l'effet de l'induction (Yang et coll, 1991).

6-5-3 Protocole de préparation de microsomes

A partir de foies de rats, les microsomes ont été préparés par centrifugation différentielle (Beaune et coll, 1985) selon le protocole suivant :

- Foie perfusé par NaCl 0,154 M, jusqu'a décoloration (élimination de l'hémoglobine), découpage en dés dans du tampon Tris 0,1 M contenant 0,2 M de sucrose et 1 mM EDTA, pH 7,4, broyé au Potter, homogénéisé dans un appareil de Potter-Elvehjem (20 à 40 g de foie pour 100 ml de tampon) et centrifugé 10 min à 800 g (précipitation des noyaux et des débris cellulaires).

- Surnageant centrifugé 20 min à 13500 g (précipitation des mitochondries).

- Surnageant centrifugé 60 min à 100.000 g (précipitation du glycogène et des microsomes, le surnageant contenant le cytosol).

- Homogénéisation du culot dans un tampon de diphosphate de tétra-sodium (pyrophosphate de sodium) 0,1 M pH 7,5, puis centrifugation 30 min à 100.000 g (élimination de l'hémoglobine soluble dans ce tampon).

- Homogénéisation du culot dans un tampon phosphate de sodium 0,1M, contenant 20% de glycérol, pH 7,4.

Toutes les manipulations sont effectuées à 4° C. Les microsomes sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C.

6-5-4 Dosages effectués sur les microsomes

Trois dosages sont immédiatement effectués sur la préparation microsomale diluée dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 0,1 M EDTA, pH 7,4.

-Dosage du contenu en cytochrome P450

Ce dosage est effectué selon la méthode de Omura et Sato décrite en 1962. Après dilution choisie dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4, la suspension microsomale est répartie dans deux cuves à bord noir limitant la diffusion de la lumière. On réduit les hémoprotéines par quelques grains de dithionite de sodium, puis la cuve échantillon est saturée en monoxyde de carbone par barbotage. La bande d'absorption à 450 nm du complexe P450-CO est alors mesurée par spectrophotométrie d'absorption différentielle ($\epsilon_{450-490 \text{ nm}} = 91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

-Dosage du contenu en cytochrome b5

Le cytochrome b5 est dosé par spectroscopie UV-visible différentielle entre la suspension microsomale réduite par quelques grains de dithionite de sodium (cuve échantillon) et la suspension microsomale non traitée ($\epsilon_{410-427 \text{ nm}} = 181 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

-Dosage des protéines

La concentration en protéines microsomales, est déterminée par la méthode de Lowry publiée en 1951. Cette méthode colorimétrique utilise l'albumine sérique bovine comme standard. La densité optique est lue à 546 nm.

6-5-5 Incubations analytiques

Les incubations sont réalisées dans des tubes à hémolyse en verre. Le volume final est de 1 ml. On mélange à 4 °C, dans un tampon phosphate de sodium 0,1M pH 7,4, des microsomes fraîchement décongelés, à la concentration en P450 variable, selon qu'il s'agit de microsomes témoins ou de microsomes induits. La concentration finale pour chaque type de microsomes est de 2 à 4 nanomoles de P450/ml. La nature de l'inducteur influe beaucoup sur la concentration microsomale en P450. La concentration de chacun des benzothiophènes substitués est de 100 à 200 µM final. La réaction est démarrée par addition de système générateur de NADPH (glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PDH : 2 unités/ml; glucose-6-phosphate, G6P : 10 mM et NADP : 1 mM). Afin de réduire le NADP en NADPH, le système générateur est préincubé durant 3 min, . Le milieu réactionnel est agité vivement pendant des intervalles de temps variables 10 min, 20 min et 30 min à 37 °C, en présence de l'oxygène de l'air. Les incubations témoins sont réalisées en l'absence du système générateur de NADPH (remplacé par de tampon phosphate pH 7,4).

6-5-6 Préparation des échantillons pour l'analyse par HPLC

L'incubation est arrêtée par addition d'un volume et demi d'acétonitrile (60%) ou en milieu acide à pH 4 final, par un mélange acétonitrile-acide acétique (CH₃CN/CH₃COOH) dans un rapport 10/1. Dans certains cas, la réaction est arrêtée par le méthanol (2,5 volumes). Après 10 min à 4 °C, les protéines sont séparées au moyen d'une centrifugation à 3000 Trs/min, pendant 20 min. L'acétonitrile est selon le cas soit gardé soit évaporé, par un flux d'azote. Le résidu est repris par du tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,6 ou un autre solvant dans lequel le résidu est soluble puis analysé par HPLC ou conservé à -80°C.

6-5-7 Incubations préparatives et prépurification sur Sep-Pak

Un volume de 10 à 30 ml final, permet la préparation de quantités utiles de métabolites. L'incubation est agitée doucement durant les différentes durées d'incubation (10 min, 20 min, 30 min) à 37 °C, afin de limiter la floculation des microsomes, puis refroidie à 4 °C avant une centrifugation pendant 20 min à 3000 g. Le surnageant est concentré par évaporation sous vide au rotavapor, puis passé sur deux petites colonnes en série (SepPak, C18) préalablement préparées par méthanol/eau. Les métabolites sont élués par 2 ml de méthanol ou d'acétonitrile ou encore par un autre solvant adapté, en fonction de leur structure.

6-5-8 Réalisation des élugrammes HPLC et des radiochromatogrammes.

Les échantillons sont chromatographiés sous haute pression (HPLC) dans une colonne à polarité en phase inverse (MOS Hypersil 250 x 4,6 mm) élués au débit de 1 ml/min (HPLC analytique), par un mélange de deux solvants A et B (en fonction de l'échantillon à analyser A = CH₃COONH₄ ou CF₃COOH 0,1%, B = CH₃CN 50% ou 90% dans l'eau). En sortie de la colonne, les élugrammes sont enregistrés par spectrophotométrie d'absorption UV/visible multilongueur d'onde, en temps réel. Une collection par fraction de 0,5 ml par 30 secondes dans des tubes de propylène de 3 ml est réalisée après addition de 2 ml de liquide scintillant (Pico-Fluor 40).

6-5-9 Métabolisme *in vitro* des benzothiophènes substitués

L'étude métabolique *in vitro*, de chacun des benzothiophènes substitués, est réalisée en faisant réagir différents types de microsomes (CONT, PB, 3MC, β-NF, ClO et DEX; 2 à 4 nmoles de P450/ml) avec 100 μM final de substrat, pour les incubations analytiques. Des volumes d'incubations beaucoup plus importants ont été utilisés lors des incubations préparatives.

6-5-10 Métabolisme *in vitro* du thiophène radioactif

Le thiophène marqué ((T-³H, activité spécifique de 0,4mCi par ml (0,16mCi parmmole) dilué au 1/5 dans l'huile), ayant servi à l'étude métabolique *in vivo* (Cf 6-2-10), a fait l'objet d'une étude métabolique *in vitro*. Le T-³H conservé dans l'huile est miscible avec l'acétone. On mélange 200 µl de T-³H avec 800 µl d'acétone (dilution au 1/5). Lors des incubations avec les microsomes on utilise 5 µl de la solution acétonique/ml final, 2 nmoles de P450. La réaction est démarrée par addition de système générateur de NADPH (glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH : 2 unités/ml), glucose-6-phosphate (G6P : 10 mM et NADP : 1 mM). Nous avons étudié le métabolisme du T-³H au début en présence du S9 (surnageant à 9000 g, obtenu lors de la préparation des microsomes), et après par différents types de microsomes et en présence ou non de système générateur et/ou de glutathion.

La durée d'incubation est de 30 min, la réaction est arrêtée par 1 ml d'isooctane (2,2,4-triméthylpentane). Chaque incubation est agitée, centrifugée. On procède à trois extractions pour séparer les deux phases organiques (l'isooctane) et aqueuse, par pipetage ou par congélation de la phase aqueuse dans un bain d'acétone/carboglace. Les tubes contenant les incubations peuvent être placés aussi dans l'azote liquide, ceci va permettre la séparation des deux phases, aqueuse et organique. Une dernière centrifugation permet de séparer le surnageant des protéines. Ainsi un aliquot de 500 µl de chaque phase aqueuse est mélangé avec 2 ml de scintillant Pico-Fluor. La radioactivité de la phase aqueuse est comptée. Cette radioactivité est directement liée à l'activité des microsomes et donc aux métabolites polaires formés à partir du T-³H.

Afin d'avoir une idée sur la radioactivité fixée par les protéines, ces dernières ont été solubilisées dans 2 ml de soude 0,1N puis comptée.

Nous avons bien vérifié qu'il s'agit bien des métabolites polaires recherchés dans la phase aqueuse et non de l'eau tritiée (T_2O), par une manipulation simple qui consiste à compter le distillat condensé sur le couvercle d'une boîte de Pétri chauffée à 40 °C (qui s'avère non radioactif).

L'étude du bilan de la radioactivité totale a montré qu'une bonne partie du $T\text{-}^3H$, échappe au métabolisme, par son comportement hautement volatil. Pour palier à ce problème (et avoir plus de produits de départ dans la réaction) nous avons multiplié par deux le volume de la solution acétonique c'est à dire 10 $\mu\text{l/ml}$ final.

Lors des incubations préparatives, le volume final était d'environ 400 ml ((2 ml de la solution acétonique de $T\text{-}^3H$). La réaction est démarrée par addition de système générateur de NADPH (glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PDH : 2 unités/ml; glucose-6-phosphate, G6P : 10 mM et NADP : 1 mM)).

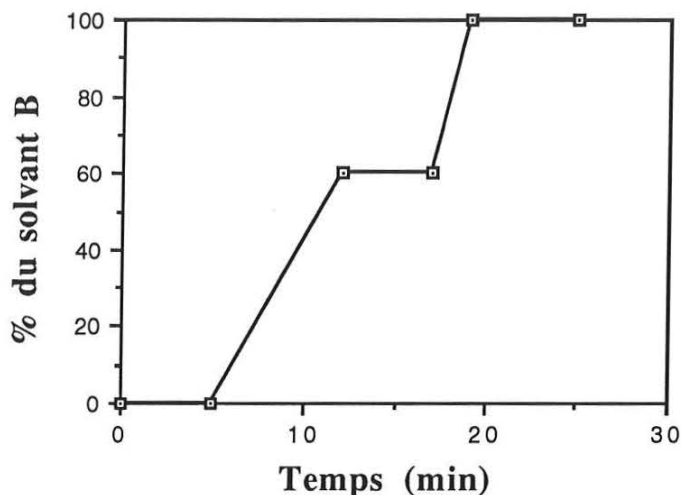
Après 30 min d'incubation, la réaction est arrêtée par CH_3COOH (20 $\mu\text{l/ml}$), centrifugation, précipitation et élimination des protéines. Le surnageant est passé sur deux SepPak en série (préablement préparés comme avant, Cf 6-4-2-1). On récupère la phase aqueuse (éluat de SepPak) plus un éluat de 2 ml d'un mélange de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 20% dans l'eau (ces deux fractions renferment 90% de métabolites). Ces deux dernières fractions sont évaporées à sec puis reprises dans un volume de 2 ml de CH_3CN 20%. Un aliquot est compté puis un autre est analysé par HPLC analytique dans les conditions suivantes (figure 6-2) :

Solvant A = CF_3COOH 0,1% dans l'eau

Solvant B = CH_3CN 90% dans l'eau. En gradient : $T_0 = 0$ min, % du solvant B = 0; $T_1 = 5$ min, % du solvant B = 60% en 12 min; $T_2 = 17$ min, % du solvant B = 100% en 2 min.

Figure 6-2

Métabolisme du thiophène radioactif : gradient d'HPLC analytique.

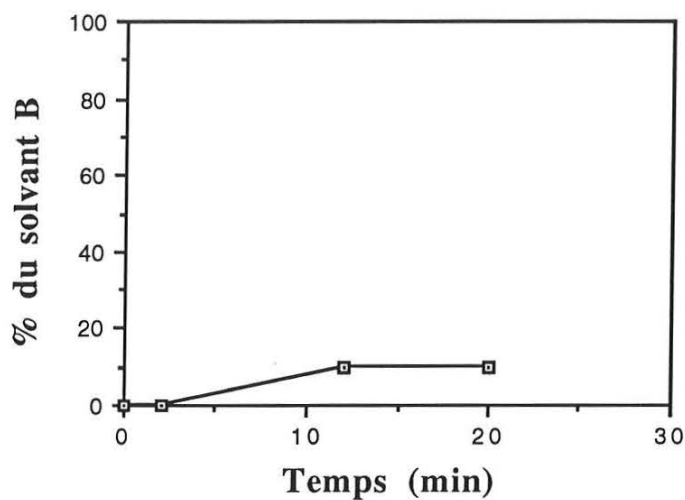


Lors de la préparation des métabolites par HPLC préparative, il a fallu palier au problème de précipitation des sels de phosphates (lié aux gros volumes des incubations). Ces sels risquaient de boucher la colonne d'HPLC. Nous avons ajouté alors le même volume de CH₃CN ou de méthanol sur le dernier volume de l'échantillon concentré, centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 min. Les sels sont ainsi précipités et éliminés. Le surnageant est récupéré puis analysé par HPLC. Les trois métabolites repérés **31**, **32**, **33** principalement par le comptage de la radioactivité et secondairement par UV, ont été prépurifiés dans les mêmes conditions d'HPLC décrites ci-dessus.

Les métabolites **31** et **32** ont été purifiés en utilisant un gradient (figure 6-3) à partir du solvant A (décrit ci-dessus), pendant deux minutes puis un gradient de 10% du solvant B (décrit ci-dessus) pendant 10 min, ou en isocratique 5% du solvant CH₃CN 90%.

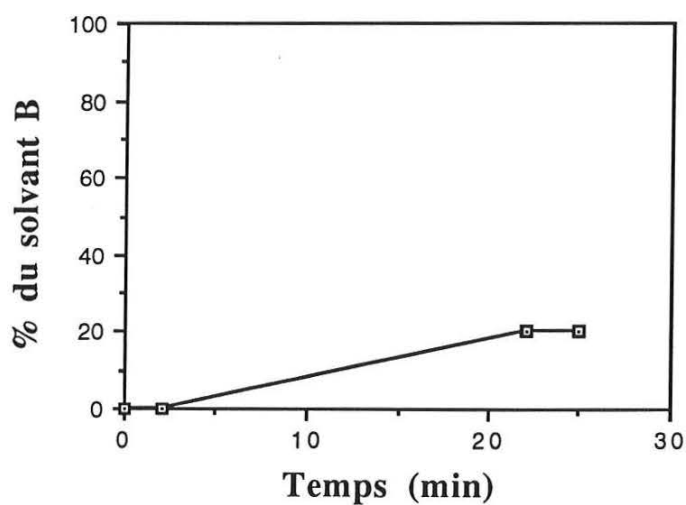
Figure 6-3

Métabolisme du thiophène radioactif : gradient d'HPLC préparative des métabolites **31** et **32**.



Le métabolite **33** a été purifié en utilisant un gradient (figure 6-4) de 100% du solvant A (décrit ci-dessus), pendant deux minutes puis le gradient de 20% du solvant B (décrit ci-dessus) en 20 min, ou en isocratique 5% du solvant = CH₃CN 90%.

Figure 6-4 : Métabolisme du thiophène radioactif : gradient d'HPLC préparative du métabolite **33**.



Activation métabolique des dérivés thiophéniques : mise en évidence d'une nouvelle classe de métabolites réactifs, les sulfoxydes de thiophène

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Axelrod, J. "The enzymatic demethylation of ephedrine"
J. Pharmacol. Exp. Ther. **114**, 430-438. 1955.
- 2- Barnes, M.M., James, S.P. and Wood, P.B (Univ. Birmingham, Engl). "Formation of mercapturic acids : I- Formation of mercapturic acid and the levels of glutathione in tissues. II- The possible role of glutathionase". Biochem. J. **71**, 680-90. 1959.
- 3- Barry.M.Trost., IAN.Fleming., Leo.A.Paquette (Editors)."In comprehensive organic synthesis". Vol.5. page 318. Pergamond Press. Oxford 1984.
- 4- Baumann, E. and Preusse, C. "Ueber Bromophenylmercaptursäure"
Ber. dtsh. Chem. Ges., **12**, 806. 1879.
- 5- Beaty, N.B. and Ballou, D.P. "Transient kinetic study of liver microsomal FAD-containing monooxygenase". J. Biol. Chem., **255**, 3817-3819. 1980.
- 6- Beaty, N.B. and Ballou, D.P. "The reductive half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase". J. Biol. Chem, **256**, 4611-4618. 1981a.

- 7- Beaty, N.B and Ballou, D.P. "The oxidative half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase". *J. Biol. Chem*, **256**, 4619-4625. 1981b.
- 8- Beaune, P.H., Flinois, J.P., Kiffel, L., Kremers, P., Leroux, J.P. "Purification of a new cytochrome P450 from human liver microsomes". *Biochem. Biophys. Acta*, **840**, 364-370. 1985.
- 9- Beaune, P.H., Dansette, P.M., Mansuy, D., Kiffel, L., Finck, M., Amar, C., Leroux, J.P. and Homberg, J.C. "Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P450 that hydroxylates the drug". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 551-555. 1987.
- 10- Beaune, P.H., Dansette, P.M., Mansuy, D., Kiffel, L., Amar, C., Leroux, J.P. and Homberg, J.C. "Autoantibodies anticytochrome P450 during autoimmune hepatitis", A. Guillouzo (Ed), *Liver Cells and Drugs*, vol. **164**, pp 175-180. London, Paris : John Libbey Eurotext, 1988.
- 11- Bellucci, G., Berti, G., Chiappe, C., Lippi, A. and Marioni, F. "The metabolism of carbamazepine in humans : steric cause of the enzymatic hydrolysis of the 10, 11 epoxide". *Journal of Medicinal Chemistry*. **30**, 768-73. 1987.
- 12- Benhamou, J.P. "Drug-induced hepatitis : clinical aspects. Liver cells and drugs". Ed. A. Guillouzo. *Coll. INSERM*, **164**, pp. 3-12. 1988.
- 13- Benoit, E., Buronfosse, T., Moroni, P., Delatour, P. and Riviere, Jean louis. "Stereoselective S-oxygenation of an aryl trifluoromethyl sulfoxide to the corresponding sulfone by rat liver cytochrome P450". *Biochemical Pharmacology*, **46**, 2337-2341. 1993.
- 14- Bickel, M.H. "Liver metabolic reactions, tertiary amine N-dealkylation, tertiary amine N-oxydation, N-oxide reduction, and N-oxide N-dealkylation". *Arch. Biochem. Biophys*, **148**, 54-62. 1971.
- 15- Biour, M., Poupon, R., Calmus, Y., Grange, J.D., Hamel, J.D., Levy, V.G., Bodin, F. and Cheymol, G. "Hépatotoxicité des médicaments".

Gastroenterol. Clin. Biol., **12** : 48-60. 1988.

16- Blanchard, M., Coichon, J. "Oxydation catalytique hétérogène de composés soufrés à caractère aromatique : Thiophène et benzothiophène". Bulletin de la société chimique de France 1-2; 289-290. 1975.

17- Bourdi, M., Larry, D., Nataf, J., Bernueau, J., Pessayre, D., Iwasaki M., Guengerich, F.P and Beaune, P.h. "Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P450 1A2". J. Clin. Invest. **85**, 1967-1973, 1990.

18- Boyland, E. The biological significance of metabolism of polycyclic compounds. Biochem. Soc. Symp. **5**, 40-54. 1950.

19- Bray, H.G. and Carpanini, F.M.B. "The metabolism of thiophene and benzothiophene in the rabbit and in the rat". Biochem. J. **109**. 11P. 1968.

20- Bray, H.G., Carpanini, F.M.B. and Waters, B.D. "The metabolism of thiophene in the rabbit and in the rat". Xenobiotica **1**, 157-168. 1971.

21- Brodie, B., Axelrod, J., Cooper, J. R., Gaudette, L., LaDu, B. N., Mitoma, C., and Udenfriend, S. Detoxication of drugs and other foreign compouds by liver microsomes". Science. **121**, 603-604. 1955.

22- Brooks, G.T., Harrisson, A and Lewis, S.E. Biochemical Pharmacology, **19**, 255-73. 1970.

23- Caldwell, J, "Concepts in drug Metabolism". (P. Jenner, B. TESTA) Marcel Dekker, editeur. **221**, Chap. 4. 1980.

24- Chassaud, L.F. Glutathione : metabolism and function (Arias, I.M. and Jacoby, W.B.Eds) pp 77-114. Raven, New-York. 1976.

25- Chien, C.S., Kawasaki, T. and Sakamoto, M. "Oxidation of Furan, Pyrrole, Thiophene, Benzo(b)furan and Benzothiophene with oxodiperoxomolybdenum (VI), MoO₅. HMPA". Chem. Pharm. Bull. **33**, 5071-5074. 1985.

- 26- Calmus, Y., Biour, M., Poupon, R. "Les tests *in vitro* dans le diagnostic des hépatites médicamenteuses". Gastroenterol. Clin. Biol., **11**, 586-598. 1987.
- 27- Capetola, R.J., McGuire, J.L., Rosenthale, M.E . "Introduction to the pharmacology of Suprofen". Pharmacology, **27**, Suppl. 1, **1**. 1983.
- 28- Casarett and Doull's. TOXICOLOGY : "The basic science of poisons". Fourth Edition. Editors : Mary, O., Amdur, Ph.D., John Doull, Ph.D., M.D Curtis, D., Klaassen, Ph.D. Pergamon Press. 1991.
- 29- Cashman, J.R., et Hanzlik, R.P. "Microsomal oxidation of thiobenzamide. A photometric assay for the flavin-containing monooxygenase". Biochem. Biophys. Res. Commun. **98**, 147-153. 1981.
- 30- Cava, M.P. and Pollack, M.J. "A novel synthesis of isothianaphtene". J. Am. Chem. Soc. **88**, 4112-4116. 1960.
- 31- Chieli, E et Malvadi, G. "Role of the P450 dependent and FAD containing monooxygenase in the bioactivation of thioacetamide, thiobenzamide and their sulfoxides". Biochem. Pharmacol, **34**, 395-396. 1984.
- 32- Chilcote, M.E. "Metabolism of thiophene and some of its derivatives". University microfilms, Ann Arbor, Mich.), pub. N° **672**, 127 pp.; Microfilms Abstracts. 6, N° **1**, 15-16. 1945.
- 33- Christomanos, A.A. "Behavior and action of organic sulfur compounds in the organism of the dog : I- Action and fate of thiophene in the metabolism of the dog". Biochem. Z. **229**, 248-54. 1930.
- 34- Ciaccio, E.I. et DeVera, H. "Effect of benzo(a)pyrene and chlorpromazine on arylhydrocarbon hydroxylase activity from rat tissues". Biochem. Pharmacol, **25**, 985-987. 1976.
- 35- Claude, A. "Fraction from normal chicken embryo similar to the tumor producing fraction of chicken tumor". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **39**, 398. 1938.

- 36- Collman, J.P., Braumann, J.I., Halbert, T.R. and Suslick, K. "Nature of O₂ and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins". Proc. Natl. Acad. Sci. **73**, 3333-3337. 1976.
- 37- Conney, A.H., Miller, E.C and Miller, J.A. "Substrate-induced synthesis and other properties of benzopyrene hydroxylase in rat liver. J. Biol. Chem. **228**, 753-766. 1957.
- 38- Conney, A.H. "Pharmacological implications of microsomal enzyme induction". Pharm. Rev. **19**, 317-366. 1967.
- 39- Coon, M.J, Haugen, D.A., Guengerich, F.P., Vermillon, W.L. "Liver microsomal membranes : reconstitution of the hydroxylation system containing cytochrome P450". Struct. Basis of membr funct., Proc. Int. Symp. Meeting. 409-427. Editors: Hatefy.Y., Djavadi-Ohaniance.Youssef. Academic Press, N.Y. 1976.
- 40- Coon, M.J., Ding, X.X., Perneckyj, S.J., and Vaz, A.D.N. "Cytochrome-P450, progress and predictions", FASEB. J., **6**, 669-673. 1992.
- 41- Coreira, M.A. and Mannering, G.J. "DPNH synergism of TPNH-dependent mixed function oxidase reactions". Drug. Metab. Dispos, **1**, 139-149. 1973.
- 42- Creaven, P.J., Davies, W.H and Williams, R.T. "Dealkylation of alkoxybiphenyls trout and frog liver preparations". Life Sci. **6**, 105-106. 1967.
- 43- Cripps, R.E. "The microbial metabolism of thiophene-2-carboxylate". Biochem. J. **134**, 353-366, 1973.
- 44- Damani, L.A. "Sulfur-containing drugs and related organic compounds". Volume 1 à 3, Damani Ed, Ellis Horwood. Limited publishers, Chichister, U.K., 1989.

- 45- Danan, G., Homberg, J.C., Bernueau, J., Roche-Sicot, J. and Pessayre, D. "Hépatite à l'iproniazide. Intérêt diagnostique d'un nouvel anticorps antimitochondrial, l'anti-M6". *Gastroenterol. Clin. Biol.* **7**, 529, 1983.
- 46- Danna, G. "Définition et critères d'imputation des atteintes hépatiques aiguës médicamenteuses. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **15**, 845-848. 1991.
- 47- Dansette, P.M., Amar, C., Smith, C.B., Pons, C., Beaune P.H. and Mansuy, D. "Oxidative activation of the thiophene ring by hepatic enzymes. Hydroxylation and formation of electrophilic metabolites during metabolism of tienilic acid and its isomer by rat liver microsomes". *Biochem. Pharmacol.* **39**, 911-918. 1990.
- 48- Dansette, P.M., Amar, C., Valadon, P., Pons, C., Beaune, P.H. and Mansuy, D. "Hydroxylation and formation of electrophilic metabolites of tienilic acid and its isomer by human liver microsomes, catalysis by a cytochrome P450 2C different from that responsible for mephenytoin hydroxylation". *Biochem. Pharmacol.* **41**, 553-560. 1991.
- 49- Descotes, J. "Evaluation précoce de l'immunotoxicité". *Médecine-Sciences.* **7**, 719-722, 1991.
- 50- Dansette, P.M., Thang, D.C., El Amri, H. and Mansuy, D. "Evidence for thiophene S-oxide as a primary reactive metabolite of thiophene in vivo : Formation of a dihydrothiophene sulfoxide mercapturic acid". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1624-1630. 1992.
- 51- Davies, W. and James, F.C.J. "The conversion of thiophen into 4 : 7 : 8 : 9-tetrahydro-4:7-sulphinylthianaphten 1: 1-dioxide". *J. Chem. Soc.* 15-18. 1954
- 52- Digman, J.P and Strobel, H. "Preparation of homogenous NADPH-cytochrome P450 reductase from rat liver". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 845-852. 1975.

- 53-** Dixit, A. and Roche, T.E. "Spectrophotometric assay of flavin-containing monooxygenase and changes in its activity in female mouse liver with nutritional and diurnal conditions". *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 50-63. 1984.
- 54-** Dolphin, C., Shephard, E.A., Povey, S., Palmer, C.N.A., Ziegler, D.M., Ayesh, R., Smith, R.L. and Phillips, I.R. "Cloning, primary sequence, and chromosomal mapping of a human flavin-containing monooxygenase (FMO1)". *J. Biol. Chem.* **266**, 12379-12385. 1991.
- 55-** Dolphin, C., Shephard, E.A., Povey, S., Smith, R.L. and Phillips, I.R. "Cloning, primary sequence, and chromosomal localization of human FMO2, a new member of the flavin-containing monooxygenase family". *Biochem. J.* **287**, 261-267. 1992.
- 56-** Dubois, R.N., Simpson, E.R., Tukey, J and Lambeth, J.D. "Evidence for a higher molecular weight precursor of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P450 and induction of mitochondrial and cytosolic proteins by corticotropin in adult bovine adrenal cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 1028-1032. 1981.
- 57-** Dutton, G.J. "Glucuronide forming enzymes". *Handbook of experimental pharmacology*, **28**, 378-400. 1971.
- 58-** Dutton, G.J. "Drug metabolism in man " (J. W. Gorrod, A. M. Becket) Taylor et Francis, Editeur. **81**, Chap. 4. 1978.
- 59-** Franklin, M.R. "Complexes of metabolites of amphetamines with hepatic cytochrome P450". *Xenobiotica.* **4**, 133-142. 1974.
- 60-** Franklin, M.R. "Inhibition of mixed function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P450 metabolic intermediate complexes". *Pharmacol. Ther.* **2**, 227-245. 1977.
- 61-** Fujii-Kuriyama, Y., Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K. I. and Kikuchi, Y. "Regulation of CYP 1A1 expression " *FASEB. J.* **6**, 706-710. 1992.

- 62- Galtier, P., Alvinerie, M. and Delatour, P. "*In vitro* sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes; assay and frequency of various xenobiotics". Am. J. Vet. Res. **47**, 447-450. 1986.
- 63- Gasser, R., Tynes, R.E., Lawton, M.P., Korsmeyer, K.K, Ziegler, D.M. and Philpot, R.M. "The flavine-containing monooxygenase expressed in pig liver : primary sequence, distribution, and evidence for a single gene". Biochemistry. **29**, 119-124. 1990.
- 64- Jaffe, M. "Ueber die nach Einführung von Brombenzol and Chlorbenzol im Organismus entstehenden schwefelhaltigen Säuren" Ber. Dtsch. Chem. Ges. **12**, 1092. 1879.
- 65- Jansson, I. and Schenkman, J.B. "Influence of cytochrome b5 on the stoichiometry of the different oxidative reactions catalysed by liver microsomal cytochrome P450". Drug. Metab. Dispos. **15**, 344-348. 1987.
- 66- Garfinkel, D. "Studies on pig liver microsomes. I : Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions" Arch. Biochem. Biophys. **77** : 493-509. 1958.
- 67- Ged, C., Rouillon, J.M., Pichard, L., Combalbert, J., Bressot, N., Michel, H., Beaune, Ph. and Maurel, P. "The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450 3A3 induction". Br. J. Clin. Pharmac. **28**, 373-387. 1989.
- 68- Geneste, P., Grimaud, J., Olivé, J.L. et Ung, S.N. "Oxydation en sulfoxydes de benzothiophènes monosubstitués". Bulletin de la société chimique de France. 271-275, 1977a.
- 69- Geneste, P., Olivé, J.L. et Ung, S.N. "Réactivité de l'hypochlorite de tertiobutyle, mécanisme de la réaction". J. Heterocyclic Chem. **14**, 953-956. 1977b.
- 70- Gibson, G.G. "Co-induction of cytochrome P450 4A1 and peroxisome proliferation - A casual or casual relationship". Xenobiotica, **22**, 1101-1109. 1992.

- 71- Gillette, J.R., Mitchell, J.R. and Brodie, B.B. Sasame. A. et Jollow, D.J. *J. Pharmac. Exp. Therap.* **199**, 41-52. 1976.
- 72- Ginderow, D., Mornon, J., Erdelmeier, I., Dansette, P. and Mansuy, D. "Structure du 2,3-dihydro-3-(2-hydroxyéthylthio)benzo(b)thiophène 1-oxide" : " $C_{10}H_{12}O_2S_2$ ". *Acta Cryst.* **C48**, 1808-1810. 1992.
- 73- Gonzalez, F. J. "The molecular biology of cytochrome P450s" *Pharmacol. Rev.* **40**, 243-288. 1989.
- 74- Gonzalez, F. J. and Gelboin, H.V. "Human cytochromes P450 : catalytic activities and interindividual variations in expression". *New Horizons in Biological Dosimetry*, 11- 20. 1991.
- 75- Groves, J.T., McClusky, G.A., White, R.E. and Coon, M.J. "Aliphatic hydroxylation by highly purified liver microsomal cytochrome P450. Evidence for a carbon radical intermediate". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 154-160. 1978.
- 76- Guengerich, F.P., Crawford, W.M and Watanabe, P.G. "Activation of vinyl chloride to covalently bound metabolites : roles of 2-chlorethylene oxide and 2-chloroacetaldehyde". *Biochemistry*, **18**, 5177-5182. 1979.
- 77- Guengerich, F.P. and Liebler, D.C. "Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolism". *CRC Critical Reviews in toxicology* **14**, 259-307. 1985.
- 78- Guengerich, F. P. "Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism". *Progress in drug metabolism*, Ed. Bridges J. W., Chasseaud L. F. and Gibson G. G., Taylor and francis. **10**, 1-53. 1987a.
- 79- Guengerich, F. P., Umbenhauer, D.R., Churchill, P. F., Beaune, Ph. H. Böcker, R., Knodell, R.G., Martin, M.V., Iloyd, R.S. "Polymorphism of human cytochrome P450". *Xenobiotica.* **17**: 311-316. 1987b.

- 80-** Guengerich, F. P. "Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy". *Cancer. Res.* **48**, 2946-2954. 1988.
- 81-** Guengerich, F.P. "Characterization of human microsomal cytochrome P450 enzymes" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 241-264. 1989.
- 82-** Guengerich, F. P. "Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals", *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 97-153. 1990.
- 83-** Guengerich, F.P. "Characterization of human cytochrome P450 Enzymes" *FASEB. J.* **6**, 745-748. 1992a.
- 84-** Gueguen, M., Yamamoto A.M., Bernard, O and Alvarez, F. "Anti-Liver Kidney Microsome antibody type I recognizes human cytochrome P450 db1". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 542-547, 1989.
- 85-** Habig, W.H., Pabst, M.J and Jacoby, W.B. "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation". *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139, 1974.
- 86-** Habig, W.H., Keen, J.H and Jacoby, W.B. : "Glutathione S-transferases in the formation of cyanide from organic thiocyanates and as an organic nitrate reductase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 501-506. 1977.
- 87-** Hamill, S. and Cooper, D.Y. "The role of cytochrome P450 in the dual pathways of N,N-dimethylaniline by hepatic microsomes". *Xenobiotica.* **14**, 139-149. 1984.
- 88-** Harrison, S.D., Bosin, T.R and Maickel, R.P. "Metabolism of 3-(2-dimethylaminoethyl)benzo(b)thiophene *in vitro* and *in vivo* in the rat". *Drug. Metab. Dispos.* **2**, 228-236, 1974.
- 89-** Hastier, P., Blanchi, D., Kuhdorf, H., Arpurt, J.P., Chichmanian. R.M., Saint-Paul, M.C et Delmont, J. "Hépatite au thiophène : un nouveau cas". *Gastroenterol. Clin. Biol.* **17**, 613-614. 1993.

- 90- Hayaishi, O., Katagiri, M. and Rothberg, S. "Mechanism of the pyrocatechase reaction". *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5450-5451. 1955.
- 91- Hefter, A. P flugers *Arch. Ges. Physiology.* **39**, 420. 1886.
- 92- Hickman, R.J.S., Christie, B.J., Guy, R.W. and White, T.J. "Synthesis of aromatic S-substituted derivatives of N-acetyl-L-cysteine". *Aust. J. Chem.* **38**, 899-904. 1985.
- 93- Hildebrandt, A and Estabrook, R.W. Evidence for the participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 66-79. 1971.
- 94- Hinson, J.A., Pohl, L.R., Monks, T.J., Gillette, J.R. "Acetaminophen-induced hepatotoxicity". *Life. Sciences.* **29**, 107, 1981.
- 95- Holder, G., Yagi, H., Dansette P., Jerina.D.M., Levin,W., Lu,A.Y. and Conney, A.H. "Effects of inducers and epoxyde hydrolase on the metabolism of benzo(a)pyrene by liver microsomes and a reconstitued system : analysis by high pressure liquid chromatography". *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 4356, 1974.
- 96- Homberg, J.C., Stelly, N., Andreis, I., Saadoun, F., André, J. and Abuaf, N.A. "A new antimitochondria antibody (M6) in iproniasid induced hepatitis". *Clin. Exp. Immunol.* **46**, 93-102. 1982.
- 97- Homberg, J.C., André, C. and Abuaf, N. "A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM2) in tienilic acid induced. hepatitis". *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 561-570. 1984.
- 98- Homberg, J.C., Abuaf, N., Bernard, O., Islam, S., Alvarez, S., Khalil, S.H., Poupon, R., Darnis, F., Levy, V.G, Gripon, P. "Chronic active hepatitis associated with Anti-Liver/Kidney Microsome Antibody Type 1 : A second type of Autoimmune hepatitis". *Hepatology*, **7**, 1333-1339, 1987.

- 99-** Imler, M., Chabrier, G., Cherfran, J. and Simon, C. "Hépatite imputable au thiophène". *Gastroenterol. Clin. Biol.* **11**, 173-174. 1987.
- 100-** Ichihara, S., Tsuyuki, Y., Tomisawa, H., Fukasawa, H., Nakayama, N., Tateishi, M. et Joly, R. "Metabolism of tenoxicam in rats". *Xenobiotica.* **14**, 727-739. 1984.
- 101-** Jacob, J., Schlodt, A., Augustin, C., Raab, G. and Grimmer, G. "Rat liver microsomes and S-oxydation of thiaarenes with central or peripheric thiophene rings". *Toxicology.* **67**, 181-194, 1991.
- 102-** Jakoby, W.B., Habig, W.H., Heen, W.H., Ketley, J.N and Pabst, M.J. In Arias I.M and Jacoby W.B. (Eds), *Glutathione : Metabolism and Function*, pp. 189-211, New York : Raven Press. 1976.
- 103-** Jakoby, W.B and Habig, W.H. "Glutathione transferases. "In enzymatic basis of detoxication" (Jacoby.W.B., eds), Academic Press, London, **II**, 394-407. 1980.
- 104-** Jakoby, W.B., Ketterer, B and Mannervik, B. " Glutathione transferases : nomenclature". *Biochemical Pharmacology.* **33**, 2539-2540, 1984.
- 105-** Jerina, D.M and Daly, J.W. "Arene oxides : a new aspect of drug metabolism". *Science.* **185**, 573-582. 1974.
- 106-** Kammerer, R.C., Schmitz, D.A., Lampe, M.A et Kloc, A. "The *in vivo* metabolism of methapyrilene, a hepatocarcinogen in the rat". *Xenobiotica.* **18**, 869-881. 1988.
- 107-** Kasper, C.B and Henton, D. "Glucoronidation. In enzymatic basis of detoxication." (Jacoby.W.B., eds), Academic press, London, **II**, 4-36. 1980.
- 108-** Katagiri.M "A soluble cytochrome P450 functional in methylene hydroxylation" *J. Biol. Chem.* **243**, 3543-3546. 1968.

- 109-** Keller, W. "Ueber Verwandlung der Benzoesäure in Hippursäure" J. Liebig's Ann. Chem. **43**, 108. 1942.
- 110-** Kellogg, R.M. "In comprehensive Heterocyclic Chemistry.", Katritzky A.R and Rees, C.W.; Ed.; Pergammon Press, Oxford, **4**, 723-726, 1984.
- 111-** Ketley, J.N., Habig, W.H. and Jacoby, W.B. "Rat liver glutathione S-transferases" : a family of binding proteins. Fed. Proc. **34**, 504, 1975.
- 112-** Ketterer, B., Meyer, D.J. and Clark, A.G. In Sies, H. and Ketterer, B (Eds). "Glutathione conjugation : Mechanism and Biological Significance." pp, 73-135, London : Academic Press. 1988.
- 113-** Kimura, T., Kodama, M. and Nagata, C. "Purification of mixed function amine oxidase from rat microsomes". Biochem. Biophys. Res. Commun., **110**, 640-645. 1983.
- 114-** Klingenberg, M. "Pigment of rat liver microsomes". Arch. Biochem. Biophys. **375**, 376-386. 1958.
- 115-** Koch, S., Tang, S.C., Holm, R.H., Frankel, R.B., Ibers, J.A. "Ferric porphyrin thiolates. Possible relationship to cytochrome P450 enzymes and the structure of (p-nitrobenzenethiolato)iron(III) protoporphyrin IX dimethyl ester". J. Am. Chem. Soc. **97**, 916-918. 1975.
- 116-** Krieter, P.A., Ziegler, D.M., Hill, K.A. and Burk, R.F. "Increased biliary GSSG efflux from rat livers perfused with thiocarbamide substrates from the flavin-containing monooxygenase". Mol. Pharmacol. **24**, 2097-2099. 1975.
- 117-** Kupfer, D., Navarro, J., Miranda, G.K and Theoharides, A.D. "Metabolism of prostaglandins and xenobiotics by adrenal microsomal monooxygenase in the guinea pig." Arch. Biochem. Biophys. **205**, 297-307. 1980.

- 118-** Kurfuerst, M., Ghila, S. and Hastings, W.J. In flavins and flavoproteins (V. Massey and C.H. Williams, eds), Elsevier/North-Holland, New York. **72**, 353-358. 1981.
- 119-** Kuwahara, T. White, R.A. and Agosine, M. "A cytosolic FAD-containing enzyme catalysing cytochrome C reduction in trypanosoma cruzi. I. Purification and some properties." Arch. Biochem. Biophys. **239**, 18-28. 1985.
- 120-** Larrey, D., Funck Brentano, C., Breil, P., Vitaux, J., Theodore, C., Babany, G., Pessayre, D. "Effect of erythromycin on hepatic drug metabolizing enzymes in humans". Biochem. Pharmacol. **32**, 1063-1068. 1983.
- 121-** Lawton, M.P., Cashman, J.R., Cresteil, T., Dolphin, C.T., Elfara, A.A., Hines, R.N. Hodgson, E., Kimura, T., Ozols, J., Phillips, I.R., Philpot, R.M., Poulsen, L.L., Rettie, A.E., Williams, D.E. and Ziegler, D.M. "A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities", Arch. Biochim. Biophys. **308**, 254-257. 1994
- 122-** Lecoeur, S., Bonierbale, E., Challine, D., Gautier, J.C., Valadon, Ph., Dansette, P.M., Catinot, R., Ballet, F., Mansuy, D. and Beaune, Ph. "Specificity of *in vitro* covalent binding of tienilic acid metabolites to human liver microsomes in relationship to the type of hepatotoxicity : comparison with two directly hepatotoxic drugs". Chem. Res. Toxicol. **7**, 434-442. 1994.
- 123-** Levron, J.C., LeFur, J.M., Adnot, P. and Dormard Y., "Pharmacokinetic study of 2,3-dichloro-4-(2-thienylketo ¹⁴C phenoxyacetic acid (tienilic acid) in animals ". Eur. J. Drug . Metabolism and pharmacokinetics. **3**, 107-120. 1977.
- 124-** Lindenmayer, A and Smith, L. "Cytochromes and other pigments of baker's yeast grow aerobically and anaerobically". Biochem. Biophys. Acta. **93**, 445-461. 1964.

- 125-** Litwak, G., Ketterer, B. and Arias, I.M. "Ligandin : A hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions". *Nature*. **234**, 466-467, 1971.
- 126-** Lomri, N.; Thomas, J. and Cashman, J.R. "Molecular cloning of the flavin-containing monooxygenase (Form 2) cDNA from adult human liver". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1685-1689. 1992.
- 127-** Lopez-Garcia, M.P., Dansette, P.M., Valadon, Ph., Amar, C., Beaune, Ph., Guengerich, F.P. and Mansuy, D. "Human-Liver cytochromes P450 expressed in yeast as tools for reactive metabolite formation studies. Oxidative activation of tienilic acid by cytochromes P450 2C9 and 2C10. *Eur. J. Biochem.* **213**, 223-232. 1993.
- 128-** Lopez-Garcia, M.P., Dansette, P.M and Mansuy, D. "Thiophenes derivatives as new mecanism-based inhibitors of P450 : "Inactivation of yeast-expressed human liver P450 2C9 by tienilic acid". *Biochemistry*, , **33**, 166-175. 1994.
- 129-** Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., "Protein mesurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
- 130-** Lu, A. Y. H. and Coon, M. J. "Role of hemoprotein P450 in fatty acid hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes". *J. Biol. Chem.* **243**, 1331-1332. 1968.
- 131-** Lu, A.Y.H., Strobel, H.W and Coon M.J. "Resolution of the cytochrome P450 containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components". *J. Biol. Chem.* **244**. 3714-3721. 1969a.
- 132-** Lu, A.Y.H., Strobel, H.W., Coon, M.J. "Hydroxylation of benzphetamine and other drugs by a solubilized form of cytochrome P450 from liver microsomes : lipid requirement for drug demethylation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 545-551. 1969b.

- 133-** Lu, A.Y.H. and Levin, W. "The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system". *Biochem. Biophys. Acta*, **344**, 206-240. 1974.
- 134-** Lu, A.Y.H., West, S.B. "Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P450". *Pharmac. Rev.* **3**, 277-295. 1979.
- 135-** Luciano, J.J., Raymond-Gelle, M.C., Hoang, W.D. "Hépatites médicamenteuses" : mise au point. *L.M.M. Médecine du Sud-Est*, **XXII**, **6**, 10472-10477. 1986.
- 136-** Ludden, T. M. "Pharmacokinetic : Interactions of the Macrolide Antibiotics". *Clin. Pharmacokin.* **10**, 63-79. 1985.
- 137-** Lynch, M.J., Mosher, F.R., Levesque, W.R. et Newby. The "*in vitro*" and the "*in vivo*" metabolism of morantel in cattle and toxicology species. *Drug. Metabolism. Reviews.* **18**, 253-288. 1987.
- 138-** McManu, M.E., Grantham, P.H., Cone, J.L., Roller, P.P., Wirth, P.J and Thorgeisson, S.S. "Guanethidine N-oxide formation as a measure of cellular flavin-containing monooxygenase activity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 437-443, 1983.
- 139-** Magdalou, J and Hammock, B.D. "Metabolism of tridiphane (2-(2,2,2-trichlorethyl)oxirane) by hepatic epoxide hydrolases and glutathione S-transférases in mouse". *Toxicology and Applied Pharmacology.* **91**, 439-49. 1987.
- 140-** Mandel, H.G. "Fundamentals of drug metabolism and drug disposition", B. N. La DU, H.G. Mandel, E.L; Way, editeur, Baltimore USA. **149**, 1971.
- 141-** Manns, M., Johnson, E.F., Griffin, K.J., Tang, E.M. and Sullivan, K.F". Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome db1". *J. Clin. Invest.* **83**, 1066-1072, 1989.

- 142-** Mansour, T.E. "Chemotherapy of parasitic worms : new biochemical strategies". *Sciences*, **205**, 462-469. 1979.
- 143-** Mansuy, D., Rouer, E., Bacot, C., Gans P., Chottard, J.C., Leroux, J.P. "Interaction of aliphatic N-hydroxylamines with microsomal cytochrome P450 : Nature of the different derived complexes and inhibitory effects of monooxygenases activities". *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1229-1237. 1978.
- 144-** Mansuy, D., Chottard, J.C., Lange, M. and Battioni, J.P. "On the nature and the reactivity towards substrates of the active oxygen hemoprotein complexes involved in the reaction of peroxydases and cytochrome P450 with two electrons oxidants". *J. Mol. Catal.* **7**, 215-226. 1980.
- 145-** Mansuy, D. "Activation de l'oxygène par les cytochromes P450". *Images de la chimie, CNRS. N° 73-75.* **41**. 1981.
- 146-** Mansuy, D., Battioni, P., Chotard, J.C., Rich, C., Chiaroni, A."Nitrosoalkane complexes of iron-porphyrins : Analogy between the bonding properties of nitrosoalkane and dioxygen". *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 455-463. 1983.
- 147-** Mansuy, D., Dansette, P.M., Foures, C., Jaouen, M., Moinet G. and Bayer, N. "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.* **33**, 1429-1435, 1984.
- 148-** Mansuy, D. "Cytochrome P450 and synthetic models" *Pure and App. Chem.* **59**, 759-770. 1987a.
- 149-** Mansuy, D. "Formation of reactive intermediates and metabolites: effects of macrolide antibiotics on cytochrome P450". *Pharmacol. Ther.* **33**, 41-45. 1987b.
- 150-** Mansuy, D. "A chemical approach to reactive metabolites", Benford, D.J., Bridges, J.W. and Gibson, G.G. Eds, *Drug metabolism from molecules to man*, Taylor and Francis, London, 669-678. 1987c.

- 151-** Mansuy, D., Battioni, P. and Battioni, J. P. "Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome P450 dependent monooxygenases". *Eur. J. Biochem.* **184**, 267-285. 1989.
- 152-** Mansuy, D. *Basic Science in Toxicology*. Edited by Volans, G.N.; Sims, J.; Sullivan, F.M and Turner, P. Proceedings of the 5th International Congress of Toxicology. Brighton, England, July 16-21, 1989.
- 153-** Mansuy, D., "Cours du D.E.A. de Toxicologie d'organes, médicaments et produits chimiques". Paris V, 1991a
- 154-** Mansuy, D., Valadon, P., Erdelmeier, I., Lopez-Garcia, P., Amar, C., Girault, J.P. and Dansette, P.M. "Thiophene S-oxides as new reactive metabolites". *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7825-7826. 1991b.
- 155-** Mansuy, D. and Delaforge, M. "Interactions of macrolides with cytochrome P450 and their clinical relevance". In *Macrolide. Chemistry. Pharmacology and clinical uses*, A. J. Bryskier, J. B. Butzler, H. C. Neu, and P. M. Tulkens vol.47 (Ed.) 635-646. Arnette Blackwell. 1993.
- 156-** Mc Murtry, R.J. and Mitchell, J.R. "Renal and hepatic necrosis after metabolic activation of 2-substituted furans and thiophenes, including furosemide and cephaloridine". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **42**, 285-291. 1977.
- 157-** Marietta, M.P., Vesell, E.S., Hartman, R.D., Weisz, J and Dvorchik, B.H. "Characterization of cytochrome P450 dependent aminopyrine-N-demethylase in rat brain : comparison with hepatic aminopyrine-N-demethylation". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 271-279. 1979.
- 158-** Marshall, W.J., Mac Lean, A.E.M. "A requirement for dietary lipids for induction of cytochrome P450 by phénobarbitone in rat liver microsomal fraction". *Biochem. J.* **122**, 569-573. 1971.

- 159-** Maser, E., Gebel, T and Netter, K. J. "Carbonyl reduction of metyrapone in human liver". *Biochem. Pharmacol.* **42**, suppl. S93-S98, 1991.
- 160-** Mason, H. S., Fowlks, W.L. and Peterson, E. "Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex". *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 2914-2915. 1955.
- 161-** Meier, U.T., Deyer, U.A., Male, P.J., Kronbach, T. and Meyer, U.A. "Mephenytoin hydroxylation polymorphism : characterization of the enzymatic deficiency in liver microsomes of poor metabolizers phenotyped *in vivo*". *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 488-494, 1985.
- 162-** Merrill, R.E. and Sherwood G. "The structure of thiophene sesquioxide: Syn, endo-3a, 4,7,7a-tetrahydro-4,7-epithiobenzo(b)-thiophene 1,1,8-trioxide". *J. Heterocyclic Chem.* **14**, 1251-1253. 1977.
- 163-** Mitchell, J.R, Jollow, D.J., Potter, W.Z, Davis. D.C, Gillette.J.R. and Brodie, B.B. "Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 185-194 1973.
- 164-** Murphy, P.J. and West, C.A. The role of mixed-function oxidases in Kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* greene endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 395-407. 1969.
- 165-** Mock, W.L. "Stable thiophene sulfoxides". *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 7610-7612. 1970.
- 166-** Morello, A., Bleeker, W. and Agosin, M. "Cytochrome P450 and hydroxylating activity of microsomal preparations from whole houseflies". *Biochem. J.* **124**, 199-205. 1971.
- 167-** Mori, Y., Yokoya, F., Toyoshi, K., Baba, S. et Sakai, Y. Absorption and excretion of suprofen in rats. "Drug Metabolism. Dispos. **11**, 387-391. 1983.

168- Mori, Y., Sakai, Y., Kuroda, N., Yokoya, F., Toyoshi, K., Horie, M et Baba, S . "Further structural analysis of urinary metabolites of suprofen in the rat". *Drug Metab. Dispos.* **12** , 767-771. 1984.

169- Mori, Y., Kuroda, N., Sakai, Y., Toyoshi, K. et Baba, S. "Species differences in the metabolism of suprofen in laboratory animals and man". *Drug Metabolism and Dispos.* **13**, 239-245. 1985.

170- Muerhoff, A.S., Griffin, K.J. and Johnson, E.F. "The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP 4A6 a cytochrome P450 fatty-acid omega-hydroxylase by clofibrac acid", *J. Biol. Chem.* **267**, 19051-19053. 1992.

171- Neau, E., Dansette, P.M., Andronick, V. and Mansuy, D. "Evidence for 5-hydroxylation of 2-aryl-thiophenes as a general metabolic pathway using a simple UV-visible assay". *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1101-1107, 1990.

172- Neau, E., "Oxydation hépatique des dérivés du thiophène : enzymes impliquées et réactions biomimétiques".Thèse de Doctorat de l'Université Paris V en Sciences pharmaceutiques, Paris, 1989.

173- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W and Gonzalez, F.J. The P450 gene superfamily : recommended nomenclature. *DNA.* **6**, 1-11. 1987.

174- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Philips, J.R., Sato, R. and Waterman, M.R. "The P450 superfamily-updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci". *DNA.* **8**, 1-13. 1989.

175- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyerseisen, R., Fuji Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Levin, W., Sato, R., Waterman, M.R. and Waxman, D.J. "The P450 superfamily : up-date on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature". *DNA and Cell Biology.* **10**, 1-14. 1991.

- 176-** Nelson, S. D. and Harvison, P.J. "Mammalian cytochromes P450", chapitre 2. Volume. 2, Guengerich Ed., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986.
- 177-** Nelson, D.R., Tetsuya, K., Waxman, D.J., Guengerich, F.P, Estabrook, R., Feyerseisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I. C, Gotho, O., Okuda, K. and Nebert, D.W. "The P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature". *DNA and Cell Biology*. **1**, 1-51. 1993.
- 178-** Nelson, D.R. and Strobel, H.W. "Evolution of P450 proteins". *Mol. Biol. Evol.* **4**, 572-593. 1987.
- 179-** Neuberger, J., Mieli-Vergani, G., Tredge, J.M., Davis, M. and Williams, R. "Oxidative metabolism of halothane in the production of altered hepatocyte membrane antigens in acute halothane-induced hepatitis" *Gut*. **22**, 669-672, 1981.
- 180-** Neuberger, J.M., Kenna, J.G and Williams, R. "Halothane hepatitis attempt to develop an animal model". *Int. J. Immunopharmacol.* **9**, 123-131. 1987.
- 181-** Nishikawa, T., Nagata, O., Tanbo, K., Yamada, T., Takahara, Y., Kato, H. et Yamamoto, Y. "Absorption excretion and metabolism of Tiquizium bromide in dogs, and relationship between pharmacological effect and plasma levels of unchanged drugs". *Xenobiotica*, **15**, 1053-1060. 1985.
- 182-** Oesch, F., Bentley, P., Golan, M., Stasiecki, P. "Metabolism of benzo(a)pyrene by subcellular fractions of rat liver : evidence for similar patterns of cytochrome P450 in rough and smooth endoplasmic reticulum but not in nuclei and plasma membrane". *Cancer. Res.* **45**, 4838-4843. 1985.
- 183-** Omura, T. and Sato, R. "A new cytochrome in liver microsomes". *J. Biol. Chem.* **237**, 1375-1376. 1962.

- 184-** Omura, T. and Sato, R. "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature" *J. Biol. Chem.*, **239** : 2370-2378. 1964a.
- 185-** Omura, T. and Sato, R. "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Solubilisation, purification, and properties" *J. Biol. Chem.* **239**, 2379-2385. 1964b.
- 186-** Omura, T. "Introduction : short history of cytochrome P450". *in* "*Cytochrome P450* " (Sato, R. and Omura, T., eds), Academic Press, 1-21. 1978.
- 187-** Ortiz de Montellano, P.R and Mathews, J.M. "Autocatalytic alkylation of the cytochrome P450 prosthetic heme group by 1-aminobenzotriazole". *Biochem J.* **195**, 761-764. 1981.
- 188-** Ortiz de Montellano, P.R and Reich, N.O. "Oxygen activation and transfer", in *Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry*, Paul R. Ortiz de Montellano (Ed.) (pp. 217-271). Plenum Press, New York. 1986a.
- 189-** Ortiz de Montellano, P.R and Reich, N.O. "Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In *cytochrome P450 , Structure. Mechanism and Biochemistry*, Paul R. Ortiz de Montellano (Ed.) (pp. 307-315). Plenum Press, New York. 1986b.
- 190-** Ostman, B and Olsson, S. "Determination of exchange of **D** and **T** against **H** in thiophene. Kinetic isotope effect in the isotopic exchange". *Arkiv Kemi.* **15**, 275-282. 1960.
- 191-** Palmer, G and Reedijk, J. "Nomenclature committee of the International Union of Biochemistry (NCIUB) nomenclature of the electron-transfer proteins. Recommendations", *Biochem. Biophys. Acta* **1060**, 599-611. 1989.
- 192-** Park, B.K., Coleman, J. W., Kitteringham, N.R. "Drug disposition and drug hypersensitivity. *Biochem. Pharmacol.*" **36**, 581-590. 1987.

- 193-** Pessayre, D., Descatoire, V., Konstantinova Mitcheva, M., Cobert, B., Level, R., Benhamou, J.P., Jaouen, M. and Mansuy, D. "Self induction by troleandomycin of its own transformation into a metabolite forming a stable 456 nm absorbing complex with cytochrome P450." *Biochem. Pharmacol.* **30**, 553-558. 1981.
- 194-** Pessayre, D. , Larrey, D. "Mechanisms of drug-induced hepatitis". *Liver cells and drugs*. Ed. A. Guillouzo. INSERM, **164**, 129-142. 1988.
- 195-** Pohl, R.J., Bend, J.R., Guarino, A.M. and Fouts, J.R. Hepatic microsomal mixed-function oxidase activity of several marine species from coastal marine. *Drug. Metab. Dispos.* **2**, 545-555. 1974.
- 196-** Pons, C., Dansette, P.M., Amar, C., Jaouen, M., Wolf, C.R., Gregeois, J., Homberg, J.C. and Mansuy, D."Detection of human hepatitis anti-liver Kidney microsomes (LKM2) autoantibodies on rat liver sections is predominantly due to reactivity with rat liver P450 2C11". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**, 1328-1334. 1991.
- 197-** Potter, W.Z, Davis, D.C., Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Gillette, J.R and Brodie, B.B. "Acetaminophen-induced hepatic necrosis. 3. Cytochrome P450 mediated covalent binding *in vitro*". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 203-210. 1973.
- 198-** Potts, J.R.M., Wecklych, R. and Conn, E.E., "The hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P450". *J. Biol. Chem.* **249**, 5019-5026. 1974.
- 199-** Pons, C. "Origine des anticorps anti-tissus apparaissant dans des hépatites médicamenteuses de type immunoallergique". Thèse de Doctorat de l'université Paris VII en toxicologie fondamentale et appliquée, Paris, 1989.
- 200-** Pompon, D. and Coon, M.J. "On the mechanism of action of cytochrome P450" *J. Biol. Chem.* **259**, 15377-15385. 1984.

- 201-** Pompon, D. "Rabbit liver cytochrome P450 LM2 : "Roles of substrates inhibitors and cytochrome b5 in modulating the partition between productive and abortive mechanisms". *Biochemistry*. **26**, 6429-6435. 1987.
- 202-** Pouderoux, P., Pageaux, P., Duhamel, O., Gilson, J. "Un nouveau cas d'hépatite au thiophéol". *Gastroenterol. Clin. Biol.* **12**, 673-4, 1988.
- 203-** Poupon, R., Calmus, Y., Homberg, J.C and Darnis, F. "Hépatotoxicité médicamenteuse", pp 225-233. Fillastre.J (INSERM) Publications de l'université de Rouen, 1986.
- 204-** Poulos, T.L. "Modeling of mammalian cytochromes P450s on basis of P450 cam X-Ray structure". In *Methods in Enzymology*, Waterman, M.R. and Johnson, E.F. (Ed.) **206** pp. 11-30. Academic Press, INC Harcourt Brace Jovanovich, San Diego. 1991.
- 205-** Press, J.B. "Pharmacologically active compounds and other thiophene derivatives, Thiophene and its derivatives. Part I. Heterocyclic compounds. Edited by Salo Gronowitz, Intersciences publication. **44**, 553. 1985.
- 206-** Prescott, L.F., "The hepatotoxicity of paracetamol", hépatotoxicité médicamenteuse, Fillastre, J. Ed., INSERM, France, 1986.
- 207-** Prochazka, M. "Über thiophen-1-oxid". *Collect Czech Chem. Comm.* **30**, 1158-1168, 1965.
- 208-** Prough, R.A., Freeman, P.C and Hines, R.N. "The oxidation of hydrazine derivatives catalysed by the purified liver microsomal FAD-containing monooxygenase". *J. Biol. Chem.* **256**, 4178-4184. 1981.
- 209-** Raach, M.S. "The chemistry of heterocyclic compouds, thiophene and its derivatives". (Gronowitz, S.; Ed.) **44** part 1, 571-627. 1985.
- 210-** Rance, D.J. "Sulfur-containing drugs and related organic compounds, chemistry, biochemistry and toxicology : Metabolism of

sulfur functional groups" (Damani L.A. Ed.) 1 part B, pp. 217-268. Ellis Horwood Ltd, Chichester. 1989.

211- Robbins, J.E., Bakke, J.E. et Feil, V.J. "Metabolism of benzo(b)thien-4-ylmethylcarbamate (mobam) in dairy goats and a lactating cow" J. Agr. Food Chem. **18**, 130-134. 1970.

212- Roth, J.A. "Benzylhydrazine a selective inhibitor of human and rat brain monoamine oxidase". Biochem. Pharmacol. **28**, 729-732. 1979.

213- Ruckpaul, K., Rein, H. Cytochrome P450. Akademie-Verlag, Berlin **11**, 1984.

214- Sartori, E., Delaforge, M., Mansuy, D. "*In vitro* interactions of rat liver cytochrome P450 with erythromycin, Oleandomycin and erythrasolamine derivatives : Importance of structural factors". Biochem. Pharmacol. **38**, 2061-2068. 1989.

215- Sacher, M., Blümel, P., Thaler, H. and Manns, M. "Chronic active hepatitis associated with vitiligo, nail dystrophy, alopecia and a new variant of LKM antibodies". Journal of hepatology. **10**, 364-369. 1990.

216- Sato, R. and Omura, T. "A carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes". Proc. 5th Intern. Congr. Biochem. **9**, 529. 1961.

217- Sartori, E., Delaforge, M., Mansuy, D. and Beaune, Ph. "Some erythromycin derivatives are strong inducers in rats of a cytochrome P450 very similar to that induced by 16 pregnenolone carbonitrile". Biochem. Biophys. Res. Comm. **128**, 1434-1439. 1985.

218- Schenkman, J.B., Remmer, H. and Estabrook, R.W. "Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome". Mol. Pharmacol. **3**, 113-123. 1967.

219- Sherlock, S. "The spectrum of hepatotoxicity due to drugs", Lancet, **22**, 440-444. 1986.

- 220-** Schmitt, J., Suquet, M., Comoy, P. Clim, T et Callet, G. " Sur une voie d'accès aux benzothiophènes S-oxides". Bulletin de la société chimique de France. **11**, 4575-4580. 1968.
- 221-** Schuetz, J. D., Molowa, D.T and Guzelian, P.S. "Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver". Arch. Biochem. Biophys. **274**, 355-365. 1989.
- 222-** Schultzen, O and Naunyn, B. "Ueber das Verhalten der Kohlenwasserstoffe im organismus". Arch. Anat. Physiol. 349. 1867.
- 223-** Skaugset, A.E., Rauchfuss, T.B., Stern, C.L. "Oxidation of coordinated thiophen : the preparation of Cp* Rh (tetramethylthiophen S-oxide)". J. Am. Chem. Soc., **112**, 2432-2433. 1990.
- 224-** Sellman, R., "Pharmacological and toxicological studies on tienilic acid. Thèse de l'Université de Turku, section Pharmacologie, Turku (Finlande), 1981.
- 225-** Sligar, S.G., Filipovic, D. and Stayton, P. "Mutagenesis of cytochromes P450 cam and b5" in Methods in Enzymology, Waterman, M.R. and Johnson, E.F. (Ed.) **206**, pp. 31-49. Academic Press, INC Harcourt Brace Jovanovich, San Diego. 1991.
- 226-** Srogl, J., Janda, M., Stibor, I., Kos, J. and Vyskocyl, V. "Electrochemical oxidation of Benzothiophenes". Collection Czechoslov. Chem. Commun. **43**, 2015-2023. 1978.
- 227-** Strittmatter. P. "Preparation of cytochrome b5". Methods in Enzymology. **10**, 553. 1967.
- 228-** Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Heidema, J. and Coon, M.J. "Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P450 and in fatty acid hydrocarbon and drug hydroxylation". J. Biol. Chem. **245**, 4851-4854. 1970.

- 229-** Strobel, H.W., Digman, J.D. "Purification and properties of NADPH-cytochrome P450 reductase". *Methods in Enzymology*. **52**, 89-96. 1978.
- 230-** Strumberg, D., Hauffa, B.P., Horsthemke, B. and Grosse-Wilde, H. "Molecular detection of genetic defects in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: a study of 27 families" *Eur. J. Pediatr.*, **151**, 821-826. 1992.
- 231-** Takaya, T., Kosaka, S., Otsuji, Y. and Imoto, E. "Preparation and oxidation of dihydrothiophenes", *Bull. Chem. Soc. Jap.* **41**, 2086, 1968.
- 232-** Tarloff, J.B., Goldstein, R.S and Hook, J.B., "Xenobiotic transformation by the kidney; pharmacological and toxicological aspects", *Progress in Drug Metabolism*. **12**, 29, Ed G.G. Gibson chez Taylor et Francis, LONDON, 1990.
- 233-** Thuillier, G., Laforest, J., Cariou, B., Bessin, P., Bonnet, J., Thuillier, J. "Dérivés hétérocycliques d'acides phénoxy-acétiques, synthèse et étude préliminaire de leurs activités diurétiques et uricosuriques". *Eur. J. Med. Chem.* **9**, 625-631, 1974.
- 234-** Todd, P.A. et Heel, R.C . "Suprofen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and analgesic efficacy". *Drugs*. **30**, 514. 1985.
- 235-** Torsell, K. "Diels-Alder reactions of Thiophene oxides generated in situ". *Acta. Chemica. Scandinavica . B.* **30**, 353-357.; 1976.
- 236-** Tynes, R.E. and Philpot, R.M. "Tissue-and species-dependent expression of multiple forms of mammalian microsomal flavin-containing monooxygenase". *Mol. Pharmacol.* **31**, 569-574. 1987.
- 237-** Uehleke, H. The role of cytochrome P450 in the oxidation of individual amines. *Drug. metab. Dispos.* **1**, 299-313. 1973.

- 238-** Valadon, Ph. "Cytochromes P450 et activation métabolique du noyau thiophène exemple de l'acide tiénilique et de ses dérivés". (Doctorat de l'université de Paris VI). 1992.
- 239-** Vainio, H.R., Pääkkönen K., Rönholm, K., Raunio, V. and Pelkonen, O. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. **3**, 147-51. 1976.
- 240-** Vignier, V., Berthou, F., Dreano, Y. et Floch, H.H. "Dibenzothiophene sulfoxidation : a new and fast high performance liquid chromatographic assay of mixed-function oxidation". *Xenobiotica*, **15**, 991-999. 1985.
- 241-** Weisburger, J.H and Weisburger, E.K. "N-oxidation enzymes". *Handbook of experimental pharmacology*. **28**, 312-333. 1971.
- 242-** Waxman, D.J., Dannan, G.A and Guengerich, F.P. "Regulation of rat hepatic cytochrome P450, age dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inductibility of sex-specific isoenzymes". *Biochemistry*. **24**, 4409-4417. 1985.
- 243-** Waxman, D.J. and Azaroff. L. "Phenobarbital induction of cytochrome P450 gene expression". *Biochem. J.* **28**, 577-592. 1992.
- 244-** Watkins, P. B., Wrighton, S. A., Maurel, P., Schuetz, E. J., Mendez Picon, G. and Guzelian, P.S. "Identification of an inducible form of cytochrome P450 in human liver". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6310-6314. 1985.
- 245-** White, R.E., and Coon, M. J. "Oxygen activation by cytochrome P450". *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 315-356. 1980.
- 246-** Wilkinson, C.F., Hentnarsky, K. and Hicks, L.J. *Pest, Biochem. Biophys.* **4**, 299-312. 1974.
- 247-** Williams, R.T. "Detoxification Mechanisms" John Wiley and Sons (Ed.), 2nd ed. New York. 1959.

- 248-** Williams, D.E., Ziegler, D.M., Nordin, D.J., Hale, S.E. and Masters, B.S.S. Rabbit lung flavin-containing monooxygenase is immunochemically and catalytically distinct from the liver enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**, 116-122. 1984.
- 249-** Williams, R.T. "Pathways of drug metabolism". Handbook of experimental pharmacology. **28**, 226-242. 1971.
- 250-** Wislocki, P.G., Miwa, G.T., Lu, A.Y.H. "Enzymatic Basis of detoxication" (W.B. Jakoby) Academic Press. **135**, Chap. 7. 1980
- 251-** Wrighton, S.A., Maurel, P., Schuetz, E.G., Watkins, P.B., Young, B. and Guuzelian, P.S. "Identification of the cytochrome P450, induced by macrolide antibiotics in rat liver as the glucocorticoid responsive cytochrome P450". *Biochemistry.* **24**, 2171-2178. 1985.
- 252-** Wu, D. A., Hu, M. C and Chung, B. C. "Expression of functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450 in *Saccharomyces cerevisiae*" *DNA and Cell Biology.* **10**, 201-209. 1991.
- 253-** Yang, C.S., Patten, C.J., Ishizaki, H and Yoo, J.S.H., "Induction, purification and characterization of cytochrome P450 IIE". *Methods in Enzymology.* vol. **206**, 595-596. 1991.
- 254-** Ziegler, D.M. "Microsomal flavin-containing monooxygenase" : oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur compounds. In enzymatic basis of detoxication (W.B. Jacoby,eds), Academic Press, New-York. **1**, 201-225. 1980.
- 255-** Ziegler, D.M. "Functional groups bearing sulfur". In enzymatic basis of detoxication (W.B. Jacoby,eds), Academic Press, New-York. **1** 171-184. 1982.
- 256-** Ziegler, D.M., "Metabolic oxygenating of organic nitrogen and sulfur compounds". *Drug Metabolism and Drug toxicity*, Mitchell and Horning Ed., Raven Press, New York, 33-53. 1984.

257- Ziegler, D.M. "Molecular basis for N-oxygenation of second ter- amines. in biological oxidation of nitrogen in organic molecules" (J.W. Gorrod and L.A.Damani, eds), Ellis Horwood, Chichester. **3**, 43-52. 1985.

258- Ziegler, D.M. "Bioactivation of xenobiotics by flavin-containing monooxygenase". *Adv. Exp. Med. Biol.* **283**, 41-50. 1990.

259- Ziegler, D.M. "Bioactivation of xenobiotics by flavin-containing monooxygenase". In *Biological Reactive Intermediates IV* (C.M. Witmer, R.R. Snyder, D.J Jollow, G.F Kalf, J.J Kocsis, and I.G Sipes, Eds.), pp.41-50. Plenum Press, New York. 1991.

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1	Système ADME : Administration-Distribution-Métabolisme et élimination des xénobiotiques	2
Figure 1.2	Enzymes de phase I et de phase II : bilan global de fonctionnalisation, de conjugaison et d'élimination d'un exogène	8
Figure 1.3	Présentation schématique des cytochromes P450s	10
Figure 1.4	Schéma des différentes protéines du complexe monooxygénasique dans la membrane du réticulum endoplasmique hépatique	12
Figure 1.5	Cycle catalytique du cytochrome P450	14
Figure 1.6	Mécanisme général d'hydroxylation d'un substrat par les monooxygénases à P450	16
Figure 1.7	Inducteurs classiques des cytochromes P450	20
Figure 1.8	Cycle catalytique des flavines monooxygénases	35
Figure 1.9	Glutathion conjugué et biosynthèse des acides mercapturiques	42
Figure 1.10	Métabolisme du benzo(a)pyrène	45
Figure 1.11	Métabolisme de l'acétaminophène	46
Figure 1.12	Hypothèse de formation d'un haptène dans les réactions d'hypersensibilité induites par les médicaments	49
Figure 1.13	Mécanismes immunitaires dans l'hépatotoxicité médicamenteuse de type immuno-allergique	51
Figure 1.14	Formule de l'acide tiénilique	54
Figure 1.15	Quelques exemples d'oxydation métabolique de dérivés soufrés	56
Figure 1.16	Formules du dibenzothiophène et du tetrahydrothiophène	57
Figure 1.17	Métabolisme proposé pour le benzothiophène et pour le mobam	58
Figure 1.18	Métabolisme oxydatif du thiophène postulé par Bray	60
Figure 1.19	Quelques dérivés substitués du thiophène	63
Figure 1.20	Métabolisme de l'acide tiénilique	66
Figure 1.21	Le dérivé 5 hydroxylé de l'acide tiénilique en solution aqueuse	67

Figure 1.22	Métabolisme proposé pour le suprofen	68
Figure 1.23	Formule de l'isomère de l'acide tiénilique	69
Figure 1.24	Métabolisme microsomal hépatique de l'isomère de l'acide tiénilique	69
Figure 1.25	Les différences d'évolution comparées de l'AT et de l'IAT après oxydation métabolique	71
Figure 1.26	Métabolisme proposé pour le pyrantel	72
Figure 1.27	Schéma de synthèse de sulfoxyde de thiophène à partir du 2,5 di-ter-butylthiophène	74
Figure 1.28	Réactions d'addition de sulfoxyde et de la sulfone de thiophène formés in situ, avec des quinones	75
Figure 1.29	Oxydation du thiophène et du 2-méthylthiophène	77
Tableau 1.1	Nomenclature, classification et multiplicité des gènes des P450s de différentes espèces animales	23
Tableau 1.2	Homologie entre les P450s de foie humain et de rat.	25
Tableau 1.3	Spécificité, inductibilité et activité oxydante de P450s hépatiques de rat	27
Tableau 1.4	Enzymes de phase II et principales réactions de conjugaison	38
Figure 2.1	Métabolites urinaires du benzothiophène tritié	82
Figure 2.2	HPLC analytique des urines de 9-24h, de rat traité avec du benzothiophène	83
Figure 2.3	Spectre RMN ^1H des métabolites A et A'	85
Figure 2.4	Spectre RMN ^1H des métabolites B et B'	85
Figure 2.5	Schéma de synthèse du sulfoxyde de benzothiophène et de ses adduits avec le mercaptoéthanol et la N-acétylcystéine	88
Figure 2.6	Schéma de synthèse de la sulfone de benzothiophène et de son adduit avec la N-acétylcystéine	89
Figure 2.7	HPLC analytique des urines de rat traité avec du benzothiophène et conservées au congélateur pendant quelques jours à quelques semaines	92
Figure 2.8	Spectre RMN ^1H des métabolites D et D'	93
Figure 2.9	Schéma de synthèse des métabolites 4D + 4D'	94
Figure 2.10	Schéma de synthèse du métabolite E	97

Figure 2.11	Métabolisme <i>in vivo</i> du benzothiophène chez le rat	101
Figure 2.12	Synthèse des authentiques des métabolites de benzothiophène	102
Tableau 2.1	Cinétique d'excrétion urinaire et fécale des métabolites du benzothiophène	84
Tableau 2.2	Les données de masse des métabolites urinaires du benzothiophène	95
Tableau 2-3	Comparaison en RMN ¹ H des signaux correspondants aux protons cycliques 2 et 3 des composés ayant les structures ci-dessous	95
Tableau 2.4	Métabolisme <i>in vivo</i> du sulfoxyde et de la sulfone de benzothiophène et des métabolites A et A'	98
Tableau 2.5	Cinétique du métabolisme <i>in vivo</i> de la sulfone de benzothiophène	99
Figure 3.1	Métabolisme <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> du benzothiophène : passage par un sulfoxyde de benzothiophène	108
Figure 3.2	Mécanisme proposé pour la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique	109
Figure 3.3	Hypothèse de formation d'un sulfoxyde de benzothiophène substitué en 2 par un groupe attracteur COAr	109
Figure 3.4	Oxydation chimique du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène 15	110
Figure 3.5	Métabolisme <i>in vitro</i> du 2-(4-chlorobenzoyl)benzo(b)thiophène 15	113
Figure 3.6	Spéctre de masse (impact électronique) du métabolite 17	116
Figure 3.7	Spéctre de masse (ionisation chimique, NH ₃) du métabolite 17	117
Figure 3.8	Spéctre de masse (impact électronique) du métabolite 18	119
Figure 3.9	Spéctre de masse (ionisation chimique, NH ₃) du métabolite 20	121
Figure 3.10	Métabolisme <i>in vivo</i> chez le rat du composé 15	122
Figure 3.11	Spéctre de masse (impact électronique)	

	du métabolite <u>22</u>	124
Figure 3-12	Spectre de masse (ionisation chimique, NH ₃) du métabolite <u>22</u>	125
Figure 3-13	Métabolites <u>19</u> , <u>20</u> et <u>22</u> dans l'urine de rat traité avec le composé <u>15</u> .	126
Figure 3-14	Métabolisme <i>in vitro</i> du 2-(4-chlorobenzoyl) 3-hydroxy benzo(b)thiophène <u>19</u>	128
Figure 3-15	Métabolisme de <u>15</u> <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> et évolution des métabolites formés	130
Figure 3-16	Schéma de synthèse des authentiques des benzothiophènes substitués	131
Tableau 3.1	RMN ¹ H et RMN ¹³ C des authentiques <u>15</u> , <u>16</u> , <u>17</u> , <u>19</u> et <u>20</u>	111
Tableau 3.2	Métabolisme <i>in vitro</i> du <u>15</u> et nature des métabolites formés en présence de différents inducteurs	114
Figure 4.1	Cinétique d'excrétion urinaire entre 0 et 33 heures des métabolites urinaires du thiophène radioactif	134
Figure 4.2	HPLC analytique de l'urine de rat traité au thiophène	135
Figure 4.3	Spectre de masse (ionisation chimique, NH ₃) du métabolite <u>28</u> , majoritaire	137
Figure 4.4	Métabolisme <i>in vivo</i> du thiophène chez le rat	138
Figure 4.5	RMN ¹³ C du métabolite <u>28</u>	139
Figure 4.6	Spectre infra-rouge du métabolite <u>28</u>	140
Figure 4.7	Métabolisme <i>in vitro</i> du thiophène radioactif	145
Figure 4.8	Spectre de masse (impact électronique) du métabolite <u>31</u>	147
Figure 4.9	Spectre de masse (ionisation chimique, NH ₃) du métabolite <u>31</u>	148
Figure 4.10	Schéma de synthèse des dimères du sulfoxyde de thiophène	149
Figure 4.11	Métabolisme <i>in vivo</i> du thiophène chez le rat et <i>in vitro</i> avec les microsomes hépatiques de rat	154
Tableau 4.1	RMN ¹ H et RMN ¹³ C du métabolite <u>28</u>	141
Tableau 4.2	Différentes activités de microsomes de rats soit non traités soit traités par divers inducteurs sur la	

transformation du thiophène marqué	143
Tableau 4.3 Les données de RMN ¹ H et de masse des métabolites du thiophène obtenus <i>in vitro</i> et de leurs authentiques correspondants	151
Figure 6.1 Exemple de numérotation de l'adduit du sulfoxyde de benzothiophène avec la N-acétylcystéine	164
Figure 6.2 Métabolisme du thiophène : gradient d'HPLC analytique	184
Figure 6.3 Métabolisme du thiophène : gradient d'HPLC préparative des métabolites <u>31</u> et <u>32</u> .	185
Figure 6.4 Métabolisme du thiophène : gradient d'HPLC préparative du métabolite <u>33</u> .	185