



HAL
open science

Cytochromes P-450 et Activation Metabolique du Noyau Thiophene : exemple de l'acide tiénilique et de ses dérivés.

Philippe Valadon

► **To cite this version:**

Philippe Valadon. Cytochromes P-450 et Activation Metabolique du Noyau Thiophene : exemple de l'acide tiénilique et de ses dérivés.. Chimie organique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 1992. Français. NNT: . tel-00651961

HAL Id: tel-00651961

<https://theses.hal.science/tel-00651961>

Submitted on 14 Dec 2011

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.

ACADEMIE de PARIS
UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE

THESE

pour l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE
PARIS VI

par **Philippe VALADON**

CYTOCHROMES P-450 et ACTIVATION METABOLIQUE
DU NOYAU THIOPHENE :
EXEMPLE DE L'ACIDE TIENILIQUE ET DE SES DERIVES

présentée et soutenue publiquement le 2 Octobre 1992
devant le jury composé de

Monsieur le Professeur François Le Goffic, Président et Rapporteur,
Monsieur le Professeur Jean-Paul Leroux, Rapporteur,
Monsieur le Professeur Philippe Druet, Examineur,
Monsieur le Docteur Daniel Mansuy, Examineur,
Monsieur le Docteur Patrick Dansette, Examineur.

ACADEMIE de PARIS
UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE

THESE

pour l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE
PARIS VI

par **Philippe VALADON**

CYTOCHROMES P-450 et ACTIVATION METABOLIQUE
DU NOYAU THIOPHENE :
EXEMPLE DE L'ACIDE TIENLIQUE ET DE SES DERIVES

présentée et soutenue publiquement le 2 Octobre 1992
devant le jury composé de

Monsieur le Professeur François Le Goffic, Président et Rapporteur,
Monsieur le Professeur Jean-Paul Leroux, Rapporteur,
Monsieur le Professeur Philippe Druet, Examineur,
Monsieur le Docteur Daniel Mansuy, Examineur,
Monsieur le Docteur Patrick Dansette, Examineur.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de Monsieur Daniel MANSUY. Je voudrais ici le remercier pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son équipe et lui exprimer ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'il a toujours su me prodiguer et l'art avec lequel il a dirigé mes recherches.

J'ai eu le plaisir de travailler aux côtés de Monsieur Patrick DANSETTE et ainsi de profiter chaque jour de son enseignement et de son enthousiasme. C'est une chance rare, je le remercie tout particulièrement.

Je remercie Monsieur Jean-Pierre GIRAULT pour m'avoir patiemment initié à la R.M.N. Sa grande disponibilité et ses compétences ont été d'un grand secours.

C'est Claudine AMAR qui a initié ce travail. Je ne pourrais oublier ces longues heures passées ensemble à traquer le 'métabolite'! Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et la remercie de m'avoir donné son amitié.

Je remercie Maryse JAOUEN, Brigitte CHAMPION, Pilar LOPEZ, Eric BONJERBALE et Colette DESCHAMPS pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Je voudrais exprimer ma plus profonde gratitude envers toutes les personnes qui m'ont aidé et fait profiter de leur conseil, en particulier Pierrette BATTIONI, Isabelle ARTAUD, Irene ERDELMEIER et Jean-Luc BOUCHER en chimie, Marcel DELAFORGE et Jean-Paul RENAUD en biochimie. Je n'oublierais pas non plus l'ensemble des membres de l'URA pour ces nombreuses années passées ensemble et les remercie.

RESUME

L'acide tiénilique (AT) est diurétique responsable d'hépatites autoimmunes. Dans le sérum des patients on retrouve des autoanticorps (anti-LKM2) dirigés contre les cytochromes P-450 impliqués dans la métabolisation de l'AT et de son isomère (TAI).

La première partie concerne la détermination de la nature de l'entité réactive du TAI au moyen d'un piégeage *in vitro* chez le rat par le mercaptoéthanol. Deux sulfoxydes de dihydrothiophènes ont été caractérisés qui nous permettent de proposer un sulfoxyde de thiophène. En présence d'un excès de mercaptoéthanol, ces deux métabolites de piégeage évoluent en une succession de plusieurs métabolites. Afin de généraliser à l'ensemble des cytochromes P-450, nous avons mis en évidence ce nouveau métabolisme successivement *in vivo* chez le rat, *in vitro* chez l'homme et dans un système modèle constitué de microsomes de levures *Saccharomyces cerevisiae* recombinées exprimant le P-450 IIC9 ou le P-450 IIC10. Ces 2 cytochromes P450 possèdent une activité d'oxydation vis à vis de l'AT et du TAI.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons fixé l'AT à la sérumalbumine de bœuf. La protéine obtenue (BSA-AT) est immunogène chez le lapin et les anticorps obtenus (anti-AT) reconnaissent en Elisa les métabolites de l'AT ou du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales. Ces anticorps seront un outil puissant pour étudier la fixation covalente des métabolites de l'AT.

SUMMARY

Tienilic acid (TA) is a diuretic drug responsible for autoimmune hepatitis in a few subjects. The sera of patients contain autoantibodies called anti-LKM2 which recognize cytochromes P450's. These P450's also catalyze the metabolic activation of TA and its isomer (TAI).

The first part of this study concerns the determination of the reactive intermediate of TAI by trapping it with mercaptoethanol *in vitro* in rats. Two dihydrothiophene sulfoxides have been fully characterised. They can only be derived from a new reactive metabolite : a thiophene sulfoxide intermediate. In excess of mercaptoethanol the primary metabolites are transformed into several successive metabolites. The involvement of cytochromes P450's in the thiophene sulfoxide formation of TAI has been generalized both *in vivo* in rats and *in vitro* in human. In that case, human microsomes and yeast microsomes expressing human P450 IIC9 or IIC10 were able to produce the same reactions with TA and TAI as substrates.

The second part describes the haptenization of bovine serumalbumin with TA. This protein injected to rabbits produced the formation of antibodies (anti-TA) which recognize TA and TAI metabolites bound to microsomal proteins as shown by Elisa. These antibodies should be an efficient tool to investigate covalent binding of TA and TAI to P450's.

SOMMAIRE

1. UN PROBLEME DE TOXICOLOGIE	1
1.1. L'exposition aux substances exogènes et pouvoir toxicogène	1
1.2. Le problème de l'acide tiénilique	2
1.3. La superfamille des cytochromes P-450	
1.3.1. Le système de détoxification hépatique	3
1.3.2. Généralités sur le cytochrome P-450	4
1.3.3. Aspects structuraux	6
1.3.4. Cycle catalytique du cytochrome P-450	7
1.3.5. Classification phylogénique des cytochromes P-450	9
1.3.6. Régulation, inductibilité	11
1.3.7. Polymorphisme génétique	13
1.4. Activation métabolique et système de détoxification	
1.4.1. Toxicité chimique et activation métabolique	13
1.4.2. Entités réactives et cytochromes P-450	13
1.4.3. Rôle du glutathion	14
1.4.4. Activation métabolique oxydative	15
1.4.5. Activation métabolique réductive	15
1.4.6. Activation métabolique par conjugaison	16
1.5. Métabolisme des dérivés thiophéniques et de l'acide tiénilique	
1.5.1. Rappels sur le métabolisme des dérivés soufrés non thiophéniques.	
1.5.2. Caractère aromatique du noyau thiophène des thiaarènes	16
1.5.3. Métabolisme des dérivés thiophéniques	17
1.5.4. Caractéristiques du métabolisme de l'acide tiénilique	20
1.6. Immunotoxicité de l'acide tiénilique.	
1.6.1. Maladie autoimmune induite par l'acide tiénilique	22
1.6.2. Hépatopathies autoimmunes et médicaments	22
1.6.3. Anticorps anti-tissus en pathologie hépatique autoimmune	23
1.6.4. Exemples d'hépatopathies autoimmunes	24
1.6.5. Hépatites induites par l'acide tiénilique	25
1.7. Problèmes posés.	
 2. MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION D'UN SULFOXYDE DE THIOPHENE <i>IN VITRO</i>	 29
2.1. Métabolisme de l'isomère de l'acide tiénilique avec des microsomes hépa- tiques de rat	29
2.1.1. En l'absence de mercaptoéthanol	29
2.1.2. En présence de mercaptoéthanol	32
2.1.3. Plan d'étude	33

2.2. Détermination de la structure des métabolites primaires <u>13</u> et <u>14</u> de piégeage par le mercaptoéthanol.	
2.2.1. Etude des métabolites <u>13</u> et <u>14</u>	33
2.2.2. Etude du métabolite <u>17</u>	44
2.3. Détermination de la structure des métabolites <u>15</u> et <u>16</u>.	
2.3.1. Réactivité des sulfoxydes <u>13</u> et <u>14</u> avec le mercaptoéthanol.....	49
2.3.2. Etude du métabolite <u>16</u>	51
2.3.3. Etude du métabolite <u>15</u>	53
2.3.4. Etude du métabolite <u>22</u>	57
2.4. Expériences de deutériation sélective.	59
2.4.1. Préparation du métabolite <u>16</u> deutérié.....	61
2.4.2. Transformation du métabolite <u>16</u> dideutéié en <u>15</u> puis en TAI.....	61
2.4.3. Attribution des signaux des protons thiophéniques du TAI.....	61
2.4.4. Transformation du métabolite <u>14</u> dideutéié en métabolite <u>21</u> deutérié et en métabolite <u>22</u> deutérié ; attribution des signaux R.M.N.....	68
2.5. Discussion.	70
2.5.1. Récapitulatif des structures des métabolites de piégeage.....	70
2.5.2. Aspects nouveaux du métabolisme du TAI et hypothèses sur les mécanismes réactionnels.....	73
2.5.3. Bilan métabolique du TAI et conséquences sur le métabolisme des composés contenant un noyau thiophène.....	78

3. ETUDE DE L'OXYDATION MICROSOMALE DU TAI..... 83

RECHERCHE D'UNE S-OXYDATION MICROSOMALE DU TAI *IN VIVO* CHEZ LE RAT ET *IN VITRO* CHEZ L'HOMME

3.1. Mise en évidence d'une S-oxydation du TAI <i>in vivo</i> chez le rat.....	85
3.1.1. Etude du métabolisme de piégeage du TAI <i>in vitro</i> par la N-acétylcystéine.....	85
3.1.2. Recherche de dérivés mercapturiques dans les urines de rats.....	89
3.1.3. Conclusion.....	92
3.2. Etude du métabolisme du TAI avec des microsomes hépatiques humains.	
3.2.1. Méthode d'étude.....	93
3.2.2. Métabolisme du TAI en présence de microsomes SP1.....	95
3.2.3. Inhibition de la S-oxydation du TAI par les anticorps anti-LKM2....	96
3.2.4. Conclusion.....	97
3.3. Etude préliminaire de la S-Oxydation du TAI et de la 5-hydroxylation de l'AT par des levures exprimant les P-450 IIC9 et IIC10.	
3.3.1. Cultures des cellules, préparation de la fraction microsomale et réalisation des incubats.....	97
3.3.2. Mise en évidence d'une 5-hydroxylation de l'AT et d'une réaction de fixation covalente du TAI aux protéines microsomales.....	98
3.3.3. Mise en évidence d'une S-oxydation du TAI.....	99
3.3.4. Conclusion.....	99
3.4. Discussion.	100

ETUDE PRELIMINAIRE DE LA FIXATION COVALENTE DU TAI AUX PROTEINES MICROSOMALES

3.5. Etude de la réactivité du sulfoxyde de TAI avec différents nucléophiles.	
3.5.1. Protocole d'étude.	101
3.5.2. Résultats.	103
3.5.3. Conclusion.	103
3.6. Propriétés des métabolites du TAI fixés aux protéines microsomales.	103
3.6.1. Méthodes et résultats.	104
3.6.2. Conclusion.	107
3.7. Discussion.	108

4. PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-ACIDE TIENILIQUE

4.1. Couplage de l'acide tiénilique à la BSA au niveau du noyau thiophène. ...	113
4.1.1. Stratégie de couplage.	114
4.1.2. Résultats.	116
4.2. Protocole d'immunisation et obtention des sérums chez le lapin. Mise en évidence d'une sérologie anti-acide tiénilique et choix du lapin meilleur répondeur.	
4.2.1. Méthodes et résultats.	116
4.2.2. Conclusion préliminaire.	121
4.3. Caractérisation de l'épitope de l'acide tiénilique reconnu par les anticorps anti-AT.	
4.3.1. Méthodes.	122
4.3.2. Résultats.	122
4.4. Discussion.	124

5. CONCLUSION.

6. PARTIE EXPERIMENTALE.

6.1. Mise en évidence de la formation d'un sulfoxyde de thiophène <i>in vitro</i>.	
6.1.1. Produits chimiques.	135
6.1.2. Origine des animaux.	135
Protocole d'induction au phénobarbital.	135
Protocole d'induction au clofibrate.	135
Protocole de préparation des microsomes de foie de rat.	135
6.1.3. Dosage des protéines.	136
Dosage du contenu en cytochromes P-450.	136
Dosage de l'activité de 5-hydroxylation de l'acide tiénilique.	137
Caractéristiques des préparations microsomales.	137
6.1.4. Réalisation des incubats et des échantillons H.P.L.C.	138
6.1.5. Réalisation des élugrammes H.P.L.C. et des radiochromatogrammes.	138
6.1.6. Mesure de la fixation covalente aux protéines microsomales.	139
6.1.7. Etudes en Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.).	139
6.1.8. Autres techniques spectroscopiques.	140
6.1.9. Préparation des métabolites 13 et 14	140
6.1.10. Préparation du métabolite 17	140
6.1.11. Deutériation du TAI et de 21 par l'acide heptafluorobutyrique deutérié.	141

6.2. Etude de la S-oxydation du TAI <i>in vivo</i> chez le rat et <i>in vitro</i> chez l'homme.	
6.2.1. Métabolisme du TAI en présence de N-acétylcystéine <i>in vitro</i> chez le rat.....	141
6.2.2. Métabolisme du TAI <i>in vivo</i> chez le rat.....	142
6.2.3. Etude du métabolisme du TAI par des microsomes hépatiques humains.....	142
Préparation d'un échantillon authentique de l'alcool 34 obtenu par réduction de la fonction cétone du TAI.....	142
Préparation du métabolite 34	143
6.2.4. Etude de la S-Oxydation du TAI par des levures exprimant les P-450 IIC9 et IIC10.....	144
Composition et préparation du milieu de culture.....	144
Dosage du P-450 sur cellules entières.....	144
Préparation de la fraction microsomale.....	145
Nouvelle méthode de dosage de la 5-hydroxylation de l'AT.....	145
Dosage des thiols libres microsomaux.....	146
6.2.5. Propriétés des métabolites du TAI fixés aux protéines microsomales.	
Réalisation des incubations.....	146
Effet du mercaptoéthanol sur la fixation covalente du TAI.....	146
Etude par H.P.L.C. des composés libérés par traitement au mercaptoéthanol de protéines microsomales ayant fixé les métabolites du TAI.....	146
Influence du temps d'incubation sur la stabilité des métabolites fixés vis à vis du mercaptoéthanol.....	147
Stabilité des métabolites fixés, vis à vis du mercaptoéthanol, après un traitement par HCl.....	147
6.3. Préparation d'anticorps anti-acide tiénilique.	
6.3.1. Synthèse de la BSA-AT par la méthode au SPDP.....	147
6.3.2. Protocole d'immunisation, obtention des sérums et de la fraction des Ig.....	148
Immunisation.....	148
Réalisation des prélèvements et préparation des sérums.....	148
Obtention de la fraction des immunoglobulines du lapin 2.....	148
6.3.3. Technique de double diffusion sur gel d'agarose (Ouchterlony).....	149
6.3.4. Techniques Elisa.....	149
6.3.5. Origine et synthèse des inhibiteurs.....	152
Synthèse du 2-acétyl, 5-S-mercaptoéthanol-thiophène 45	152
Synthèse de l'acide dihydroéthacrynique 43	152
Synthèse de 42	153

7. ANNEXE

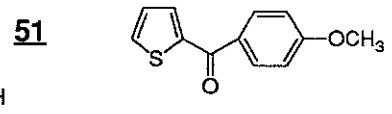
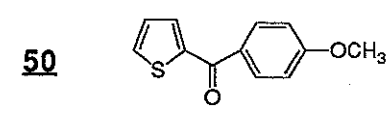
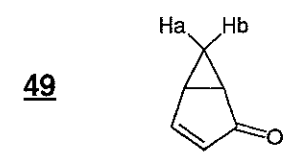
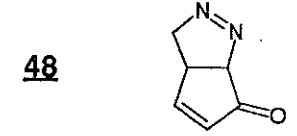
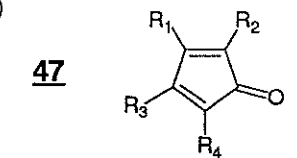
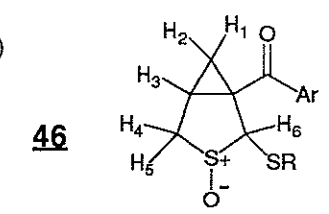
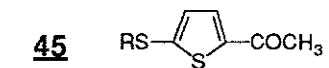
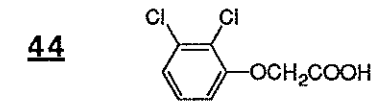
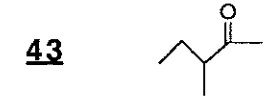
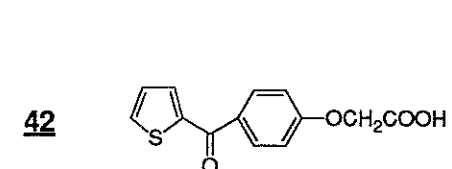
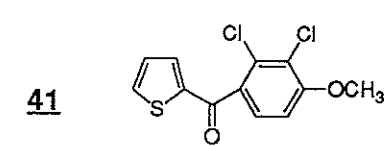
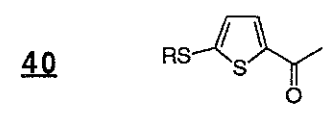
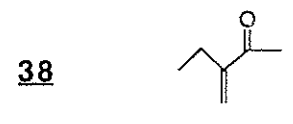
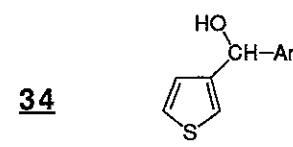
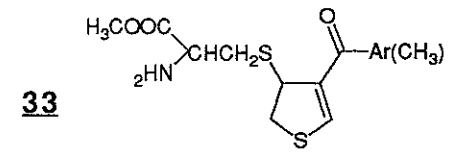
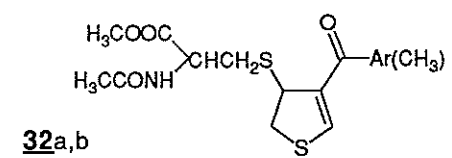
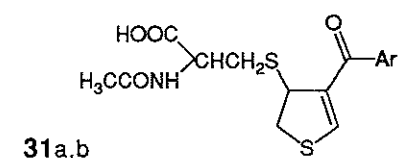
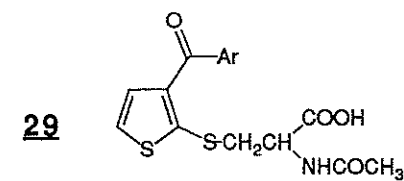
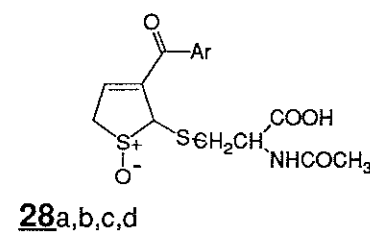
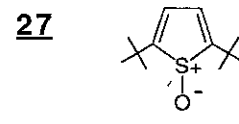
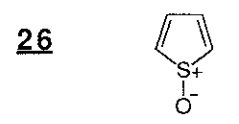
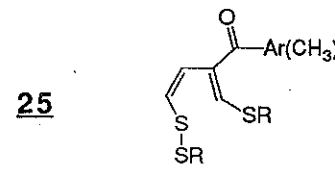
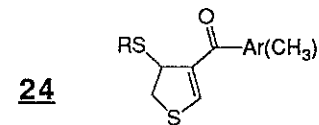
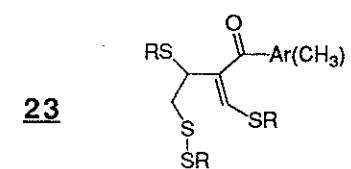
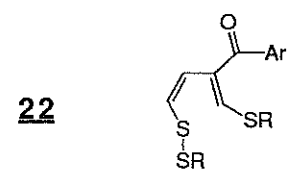
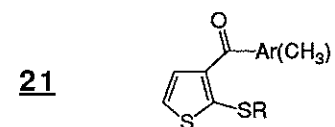
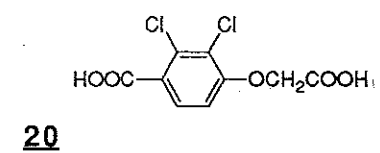
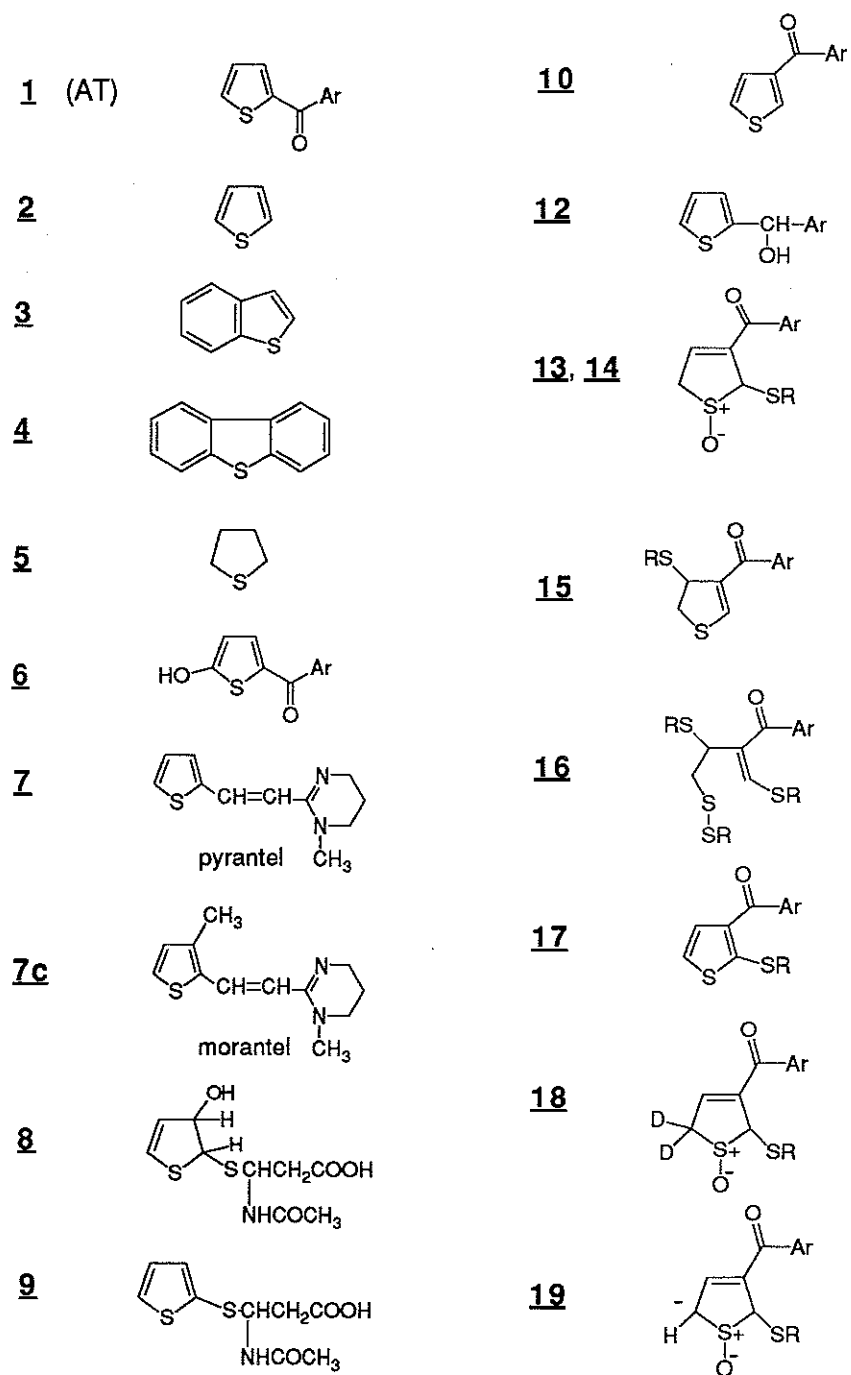
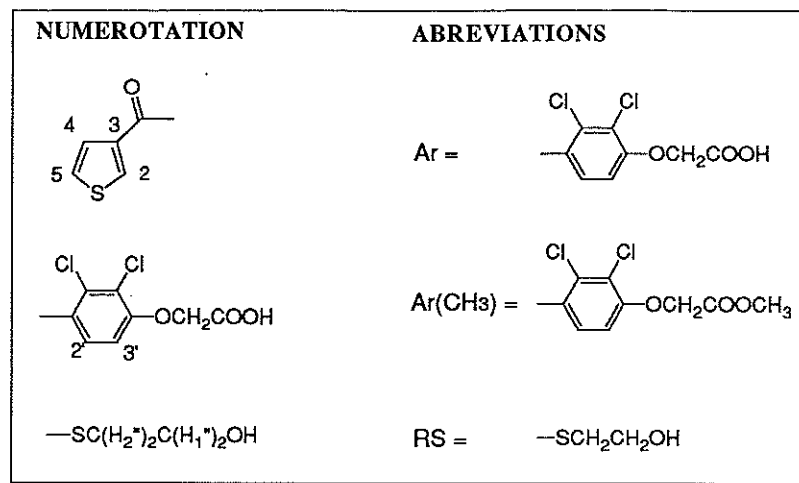
7.1. Méthylation des métabolites 13 et 14	155
7.2. Estimation de l'affinité des anticorps anti-AT pour le TAI.....	158
7.3. Publications issues de ce travail.....	160

BIBLIOGRAPHIE

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

ABREVIATIONS

ABTS	acide 2,2'-azino-di(3'-éthyl-benzothiazole sulfonique)
Ac	anticorps
ac.	acide
AT	acide tiénilique
AMA	anticorps anti-mitochondries
ANA	anticorps anti-noyaux
BSA	sérumalbumine de bœuf
BSA-AT	BSA substituée par l'AT
CON	contrôle
COSY	correlation spectroscopy
CLO	clofibrate
DEPT	distortionless enhancement polarisation transfert
DETAPAC	acide diéthylènetriamine pentaacétique
D.O.	densité optique
DTNB	acide (5,5'-dithiobis)2-nitrobenzoïque
DTT	dithiotréitol
EDTA	éthylènediamine sodique
Elisa	enzyme-linked immunosorbent assay
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSH	glutathion réduit
HCA	hépatite chronique autoimmune
H.P.L.C.	chromatographie en phase liquide sous haute pression
HVS1	Herpès simplex virus de type 1
Ig	immunoglobuline
INEPT	insensitive nuclei enhanced by polarization transfert
I.R.	infrarouge
i.p.	intrapéritonéal
LKM	microsomes de foie et de rein
LM	microsomes de foie
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NADH	nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit)
NADP(H)	nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (réduit)
NAPQI	N-acétyl-p-benzoquinone imine
NOE	effet nucléaire Overhauser
P-450	cytochrome P-450
PB	phénobarbital
PBS	tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM
PEG	polyéthylène glycol
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluorure
SDS	sodium-dodécyl-sulfate
SLA	anticorps anti-antigènes hépatiques cytoplasmiques
SMA	anticorps anti-muscle lisse
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
R.M.N.	résonance magnétique nucléaire
TAI	isomère de l'acide tiénilique
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzoparadioxin
Tris	sel de "tris" (Trizma, Sigma)
TAO	triacétate d'oléandomycine
U.V.	ultra-violet



CHAPITRE PREMIER

UN PROBLEME DE TOXICOLOGIE

1.1. Exposition aux substances exogènes et pouvoir toxicogène.

De toutes les relations que nous entretenons avec l'environnement, l'exposition aux substances exogènes retiendra notre attention dans le travail qui va suivre. Ces molécules aussi appelées xénobiotiques réalisent un flot incessant qui pénètre et agresse 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 et sont généralement dépourvus d'activité pharmacologique.

Sous le terme de xénobiotique, on regroupe l'ensemble des substances qui se différencient des composés naturels de notre organisme (protéines, lipides, glucides ou vitamines ubiquitaires...) tels 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 saurait guère constituer une barrière efficace. La cellule réagit à cette intrusion de molécules en faisant intervenir le système multienzymatique de **détoxification** cellulaire. Ce système doit prendre en charge une multitude de molécules les plus souvent hydrophobes et peu fonctionnalisées. Il réalise ainsi des **biotransformations** peu spécifiques et très énergétiques et c'est fréquemment au cours de ces processus qu'apparaissent des entités réactives 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.

1.2. Le problème de l'acide tiénilique.

Fruit de la recherche des Laboratoires Anphar-Rolland, l'acide tiénilique (AT) est né de l'étude systématique de dérivés de l'acide phénoxyacétique, motif chimique déjà présent dans les premiers diurétiques qu'étaient les dérivés mercuriels ou l'acide éthacrynique (Thuillier et al, 1974). Sa commercialisation débute en 1976 sous l'appellation de DIFLUREX® ; ses propriétés diurétiques au niveau rénal en faisait une indication de choix dans l'hypertension artérielle et les rétentions hydrosodées d'origine cardiaque avec en prime une action originale uricosurique (Doroz, 1989).

Peu après son introduction sur le marché américain, la vente du médicament fut interrompue pour son imputabilité dans la survenue de rares hépatites (1 cas d'hépatite sur environ 10 000 traitements) d'issue parfois fatale. Cette complication hépatique comportait tous les critères de l'idiosyncrasie : fréquence basse, période de sensibilisation, absence de relation effet - dose, réapparition des symptômes à l'épreuve de réintroduction (à proscrire). Le diagnostic d'hépatite autoimmune d'origine médicamenteuse était porté.

Encore prescrit en France, le diflurex n'occasionne 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 vient d'être posé le problème de la prédiction des accidents d'idiosyncrasie dans les phases de développement du médicament. Il n'existe pas actuellement de modèle prédictif d'autoimmunité spécifique d'organe d'origine médicamenteuse (Descotes, 1991). L'alternative serait donc de comprendre les mécanismes par lesquels s'expriment ce type de pathologie et par là de les prévoir. Là où s'arrête l'histoire du diflurex commence celle de l'acide tiénilique (figure 1.1) !

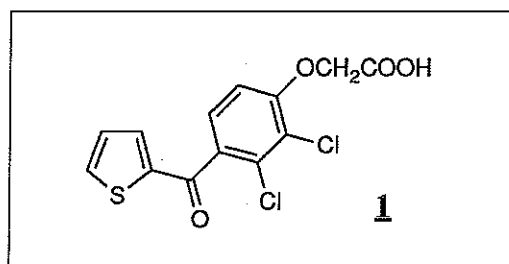


Figure 1.1 Structure de l'acide tiénilique.

Nous nous sommes très tôt intéressés au cas de l'acide tiénilique. L'origine hépatique de ses effets secondaires, sa nature hydrophobe, sa structure caractérisée par la présence d'un noyau thiophène au métabolisme seulement illustré de quelques exemples nous faisaient évoquer un accident au cœur même du métabolisme des xénobiotiques. Nous avons ainsi démontré la métabolisation de l'acide tiénilique au niveau hépatique, mis en évidence l'enzyme responsable, un cytochrome P-450, par ailleurs découvert que ce cytochrome est l'antigène majeur des hépatites autoimmunes induites par l'acide tiénilique. Mais même si la causalité entre l'enzyme qui métabolise et le fait qu'il devienne antigène paraît plausible, les étapes clés de ce type de pathologie nous sont encore inconnues.

Le présent travail concerne plus particulièrement l'étape d'activation métabolique du noyau thiophène. Il est clair maintenant que la métabolisation de l'acide tiénilique ou de ses dérivés s'accompagne d'une importante fixation covalente aux macromolécules intracellulaires. Quelle est la nature de cette bioactivation ? Comment et sous quelles formes se fait la fixation covalente ? Quel(s) rôle(s) peut(vent) jouer ces

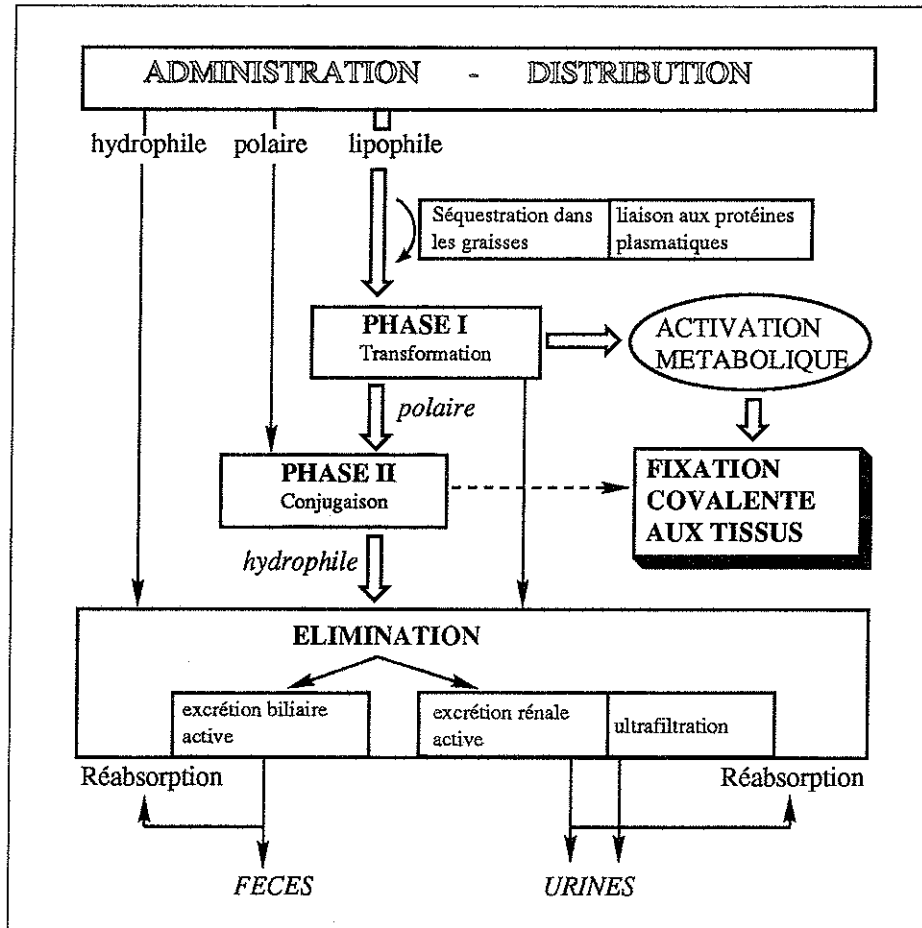


Figure 1.2 Les différentes phases de l'élimination d'un médicament.

altérations de la structure intracellulaire, quelles sont leurs implications dans la survenue d'une pathologie de type autoimmune ? Autant de questions qui ont motivé ce travail et qui certainement motiveront sa suite.

1.3. La superfamille des cytochromes P-450.

1.3.1. Le système de détoxification hépatique.

Il y a pour les xénobiotiques trois principales "portes d'entrée" qui sont l'ingestion orale, l'inhalation et l'absorption par voie transcutanée. Après son administration, le devenir d'un composé dépendra de ses propriétés. Ses propriétés physicochimiques rendent compte pour l'essentiel des paramètres pharmacocinétiques, absorption - distribution - élimination, tandis que la structure chimique est le facteur principal qui guide les biotransformations.

Ce métabolisme est présent dans tous les organes mais principalement en des positions stratégiques que sont les poumons, la peau, les intestins, les reins et surtout le foie, organe le plus important quantitativement où se trouve le **système de détoxification hépatique** (figure 1.2).

Les réactions enzymatiques impliquées dans les biotransformations sont de deux ordres. Les réactions de transformation sont catalysées par les enzymes de la phase I qui agissent sur le composé lui-même réalisant une fonctionnalisation généra-

lement oxydative comme par exemple la transformation d'un alcane en alcool ($RH \rightarrow ROH$), et les réactions de conjugaison catalysées par les enzymes de la phase II qui transfèrent un groupement à partir d'un donneur endogène (glutathion, acide glucuronique, aminoacides ...) (tableau 1.1). Il y a souvent enchaînement phase I - phase II comme dans la formation d'un époxyde d'arène à partir d'un composé polycyclique aromatique catalysée par une monooxygénase de la phase I suivie de son inactivation par l'époxyde hydrolase de la phase II. Ainsi dans l'exemple tout à fait remarquable du benzo[a]pyrène, l'action conjuguée du P-450 et de l'époxyde hydrolase est responsable d'une activation toxique cancérigène par formation d'un époxyde-diol très électrophile qui se fixe de façon covalente sur les acides nucléiques (figure 1.3). Nous nous intéresserons plus particulièrement à la famille des cytochromes P-450 qui joue un rôle central dans ces phénomènes d'activation métabolique.

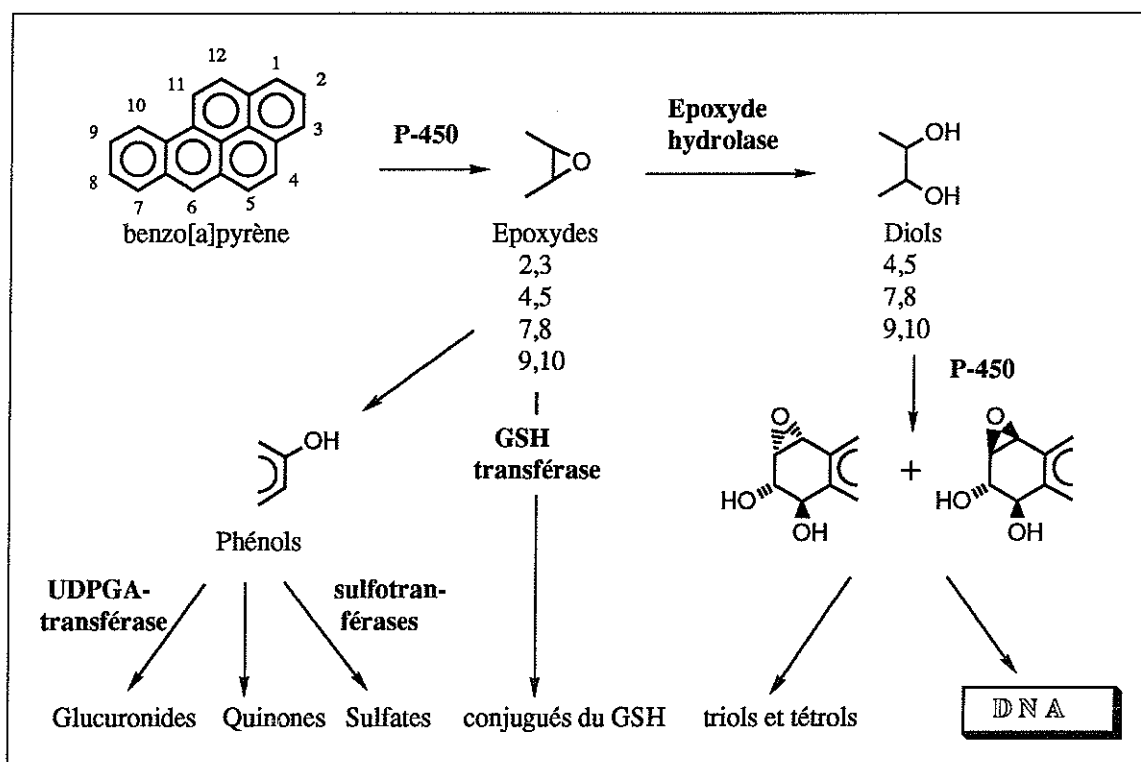


Figure 1.3 Métabolisme du benzo[a]pyrène (selon Holder et al, 1974).

1.3.2. Généralités sur le cytochrome P-450.

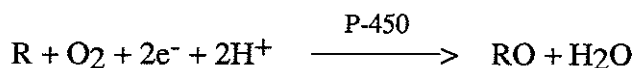
Au cours des années cinquantes, la métabolisation des médicaments par les microsomes hépatiques a été caractérisée (Guengerich, 1986). Parallèlement l'étude d'un pigment des microsomes de foie de rat, au spectre particulier d'absorption à 450 nm après réduction puis fixation de monoxyde de carbone, a conduit à la découverte d'une hémoprotéine, le cytochrome P-450, à activité oxygénasique directement liée à ce métabolisme. Le fait que l'administration d'un médicament pouvait en elle-même modifier l'activité du cytochrome P-450 permit la mise en évidence de la multiplicité de ses isoenzymes ainsi que de leur inductibilité par les substances exogènes (Conney, 1967).

Tableau 1.1 Principales réactions impliquées dans les biotransformations des xénobiotiques (selon Gordon Gibson et al, 1986).

Réaction	enzymes	localisations	substrats
PHASE I - TRANSFORMATION			
Oxydation	monooxygénases (flavoprotéines, P-450)	microsomes	voir fig.1.7 p. 9
	monoamines oxydases alcools déshydrogénase aldéhydes déshydrogénases	mitochondries cytosol cytosol	amines alcools aldéhydes
Réduction	monooxygénases (cytochromes P-450) alcools déshydrogénases	microsomes cytosol	voir fig.1.7 p. 9 aldéhydes, cétones
Hydrolyse	estérases	cytosol, microsomes, mitochondries	esters
	hydrolyse d'amides, d'hydrazides, de carbamates ...		
PHASES II - CONJUGAISON			
(avec) H ₂ O	époxyde hydrolase	microsomes, cytosol	époxydes
le glutathion	glutathion transférases	cytosol	électrophiles
l'ac. glucuronique ^{a)}	glucuronyl transférases	microsomes	NH, OH COOH, SH
l'ac. sulfurique ^{b)}	sulfotransférases	cytosol	NH, OH
un grpt méthyle ^{c)}	N- et O-méthyl- transférases	cytosol, microsomes	NH, OH
un grpt acétyl ^{d)} un aminoacide	N-acétyl transférases	cytosol	NH, OH COOH

a) donneur = UDPGA = uridine-3',5'-diphosphoglucuronique acid ; b) PAPS = 3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate ; c) SAM = S-adenosylmethionine ; d) CoA = coenzyme A.

Le cytochrome P-450 est un élément d'un complexe enzymatique appelé mono-oxygénase qui, en présence d'un système donneur d'électrons provenant du NADPH ou du NADH, est capable de transférer un atome d'oxygène de l'oxygène moléculaire sur un substrat R selon la réaction schématisée ci-dessous :



La famille des cytochromes P-450 est largement répandue dans notre organisme et se répartit en deux sous-groupes qui sont les isoenzymes dévolues au métabolisme des xénobiotiques et les isoenzymes qui interviennent dans des voies métaboliques endogènes comme dans la biosynthèse et la biodégradation des hormones stéroïdes, des acides gras, des leucotriènes ou des prostaglandines... La spécificité étroite et l'oxydation rapide des substrats des isoenzymes à visée endogène s'opposent à la faible spécificité de substrat et la lenteur réactionnelle des cytochromes P-450 du métabolisme des xénobiotiques.

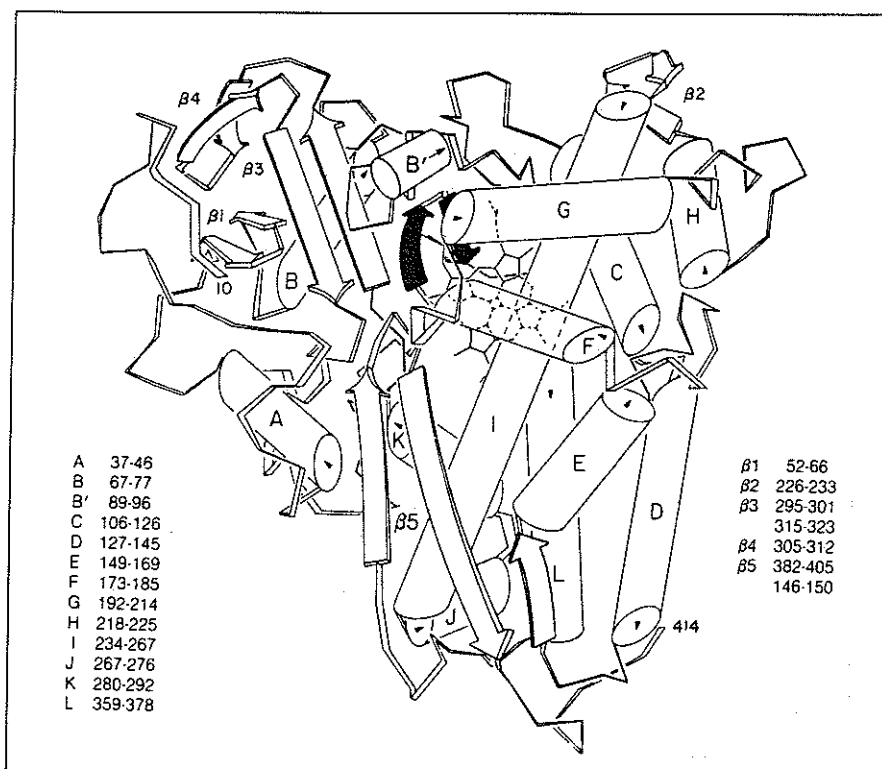


Figure 1.4 Schématisation du cytochrome P-450 cam (P-450 Cl) d'après les données cristallographiques. Les hélices sont représentées par des cylindres et les feuillets β par des flèches ; la région centrale plus foncée contient la cystéine 357, ligand axial de l'hème (d'après Poulos et al, 1987b).

1.3.3. Aspects structuraux.

Le complexe multienzymatique d'une monooxygénase est composé de:

- une hémoprotéine, le *cytochrome P-450*, au cœur de laquelle l'oxygène moléculaire est activé et réagit avec le substrat,
- une flavoprotéine, la *NADPH-cytochrome P-450-réductase*, qui transfère les électrons du NADPH cytosolique vers les cytochromes P-450 et b5,
- une deuxième flavoprotéine, la *NADPH-cytochrome b5-réductase*, qui transfère les électrons du NADH intraluminal au cytochrome b5,
- une deuxième hémoprotéine, le *cytochrome b5*, qui transfère les électrons vers le P-450,
- enfin des *phospholipides* qui assurent la cohésion de l'ensemble.

Les cytochromes P-450 sont membranaires, enchassés à la face externe du réticulum endoplasmique pour la plupart d'entre eux - notamment ceux intéressés dans le métabolisme des xénobiotiques -, mais l'on connaît des formes mitochondriales ou nucléaires ainsi que des formes solubles chez les bactéries. Il n'existe pas encore de cytochrome P-450 membranaire cristallisé et le modèle le plus ressemblant nous est fourni par le cytochrome P-450 cam, enzyme procaryotique soluble hydroxylant le camphre dont la structure cristalline a été résolue récemment (Poulos et al, 1987a) (figure 1.4). L'étude prédictive de la structure secondaire à partir de la séquence des aminoacides des cytochromes P-450 de mammifères montre une similarité avec la structure connue de P-450 cam, toutefois insuffisante pour servir de modèle d'étude (Nelson et al, 1989, Edwards et al, 1989).

L'apoprotéine du P-450 contient environ 500 acides aminés où se distinguent plusieurs régions beaucoup conservées :

- *le peptide signal et le domaine d'insertion membranaire*. A la partie N-terminale se trouve une séquence hydrophobe qui formerait le domaine d'ancrage transmembranaire probablement unique (Sakaguchi et al, 1987) ; dans cette même partie initiale et hydrophobe de la chaîne, un peptide signal permet la localisation réticuloplasmique de l'enzyme,

- *région impliquée dans la fixation de l'hème*. Cette région est située à l'extrémité C-terminale qui contient le plus d'acides aminés invariants, notamment la cystéine 436 (numérotation selon P-450 IIB1) impliquée dans la coordination de l'hème et plusieurs acides aminés à proximité importants pour son environnement (figure 1.4),

- moins connues sont les régions impliquées dans les sites d'interaction avec les transporteurs d'électrons.

1.3.4. Cycle catalytique du cytochrome P-450.

Le groupement prosthétique du cytochrome P-450 ou hème est une protoporphyrine IX de fer (figure 1.5 A). Au "repos" l'atome de fer est à l'état oxydé Fe^{3+} hexacoordiné. Quatre azotes pyrroliques du cycle porphyrinique lient le fer selon un plan carré, le cinquième ligand est le groupement thiolate d'un résidu cystéinyle situé dans l'axe du plan et le sixième serait soit un groupement hydroxyle de l'apoprotéine soit une molécule d'eau. Cet état du fer dit de spin faible est en équilibre avec un état pentacoordiné de spin fort où le fer est légèrement en dehors du plan (figure 1.5 B).

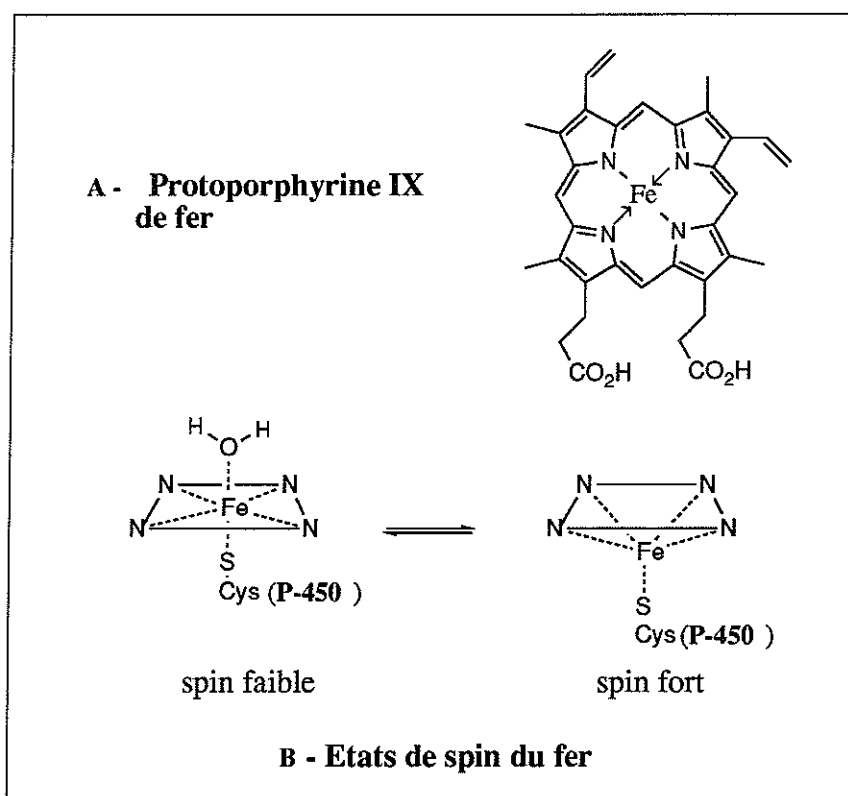


Figure 1.5 Structure de l'hème (A) et états de spin du fer (B) .

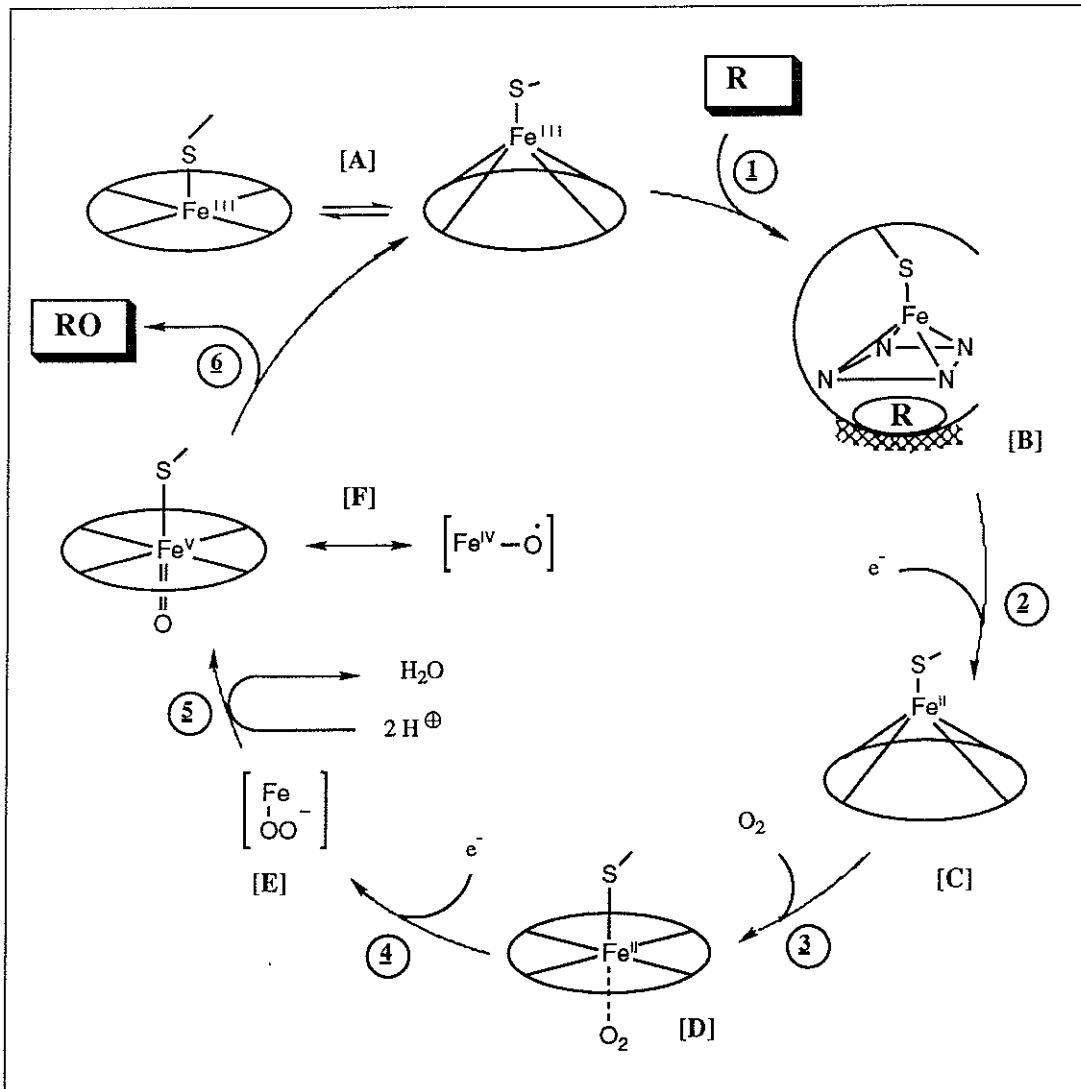


Figure 1.6 Cycle catalytique du cytochrome P-450. R est le substrat, RO sa forme oxydée ; la poche de l'hème et le site de fixation du substrat sont schématisés dans le complexe [B] (selon Mansuy, 1978).

Proche de la poche de l'hème se trouve le site de fixation du substrat ; l'arrivée de celui-ci provoque une transition vers l'état de spin fort dont le potentiel rédox augmenté d'une centaine de millivolts permet le passage d'un électron provenant du NADPH et l'enclenchement du cycle catalytique (figure 1.6). Le transfert de l'électron (étape 2) réduit le complexe [B] en complexe [C] ferreux pentacoordiné. L'arrivée d'une molécule d'oxygène est l'étape 3 qui conduit au complexe ferreux hexacoordiné [D]. Le deuxième électron provient soit du NADH via le cytochrome b5, soit du NADPH via la NADPH-cytochrome P-450-réductase et conduit, après élimination d'une molécule d'eau (étapes 4 et 5), au complexe oxo à oxygène actif très instable [F]. Un complexe porphyrinique $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ a été caractérisé (Groves et al, 1981). Il semble que ce serait un complexe de ce type qui transfère l'oxygène au substrat. C'est un des meilleurs agents oxydants connus, il est capable d'oxyder les composés les plus inertes comme un alcane. Le complexe [A] est ensuite régénéré après libération du substrat oxydé RO (étape 6).

Ce cycle, le plus fréquent, constitue la voie oxydante ; trois types de réactions y sont prépondérants : les hydroxylations aliphatiques, les époxydations des doubles

liaisons (aromatiques ou non) et les transferts sur un hétéroatome, surtout soufre et azote (figure 1.7).

D'autres cycles de fonctionnement sont connus pour le cytochrome P-450 :

- *comme une réductase*, favorisée par l'anaérobiose, à partir du complexe [C] (réduction d'époxydes d'arènes, de nitrés aromatiques, d'oxydes d'amines, déshalogénéation) (figure 1.7),

- *comme une oxydase* produisant de l'ion superoxyde $[O_2^{\cdot-}]$ par décomposition du complexe [D] ; il s'agit d'une voie minoritaire (figure 1.7),

- *en cycle court* où le donneur d'oxygène peut être l'eau oxygénée, l'hydroperoxyde de cumène, un peracide... Il s'agit d'une propriété des porphyrines mise à profit dans les systèmes modèles (Mansuy et al, 1989).

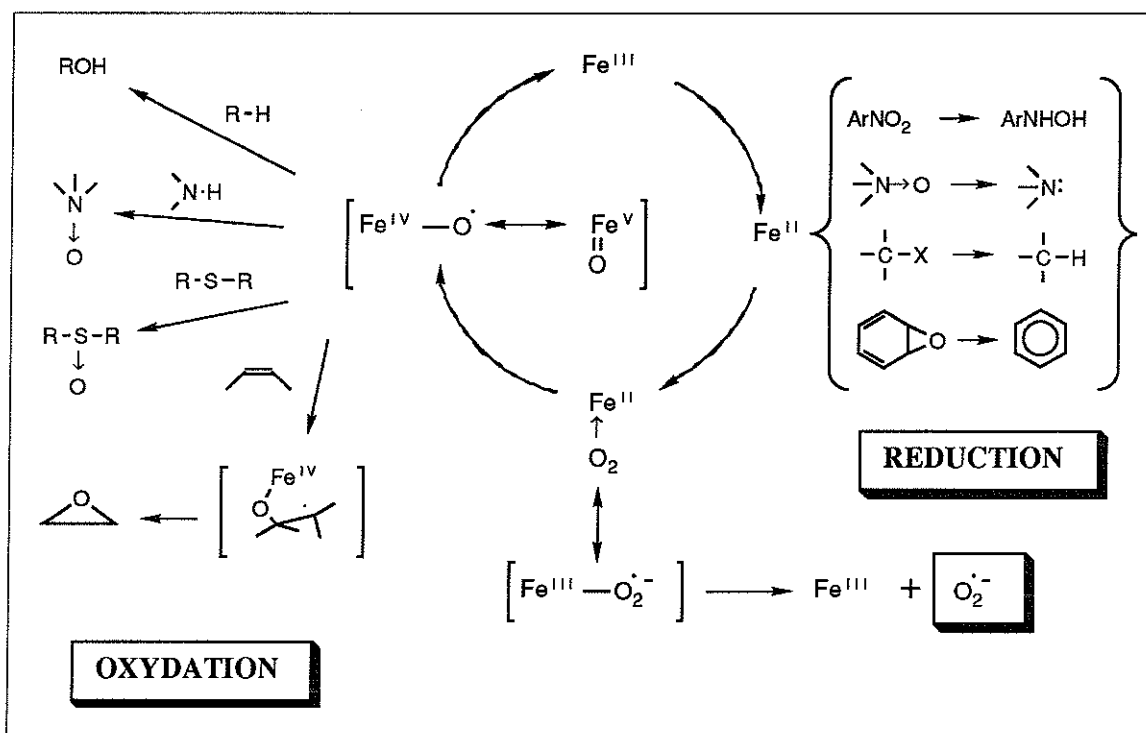


Figure 1.7 Les principales réactions catalysées par le P-450 (Mansuy, 1978).

1.3.5. Classification phylogénique des cytochromes P-450.

L'homme possède au moins 32 isoenzymes de P-450 identifiées. Deux nomenclatures sont employées, d'abord la nomenclature triviale issue de l'époque "héroïque" où chaque laboratoire numérotait ses P-450 au fur et à mesure de leur sortie de la colonne de purification, enfin celle que nous préférons, la classification phylogénique (Nebert et al, 1989a et 1991). Les membres de la superfamille des cytochromes P-450 sont classés par l'homologie de séquence de leur gène. Deux cytochromes P-450 feront partie de la même famille si leurs gènes présentent plus de 40% d'homologie et de la même sous-famille si elle dépasse 55% (Nebert et al, 1991). La famille se numérote et la sous-famille s'épelle ; au sein d'une sous-famille les P-450 sont numérotés par ordre de découverte, par exemple IIB1, IIB2, etc... En tout 152 gènes connus et répartis en 27 familles ; la famille II avec ses sept sous-familles est la plus riche. Au sein d'une même famille, malgré l'orthologie des gènes qui la

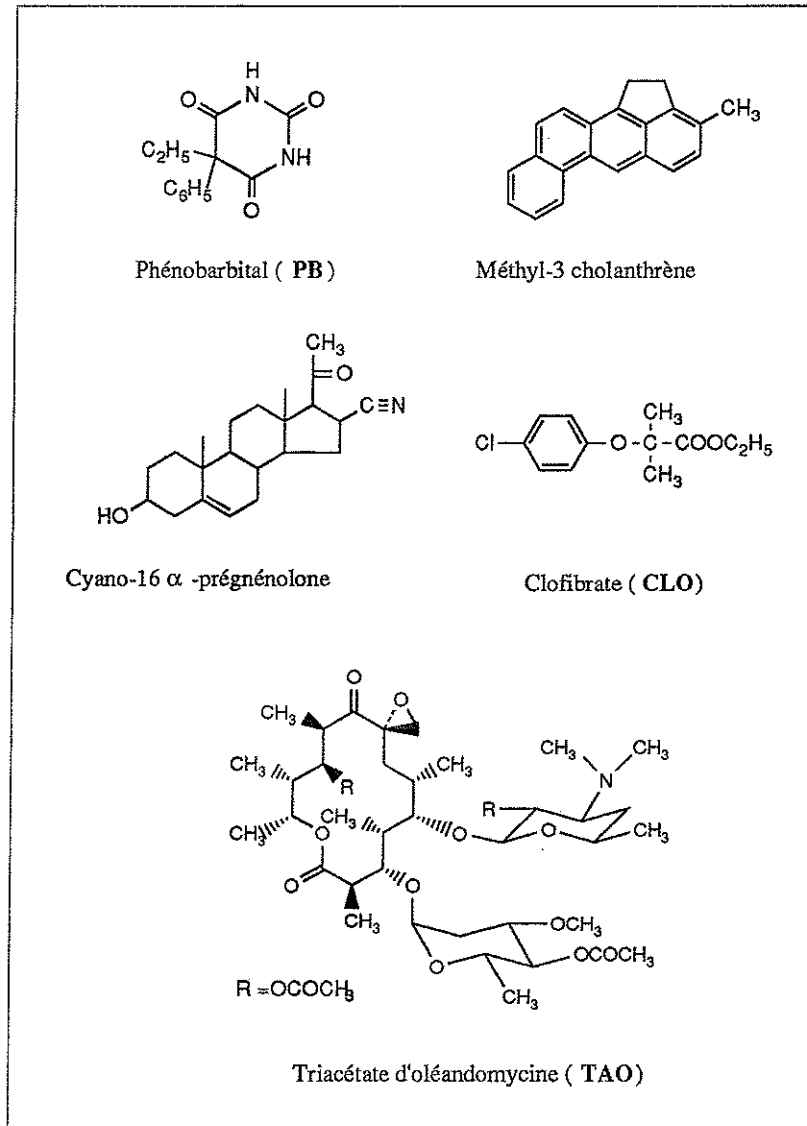


Figure 1.9 Structure des principaux inducteurs de cytochromes P-450.

sité génétique (par exemple unité d'évolution de 0.7 million d'années pour les immunoglobulines). On a attribué le "boom" génomique de la superfamille des cytochromes P-450 de ces derniers 800 millions d'années au conflit lié à l'émergence des règnes animal et végétal (Nelson et al, 1987), autrement dit à la nécessité de s'adapter à l'exposition aux xénobiotiques d'un monde vivant de plus en plus diversifié.

1.3.6. Régulation, inductibilité.

Plusieurs centaines de substances inductrices du métabolisme des xénobiotiques sont connues à ce jour ; la structure des principales est présentée sur la figure 1.9. Ce phénomène est la réponse adaptative de l'individu à l'exposition aux substances exogènes. La comparaison des différents inducteurs chez le rat permet de les subdiviser en cinq classes indépendantes (selon la revue Gonzalez, 1989) :

- la famille du TCDD ou 2,3,7,8-tétrachlorodibenzoparadioxin avec entre autres membres le 3-méthylcholanthrène, le benzopyrène, la β -naphthoflavone... essentiel

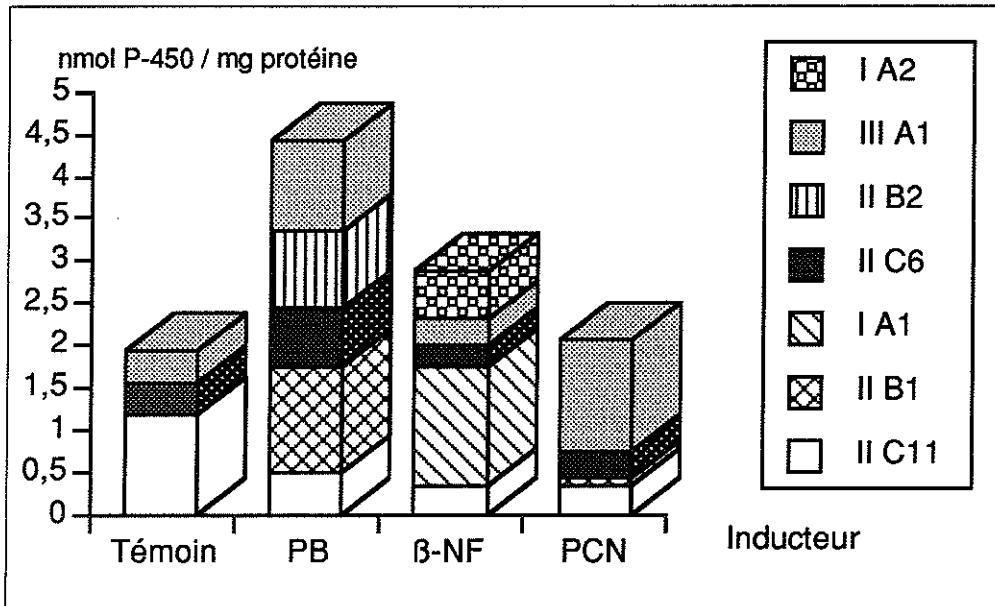


Figure 1.10 Quantification immunologique des principaux cytochromes P-450 des microsomes de foie de rat mâle (Guengerich et al,1982) avec en abscisse l'inducteur utilisé (ou non = témoin) ; la β -naphtoflavone (β -NF) est un inducteur polycyclique de la famille de la Dioxine (TCDD). Cette méthode surestime le contenu total en P-450 qui est environ moitié moindre lorsqu'il est déterminé par méthode spectrale. La forme IIC11 est pour ainsi dire absente chez la rate au profit du P-450 IIC 12.

lement des hydrocarbures aromatiques polycycliques condensés. Cette induction est médiée par un récepteur cytosolique et concernerait, entre autres, plusieurs enzymes telles les P-450 IA1 et IA2, une forme de glutathion transférase et une forme d'aldéhyde déshydrogénase ;

- la famille du **Phénobarbital**, vaste famille sans parenté structurale évidente au mécanisme d'induction inconnu. Suite à l'administration de phénobarbital, le taux d'ARN messagers de l'époxyde hydrolase, de la NADPH-cytochrome P-450-réductase, de l'UDP-glucuronyltransférase ainsi que de plusieurs cytochromes P-450 comme les IIB1, IIB2, IIIA1 ou IIIA2 augmentent ;

- la famille des **stéroïdes**, avec une induction par les glucocorticoïdes de type dexaméthasone ou 16α cyano-prégnénolone qui agissent par activation transcriptionnelle de plusieurs cytochromes P-450 notamment des familles II et III. Le récepteur aux glucocorticoïdes serait impliqué via des séquences consensus retrouvées en amont de la partie codante des gènes (Ged, 1990). Des macrolides comme le triacétate d'oléandomycine (TAO) induisent l'activité de certains des mêmes cytochromes par un mécanisme postranscriptionnel ;

- la famille des **hypolipémiants** (clofibrate, fénofibrate, nafénopin ...) qui induisent un profond remaniement ultrastructural intracellulaire avec redistribution du réticulum et des peroxysomes. De nombreuses activités enzymatiques, dont celles des P-450 IVA1 et IVA3, augmentent ; il y a une induction importante de l'oxydation des acides gras ;

- l'**éthanol**, inducteur peu puissant, qui constitue la dernière catégorie d'inducteurs avec également l'acétone et l'isoniazide. L'induction des P-450 concerne la sous-famille IIE.

Ainsi selon le protocole d'induction employé, le contenu en cytochromes P-450 de la fraction microsomale hépatique présentera un profil caractéristique. Toutefois la quantification exacte de chaque forme est techniquement difficile et la littérature ne fournit que des données incomplètes ; une approche immunologique est présentée à la figure 1.10 (quelques exemples de quantification : Thomas et al, 1981, Guengerich et al, 1982, Waxman et al, 1985). A côté de l'induction par les substances exogènes, bien décrite pour les cytochromes P-450 hépatiques, il existe d'autres régulations que nous ne ferons que citer : régulation au cours du développement, expression différentielle selon la nature des tissus, expression dépendante du sexe, dépendante de l'âge...

1.3.7. Polymorphisme génétique.

Savoir si un médicament va être ou non métabolisé est parfois une question primordiale en thérapeutique. Le profil d'activités des enzymes du système de détoxification dépend de l'état d'induction mais aussi de l'intervention d'interactions médicamenteuses, par exemple comme dans une simple inhibition compétitive de deux médicaments sur un même cytochrome ou plus complexe comme dans l'inactivation de certaines isoenzymes par le TAO (antibiotique). Une troisième variable est une hétérogénéité dans la métabolisation des médicaments, de nature héréditaire, appelée polymorphisme génétique. De nombreuses enzymes comme les P-450 de la famille II présentent une grande variabilité, tant au niveau de l'expression de leurs apoprotéines que du nombre d'allèles des gènes dont elles sont issues. Parmi les nombreux cas décrits, citons les plus connus : les individus acétyleurs lents qui métabolisent peu l'isoniazide - la non-adaptation des taux sériques thérapeutiques conduit à des complications neurologiques -, les polymorphismes d'hydroxylation de la débrisoquine (anti-hypertenseur) et de la méphénytoïne (anticonvulsivant) qui, au sein de la population, ont une distribution bimodale de leur vitesse d'hydroxylation. Ces trois polymorphismes se transmettent sur le mode autosomique récessif (revue Relling, 1989).

1.4. Activation métabolique et système de détoxification.

1.4.1. Toxicité chimique et activation métabolique.

Le *primum movens* de l'activation métabolique est la transformation d'un composé anodin par une enzyme de l'organisme en un toxique vrai. Ce mécanisme en apparence fortuit prend toute sa mesure lorsqu'il est médié par le système de détoxification. La production au sein du cytochrome P-450 d'entités réactives mal contrôlées rend compte de la majeure partie des toxicités chimiques par activation métabolique (Nelson et al, 1986). Le foie est de fait un organe particulièrement exposé à des accidents médicamenteux comme une hépatite aiguë toxique, une hépatite auto-immune, une fibrose, des manifestations de cholestase ou encore un hépatome... (Sherlock, 1986).

1.4.2. Entités réactives et cytochromes P-450.

Les cytochromes P-450 sont capables de générer deux grands types d'entités réactives. Le premier type, largement majoritaire, est constitué de composés électro-

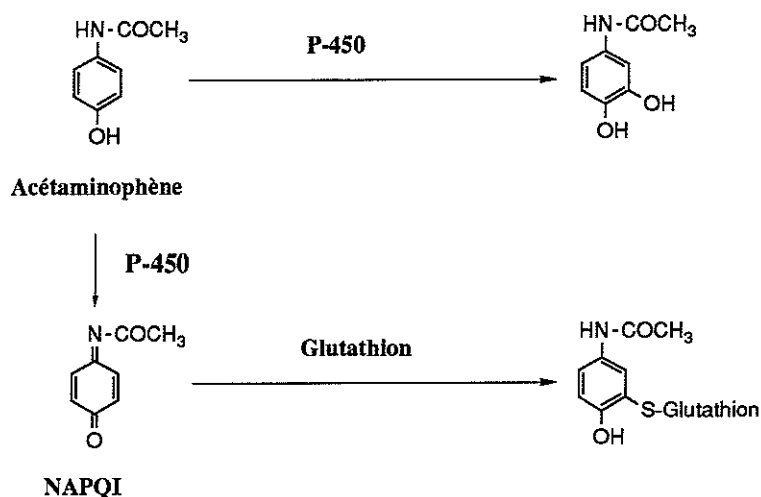


Figure 1.11 Métabolisme de l'acétaminophène.

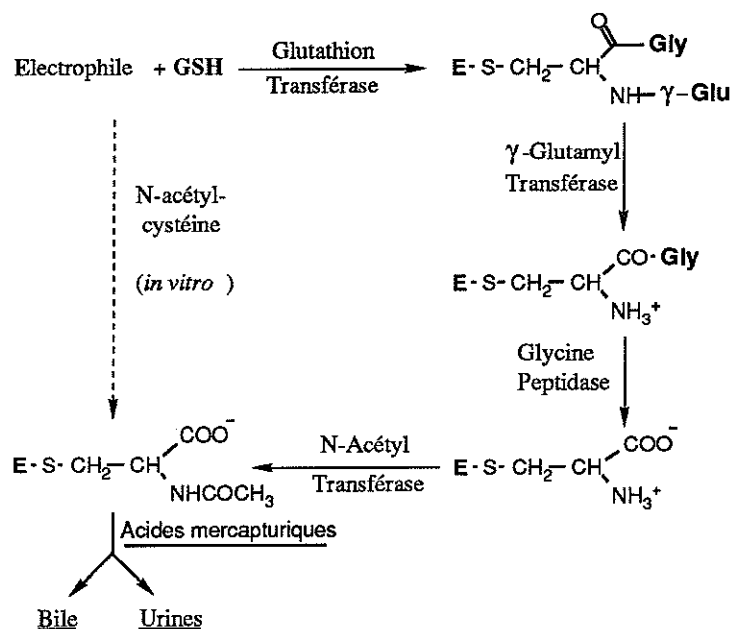


Figure 1.12 Formation des acides mercapturiques.

philes qui sont capables de se lier aux groupements nucléophiles des macromolécules d'où leur appellation "d'agents alkylants". La voie oxydative du cytochrome P-450 est responsable de la formation de la majorité de ces entités. Le deuxième type regroupe des entités susceptibles d'activer l'oxygène moléculaire en un ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), essentiellement des oxydoréducteurs et des radicaux libres issus de la voie réductrice (Mansuy, 1985).

1.4.3. Rôle du glutathion.

Le glutathion, γ -glutamyl-L-cystéinyglycine (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. Par exemple, l'acétaminophène (Paracétamol®) est hydroxylé en 3 en un dérivé non toxique par les P-450 qui réalisent également une oxydation en N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) conjuguée rapidement par le glutathion (revue Nelson et al, 1986 ou Tarloff

et al, 1990 et figure 1.11). 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. 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 h et des atteintes rénales.

La conjugaison par le glutathion est catalysée par la famille des glutathion transférases. Les conjugués sont ensuite éliminés sous la forme d'acides mercapturiques dans les urines ou les fèces 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 -glutamyl transférase, la glycine par une glycine peptidase, enfin l'amine libérée est acétylée par une N-acétyl transférase (revue Tarloff et al, 1990 et figure 1.12). La N-acétylcystéine peut être utilisée *in vitro* pour piéger l'entité réactive électrophile et accéder au métabolite final de ce métabolisme (figure 1.12) ; dans le cas de l'intoxication à l'acétaminophène, elle constitue le traitement de première intention avec le lavage gastrique précoce (revue Prescott, 1986).

1.4.4. Activation métabolique oxydative.

La voie principale de détoxification, par oxydation des xénobiotiques, aboutit à des entités particulièrement électrophiles. L'exemple de l'époxydation des noyaux polyaromatiques rappelé en début de ce chapitre (activation du benzopyrène, figure 1.3, p. 4) montre l'activation métabolique malencontreusement réalisée après l'échec de l'enzyme époxyde hydrolase chargée d'inactiver ce type de composé. La capacité d'intercalation des diols-époxydes des composés polyaromatiques les rend particulièrement réactifs vis à vis des groupements nucléophiles des acides nucléiques d'où leur pouvoir mutagène et leur implication dans des mécanismes d'oncogénèse.

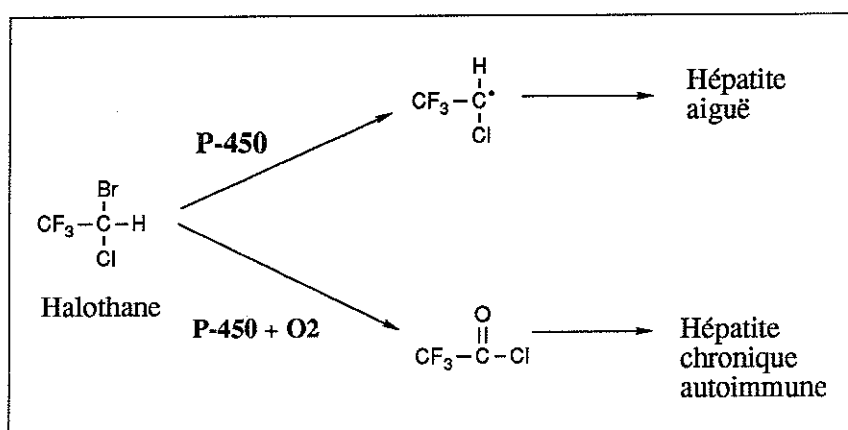


Figure 1.13 Métabolisme de l'halothane

1.4.5. Activation métabolique réductive.

Ce type de bioactivation a été décrit au cours de la réduction des groupements nitroaromatiques ou de celle des composés halogénés. L'activation métabolique du tétrachlorure de carbone implique la formation du radical trichlorométhyle qui est à l'origine d'une fixation covalente aux macromolécules et d'un stress oxydant (Noguchi et al, 1982). L'halothane, 1-bromo-1-chloro-2,2,2-trifluoroéthane, anesthésique puis-

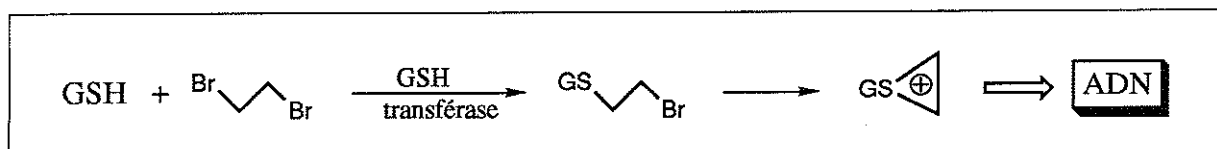


Figure 1.14 Activation métabolique des dihaloalcane par le glutathion. L'ion épisulfonium formé est capable de réagir avec l'ADN.

sant couramment utilisé en clinique, subit une déhalogénéation oxydative par les cytochromes P-450 en chlorure d'acide qui s'hydrolyse en acide trifluoroacétique ou acyle les protéines. Cette voie métabolique est impliquée dans l'apparition d'hépatites auto-immunes (revue Pohl et al, 1988). En présence d'une faible pression partielle en oxygène tissulaire, un métabolisme réductif s'effectue avec production de radicaux libres qui sont sources d'hépatites aiguës (Gandolfi et al, 1980 et figure 1.13).

1.4.6. Activation métabolique par conjugaison.

Des enzymes de la phase II sont également retrouvées dans des processus de bioactivation. Le glutathion est aussi particulièrement impliqué, soit par une activation directe comme dans la formation d'ions épisulfonium alkylants catalysée par la glutathion transférase à partir de dihaloalcane vicinaux (figure 1.14), soit dans le transport et le stockage d'entités réactives sous la forme de conjugués (Slatter et al, 1991, Monks et al, 1990).

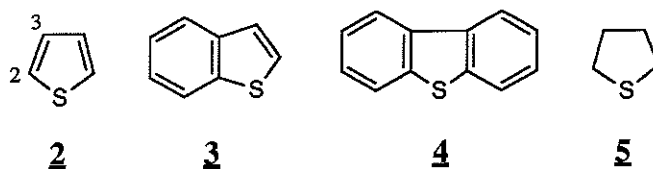
1.5. Métabolisme des dérivés thiophéniques et de l'acide tiénilique.

1.5.1. Rappels sur le métabolisme des dérivés soufrés non thiophéniques.

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. Cette S-oxydation est largement catalysée par les cytochromes P-450 et les flavine-monoxygénases (figure 1.15 et Ziegler, 1984). La S-méthylation est une autre voie importante de biotransformation des xénobiotiques soufrés (Damani et al, 1989, volume 2A p. 211).

1.5.2. Caractère aromatique du noyau thiophène des thiaarènes.

Le thiophène **2** est un hétérocycle aromatique. Toutefois ce caractère peut varier d'intensité selon la nature des substituants, en particulier lorsque le noyau thiophène est inséré au sein d'un système polycyclique. Parmi les composés polycycliques soufrés insaturés, seuls les noyaux thiophènes situés en position terminale comme dans le benzothiophène **3** présentent un caractère aromatique marqué. Le dibenzothiophène **4** se rapproche plus d'un thioéther.



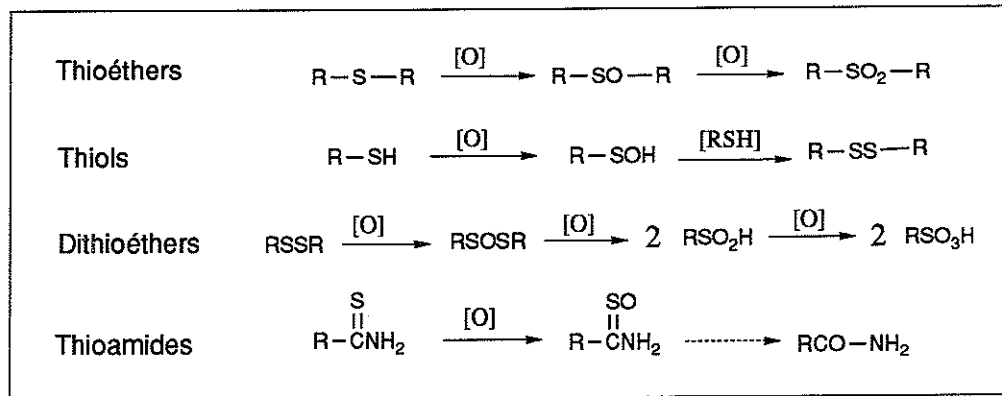


Figure 1.15 S-oxydation de quelques composés soufrés.

1.5.3. Métabolisme des dérivés thiophéniques.

Leur métabolisme est peu connu mais toutefois, selon l'intensité du caractère aromatique du noyau thiophène, on peut distinguer plusieurs cas.

Thiaarènes apparentés au dibenzothiophène - Il s'agit des cas de thiaarènes où le noyau thiophène ne possède pas ou peu de caractère aromatique. L'oxydation réalisée par les enzymes de la détoxification est soit une S-oxydation en sulfoxyde stable, soit une époxydation au niveau des noyaux benzéniques (quelques exemples : Jacob et al, 1991). Ainsi le dibenzothiophène **4** est métabolisé en sulfoxyde puis en sulfone (Hoodi et al, 1984). Ce type de métabolisme est donc identique à la S-oxydation des dérivés du tétrahydrothiophène **5** réalisée par les monooxygénases (Damani et al, 1989, volume 1B p.229).

Benzothiophène et dérivés - Dans le cas du benzothiophène **3**, plusieurs structures de métabolites ont été proposées comme un dérivé hydroxylé en 2 excrété dans les urines sous forme de glucuronide **3a** chez le lapin et un acide 3-mercaptopurique **3b** (revue Rance, 1989 et figure 1.16). Dans le cas du mobam **3c** qui est un benzothiophène substitué aux propriétés insecticides, un sulfoxyde stable **3d** a été caractérisé dans les urines de différents animaux (Robbins et al, 1970) (figure 1.16).

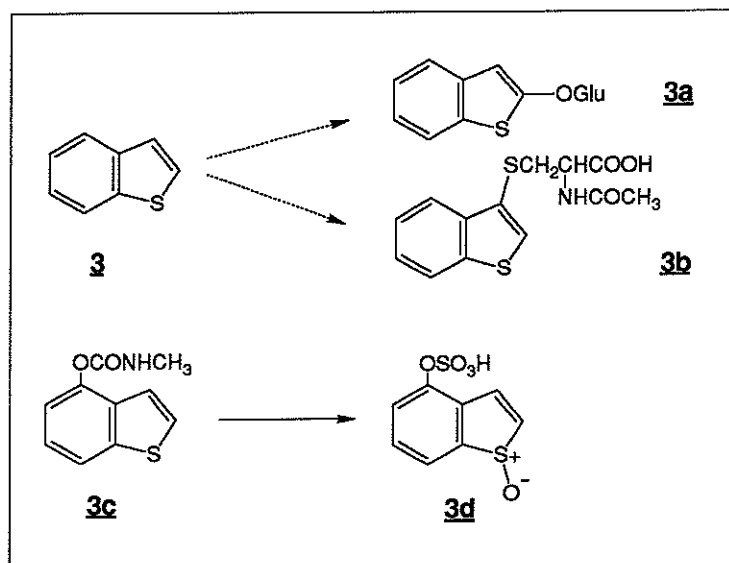


Figure 1.16 Métabolisme du benzothiophène. Différents métabolites proposés et S-oxydation du mobam.

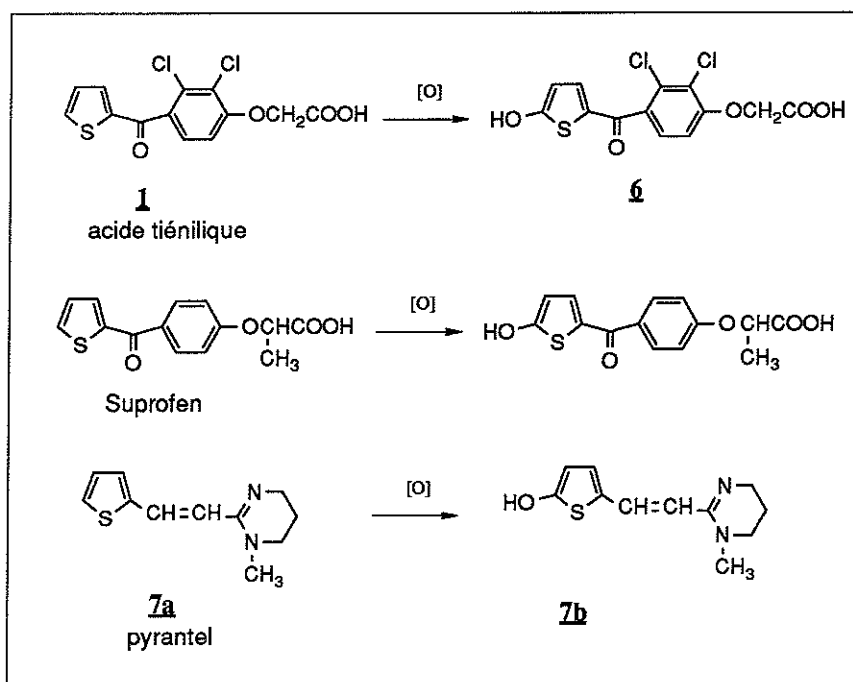
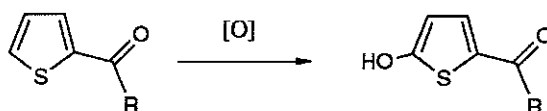
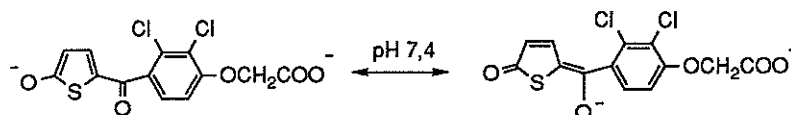


Figure 1.17 5-Hydroxylation des dérivés 2-arylothiophènes. Cas de l'acide tienilique et apparentés.

Dérivés 2-aryl-thiophènes - La 5-hydroxylation des dérivés 2-aryl-thiophènes par oxydation enzymatique :



a été suggérée pour la première fois en 1972 comme réaction intermédiaire de l'oxydation microbienne de l'acide thiophène-2-carboxylique ("R" = OH) (Cripps, 1973). Il faut attendre 1984, dans le cas de la métabolisation de l'acide tienilique, pour que soit caractérisé sans ambiguïté le premier dérivé 5-hydroxylé **6** (figure 1.17 et Mansuy et al, 1984). Cette hydroxylation est catalysée par les cytochromes P-450 (Mansuy et al, 1987) et s'est avérée une voie majoritaire de l'oxydation microsomale des dérivés 2-aryl-thiophènes (Neau et al, 1990). Depuis la littérature s'est enrichie de nombreux exemples de 5-hydroxylation, soit de dérivés 2-aryl-thiophènes, soit de thiophènes ayant un système π -accepteur en 2 (Damani 1989, volume 1B p.223 et figure 1.17). En solution aqueuse à pH 7,4, le dérivé 5-hydroxylé **6** de l'acide tienilique existe sous une forme dianionique (le pK de l'hydroxyle est de 2,5) :



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 U.V. *in vitro* qui est aussi applicable à l'ensemble des dérivés 2-aryl-thiophènes (Neau et al, 1990).

Le pyrantel **7a** est un antihelminthique métabolisé également en dérivé 5-hydroxylé **7b** (figure 1.17). L'étude *in vivo* du métabolisme de son analogue méthylé en 3,

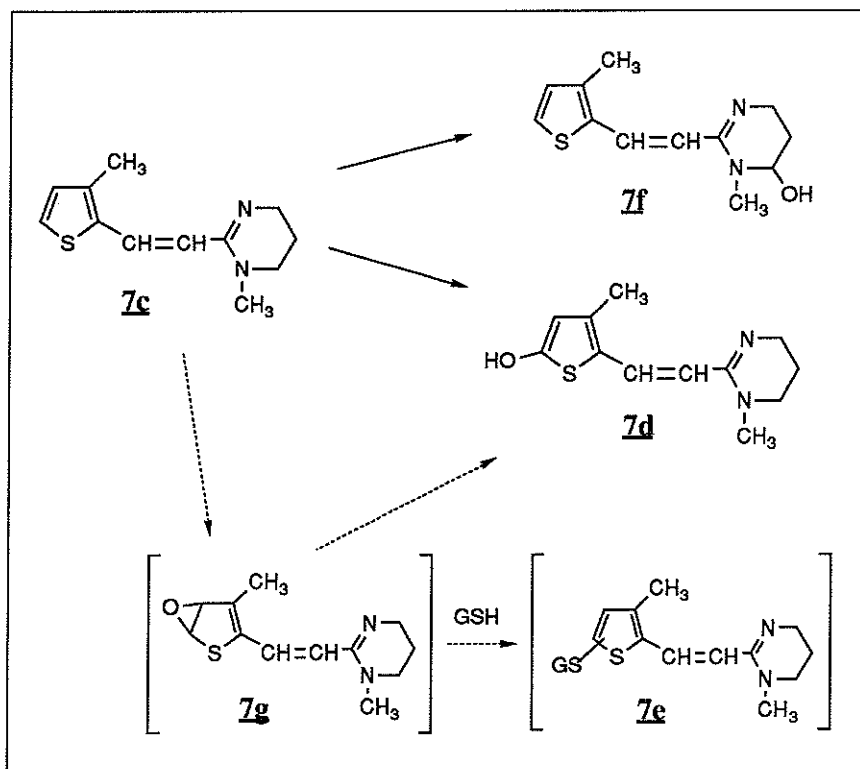


Figure 1.18 Métabolisme du morantel **7c**. 5-Hydroxylation et proposition d'un époxyde **7g** intermédiaire et de son piégeage par le glutathion en un dérivé **7e** non-caractérisé.

le morantel **7c**, retrouve un dérivé 5-hydroxylé **7d**, un dérivé **7e** non-caractérisé qui pourrait provenir d'un piégeage d'une entité réactive par le glutathion ainsi qu'un métabolite **7f** issu de l'oxydation du noyau tétrahydropyrimidine (Lynch et al, 1987 et figure 1.18). *In vitro*, ce métabolisme a été reproduit et un époxyde en position 4 et 5 **7g** 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 dérivé 5-hydroxylé **7d**.

Métabolisme du thiophène - Une étude plus ancienne du métabolisme du thiophène **2** chez le rat avait conduit à l'isolement de 2 métabolites urinaires de type mercapturique. En fonction de la structure du deuxième métabolite **2** obtenu par aromatisation du premier et des éléments spectroscopiques dont disposaient les auteurs à l'époque (masse, I.R.), la structure **8** avait été proposée. Cette structure suggérait le piégeage par le glutathion d'un époxyde intermédiaire (figure 1.19 et Bray et al, 1971).

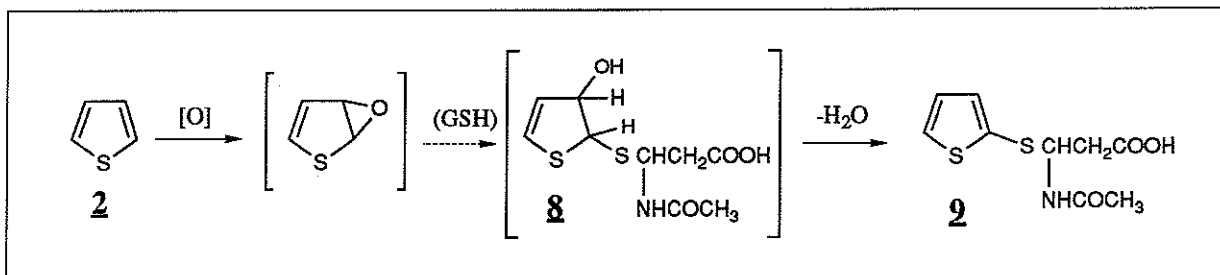


Figure 1.19 Métabolisme postulé pour le thiophène *in vivo* chez le rat (Bray et al, 1971).

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 al, 1989, volume 1B, p. 226). La littérature ne fournit aucune donnée sur les dérivés 3-aroyle-thiophènes en dehors de la fixation covalente aux protéines hépatiques de l'isomère en 3 de l'acide tiénilique **10** (TAI) (figure 1.20) sur laquelle nous reviendrons. Les autres exemples se résument dans les grandes voies présentées ci-dessus, montrant la pauvreté de nos connaissances sur le métabolisme des dérivés thiophéniques de plus en plus utilisés dans la synthèse de nouveaux principes actifs.

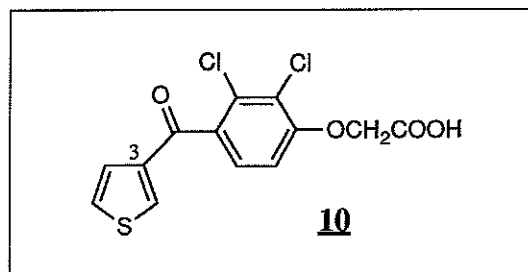


Figure 1.20 Structure de l'isomère en 3 de l'acide tiénilique (TAI, **10**).

1.5.4. Caractéristiques du métabolisme de l'acide tiénilique.

Métabolisme de l'acide tiénilique *in vitro* et *in vivo* - Les différents aspects de ce métabolisme connus à ce jour sont résumés sur la figure 1.21. La 5-hydroxylation représente 65% du métabolisme *in vitro* avec des microsomes de foie de rat et 45% du métabolisme *in vivo* chez l'homme (Dansette et al, 1990 et Mansuy et al, 1984). La coupure oxydante conduisant au diacide **20** 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 al, 1977) et de moins de 1% du métabolisme total chez l'homme (Mansuy et al, 1984). Une réaction de fixation covalente aux protéines microsomales a été mise en évidence *in vitro* (30% du métabolisme total en présence de microsomes de foie de rat). Enfin le métabolite **12** de réduction de la cétone, non retrouvé *in vitro* chez le rat, représente 11% des métabolites urinaires excrétés chez l'homme (Mansuy et al, 1984) et 80% du métabolisme total *in vivo* chez le chien (Levron et al, 1977).

Cytochromes P-450 métabolisant l'acide tiénilique - Les réactions de 5-hydroxylation et de fixation covalente aux protéines sont sous la dépendance des cytochromes P-450. L'isomère de l'acide tiénilique est métabolisé par les mêmes P-450. Chez le rat non induit, le cytochrome P-450 IIC11 est majoritairement responsable de ces activités. Deux nouveaux P-450 hydroxylent l'acide tiénilique après traitement des rats par le phénobarbital, ce sont les P-450 IIB1 et IIB2. Cette activité est également fortement induite chez le rat par le clofibrate sans que le ou les P-450 impliqués aient été identifiés (Neau, 1989). Chez l'homme, l'hydroxylation de l'AT est sous la dépendance des cytochromes de la famille IIC qui contient au moins 7 gènes associés au polymorphisme d'hydroxylation de la méphénytoïne ; l'identification exacte des isoenzymes impliquées est en cours d'étude.

Fixation covalente de l'acide tiénilique et de son isomère aux protéines microsomales hépatiques *in vitro* - L'acide tiénilique est activé par les cytochromes P-450 en une entité réactive qui se fixe de manière covalente aux protéines microsomales. En présen-

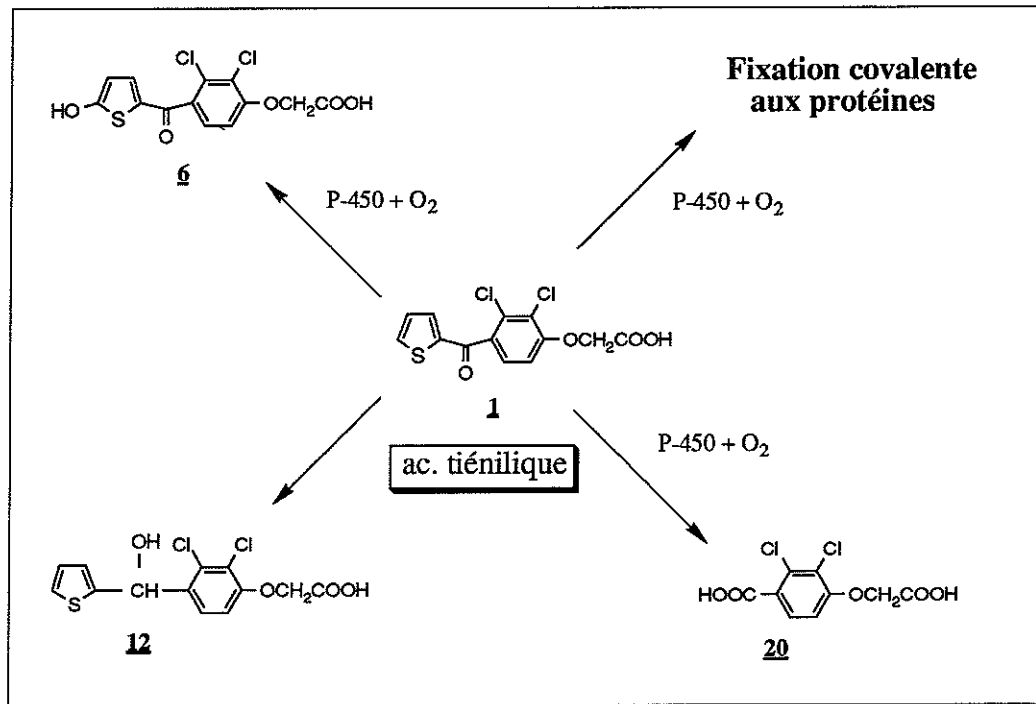


Figure 1.21 Métabolisme de l'acide tienilique.

ce de glutathion ou d'un thiol comme la cystéine ou la cystéamine, cette réaction est inhibée presque totalement. La voie principale du métabolisme *in vitro* de l'AT est son hydroxylation en 5, tandis que l'activation métabolique de son isomère conduit majoritairement à la fixation de ses métabolites sur les protéines microsomales (80% du métabolisme du TAI *in vitro*). Cette fixation covalente du TAI est également inhibée par l'addition de thiols comme le GSH au milieu d'incubation (tableau 1.2).

Tableau 1.2 Influence du glutathion sur la fixation covalente de métabolites de l'acide tienilique (AT) ou de son isomère (TAI) aux protéines lors de l'oxydation de ces composés par des microsomes de foie de rat.

	AT*	AT + GSH	TAI	TAI + GSH
Métabolites solubles	4,9**	7,8	2,7	***
Fixation covalente	2,5	0,26	11,9	2,0

* AT et TAI 100 μ M, GSH 6 mM, 2 μ M P-450 PB,

** en nmol/nmol P-450/20 min.,

*** non-étudié.

Toxicité de l'acide tienilique et de son isomère *in vivo* - La dose létale 50 (DL₅₀) du TAI est de 900 mg/kg per os chez la souris alors que celle de l'AT est en moyenne de 2100 mg/kg per os (Thuillier et al, 1974 et Sellman et al, 1981). Le TAI provoque une baisse du taux de glutathion hépatique de 70% au delà de 100 mg TAI/kg per os chez le rat contre seulement 30%, même à doses supérieures, pour l'acide tienilique. La fixation covalente de l'acétaminophène aux macromolécules intracellulaires est connue pour ne se produire *in vivo* qu'après effondrement d'au moins 70% du taux de glutathion (Hinson et al, 1981). L'isomère de l'acide tienilique est le troisième exemple de dérivé du thiophène, avec l'acide tienilique et le thiophène lui-même (Bray et al, 1971), connu pour être activé en métabolite électrophile lors de sa

biotransformation. On a d'ailleurs proposé l'implication de cet isomère dans la genèse de l'hépatite induite par la prise d'acide tiénilique à cause de sa présence comme impureté à un taux supérieur dans la présentation américaine, pays où l'hépatite a eu une incidence 10 fois plus élevée et entraîné l'arrêt de la commercialisation de l'acide tiénilique.

1.6. Immunotoxicité de l'acide tiénilique.

1.6.1. Maladie autoimmune induite par l'acide tiénilique.

Peu après son introduction sur le marché, l'acide tiénilique a été rapidement mis en cause dans la survenue d'hépatites autoimmunes (1 cas sur 10 000 en France). Cette complication comportait en effet tous les critères d'une maladie autoimmune secondaire à la prise d'un médicament, c'est à dire une fréquence basse, une période de sensibilisation, une absence de relation effet - dose et une réapparition des symptômes en cas de réintroduction accidentelle (rechute rapide et plus intense de l'hépatite). Il s'agit d'une réaction immunitaire spécifique d'organe où les réponses de l'individu sont dirigées contre des auto-antigènes et l'organe cible est ici le foie.

Aspects cliniques, histologiques et biologiques - L'hépatite induite par l'acide tiénilique donne le tableau clinique d'une hépatite chronique active (HCA) dont le profil histologique caractéristique est fait d'infiltrats inflammatoires mononucléés envahissant les lobules avec des lésions de fibrose et de nécrose dans les formes complètes. Dans le sérum des patients malades, on peut mettre en évidence des auto-anticorps appelés anti-LKM2 (voir ci-dessous) (Homberg et al, 1984).

1.6.2. Hépatopathies autoimmunes et médicaments.

Hépatopathies autoimmunes et médicaments - Les maladies autoimmunes hépatiques se partagent entre les hépatites chroniques actives, la cirrhose biliaire primitive et certaines cirrhoses mal caractérisées d'origine inconnue. De nombreux médicaments comme l'halothane, l'acide tiénilique, l'oxyphénisatine, la nitrofurantoïne, la papavérine, l' α -métyldopa, l'iproniazide ou encore la dihydralazine... sont à l'origine de complications hépatiques qui comportent les stigmates d'une maladie autoimmune. Le plus souvent leur expression clinique prend la forme d'une HCA (tableau 1.3).

Etiologies des HCA - Les étiologies sont virales (virus des hépatites B, C et D), auto-immunes ou idiopathiques et médicamenteuses (revue Maddrey, 1987 et tableau 1.3). Les HCA idiopathiques sont actuellement partagées en trois sous-groupes. D'abord le sous-groupe des HCA autoimmunes de type I décrit en premier par Waldenström (Waldenström, 1950 et historique dans Fenton Schaffner, 1986) sous la forme d'un syndrome associant une hypergammaglobulinémie polyclonale et des infiltrations du parenchyme hépatique atteignant électivement la femme jeune. On note la présence d'autoanticorps circulants, des associations fréquentes avec d'autres maladies autoimmunes et une prévalence accrue des marqueurs d'histocompatibilité HLA B8 et DR3. Le terme d'hépatite lupoïde a été utilisé par la suite grâce à la mise en évidence fréquente d'une sérologie antinucléaire (ANA) chez ce type de patient (Mackay et al, 1956) puis d'une sérologie anti-muscle lisse (SMA) plus spécifique. Le deuxième sous-groupe, appelé HCA autoimmune de type II, a été individualisé plus récemment

Tableau 1.3 Classification des hépatites chroniques actives.

	Etiologies	anticorps anti-tissus
VIRALES	hépatite virale B hépatite virale D hépatite virale C	
IDIOPATHIQUES	type I	anti-muscle lisse (actine) ANA
	type II	anti-LKM1
	autres	SLA
MÉDICAMENTEUSES	oxyphénisatine	
	α -méthildopa	
	nitrofurantoïne	
	acide tiénilique	anti-LKM2 (100%)
	halothane	anti-LKM1 (25%)
	iproniazide	anti-M6
	amineptine	
	clométacine	
dihydralazine...	anti-LM	

par la présence dans le sérum de certains patients d'anticorps dirigés contre les membranes du réticulum endoplasmique de foie et de rein (anti-LKM1) et atteignant volontiers l'enfant (Homberg et al, 1987). Actuellement on individualise un troisième sous-groupe marqué par la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes hépatiques solubles (SLA) (tableau 1.3).

1.6.3. Anticorps anti-tissus en pathologie hépatique autoimmune.

Les anticorps anti-tissus, nommés ainsi pour leur capacité à reconnaître des sous-structures cellulaires indépendamment de l'organe ou l'espèce d'origine, ont, dans ces pathologies, une valeur diagnostique toute particulière. Il semble que chaque cadre étiologique soit associé à un profil caractéristique de ces auto-anticorps. L'immunofluorescence indirecte sur coupe de tissus de divers organes est la méthode de choix de leur détection (revue Calmus et al, 1987). Ainsi on distingue :

- les *anticorps anti-noyaux* (ANA), non spécifiques des affections hépatiques mais souvent présents dans les HCA autoimmunes de type I,
- les *anticorps anti-muscle lisse* (SMA) dans 25% des HCA où ils sont spécifiques quand leur titre est supérieur à 80 et de toutes manières propres aux pathologies hépatiques et souvent associés aux ANA ; la molécule cible serait l'actine (Pedersen et al, 1982),
- les *anticorps anti-antigènes hépatiques cytoplasmiques* (anti-SLA) détectés par les techniques radioimmunologiques et définissant le troisième sous-groupe des HCA autoimmunes ; la cytokératine a été proposée comme étant l'antigène endogène reconnu (Wächter et al, 1990),
- les *anticorps antimitochondries* (AMA), de M1 à M9 selon leur profil histologique de reconnaissance ; les anti-M2 sont présents dans la cirrhose biliaire primitive où ils reconnaissent des composants du complexe multienzymatique de la pyruvate déshydrogénase (revue Yeaman, 1991) ; l'anti-M6 est spécifique d'un effet

secondaire à la prise d'iproniazide et est dirigé contre la monoamine oxydase B (Pons, 1989),

- les *anticorps anti-microsomes de foie et de rein* (anti-LKM) qui sont de trois types : les anti-LKM1 retrouvés dans les HCA autoimmunes de type II et spécifiques du segment P3 du tube contourné proximal du rein, les anti-LKM2 qui n'ont été détectés que dans les hépatites secondaires à la prise d'acide tiénilique et qui sont dirigés contre les segments P1 et P2, enfin les anti-LKM3 mis en évidence dans certaines hépatites à virus δ . Un nouveau type a été décrit récemment (Sacher et al, 1990). L'autoantigène est dans les cas connus un cytochrome P-450 (voir ci-dessous),

- les *anticorps anti-microsomes de foie* (anti-LM) sont retrouvés dans les HCA induites par la dihydralazine et encore dirigés contre un cytochrome P-450, le P-450 IA2 (Bourdi et al, 1990).

A coté des anticorps anti-tissus, d'autres types d'anticorps peuvent être mis en évidence dans les hépatopathies autoimmunes. Des anticorps anti-médicament sont présents dans certaines étiologies médicamenteuses et dirigés contre le médicament ou un métabolite réactif, voire une protéine hapténisée appelée néoantigène. Des auto-anticorps dirigés contre la membrane des hépatocytes sont fréquemment retrouvés (revue Meyer zum Büschenfelde et al, 1990). Les antigènes sont dans ce cas des protéines spécifiques du foie obtenues par fractionnement d'un homogénat cellulaire (anti-LSP), ou des fractions de protéines membranaires hépatiques (anti-LMA) ou encore les membranes elles-mêmes (anti-HMP). Le problème est de savoir si l'autoanticorps est cause ou conséquence de la dysrégulation immunitaire et ce contre quoi il est dirigé. Actuellement, seuls les anticorps anti-microsomes ont été définis avec précision d'où leur valeur dans le diagnostic et la compréhension des maladies autoimmunes hépatiques.

1.6.4. Exemples d'hépatopathies autoimmunes.

Hépatite à l'halothane - Il s'agit d'une hépatite rare qui présente souvent des lésions histologiques d'HCA apparaissant à la suite d'expositions répétées à l'anesthésique (1 cas /30000). Les antigènes ont été identifiés sous la forme de protéines membranaires hapténisées par le groupement trifluoroacétyle issu de la voie oxydative du métabolisme de l'halothane (figure 1.13, p. 15). Les sérums des patients reconnaissent l'haptène et la séquence protéique sous-jacente. Plusieurs néoantigènes apparaissent systématiquement chez l'animal après une exposition à l'halothane, les protéines correspondant à certains d'entre-eux ont été identifiées comme par exemple l'endoplasmine (100 kDa), une carboxylestérase (59 kDa), la disulfure isomérase (57 kDa) et un cytochrome P-450 induit par le phénobarbital (54 kDa). Le mécanisme proposé pour expliquer la formation de ces néoantigènes est une activation métabolique de l'halothane réalisée par les P-450 qui conduirait à une trifluoroacétylation de ces protéines dans le lumen du réticulum où elles sont concentrées avant d'être exportées vers la membrane plasmique (revue Kenna, 1991).

HCA autoimmune de type II - Les auto-anticorps anti-LKM1 reconnaissent une bande unique à 50 kDa par immunotransfert de protéines microsomaux hépatiques qui n'est autre que le cytochrome P-450 IID6 (Manns et al, 1989, Gueguen et al, 1989, Kiffel et al, 1989). L'activité de ce P-450 est inhibée par les auto-anticorps anti-LKM1

(Manns et al, 1990a). L'épitope pourrait être unique dans la région 258-270 et reconnu de manière consensuelle par tous les sérums. Une homologie avec la séquence du virus Herpès simplex de type I (HSV1) a été proposée par plusieurs auteurs (Manns et al, 1991 et Gueguen et al, 1991). Un facteur de l'environnement a aussi été suspecté dans la genèse de ces hépatites (Krawitt et al, 1987).

HCA induite par la dihydralazine - Les sérums des patients atteints d'une hépatite secondaire à la prise de dihydralazine reconnaissent et inhibent le P-450 IA2 ; le rôle de ce cytochrome P-450 dans le métabolisme de la dihydralazine n'est pas formellement démontré (Bourdi et al, 1990). Ce même cytochrome est reconnu par le sérum d'un unique cas rapporté d'HCA autoimmune idiopathique avec une sérologie de type LKM (Sacher et al, 1990 et Manns et al, 1990b).

1.6.5. Hépatite induite par l'acide tiénilique.

L'étude rétrospective des autoanticorps retrouvés dans les maladies hépatiques révèle que les auto-anticorps de type anti-LKM2 sont apparus peu de temps après la commercialisation de l'acide tiénilique. Inversement, on retrouve systématiquement une prise d'acide tiénilique chez les patients où des anticorps anti-LKM2 avaient été détectés (Homberg et al, 1984). Les anti-LKM2 sont donc spécifiques de l'hépatite induite par la prise d'acide tiénilique. Ils reconnaissent des autoantigènes qui ont été identifiés aux cytochromes P-450 de la famille IIC (Beaune et al, 1987). Ces P-450 sont responsables de la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique chez l'homme et sont inhibés par les anti-LKM2. Sur des coupes de foie fœtaux humains où ces P-450 ne sont pas exprimés, les sérums contenant des anticorps anti-LKM2 ne reconnaissent aucune protéine.

L'hypothèse "d'activation-fixation-externalisation" - Ces résultats ont permis d'émettre une hypothèse sur les mécanismes intracellulaires qui conduisent à l'apparition de nouveaux antigènes présents à la surface de la cellule, c'est l'hypothèse "d'activation-fixation-externalisation" (figure 1.22). Dans ce modèle, le P-450 réalise une activation métabolique de l'acide tiénilique qui va en retour se fixer sur ce même P-450. Cette protéine modifiée est ensuite externalisée sur la face externe de la membrane plasmique et devient un nouvel antigène exposé à la réaction du système immunitaire.

Actuellement nous savons que ce sont un ou plusieurs P-450 de la sous-famille IIC qui métabolisent l'acide tiénilique chez l'homme. Cette métabolisation s'accompagne d'une activation métabolique visible *in vitro* sous la forme d'une fixation covalente aux protéines microsomales. Par autoradiographie, Michèle Sonnier a pu montrer au laboratoire que cette fixation covalente était située au niveau des P-450. Catherine Pons a également développé un modèle d'étude chez le rat non-induit dans lequel le P-450 de rat IIC11 joue le rôle de cible reconnue par les anti-LKM2. De même que chez l'homme, ce P-450 métabolise l'acide tiénilique et est inhibé par les anti-LKM2 (Pons, 1989). Par immunofluorescence indirecte sur hépatocytes de rat en survie, elle a montré au moyen de ce modèle qu'un traitement des rats par du clofibrate puis par de l'acide tiénilique faisait apparaître un néoantigène reconnu par les anti-LKM2 à la surface de leur membrane plasmique ainsi que le P-450 IIC11 (Pons et al, 1991).

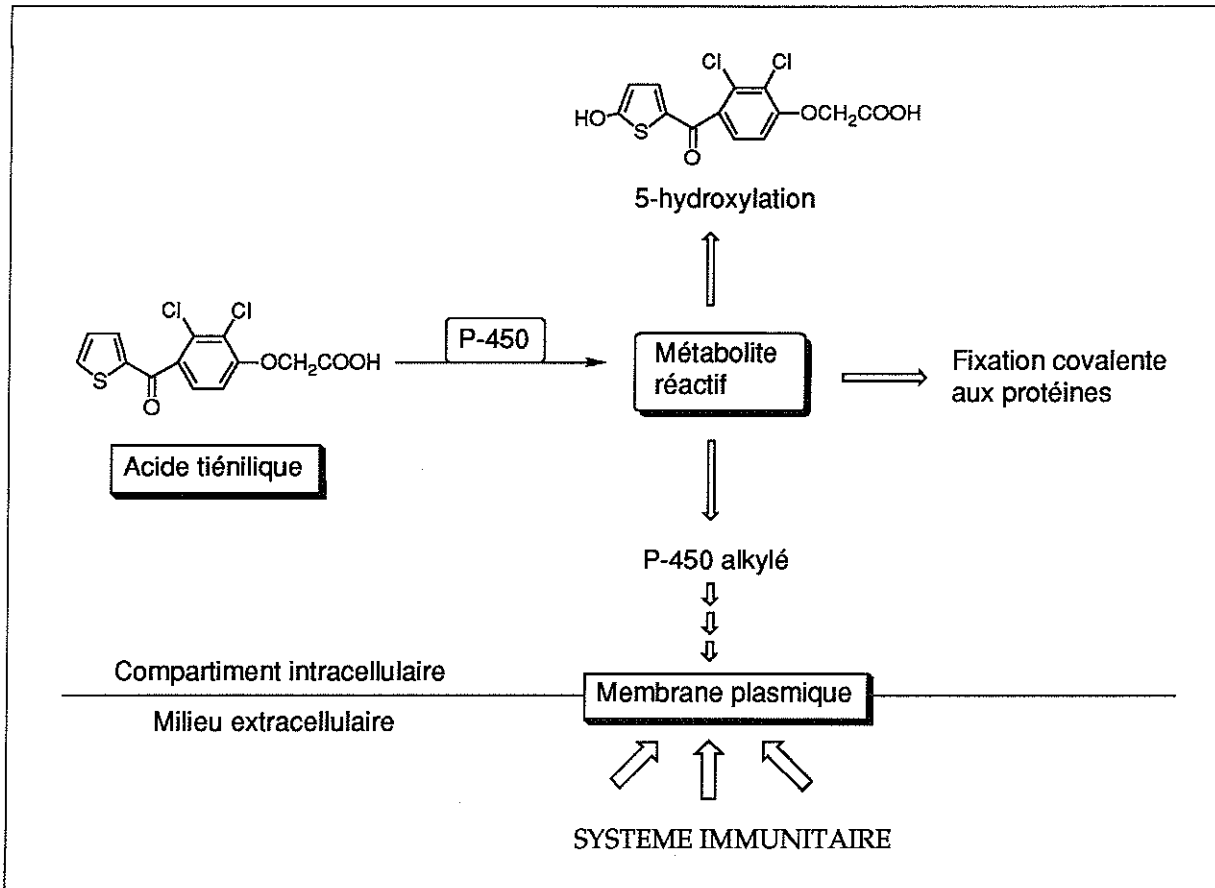


Figure 1.22 Mécanisme proposé pour expliquer l'apparition de néoantigènes à la surface de la cellule hépatique dans le cas de l'acide tienilique.

1.7. Problèmes posés.

En prenant comme support de raisonnement l'hypothèse d'apparition de nouveaux antigènes à la surface de la membrane plasmique, plusieurs interrogations persistent sur les phénomènes qui se produisent entre l'arrivée de l'AT dans la cellule et l'action du système immunitaire. Nous pouvons les scinder en 4 problèmes indépendants :

1 - Quelle est la nature du ou des métabolites réactifs formés par oxydation de l'AT ou de son isomère par les P-450 hépatiques ? Ce problème entre dans le cadre plus général du métabolisme des dérivés thiophéniques qui est, comme nous avons pu le voir, peu connu à part la réaction de 5-hydroxylation des dérivés 2-aryltiophènes dont on ignore d'ailleurs le mécanisme ;

2 - Quels sont le ou les P-450 de la famille IIC responsables de l'activation de l'AT et de son isomère dans le foie humain ?

3 - Quelle est la nature des néoantigènes produits par l'activation métabolique de l'AT ? En particulier quels sont le ou les sites de fixation covalente sur les P-450 IIC, les acides aminés impliqués, le mécanisme de l'apparition des néoantigènes à la surface de la membrane plasmique (il existe de nombreuses possibilités comme leur formation *in situ* sur la membrane plasmique par des P-450 membranaires fonctionnels à ce niveau (Loeper et al, 1990) ou encore via les molécules d'histocompatibilité de

classe I qui sont responsables de l'exposition des antigènes intracellulaires à la surface cellulaire sous forme de peptides...)?

4 - Quels sont les déterminants structuraux reconnus par les anticorps anti-LKM2 ? En particulier quelles sont la ou les séquences peptidiques des P-450 IIC concernées et l'éventuelle reconnaissance de métabolites de l'AT fixés de façon covalente à ces protéines ?

Pour répondre à la première question, nous avons essayé de piéger le ou les métabolites réactifs du TAI par différents nucléophiles à fonction thiol. En fait, diverses incubations d'AT avec des microsomes hépatiques en présence de nucléophiles soufrés comme le GSH nous avaient montré (tableau 1.2, p. 21) que si la fixation covalente des métabolites de l'AT sur les protéines hépatiques diminuait fortement en présence de ces nucléophiles, aucun métabolite de piégeage n'était formé. Par contre, la formation d'un métabolite nouveau avait pu être mise en évidence lors d'incubations de l'isomère de l'AT dans ces mêmes conditions. Le chapitre II de ce travail décrit nos résultats concernant la détermination de la nature du métabolite réactif formé par activation du TAI par les P-450 hépatiques à partir de la structure des métabolites de piégeage par des nucléophiles soufrés.

Dans le cadre du chapitre III, nous avons abordé successivement plusieurs problèmes du métabolisme microsomal du TAI qui sont la vérification de la formation de ce métabolite réactif *in vivo* chez le rat, la comparaison des résultats concernant la nature du métabolite réactif du TAI obtenu avec des microsomes hépatiques de rats et des microsomes hépatiques humains et l'identification d'un P-450 humain de la famille IIC responsable de la métabolisation du TAI et de l'hydroxylation de l'AT au moyen de la fraction microsomale d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* contenant le gène d'un P-450 inséré au sein d'un plasmide. Dans un sous-chapitre à part, nous avons abordé le problème de la fixation covalente du métabolite réactif du TAI aux protéines microsomales en essayant d'identifier le ou les acides aminés avec lesquels il est capable de réagir pour donner éventuellement lieu à une fixation covalente.

Dans le chapitre IV, nous avons poursuivi un travail commencé par Catherine Pons sur l'obtention d'anticorps anti-acide tiénilique. Plus exactement, Il s'agit d'essayer de produire des anticorps chez le lapin capables de reconnaître spécifiquement les métabolites de l'AT ou de son isomère fixés de façon covalente aux protéines après activation par les P-450 et ainsi de se donner un outil puissant qui permettra d'aborder les points 3 et 4 ci-dessus. A l'aide des résultats obtenus sur la nature de l'activation métabolique du TAI, nous avons construit un haptène que l'on peut penser être de structure analogue à celle des métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines microsomales et procédé à une immunisation chez le lapin.

CHAPITRE DEUXIEME

**ACTIVATION METABOLIQUE DE L'ISOMERE DE
L'ACIDE TIENLIQUE :**

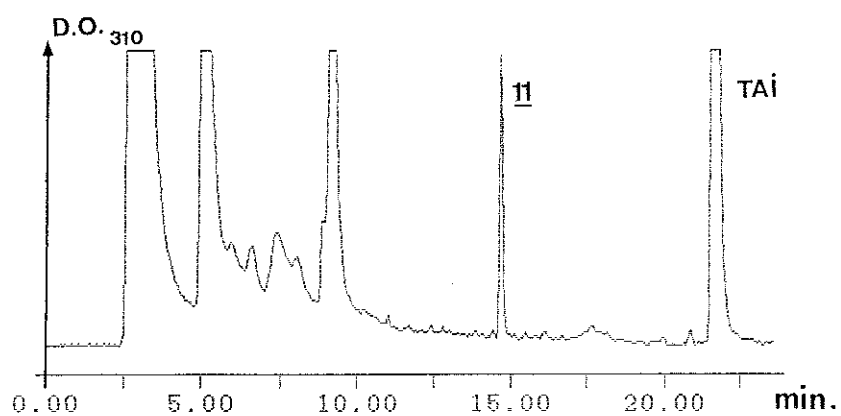
**MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION D'UN
SULFOXYDE DE THIOPHENE *IN VITRO***

Diverses incubations de TAI en présence de microsomes hépatiques de rat, d'un système générateur de NADPH et de mercaptoéthanol ont été réalisées. La composition du milieu réactionnel a été analysée en fin de réaction, les protocoles expérimentaux sont décrits dans la partie expérimentale (chapitre VI). Le choix du thiol a été guidé par le souci de simplifier les profils chromatographiques et les spectres R.M.N. des divers métabolites de piégeage obtenus, c'est la raison qui nous a fait préférer le mercaptoéthanol au glutathion ou à la N-acétylcystéine dans un premier temps.

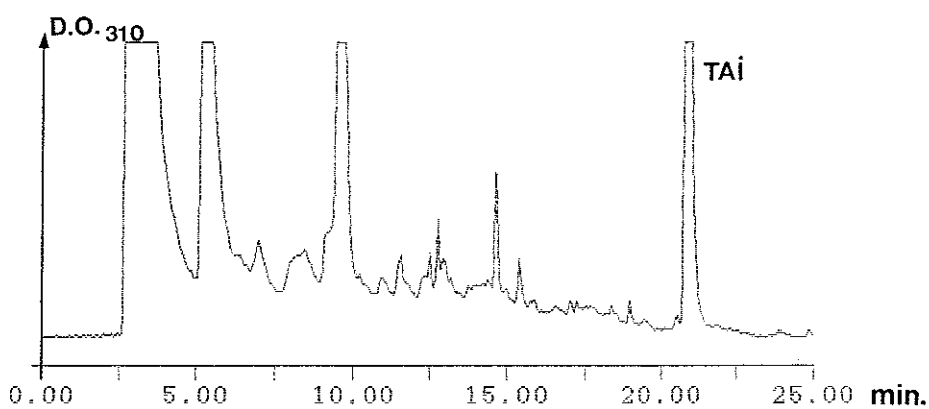
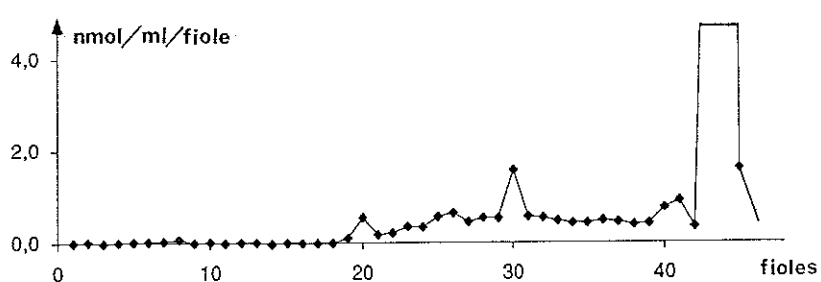
2.1. Métabolisme de l'isomère de l'acide tiénlique avec des microsomes hépatiques de rat.

2.1.1. En l'absence de mercaptoéthanol.

Avec des microsomes induits par le phénobarbital (PB) - Sur la figure 2.1 sont présentés l'éluogramme et le radiochromatogramme d'une incubation analytique de TAI en présence de microsomes PB (P-450 1 μ M, TAI 100 μ M, 20 min. à 37°C, protocole décrit au paragraphe 6.4.1, p. 138). Entre 10 et 20 min. le radiochromatogramme présente un fond de radioactivité composé d'une multitude de métabolites absorbant en U.V. autour de 260 nm. Un seul pic est individualisable au temps de rétention de 14,5 min, le métabolite **11** de maximum d'absorption U.V. à 315 nm. La présence de ces métabolites est dépendante de celle du système générateur de NADPH car en son absence le radiochromatogramme ne montre aucune radioactivité en dehors de celle du pic de TAI. La mesure en parallèle de la fixation covalente aux protéines microsomales permet de répartir la métabolisation du TAI (métabolisme total, 17%) en fixation covalente (6%) et métabolites solubles (11%) (tableau 2.1, p. 33).



PB



CLO

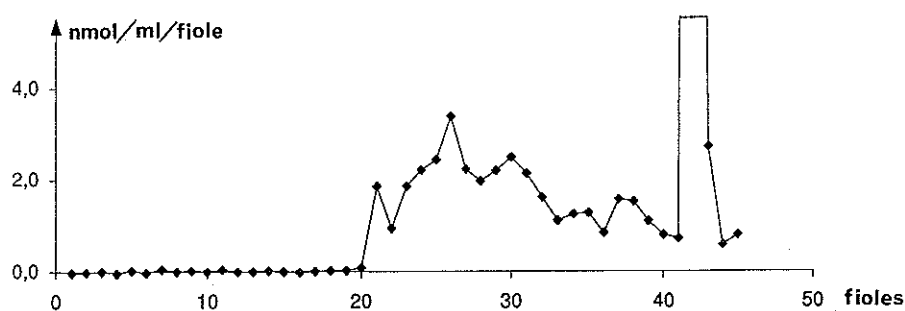


Figure 2.1 Incubation analytique de TAI en présence de microsomes PB (en haut) ou CLO (en bas) (éluogrammes avec détection à 310 nm et radiochromatogrammes, P-450 1 μ M, TAI 100 μ M, incubations 20 min. à 37°C, gradient H.P.L.C. A, radioactivité exprimée en nmol/ml d'incubat par fraction de collection de 30 s).

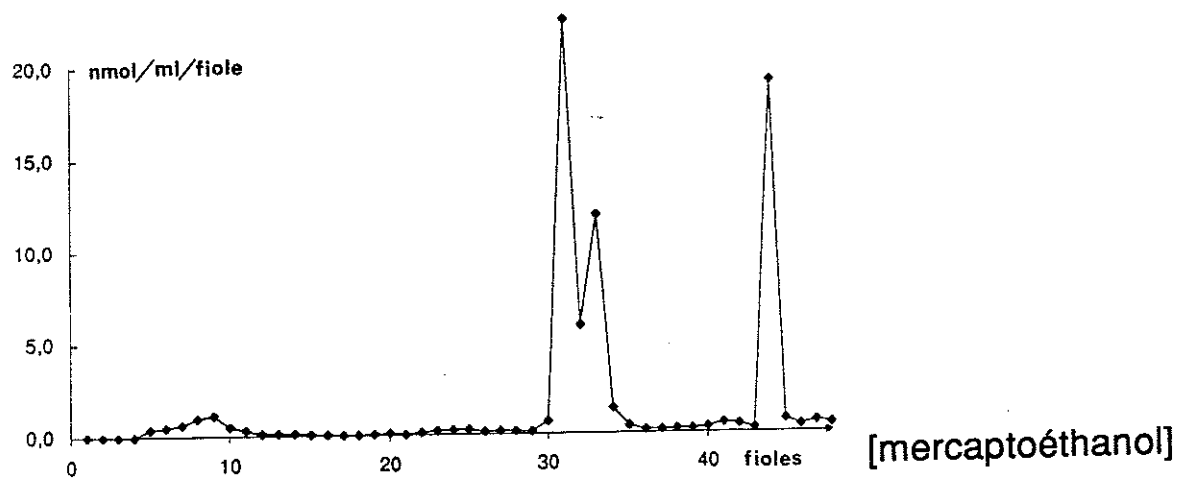
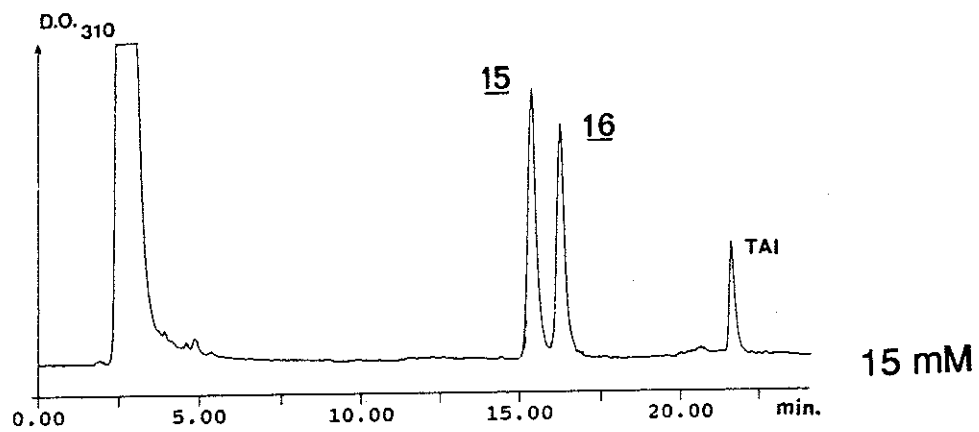
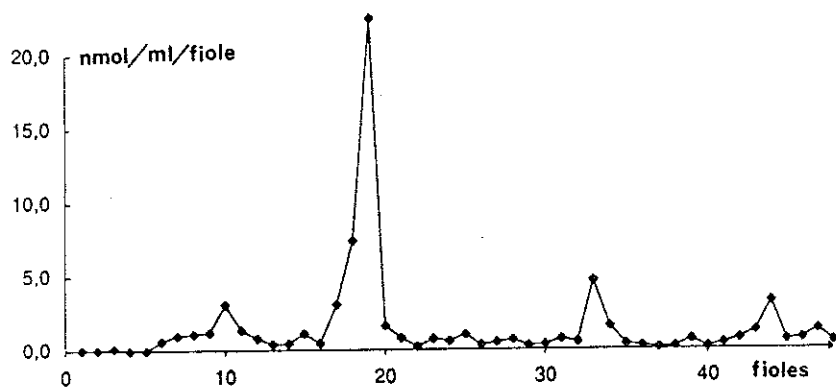
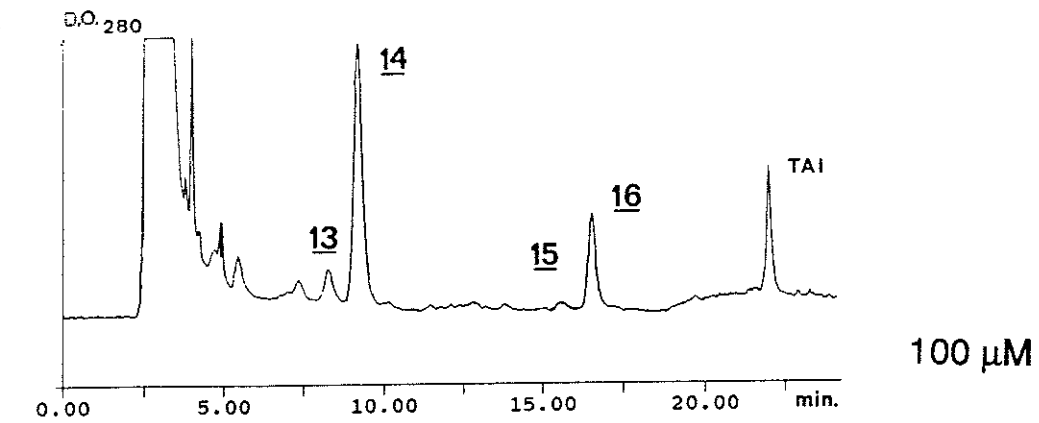


Figure 2.2 Incubation analytique de TAI en présence de microsomes CLO et de mercaptoéthanol 100 μ M (en haut) ou 15 mM (en bas) (éluogrammes avec détection à 280 ou 310 nm et radiochromatogrammes, P-450 1 μ M, TAI 70 μ M, 20 min. à 37°C).

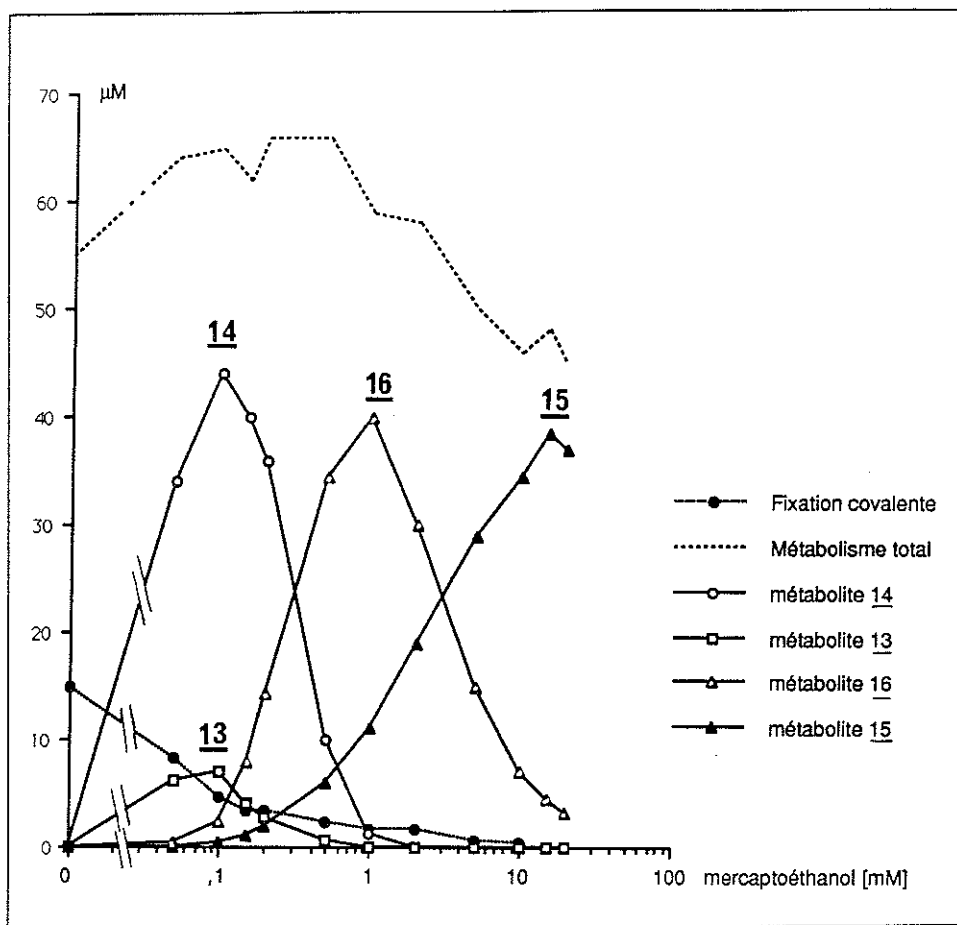


Figure 2.3 Evolution¹, en fonction de la concentration initiale du mercaptoéthanol présent dans le milieu réactionnel, de la fixation covalente aux protéines microsomaux et des concentrations finales des métabolites **13**, **14**, **15** et **16** d'une incubation de TAI (70 μM , 20 min. à 37°C) en présence de microsomes CLO (P-450 1 μM).

Avec des microsomes induits par le clofibrate (CLO) - La métabolisation est 3 fois plus importante avec un métabolisme total de 48% se répartissant en 14% de métabolites fixés aux protéines et 34% de métabolites solubles (tableau 2.1). De nombreux métabolites dont **11** sont visibles mais aucun ne compte pour plus de 2% du métabolisme total (figure 2.1).

2.1.2. En présence de mercaptoéthanol.

Avec des microsomes induits par le clofibrate - Le mercaptoéthanol est utilisé à différentes concentrations variant de 50 μM à 20 mM. Les échantillons sont chromatographiés par H.P.L.C. selon la méthode de gradient B (gradient étagé, voir partie expérimentale 6.1.5, p.138). Dans ces conditions, la majorité du fond de radioactivité sort

¹ Pour construire ce diagramme, les concentrations des métabolites **13** et **14** ont été calculées par intégration de la radioactivité sous leur pic commun du radiochromatogramme. Cette radioactivité a été ensuite répartie selon l'intégration de la surface des deux pics mesurée à leur longueur d'onde d'égale absorption molaire (285 nm). Un traitement identique a été nécessaire pour le pic de radioactivité commun aux métabolites **15** et **16** qui possèdent un coefficient d'absorption molaire identique à 325 nm.

Tableau 2.1. Répartition du métabolisme total du TAI entre la fixation covalente aux protéines microsomales et les métabolites solubles selon les différents types de microsomes employés (P-450 1 μ M, TAI 100 μ M, incubations 20 min. à 37°C).

	Métabolisme total	fixation covalente	métabolites solubles dont 12	métabolite 12
Microsomes PB	17	6	11	5,0
Microsomes CLO	48	14	34	1-2

* résultats exprimés en % du TAI total.

en tête vers 11 min. et 4 métabolites de piégeage, dépendants de la présence de mercaptoéthanol et du système générateur de NADPH, sont identifiés sur l'élugramme. Ce sont, par ordre d'apparition, les métabolites **13**, **14**, **15** et **16**. Sur la figure 2.2 sont présentés les élugrammes et les radiochromatogrammes d'incubations réalisées en présence de mercaptoéthanol 150 μ M et 15 mM.

La concentration en fin d'incubation de ces quatre métabolites varie en fonction de la concentration initiale de mercaptoéthanol présente dans le milieu réactionnel (figure 2.3). Les métabolites **13** et **14** apparaissent ensemble à faible concentration en mercaptoéthanol, dans un rapport 20/80, puis disparaissent progressivement au fur et à mesure que celle-ci augmente, au profit des métabolites **16** puis **15**. Le métabolisme total passe par un maximum pour une concentration de 100 μ M en mercaptoéthanol (figure 2.3). La fixation covalente aux protéines microsomales diminue progressivement.

Avec des microsomes induits par le phénobarbital - En présence de microsomes PB et de différentes concentrations en mercaptoéthanol, l'évolution de l'élugramme est similaire mais le métabolisme total ne dépasse jamais 16% et donc reste très inférieur au métabolisme observé avec les microsomes CLO.

2.1.3. Plan d'étude.

Nous nous attacherons dans un premier temps à caractériser les métabolites primaires de piégeage **13** et **14** qui apparaissent aux faibles concentrations en mercaptoéthanol. Nous établirons ensuite la structure des métabolites **15** et **16** et enfin les incertitudes sur les structures proposées seront levées par des expériences de deutériation sélective. Les microsomes CLO ont été choisis pour préparer ces métabolites.

2.2. Détermination de la structure des métabolites primaires **13** et **14** de piégeage par le mercaptoéthanol.

2.2.1. Etude des métabolites **13** et **14**.

Préparation - Des volumes d'incubation de 50 ml (TAI 70 μ M, P-450 CLO 1,2 μ M et mercaptoéthanol 100 μ M, voir partie expérimentale, paragraphe 6.1.9, p. 140) donnent, après purification par H.P.L.C. préparative, des quantités des deux métabolites de l'ordre du mg avec un rendement de 50% par rapport au TAI initial. Leur séparation nécessite des chromatographies H.P.L.C. itératives à pH 6,7 au moyen d'un gradient de faible pente.

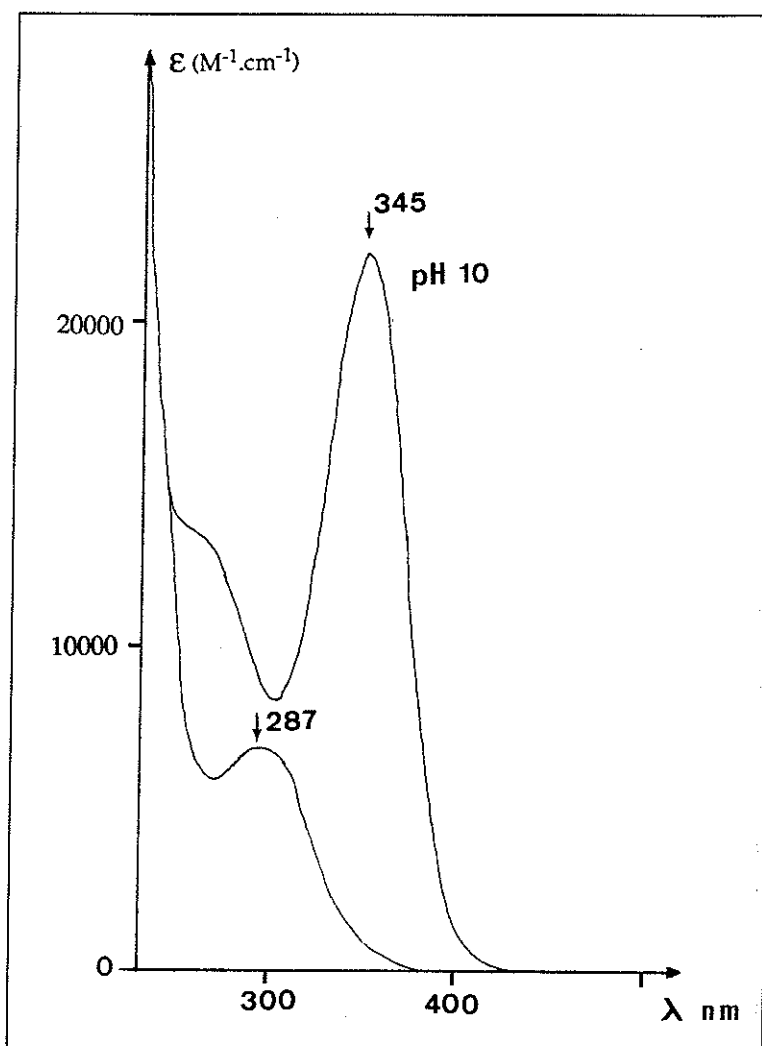


Figure 2.4 Spectre d'absorption U.V. du métabolite **14** à pH neutre et à pH 10 (NaOH).

Description - Les sels d'ammonium des métabolites **13** et **14** se présentent sous la forme d'une poudre orangée extrêmement hygroscopique, très soluble dans l'eau, le DMSO ou le méthanol, peu soluble dans l'acétone et insoluble dans l'acétonitrile. Leurs solutions aqueuses sont stables à pH neutre un jour à 4°C, plusieurs mois à -80°C avec une légère dégradation les premières semaines. Elles virent à l'orange foncé en milieu basique (NaOH, pH entre 8,5 et 10) et donnent un précipité jaune d'or en milieu acide (HCl, pH inférieur à 3,5). Ces réactions sont renversables entre pH 3 et 10. En milieu acide (HCl 0,1N ou acide trifluoroacétique 70% dans l'eau), les deux métabolites se transforment en un nouveau métabolite **17**, peu polaire, de temps de rétention de 17,5 min. (méthode de gradient H.P.L.C. A). Cette réaction est significative au dessous de pH 1 à 37°C et est quantita-

Tableau 2.2 Caractéristiques d'absorption U.V. des métabolites **13** et **14** en solution aqueuse à pH 7,4 et à pH 10.

	λ max (nm)	ϵ max ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)
Métabolite 13	287	7200
Métabolite 14	292	6400
à pH 10 (NaOH)	345	21200

tive avec HCl (HCl entre 0,1 et 2N). Le métabolite **14** se transforme plus rapidement que le métabolite **13** ($t_{1/2} = 25 \pm 5$ min. contre 210 ± 30 min. avec HCl 1N à 37°C).

Spectres d'absorption U.V. - En solution aqueuse, ces deux métabolites ont un spectre d'absorption U.V. similaire avec un maximum vers 290 nm. En augmentant le pH au moyen de soude, leurs spectres se transforment par apparition d'une bande d'absorption intense à 345 nm de mêmes caractéristiques (tableau 2.2 et figure 2.4). Cette réaction est renversable par HCl et l'étude des variations de l'absorption U.V. d'une solution des métabolites **13** et **14** en fonction du pH conduit à un pKa de l'ordre de 8,5.

Interconversion des métabolites **13** et **14** en milieu basique - Un contrôle par H.P.L.C. (pH 4,6) de la composition d'une solution des métabolites **13** et **14** traitée par NaOH montre des variations qui ne dépendent pas du mélange initial mais du pH auquel il a été porté. Ainsi, après pH 13, le métabolite **13** représente moins de 1% du mélange, à pH 10 5%, à pH 8 14% et enfin, en redescendant lentement le pH à neutralité, 17%.

Ces variations peuvent s'expliquer par l'existence d'un équilibre. L'interconversion du métabolite **13** en **14**, presque complète après traitement en milieu basique, est facilement mise en évidence par H.P.L.C. Par contre la réaction inverse, transformation du métabolite **14** en **13**, est plus difficile à caractériser car ce dernier reste toujours minoritaire et se différencie mal de plusieurs impuretés qui apparaissent sur l'éluogramme après traitement basique. Pour ce faire, une solution fraîchement isolée par H.P.L.C. de métabolite **14** est amenée à pH 8 au moyen de soude. Après neutralisation puis injection sur la colonne H.P.L.C. en conditions isocratiques (33% solvant B), on mélange le solvant en sortie de colonne avec NaOH 0,1N, 2 ml/min. avant l'analyse U.V. qui a lieu à pH 10. Dans ces conditions, la bande intense d'absorption à 345 nm apparaît pour les deux métabolites qui sont alors aisément identifiés sur l'éluogramme. La mise en évidence, au moyen de ce procédé, d'un métabolite **13** obtenu à partir d'une solution de métabolite **14** traitée par NaOH a permis de montrer la transformation de **14** en **13**. Cette réaction demande plusieurs minutes à pH 8,5 tandis que la réaction inverse est au moins 10 fois plus rapide. Il n'a jamais été observé d'interconversion entre les deux métabolites conservés à pH neutre ou acide.

Le parallélisme des propriétés de ces deux métabolites en fait de probables isomères : temps de rétention H.P.L.C. presque identiques, spectres U.V. semblables, aptitude à se transformer en métabolite **17** en milieu acide et interconversion via un double équilibre acido-basique.

Etude par R.M.N.¹H du métabolite majoritaire **14** - Le spectre R.M.N.¹H de ce métabolite, purifié par H.P.L.C. sous forme de sel d'ammonium, a été enregistré à 400 MHz dans de l'eau lourde légèrement acidifiée à pH 4 au moyen d'acide acétique deutérié. Il présente tous les signaux attendus pour la partie 4-céto-2-3-dichlorophénoxyacétate du TAI (figure 2.5 et tableau 2.3), soit pour le OCH₂ un singulet intégrant pour deux protons à 4,66 p.p.m. et pour les deux protons aromatiques deux doublets couplés ($J = 8,8$ Hz) intégrant chacun pour un proton à 7,45 et 6,96 p.p.m. Un résidu mercapto-éthanol est visible sous l'aspect d'un triplet à 3,89 p.p.m. intégrant pour 2 protons et d'un doublet de triplets à 3,03 p.p.m. de même intégration (figure 2.5c). Il reste 4 protons non attribués dont un sous forme de singulet à 5,44 p.p.m. et un système de 3 protons couplés deux à deux : un proton à 3,83 p.p.m. ($J = 3,4$ Hz, doublet), un proton vinylique à 7,02 p.p.m. ($J = 3,4$ Hz, doublet) et un proton à 4,57 p.p.m. ($J = 2$ Hz et 20

Hz, quadruplet). Dans ces conditions de solvant, ce dernier proton est échangé avec un deutérium à plus de 90% et son appartenance à la molécule est montrée par la disparition de ses constantes de couplage après irradiation sélective des deux autres protons situés à 3,83 p.p.m. et 7,02 p.p.m.

A pH neutre dans l'eau lourde, le proton à 4,57 p.p.m. est presque totalement échangé et celui à 3,85 p.p.m. s'échange en quelques jours (ou après traitement par NaOD, figure 2.5c) ; le proton vinylique apparaît alors sous la forme d'un singulet (figure 2.5a). Ce métabolite doublement deutérié **18** s'est avéré important par la suite comme point de départ pour des expériences de deutériation sélective (paragraphe 2.4, p. 59). L'étude dans un mélange eau lourde-acétonitrile deutérié (en présence de DCI pour protoner la fonction carboxylate) évite cet échange et les trois protons prennent alors l'aspect de doublets de doublets (figure 2.5d et tableau 2.3).

Seule une double liaison sur les carbones 3 et 4 fournit une structure de la chaîne carbonée du noyau thiophène initial compatible avec les déplacements chimiques et les couplages observés entre ces trois protons. Le résidu mercaptoéthanol se positionne par défaut sur le carbone 2 avec le proton H₂ en singulet. Il ne reste que les carbones 2 et 5 avec des positions libres pour lier éventuellement le soufre. Le motif de structure résultant, présenté sur la figure 2.6, doit être présent dans le métabolite **14**, sa masse est de 408.

Etude par R.M.N.¹H du métabolite minoritaire **13** - Le métabolite minoritaire **13**, partiellement purifié par H.P.L.C., a été étudié dans les mêmes conditions (figure 2.5). Ses caractéristiques en R.M.N.¹H sont résumées dans le tableau 2.3 et sont très proches de celles du métabolite **14**. Ce sont certainement deux diastéréoisomères. Le proton H_{5b} de ce métabolite s'échange plus lentement que le proton H_{5b} du métabolite **14** et son équivalent dideutérieré n'a jamais été mis en évidence, probablement à cause de la transformation en son isomère lors du traitement basique nécessaire à l'échange rapide des protons H₅.

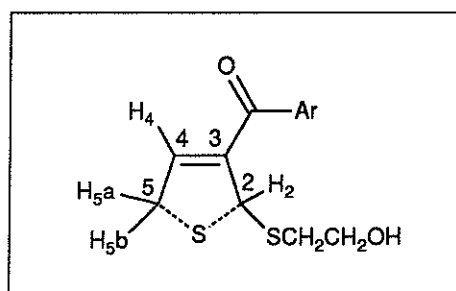


Figure 2.6 Motif de structure dont la présence dans les métabolites **13** et **14** est imposée par les résultats de l'étude par R.M.N.¹H.

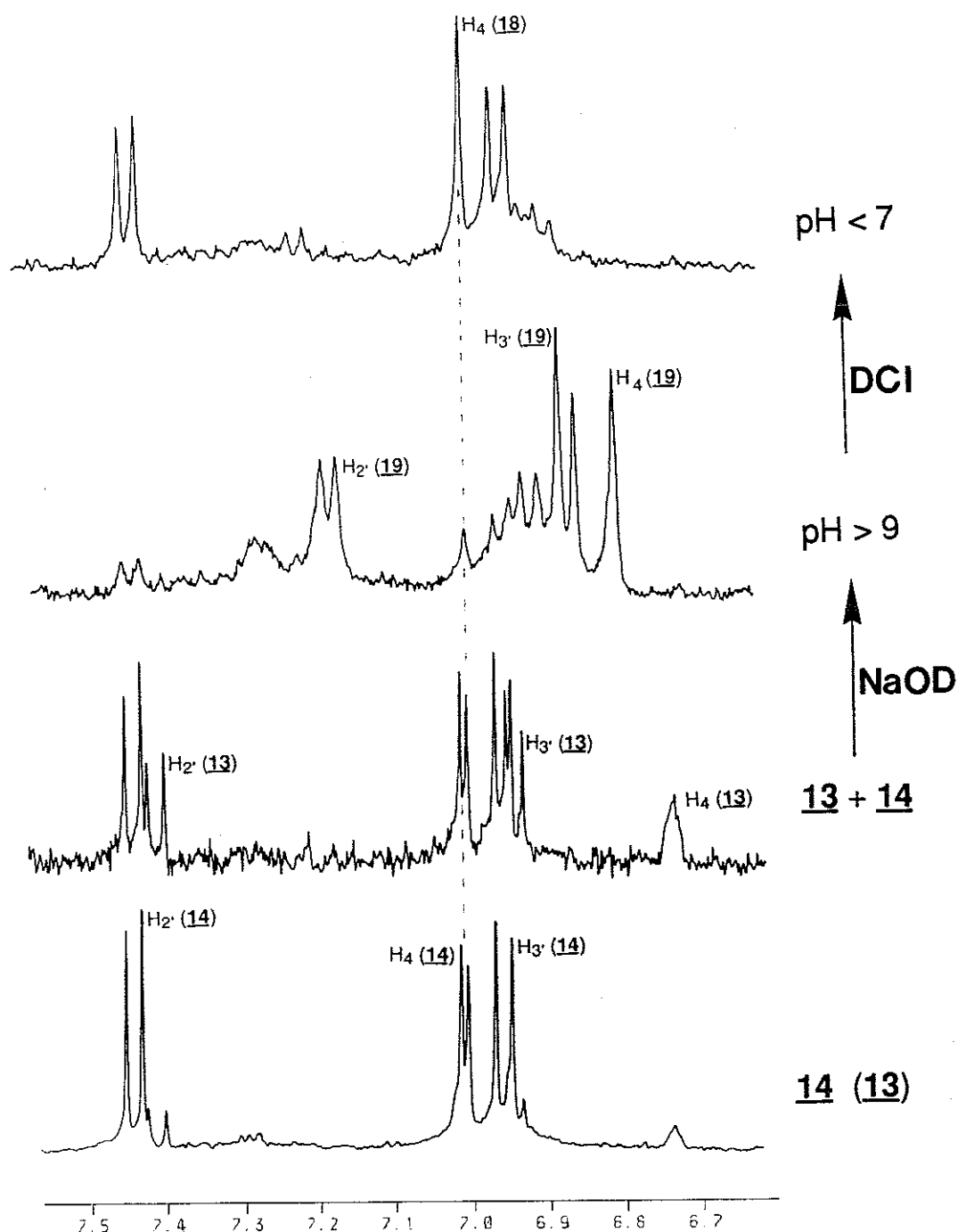


Figure 2.5a Spectres R.M.N. ^1H des métabolites **13** et **14** dans D_2O (pH 4, CD_3COOD , 400 MHz).

Partie des spectres montrant les protons aromatiques et vinyliques avec de bas en haut : le métabolite **14** partiellement purifié, une préparation enrichie en métabolite **13**, cette même préparation amenée à pH basique (voir texte) puis de nouveau à pH acide.

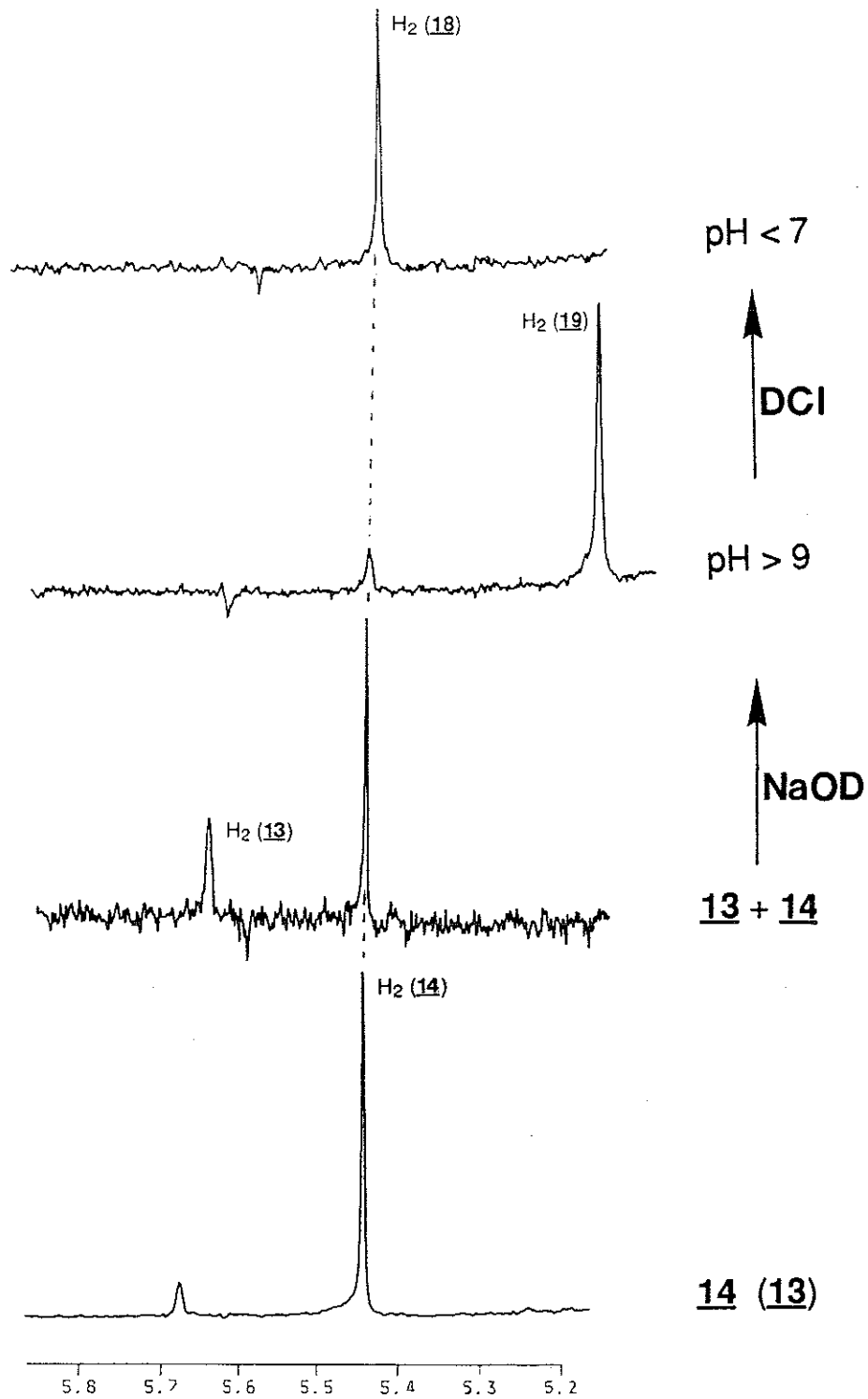


Figure 2.5b Spectres R.M.N.¹H des métabolites **13** et **14** dans D₂O (pH 4, CD₃COOD, 400 MHz).

Partie des spectres montrant le proton H₂ avec de bas en haut : le métabolite **14** partiellement purifié, une préparation enrichie en métabolite **13**, cette même préparation amenée à pH basique (voir texte) puis de nouveau à pH acide.

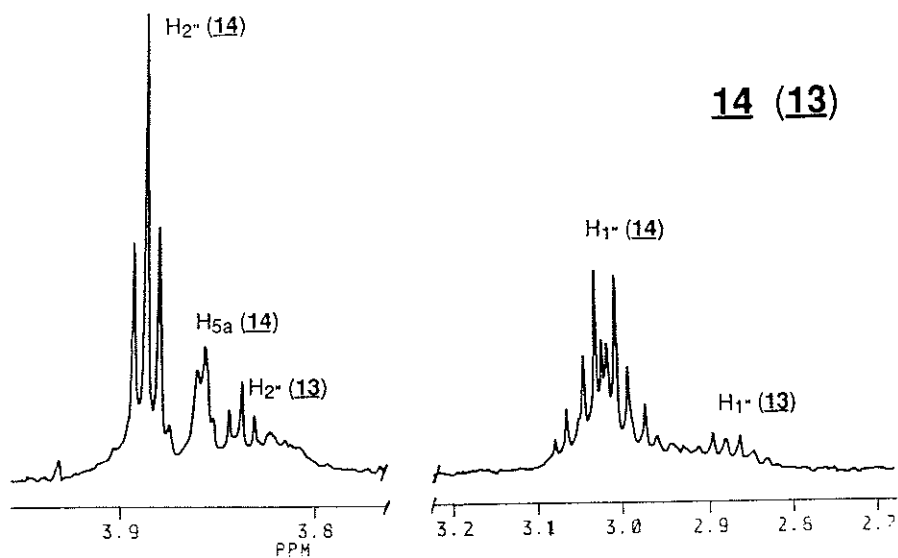
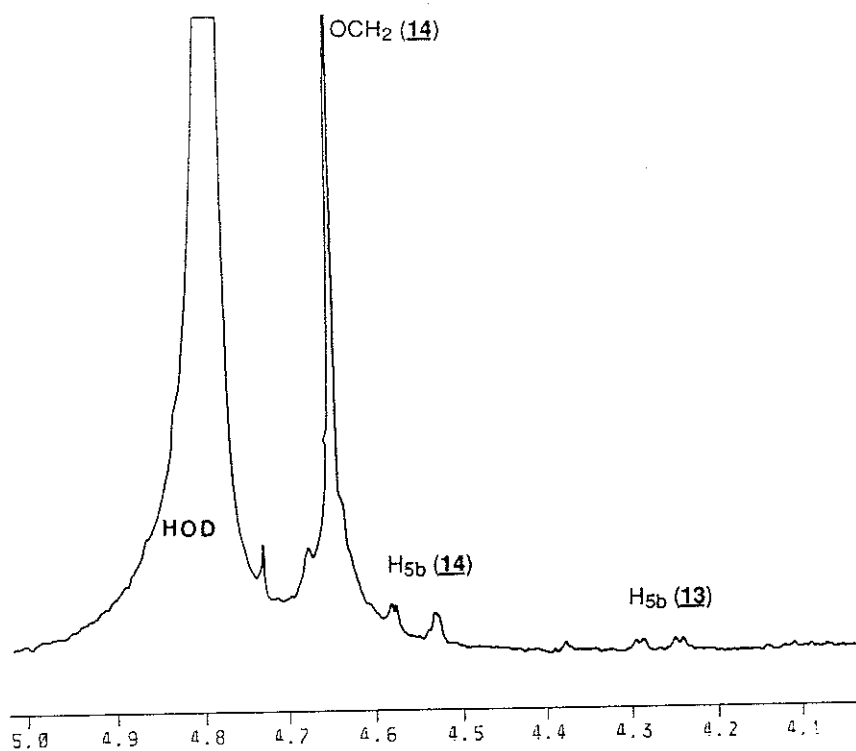


Figure 2.5c Spectre R.M.N.¹H du métabolite **14** dans D₂O (pH 4, CD₃COOD, 400 MHz).
Partie restante du spectre du métabolite **14**, enregistrée sur une préparation partiellement purifiée, montrant en haut le signal des protons OCH₂, celui du proton H_{5b} presque totalement échangé avec un deutérium de l'eau lourde (le proton H_{5b} du métabolite **13** est aussi visible car bien que ce métabolite soit minoritaire, son proton H_{5b} est moins échangé), en bas les signaux du résidu mercaptoéthanol et celui du proton H_{5a}.

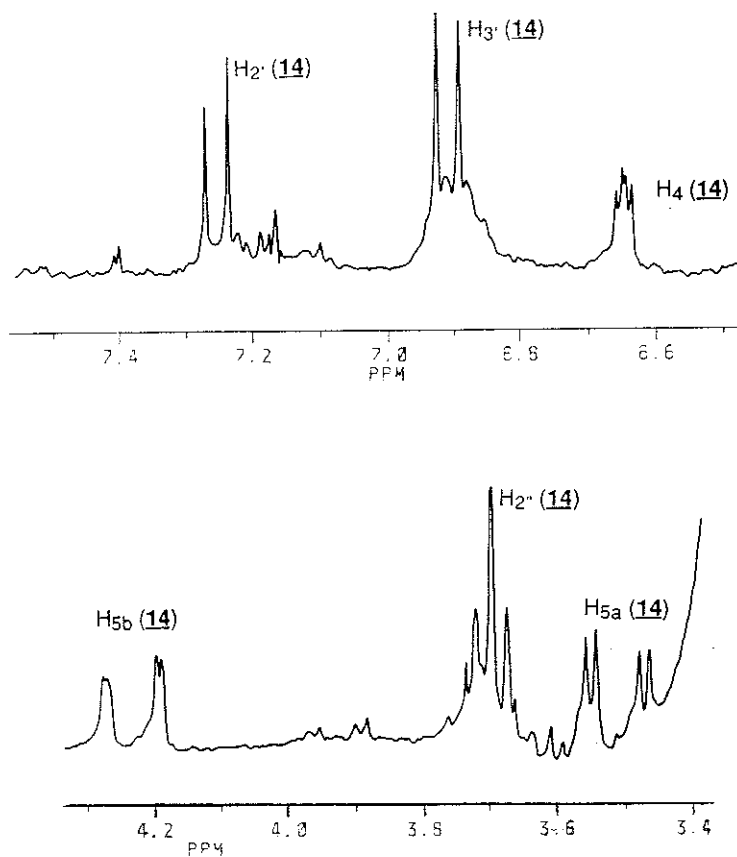


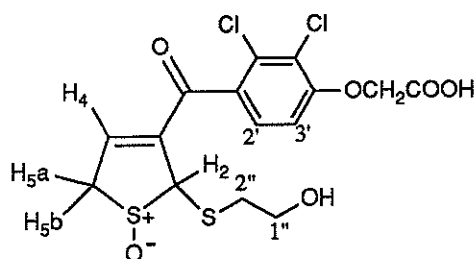
Figure 2.5d Spectre R.M.N. ^1H des métabolites **13** et **14** dans $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}/\text{DCI}$ (250 MHz).

Parties des spectres montrant les signaux des trois protons H_4 , H_{5a} et H_{5b} sous forme de quadruplet. Dans ces conditions d'observation, il n'y a pas d'échange de H_{5a} ou de H_{5b} avec un deutérium de l'eau lourde.

Tableau 2.3 Caractéristiques R.M.N.¹H des métabolites **13**, **14**, et **19**.

	H2	H4	H5a *	H5b **
Métabolite 14 D ₂ O	5,44 s	7,02 d : 3,4	3,83 d : 3,4	4,57 *** dd : 2 - 20
Métabolite 14 D ₂ O/CH ₃ CN/DCl	5,17 s	6,67 dd : 3,7 - 1,5	3,52 dd : 3,7 - 20	4,25 dd : 1,5 - 20
Métabolite 13 D ₂ O	5,67 s	6,74 massif	n. id. **** d : 18	4,28 dd : 3,4 - 18
Métabolite 19 D ₂ O + NaOD	5,15 s	6,82 s	1 anion + 1 deutérium	

	H2'	H3'	OCH ₂	H1''	H2''
Métabolite 14 D ₂ O	7,45 d : 8,8	6,96 d : 8,8	4,66 s, 2H	3,89 t : 6, 2H	3,02 1H 3,02 1H dt : 14 - 6
Métabolite 14 D ₂ O/CH ₃ CN/DCl	7,29 d : 8,8	6,94 d : 8,8	4,76 s, 2H	3,71 t : 6 2H	2,86 1H 2,90 1H dt : 14 - 6
Métabolite 13 D ₂ O	7,42 d : 8,8	6,95 d : 8,8	4,66 s, 2H	3,78 t : 6, 2H	2,89 2H dt : 12 - 6
Métabolite 19 D ₂ O + NaOD	7,19 d : 8	6,88 d : 8	4,60 s, 2H	3,88 1H 3,90 1H dt : 14 - 6	2,89 1H 3,09 1H dt : 14 - 6

**13, 14**

δ en p.p.m./Si(CH₃)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, dd = doublet de doublets, dt = doublet de triplets.

* H_{5a} s'échange rapidement au dessus de pH 7,

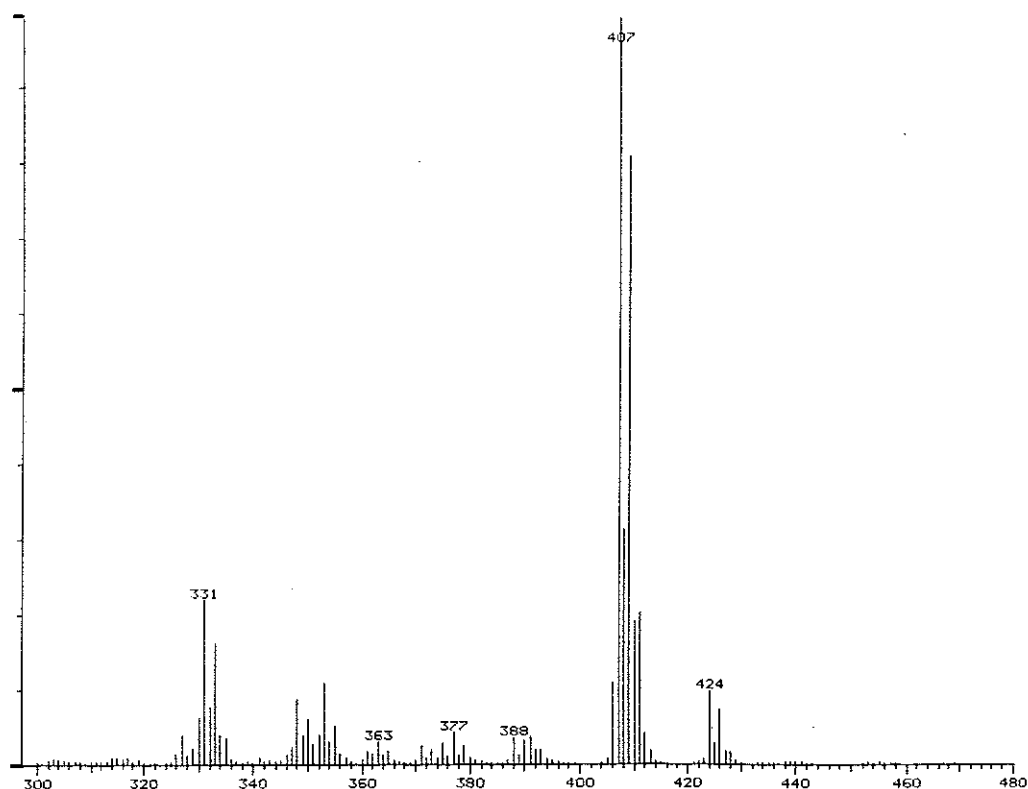
** H_{5b} s'échange rapidement au dessus de pH 3,

*** échange presque complet de H_{5b} avec un deutérium de l'eau lourde,

**** n. id. = non identifié (H_{5a} de **13** est masqué par le massif des H_{1''} de **14** mais l'irradiation à cet endroit voit la disparition de la constante de couplage de 18 Hz de H_{5b} et le proton H₄ s'affiner).

Tableau 2.4 Spectre de masse du mélange des métabolites **13** et **14** en ionisation chimique (NH₃).

m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 424
331	25%, Cl ₂ [*]	TAI + H ⁺
407	100%, Cl ₂	M + H ⁺ - H ₂ O
424	10%, Cl ₂	M + NH ₄ ⁺ - H ₂ O



* Cl₂ indique un triplet isotopique correspondant à la présence des deux chlores.

Spectre de masse - L'étude en spectrométrie de masse a été réalisée sur une préparation des deux isomères **13** et **14** non séparés. Le résultat en ionisation chimique (NH₃) est détaillé ci-dessus (tableau 2.4). En impact électronique, seuls des fragments de bas poids moléculaire sont retrouvés qui n'apportent pas de renseignements complémentaires. La présence des deux chlores dans la molécule est signée par l'existence de pics sous forme de triplet isotopique dans un rapport 9/6/1 en rapport avec la distribution naturelle des isotopes ³⁵Cl et ³⁷Cl.

Le pic principal à 407 (ou son correspondant à 424, soit 17 ou NH₃, en plus) possède deux unités de masse de moins que la masse M + H⁺ de 409 de l'élément de structure proposé par l'étude en R.M.N.¹H (voir figure 2.6, p. 36). Une déshydratation des métabolites **13** et **14** lors du passage dans le spectromètre de masse peut être supposée ; ceci revient, en effet, à proposer un oxygène supplémentaire à cet élément de structure, oxygène attendu de par l'origine des métabolites. L'oxygène peut participer à un cycle à 6 (figure 2.7A) ou être sous forme de sulfoxyde (figure 2.7B).

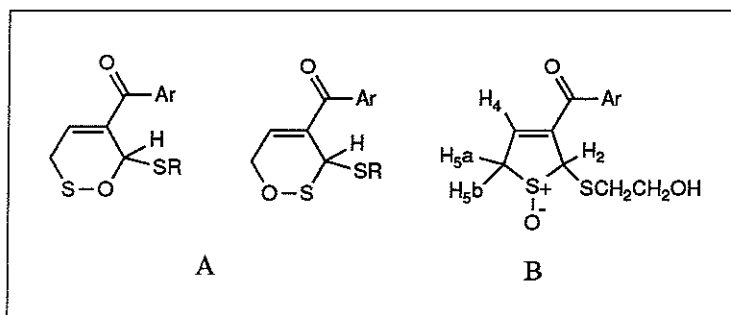


Figure 2.7 Propositions de structure pour les métabolites **13** et **14**.

Seule la structure B avec un sulfoxyde chiral est compatible avec la présence de deux diastéréoisomères **13** et **14**. La grande constante de couplage géminale de 18 Hz des protons H₅ est en accord avec la présence en α d'un groupement fortement électro-attracteur. Cet effet électro-attracteur du groupe sulfoxyde et la stabilisation due à la délocalisation d'un anion en C5 (figure 2.8) expliquent également l'acidité des protons H₅. L'absorption intense à 345 nm, qui apparaît lorsque les métabolites **13** et **14** sont à pH supérieur à 8, est compatible avec un tel anion.

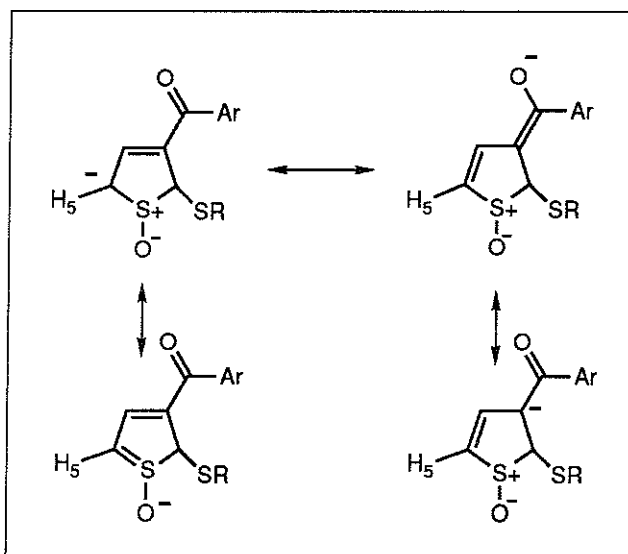


Figure 2.8 Délocalisation d'un anion en C5.

Etude par R.M.N.¹H en milieu basique - L'étude par R.M.N.¹H d'une solution dans D₂O des métabolites **13** et **14**, après addition de NaOD (jusqu'au virage de la couleur de la solution par apparition de la bande d'absorption intense à 345 nm), met en évidence un nouveau produit **19** majoritaire et le métabolite **14** minoritaire (des produits minoritaires de dégradation sont aussi visibles) ; après neutralisation par DCl, seul le métabolite dideutéié **18** est retrouvé (figure 2.5). Les deux signaux singulets identifiés sur le spectre de **19** à 6,82 p.p.m. (H₄, vinylique) et 5,15 p.p.m. (H₂) sont en accord avec l'anion proposé sur la figure 2.8. Le carbone 5 porte un deutérium que l'on retrouve sur le métabolite dideutéié **18** après retour à pH neutre (figure 2.9).

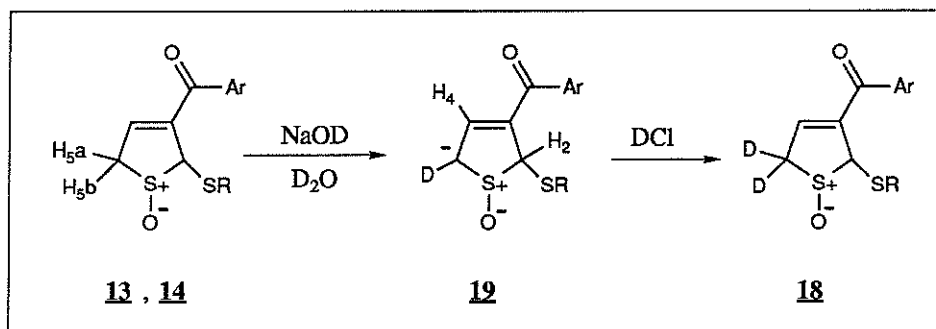
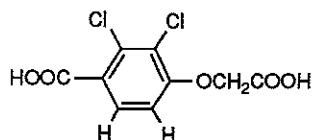


Figure 2.9 Hypothèse de deutériation des métabolites **13** et **14** en **18** via un intermédiaire anionique monodeutérlé **19**.

Spectre d'absorption infrarouge - L'étude du spectre infrarouge du mélange des métabolites primaires **13** et **14** montre une bande large d'absorption intense à 1055 cm^{-1} compatible avec une vibration S-O. Toutefois le spectre infrarouge du TAI présente également une bande d'absorption, certes plus fine, dans cette région à 1061 cm^{-1} (figure 2.10). Le diacide **20** :



20

possède aussi cette bande d'absorption, qui donc proviendrait de la partie phénoxy-acétique de cette famille des métabolites du TAI, avec vraisemblablement superposition à une bande due à la liaison S-O (1030 cm^{-1} ?) dans le cas des métabolites **13** et **14**.

Etudes complémentaires sur la structure proposée - Au terme de ce travail préliminaire, il apparaît clair que seule une structure comportant un groupe sulfoxyde répond aux données observées. Toutefois, nous avons fait une hypothèse sur une éventuelle perte d'une molécule d'eau lors du passage dans le spectromètre de masse ; afin d'observer une masse exacte, le produit de la méthylation par le diazométhane des métabolites **13** et **14** a été étudié. Cette étude s'est révélée plus complexe que prévue et est présentée en annexe (paragraphe 7.1, p. 155). La transformation des métabolites **13** et **14** en milieu acide est une réaction qui conduit à un produit stable et unique **17** avec perte de la chiralité. Nous avons caractérisé ce métabolite de transformation. Au cours d'expériences de deutériation sélective, nous avons par ailleurs vérifié l'attribution des signaux R.M.N. des protons H₅ par corrélation avec le proton H₅ du TAI et le proton H₅ du métabolite **17** (voir paragraphe 2.4, p. 59).

2.2.2. Etude du métabolite **17**.

Préparation - Le traitement par un excès d'HCl 2N des métabolites **13** et **14** en solution aqueuse conduit au métabolite **17** (partie expérimentale 6.1.10, p. 140) qui est méthylié par le diazométhane en métabolite **21** (temps de rétention de 8,4 min. par analyse H.P.L.C. en condition isocratique 100% de solvant B).

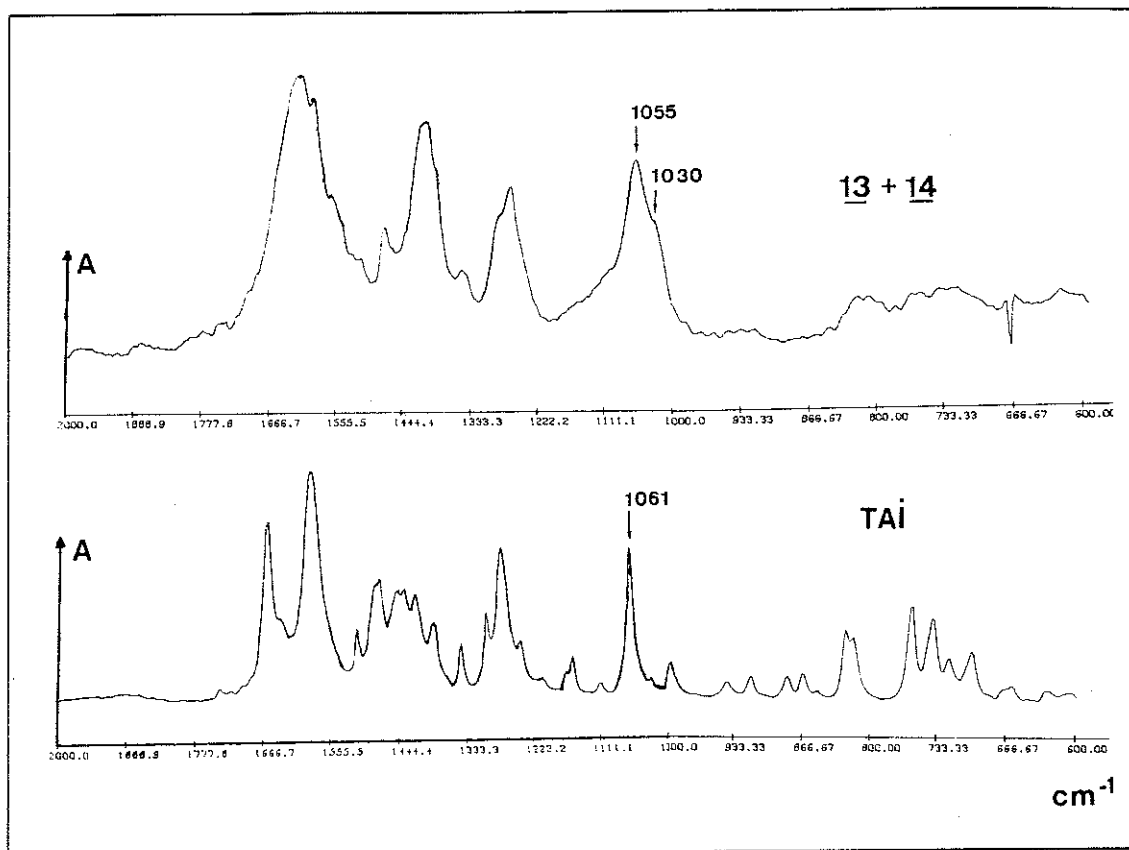


Figure 2.10 Spectres d'absorption infrarouge des métabolites **13** et **14** (en haut) et du TAI (en bas) (en pastille de KBr, sels d'ammonium, même spectre dans le lubroil pour **13** et **14**).

Spectre U.V. - visible du métabolite 17 - Le spectre d'absorption U.V. de sa solution aqueuse tamponnée à pH 7,4 montre 3 maxima à 240, 277 et 358 nm ($\epsilon_{240, 277}$ et $358 = 20800, 15700$ et $8200 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, figure 2.12). Le spectre d'absorption de la forme méthylée lui est superposable.

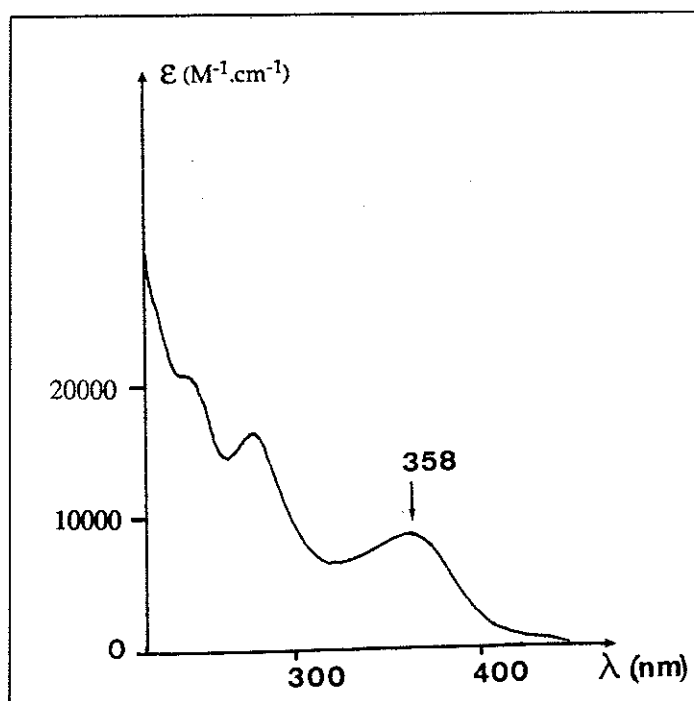
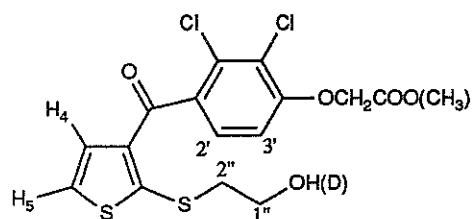


Figure 2.11 Spectre d'absorption U.V. du métabolite **17** en solution aqueuse tamponnée à pH 7,4.

Tableau 2.5 Caractéristiques R.M.N.¹H du métabolite **17** et de **21**.

	H ₂ '	H ₃ '	OCH ₂	H ₂ ''	H ₁ ''	H ₄	H ₅	CH ₃
17 D ₂ O	7,37 d : 8,8	6,97 d : 8,8	4,66 s, 2H	3,33 t : 6	3,93 t : 6	7,12 d : 5,8	7,30 d : 5,8	
17 DMSO	7,38 d : 8,0	7,12 d : 8,0	4,90 s, 2H	3,16 t : 6	3,73 t : 6	6,91 d : 5	7,39 d : 5	
21 CD ₂ Cl ₂	7,27 d : 9,0	6,83 d : 9,0	4,79 s, 2H	3,25 t : 6	3,93 q* : 6	6,97 d : 5,5	7,13 d 5,5	3,81 s, 3H

**17, 21**

δ en p.p.m./ Si(CH₃)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, t = triplet.

* quadruplet large par couplage avec le proton de l'alcool.

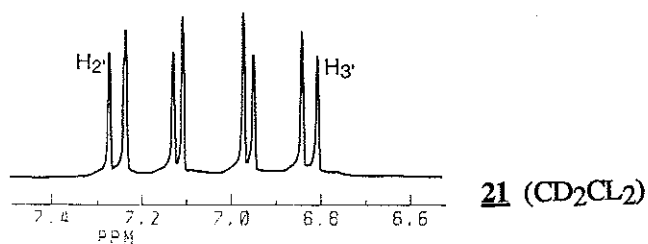
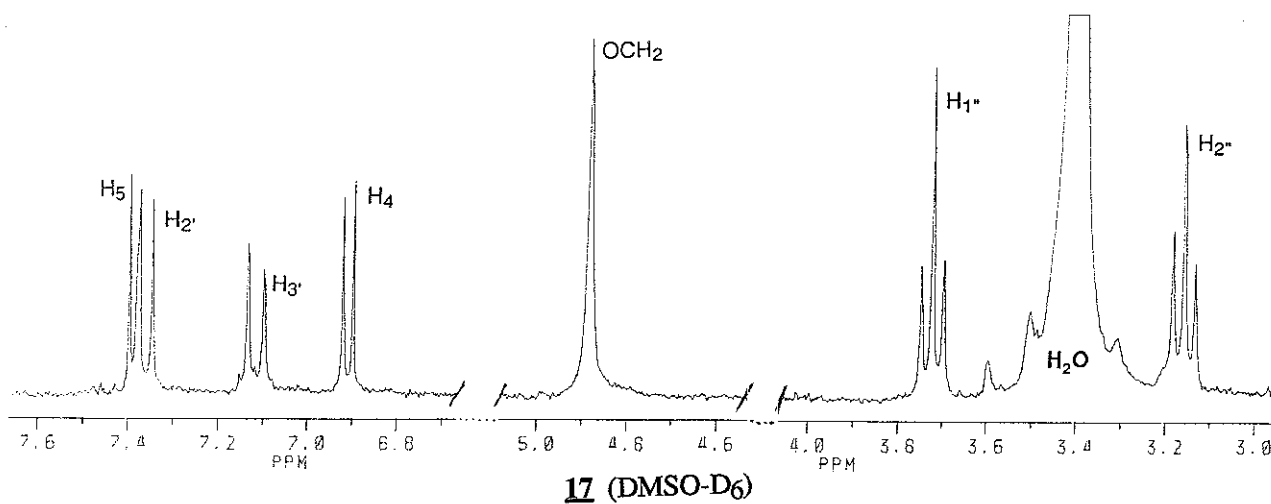


Figure 2.12 Spectre R.M.N.¹H du métabolite **17** dans le DMSO-D₆ (sel d'ammonium) et spectre du métabolite **21** dans CD₂Cl₂ (signaux des protons aromatiques).

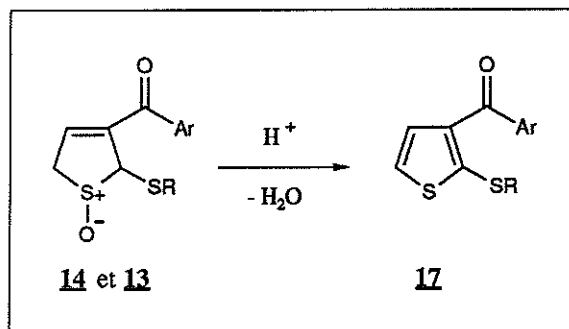
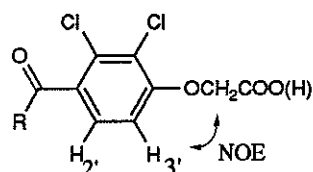


Figure 2.13 Déshydratation des métabolites 13 et 14 en métabolite 17 avec perte de chiralité.

Etude par R.M.N.¹H - Cette étude a été conduite dans différentes conditions de solvant présentées dans le tableau 2.5. Le spectre est simple avec les protons du résidu 4-céto-2-3-dichlorophénoxyacétique et ceux d'un résidu mercaptoéthanol facilement identifiés. Il reste deux protons à bas champ couplés par une constante de 5 à 6 Hz (figure 2.12 et tableau 2.5). Un effet Nucléaire Overhauser (NOE) intense entre le OCH₂ et le proton H₃' a été observé sur ce métabolite :



Déjà constaté dans le cas du TAI, cet effet a permis l'attribution du proton H₃' : le proton H₂' est toujours le plus déblindé et ne donne pas de NOE avec les protons OCH₂. Cette différence de déplacement chimique a été à la base de l'attribution de ces deux protons dans les métabolites 13 et 14.

Les propriétés de ce métabolite peu polaire, stable, à forte absorption dans l'ultraviolet, aux protons dérivant de la partie thiophénique du TAI très déblindés, évoquent une structure aromatique. Les deux protons à 7,12 et 7,30 p.p.m. ont la constante de couplage de 5,8 Hz attendue pour 2 protons thiophéniques en position 4 et 5 (Cagniant et al, 1985). La structure proposée, obtenue par simple introduction d'un groupe mercaptoéthanol en position 2 du TAI, provient d'une déshydratation des deux sulfoxydes 13 et 14 (figure 2.13). L'étude en R.M.N.¹H du métabolite 21, obtenu par traitement au diazométhane du métabolite 17, confirme la structure proposée avec une seule méthylation sur la fonction carboxyle visible sous l'aspect d'un singulet à 3,81 p.p.m. intégrant pour 3 protons (tableau 2.5).

Spectres de masse des métabolites 17 et 21 - Leurs résultats sont détaillés ci-dessous (tableau 2.6). De même qu'avec les métabolites 13 et 14, seule l'ionisation chimique (NH₃) fournit des fragments de haut poids moléculaire. Le pic de masse principal observé à 407 est en accord avec la masse proposée de 406 (M + H⁺ = 407). Le dérivé 21, obtenu après traitement au diazométhane, a un pic de masse M + H⁺ de 421 indiquant une monométhylation.

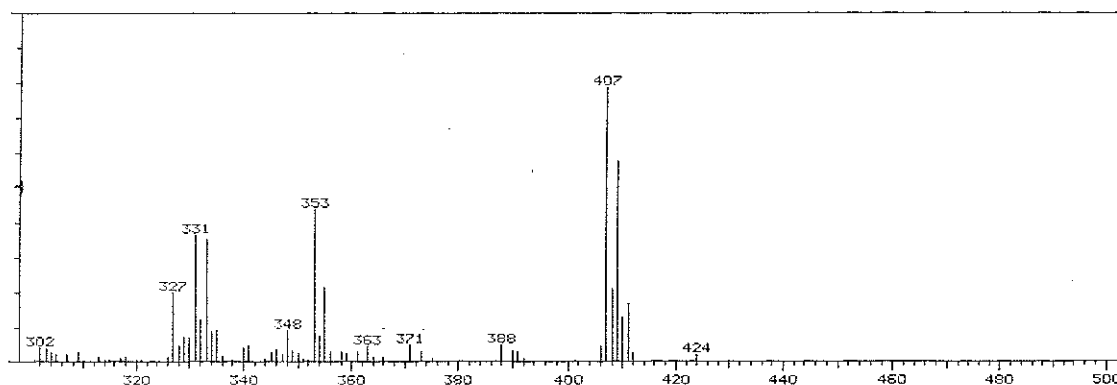
Tableau 2.6 Spectres de masse des métabolites 17 et 21 en ionisation chimique (NH₃) et présentation du spectre du métabolite 17.

Métabolite 17

m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 406
111	80%	thénylium
161	100%	S-mercaptoéthanol-thiophène + H ⁺
331	40%, Cl ₂ [*]	TAI + H ⁺
348	5%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺
353	45%	M - HCl - H ₂ O + H ⁺
371	3%	M - HCl + H ⁺
388	3%	M - HCl + NH ₄ ⁺
407	80%, Cl ₂	M + H ⁺
424	3%, Cl ₂	M + NH ₄ ⁺

Métabolite 21

m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 420
367	60%	M - HCl - H ₂ O + H ⁺
385	15%	M - HCl + H ⁺
421	100%, Cl ₂	M + H ⁺
438	1%	M + NH ₄ ⁺



* Cl₂ indique un triplet isotopique correspondant à la présence des deux chlores.

Les résultats de l'étude R.M.N.¹H, de la masse et de l'U.V. recueillis pour le métabolite 17 indiquent une structure de thiophène substitué en 2 par un résidu mercaptoéthanol. La similitude de son spectre de masse avec celui des métabolites 13 et 14 montre qu'il y a bien eu perte d'une molécule d'eau dans le spectromètre et confirme la structure de sulfoxyde de dihydrothiophène pour 13 et 14 qui, par déshydratation, conduit à la structure aromatique de 17 (voir tableaux 2.3 et 2.6).

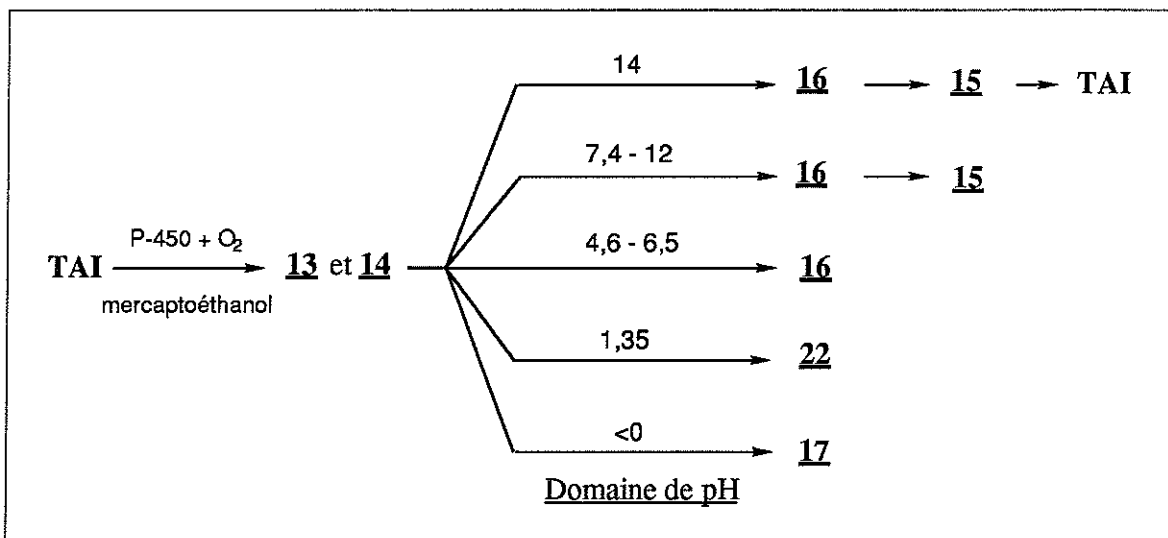


Figure 2.14 Evolutions de **13** et de **14** en fonction du pH en présence de mercaptoéthanol.

2.3. Détermination de la structure des métabolites **15** et **16**.

2.3.1. Réactivité des sulfoxydes **13** et **14** avec le mercaptoéthanol.

Une solution des métabolites **13** et **14** fraîchement purifiés par H.P.L.C. est mise en présence de mercaptoéthanol dans différentes conditions à 37°C. Le produit de la réaction est étudié par H.P.L.C. (méthode B).

Entre pH 2,0 et 6,5, transformation en métabolite **16** - Dans ce domaine de pH, ces deux métabolites se transforment quantitativement en métabolite **16**. Cette réaction est d'autant plus rapide que le pH est élevé et la concentration en mercaptoéthanol importante. Par exemple en présence de mercaptoéthanol 5 mM, plus de 95% des sulfoxydes ont réagi en 20 minutes à pH 4,6 (tampon acétate de sodium 100 mM), cette proportion tombe à 10% avec 0,5 mM mais remonte à 95% si le pH est alors amené à 6,5.

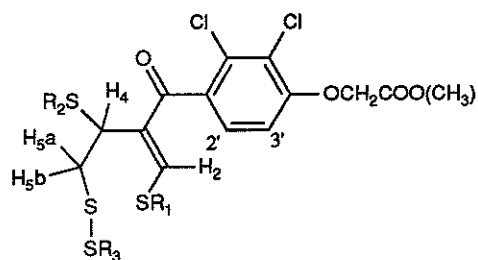
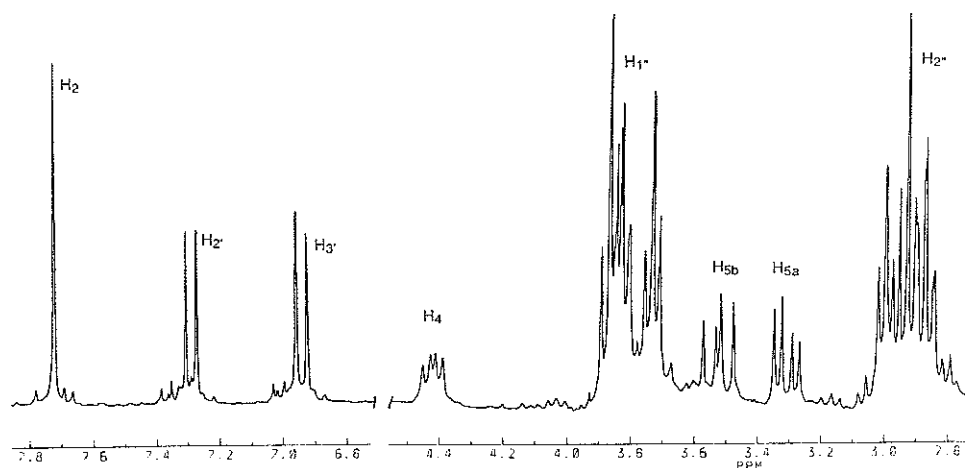
A pH 7,4 et plus, transformation en métabolite **16** puis **15** - Au dessus de la neutralité, la formation du métabolite **16** s'accompagne de celle du métabolite **15** ; par exemple, toujours avec 0,5 mM de mercaptoéthanol, les sulfoxydes se transforment en 20 min. à pH 7,4 (tampon phosphate de sodium 100 mM) en 90% de métabolite **16** et 10% de **15**. A pH 12 en présence de mercaptoéthanol 5 mM, seul le métabolite **15** est obtenu ; la réaction se termine en 3 min. Le métabolite **16** se transforme en **15** en présence de mercaptoéthanol, ce qui montre le caractère séquentiel de la transformation de **13** (ou **14**) en **16** puis en **15**. Des concentrations élevées de mercaptoéthanol (jusqu'à 0,5 M) sont sans effet sur ce dernier métabolite qui en font le métabolite final de la transformation. Au delà de pH 12 (NaOH), le métabolite **15** redonne le TAI.

A pH 1,35 (HCl 0,05N), transformation en métabolite **22** - Autour de pH 1,35 ([HCl] = 0,05 M), il existe une fenêtre de pH où, en présence de fortes concentrations de mercaptoéthanol, les deux sulfoxydes se transforment majoritairement en un nouveau métabolite **22**. Ainsi à ce pH, en présence du thiol 10 mM, 80% des sulfoxydes ont réagi en 45 min. pour donner 10% de métabolite **16**, 70% de **22** et moins de 2% d'aromatique **17**. Cette réaction nécessite la présence de mercaptoéthanol comme le prouve

Tableau 2.7 Caractéristiques R.M.N. ^1H du métabolites **16** et **23**.

	H _{2'}	H _{3'}	OCH ₂	H ₂	H ₄	H _{5a}	H _{5b}	CH ₃
16 D ₂ O	7,45 d : 8,8	6,96 d : 8,8	4,66 s, 2H	7,73 s	4,42 dd : 6 10	3,31 dd : 10 -14	3,53 dd : 6 -14	
23 CD ₂ Cl ₂	7,17 d : 9	6,80 d : 9	4,77 s, 2H	7,29 s	4,39 dd : 10 6	3,27 dd : 6 14	3,55 dd : 10 14	3,80 s, 3H

	mercaptoéthanol 1	mercaptoéthanol 2	mercaptoéthanol 3	OH
16 D ₂ O	3,00 t : 6, 2H 3,73 t : 6, 2H	2,87 et 2,88 * 3,82 et 3,83	2,94 t : 6, 2H 3,87 t : 6, 2H	
23 CD ₂ Cl ₂	2,84 t : 6, 2H 3,85 **	2,9 ** 3,85 **	2,9 ** 3,85 **	2,16 1H 2,32 2H

**16** et **23** (R = C(H₂)₂C(H₁)₂OH)**16** (D₂O)

δ en p.p.m./Si(CH₃)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet.

* étudiés à 400 MHz,

** 6 protons H₁' en massif à 3,85 p.p.m. et 4 protons H₂' en massif à 2,90 p.p.m.

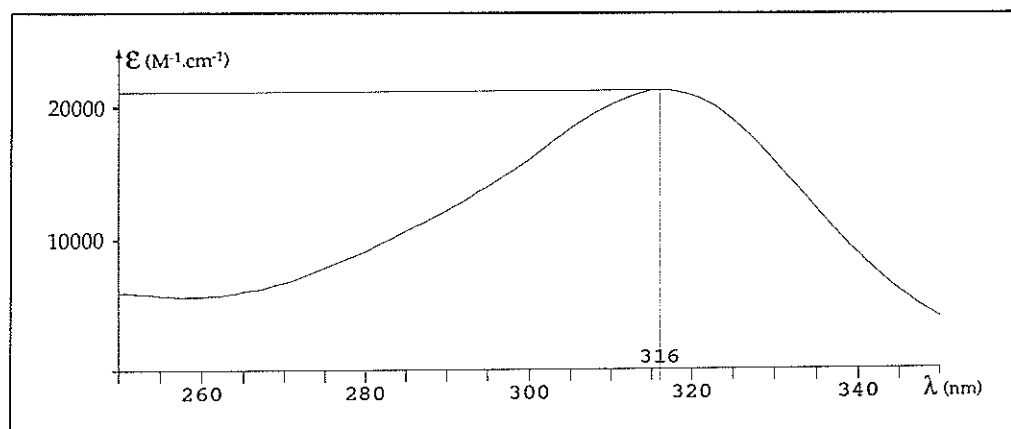


Figure 2.15 Spectre d'absorption U.V. du métabolite **16**.

une réaction témoin sans thiol où seulement un peu de **17** apparaît. Si la concentration de l'HCl est augmentée (supérieure à 1 M), la transformation en **17** devient majoritaire (>90% en présence de 10 mM de mercaptoéthanol et HCl 1N).

2.3.2. Etude du métabolite **16**.

Préparation, description - Des incubations conduites en présence de 1 à 10 mM de mercaptoéthanol à pH 7,4 fournissent après purification par H.P.L.C. selon le gradient A une fraction au temps de rétention de 18 min. qui, rechromatographiée en condition isocratique (40% de solvant B), se sépare en deux pics homogènes, le métabolite **15** au temps de rétention de 9,4 min. et le métabolite **16** à 12 min., dans des proportions qui dépendent de la concentration du mercaptoéthanol et du temps d'incubation (voir figure 2.3, p. 32). Après lyophilisation, le métabolite **16** se présente sous la forme d'une poudre blanche. Sa solution aqueuse est stable et possède un maximum d'absorption U.V. à 317 nm ($\epsilon = 20800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, figure 2.15). Ce métabolite est également stable en milieu acide (HCl 0,1N, 15 min. à 37°C) et en milieu basique jusqu'à pH 12 (NaOH) au delà duquel il se transforme en TAI. Après traitement au diazométhane, on obtient le dérivé méthylé **23**, de spectre d'absorption U.V. semblable ($\lambda_{\text{max}} = 314 \text{ nm}$) et de temps de rétention 4,9 min. (H.P.L.C. isocratique 100% solvant B).

Etude par R.M.N. ^1H des métabolites **16** et **23** - Cette étude a été réalisée dans l'eau lourde pour le sel d'ammonium du métabolite **16** et dans le dichlorométhane deutérié pour le dérivé méthylé. A côté des signaux attendus pour les protons du groupe dichlorophénoxyacétique, le spectre présente des signaux correspondant à un proton vinylique très déblindé (singulet à 7,73 p.p.m.), à un système de trois protons couplés deux à deux (H_{5a} , H_{5b} et H_4) ainsi qu'à trois résidus mercaptoéthanol (six massifs prenant l'aspect de triplets intégrant chacun pour 2 protons et couplés deux à deux) (tableau 2.7). Les protons H_{5a} et H_{5b} sont géminaux avec une constante de couplage de 14 Hz négative comme l'indique l'intensité des pics de corrélation vus sur une expérience de COSY 45. Le métabolite **23** est monométhylé (singulet supplémentaire intégrant pour trois protons à 3,80 p.p.m.).

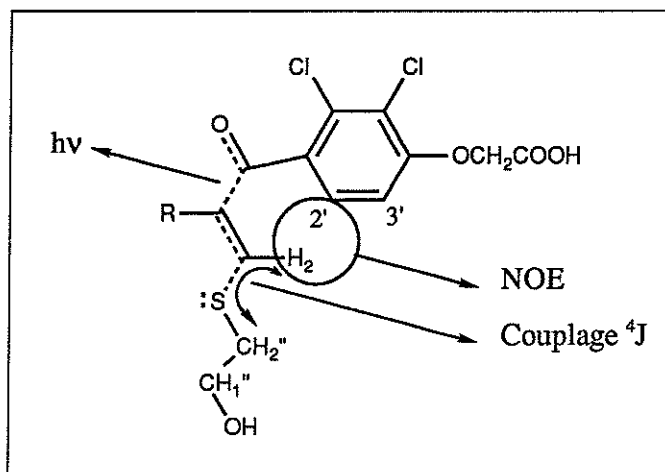


Figure 2.16 Structure partielle du métabolite **16**.

Le déplacement chimique à bas champ de H_2 est en accord avec une position sur une double liaison que l'on conjugue avec la cétone pour rendre compte de la forte absorption à 317 nm. L'existence d'un NOE intense entre les protons H_2 et H_2' et d'un couplage longue distance entre H_2 et H_2'' du mercaptoéthanol-1 (expérience de Cosy Long Range) positionne H_2 en *cis* du groupe COAr (figure 2.16). La chaîne carbonée restante porte donc 3 protons, deux groupes mercaptoéthanol et un soufre. Le couplage à longue distance entre les protons H_2'' du mercaptoéthanol-1 et H_2 rend peu probable la présence d'un pont dithioéther sur C2 qui en ferait un couplage en 5J ; nous le positionnons donc en C5 pour respecter la position du soufre dans le TAI (figure 2.17). Il ne semble pas possible aux vues des données disponibles de positionner le troisième mercaptoéthanol en C4 ou en C5 ; ce problème a été résolu par des expériences de deutériation sélective (voir paragraphe 2.4, p. 59).

Spectres de masse des métabolite **16** et **23** -

Les spectres de masse en ionisation chimique (NH_3) du métabolite **16** et de son équivalent méthylé **23** sont présentés dans le tableau 2.8. Le pic de masse la plus élevée observé pour **16** est de 563, soit 562, masse de la structure proposée, plus H^+ ; le dérivé **23** est monométhylé avec un pic à 577, soit $562 + H^+ + CH_2$.

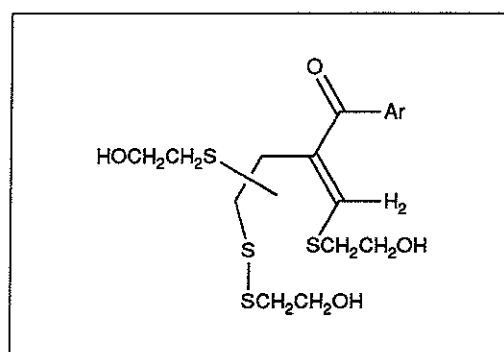


Figure 2.17 Structure du métabolite **16**.

Réduction du métabolite 16 - La présence d'un pont dithioéther impliquait une possibilité de sa réduction. Le mercaptoéthanol est évidemment le premier réducteur testé, en présence duquel le métabolite **16** se transforme quantitativement en métabolite final **15** (par exemple mercaptoéthanol 1 mM, 30 min. à 37°C à pH 7,4 en tampon phosphate de sodium 100 mM). Cette réaction est reproduite sans apparition de produits secondaires en présence de faibles concentrations de dithiotréitol (dithiotréitol 150 μM , 80% de transformation en métabolite **15** en 60 min. à 37°C à pH

Tableau 2.8 Spectres de masse des métabolites 16 et 23 (en ionisation chimique (NH₃)).

Métabolite <u>16</u>		
m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 562
172	100%	
331	80%, Cl ₂ *	TAI + H ⁺
348	40%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺
377	5%, Cl ₂	
391	12%, Cl ₂	TAI + H ⁺ + 1 mercaptoét. - H ₂ O
408	10%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺ + 1 mercaptoét. - H ₂ O
424	1%, Cl ₂	M + NH ₄ ⁺ - 2 mercaptoéthanol
451	1,5%, Cl ₂	TAI + H ⁺ + 2 mercaptoét. - 2 H ₂ O
467	2%, Cl ₂	M + H ⁺ - H ₂ O - 1 mercaptoéthanol
485	5%, Cl ₂	M + H ⁺ - 1 mercaptoéthanol
502	1%, Cl ₂	M + NH ₄ ⁺ - 1 mercaptoéthanol
545	0,5%, Cl ₂	M + H ⁺ - H ₂ O
563	1%, Cl ₂	M + H ⁺

Métabolite <u>23</u>		
m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 576
345	100%, Cl ₂	TAI + H ⁺
362	50%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺
391	90%	
423	10%, Cl ₂	
499	30%, Cl ₂	M + H ⁺ - 1 mercaptoéthanol
577	5%, Cl ₂	M + H ⁺

* Cl₂ indique un triplet isotopique correspondant à la présence des deux chlores.

7,4). Le chlorure stanneux a été essayé avec succès ; ainsi, en 45 min. à 70°C et SnCl₂ 1 mM en solution aqueuse, le métabolite 16 se transforme quantitativement en métabolite 15 (sans transformation en l'absence du sel d'étain). Nous concluons que la transformation du métabolite 16 en métabolite final 15 obéit à un mécanisme de réduction.

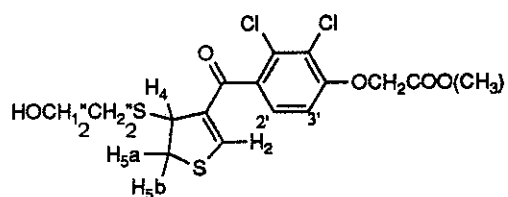
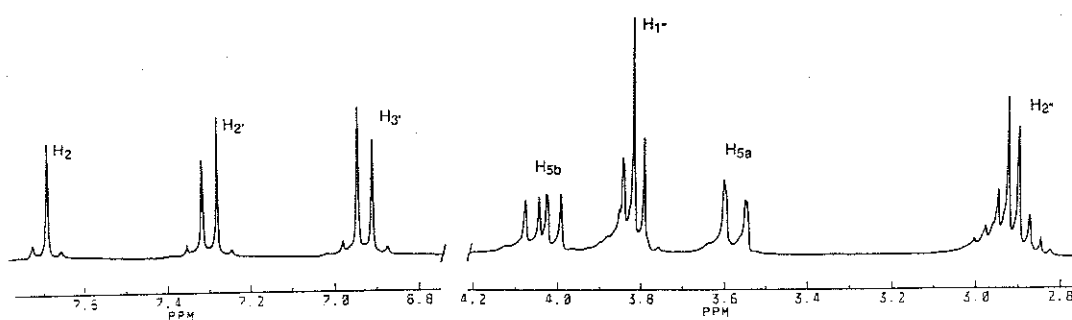
2.3.3. Etude du métabolite 15.

Préparation, description - Sa préparation est aisée notamment en traitant le milieu réactionnel en fin d'incubation par un excès de mercaptoéthanol. Plusieurs milligrammes de ce métabolite final ont pu être préparés avec un rendement supérieur à 90% par rapport au TAI initial. Sa solution aqueuse est jaune avec un maximum d'absorption U.V. à 334 nm ($\epsilon_{334} = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, à pH 7,4, figure 2.18), elle est stable en milieu acide ou basique de pH inférieur à 12, pH au dessus duquel le métabolite 15 redonne le TAI ; cette transformation en TAI se produit également sur plusieurs mois lorsque 15 est conservé en solution. Il est insensible aux fortes concentrations de mercaptoéthanol (au moins 0,5 M, 60 min. à 37°C et pH 7,4). Sa forme méthylée 24 est obtenue après traitement au diazométhane et est purifiée par H.P.L.C. au temps de rétention de 6,5 min. (conditions isocratiques 100% de solvant B) ; son spectre d'absorption U.V. est semblable ($\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$).

Tableau 2.9 Caractéristiques R.M.N¹H. des métabolites **15** et **24**.

	OCH ₂	H ₂	H ₄	H _{5a}	H _{5b}
15 D ₂ O	4,65 s, 2H	7,71 s, 1H	4,80 * dd : 8,5 1,5	3,58 dd : 1,5 13	4,03 dd : 8,5 13
24 CD ₂ Cl ₂	4,78 s, 2H	7,14 s, 1H	4,81 dd : 8 1,5	3,50 dd : 12 1,5	3,98 dd : 12 8

	H ₂ '	H ₃ '	H ₁ ''	H ₂ ''	CH ₃
15 D ₂ O	7,29 d : 8,5	6,96 d : 8,5	3,82 t : 6, 2H	2,91 m **: 6, 2H	
24 CD ₂ Cl ₂	7,20 d : 9	6,80 d : 9	3,83 m **: 6, 2H	2,85 m **: 6, 2H	3,80 s, 3H

**15. 24****15 (D₂O)**

δ en p.p.m./Si(CH₃)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, t = triplet.

* vu par les techniques d'effacement du pic de l'eau,

** aspect de multiplet où l'on ne voit que le couplage ³J de 6 Hz à cause des déplacements chimiques presque isochrones des deux protons géminaux H_{5a} et H_{5b}.

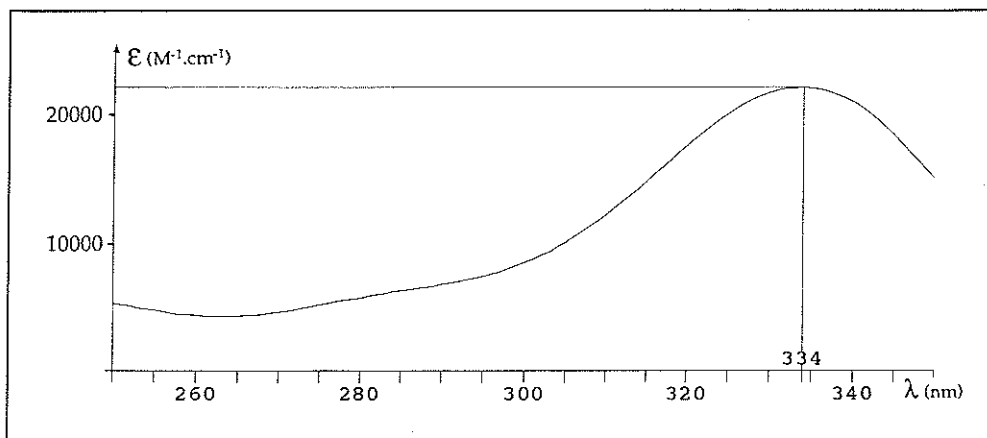


Figure 2.18 Spectre d'absorption U.V. du métabolite **15**.

Etude par R.M.N. ^1H des métabolites **15** et **24** - Cette étude a été effectuée dans l'eau lourde pour le sel d'ammonium du métabolite **15** et le dichlorométhane deutérié pour la forme méthylée (tableau 2.9). Les signaux correspondant à un groupe dichlorophénoxyacétique, un mercaptoéthanol, un proton vinylique H_2 et trois protons couplés deux à deux sont visibles sur le spectre. Le carbone portant le proton vinylique H_2 et la double liaison est attribué à C2, seule position où H_2 soit singulet. Confirmant cette hypothèse, un NOE intense est trouvé entre ce proton vinylique H_2 et le proton aromatique H_2 . La double liaison est donc conjuguée avec la cétone et les doublets libres du soufre, en accord avec l'absorption U.V. intense aux longueurs d'ondes élevées déjà observée avec le métabolite **16**. Il ne reste que quatre positions vacantes sur la chaîne carbonée ; on ferme le cycle mais il n'est pas possible d'attribuer la position du résidu mercaptoéthanol sur C4 ou sur C5. Le spectre du dérivé méthylé **24** est semblable avec un seul groupement méthyle visible sous l'aspect d'un singulet intégrant pour 3 protons à 3,80 p.p.m. La structure proposée, un dihydrothiophène, obtenue par réduction du pont dithioéther du métabolite **16**, doit logiquement redonner le TAI après une élimination du mercaptoéthanol catalysée par une base forte comme OH^- (figure 2.19).

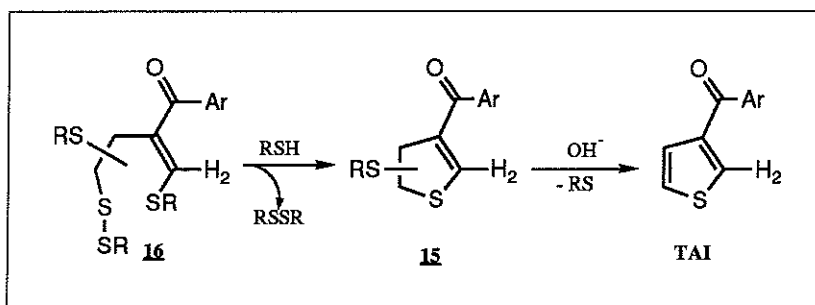


Figure 2.19 Proposition de structure du métabolite **15** formé par réduction du métabolite **16** et conduisant au TAI en milieu basique.

Etude par R.M.N. ^{13}C du métabolite **15** - Sept milligrammes de ce métabolite ont pu être préparés et une étude comparée avec le TAI en R.M.N. ^{13}C réalisée (voir Tables ^{13}C dans le tableau 2.13 p. 64). Quinze carbones sont identifiés sur le spectre, la multiplicité des hydrogènes portés par chacun est déduite d'une expérience de DEPT

(Pegg et al, 1982). L'attribution des carbones portés par le noyau aromatique repose sur les couplages 3J ^{13}C - 1H observés par des expériences d'INEPT sélectifs (Bax, 1983) à partir des protons H_2 , H_3 et OCH_2 . La comparaison, entre le métabolite **15** et le TAI, des déplacements chimiques et des couplages sur les spectres 1H et des déplacements chimiques et de la multiplicité sur les spectres ^{13}C ne montre que des différences situées sur le noyau thiophène. Le métabolite **15** présente, au niveau de sa partie issue du noyau thiophène du TAI, un carbone, C4 ou C5, de type CH_2 , un carbone, C4 ou C5, de type CH , un carbone C3 quaternaire, un carbone C2 de type CH et une structure cyclique affirmée sur les couplages 3J ^{13}C - 1H observés entre le proton H_2 et les carbones C4 et C5 (et inversement entre les protons H_5 et H_4 et le carbone C2). Deux carbones supplémentaires à haut-champ (35,10 et 63,32 p.p.m.) sont en accord avec la présence d'un groupe mercaptoéthanol. Ces observations confirment la structure proposée pour **15** d'un 4,5-dihydrothiophène substitué par un résidu mercaptoéthanol (en C4 ou en C5).

Dans le but d'attribuer les signaux à 3,58, 4,03 et 4,80 p.p.m. aux protons H_4 et H_5 , nous avons recherché des couplages 3J ^{13}C - 1H avec le carbone du carbonyle. Seul le proton H_5 est couplé, mais avec un signal trop faible pour permettre une attribution définitive. Dans le paragraphe 2.4.2 (p. 61), ce positionnement sera réalisé au moyen d'une expérience de deutériation sélective.

Spectres de masse des métabolites **15** et **24** - Les spectres de masse en ionisation chimique (NH_3) du métabolite **15** et de son produit de méthylation **24** sont présentés dans le tableau 2.10. La masse la plus élevée observée pour **15** est de 409, soit 408, masse de la structure proposée, plus H^+ ; le dérivé **24** est monométhylé avec un pic à 423, soit $408 + H^+ + CH_2$.

Tableau 2.10 Spectres de masse des métabolites **15 et **24****
(en ionisation chimique (NH_3)).

Métabolite 15		
m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 408
172	100%	
331	50%, Cl_2^*	TAI + H^+
348	60%, Cl_2	TAI + NH_4^+
391	2%, Cl_2	M + $H^+ - H_2O$
409	10%, Cl_2	M + H^+
426	4%, Cl_2	M + NH_4^+
Métabolite 24		
m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 422
345	100%, Cl_2	TAI + H^+
362	60%, Cl_2	TAI + NH_4^+
423	30%, Cl_2	M + H^+
440	3%, Cl_2	M + NH_4^+

* Cl_2 indique un triplet isotopique correspondant à la présence des deux chlores.

2.3.4. Etude du métabolite **22**.

Préparation, description - le métabolite **22** est préparé par incubation des sulfoxydes **13** et **14** à 37°C pendant 45 min. dans un mélange H₂O/HCl 0,1N v/v (pH 1,35) en présence de mercaptoéthanol 10 mM. Par H.P.L.C., on sépare le métabolite **22** (70%) des métabolites **13** et **14** n'ayant pas réagi (20%) et du métabolite **16** (10%). Le métabolite **22** est contaminé par un peu de métabolite aromatique **17** qui sort au même temps de rétention de 18 min. (méthode de gradient A ou B). La solution aqueuse du métabolite **22** absorbe en U.V. avec un maximum à 315 nm ($\epsilon_{315} = 19000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, figure 2.20). Stable en milieu acide et à pH neutre, il se transforme en quelques minutes en TAI au delà de pH 8 (NaOH). Après traitement au diazométhane, on obtient le dérivé méthylé **25** (temps de rétention de 6,1 min. en conditions isocratiques 100% solvant B, spectre U.V. similaire de λ_{max} à 311 nm).

Etude par R.M.N.¹H des métabolites **22 et **25**** - Etude effectuée dans l'eau lourde pour le sel d'ammonium du métabolite **22** et le dichlorométhane deutérié pour la forme méthylée **25** (tableau 2.11). Les signaux correspondant à deux résidus mercaptoéthanol et au groupe phénoxyacétique sont visibles sur le spectre, de même que ceux d'un proton vinylique H₂ (singulet) et de 2 protons à bas champs (en doublets, J = 10 Hz), dont le moins déblindé H₄ est couplé, dans le dérivé méthylé, par une petite constante de 1,5 Hz avec le proton H₂ (tableau 2.11). Les déplacements chimiques des protons de la partie phénoxyacétique, de H₂ et du mercaptoéthanol-1 sont presque identiques à ceux du métabolite ouvert **16** (δH_2 à 7,73 et 7,70 p.p.m. (**16** et **22**), $\delta \text{H}_2''$ à 3,00 et 3,01 p.p.m. et $\delta \text{H}_1''$ à 3,73 et 3,73 respectivement ; les déplacements chimiques du groupe phénoxyacétique sont identiques et doivent correspondre à un même environnement autour du carbone C2 :

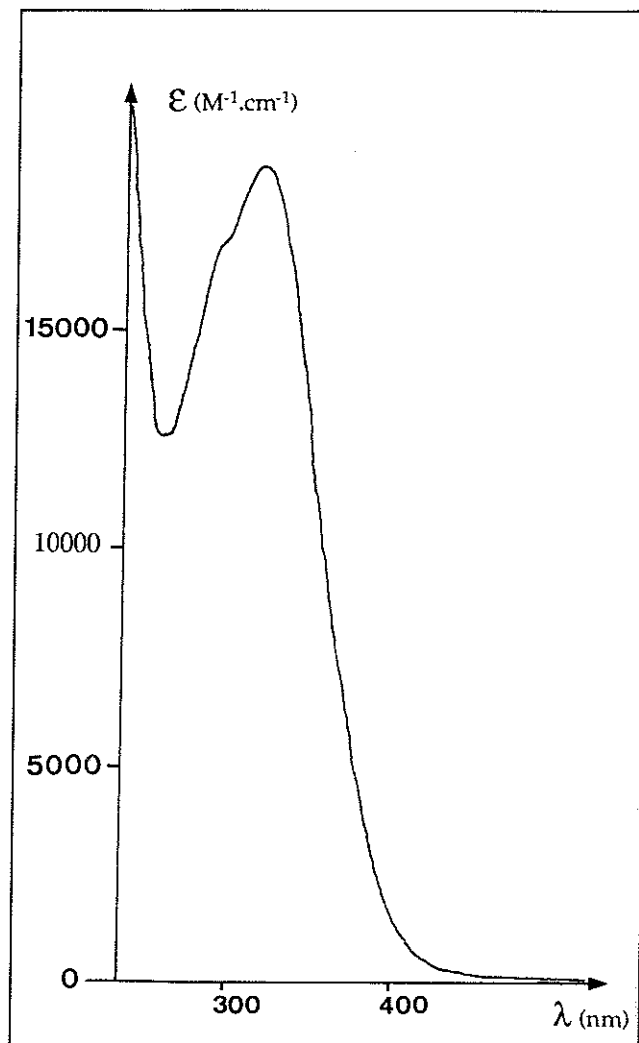
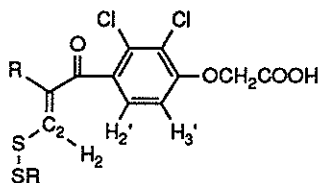
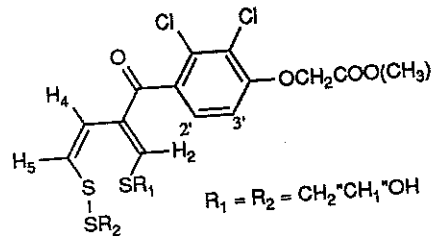
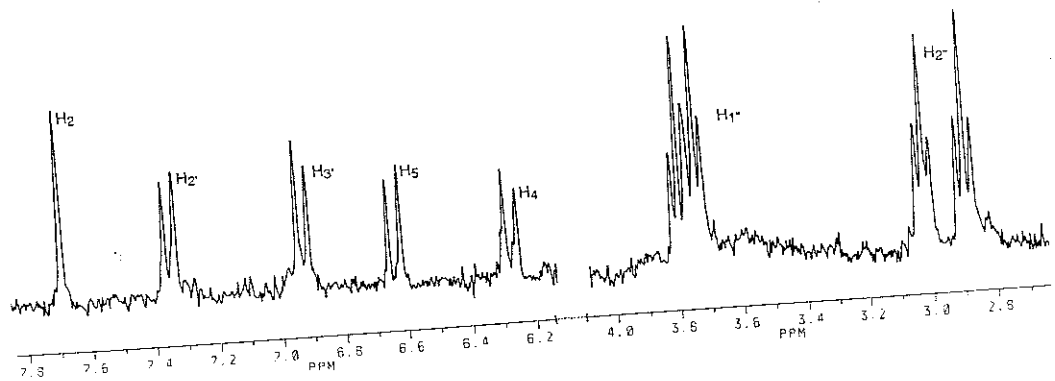


Figure 2.20 Spectre d'absorption U.V. du métabolite **22** en solution aqueuse.

Tableau 2.11 Caractéristiques R.M.N.¹H des métabolites **22** et **25**.

	OCH ₂	H ₂ '	H ₃ '	H ₂	H ₄	H ₅	mercaptoéthanoils		CH ₃
							1	2	
26 D ₂ O	4,65 s, 2H	7,34 d : 8,8	6,94 d : 8,8	7,70 s	6,29 d : 10	6,65 d : 10	3,01 t : 6 3,73 t : 6	2,89 t : 6 3,79 t : 6	
29 CD ₂ Cl ₂	4,79 s, 2H	7,22 d : 9	6,80 d : 9	7,31 s*	6,24 dd : 1,5 10	6,49 d : 10	3,80 massif	2,86 t : 6 2,96 t : 6	3,80 s, 3H

**22, 25****22** (D₂O)

δ en p.p.m./ Si(CH₃)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, t = triplet.
* singulet élargi où le couplage en W ⁴J avec H₂ est vu par la disparition de la constante de 1,5 Hz de H₂ après irradiation sélective de H₄.

Les déplacements chimiques à bas-champ de H₄ et H₅ obligent à considérer une double liaison entre C₄ et C₅ ; leur couplage vicinal de 10 Hz positionne ces deux protons en *cis* (Jackman et al, 1969). Comme dans le métabolite **16**, seul un pont dithioéther peut répondre au groupe mercaptoéthanol restant. Formellement deux structures sont compatibles avec les données de la R.M.N.¹H de **22** :

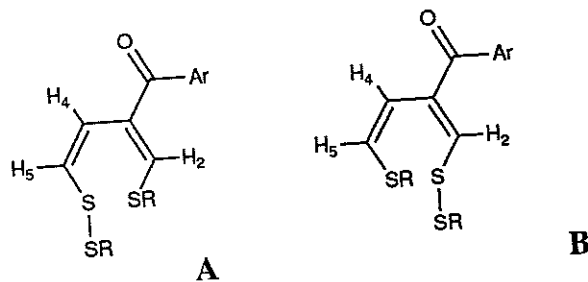


Tableau 2.12 Spectres de masse des métabolites 22 et 25
(en ionisation chimique (NH₃)).

Métabolite <u>26</u>		
m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 484
172	100%	
331	85%, Cl ₂ *	TAI + H ⁺
348	40%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺
391	10%, Cl ₂	TAI + H ⁺ + 1 mercaptoét. - H ₂ O
407	35%, Cl ₂	M + H ⁺ - 1 mercaptoét.
424	5%, Cl	M + NH ₄ ⁺ - 1 mercaptoét.
485	5%, Cl ₂	M + H ⁺
Métabolite <u>29</u>		
m/z	% pic de base	fragments proposés avec M = 498
345	100%, Cl ₂	TAI + H ⁺
362	5%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺
389	25%, Cl ₂	
421	10%, Cl ₂	M + H ⁺ - 1 mercaptoét.
499	20%, Cl ₂	M + H ⁺

* Cl₂ indique un triplet isotopique correspondant à la présence des deux chlores.

Par analogie avec le métabolite 16, le dithioéther se positionne en C5 et la structure A est probablement vraie. Mais cette attribution repose sur un simple couplage en ⁴J entre H₂ et H₂" observé dans le métabolite 16 ; dans la conclusion nous renforcerons ce positionnement à partir des mécanismes réactionnels probables de formation de ces métabolites.

Spectres de masse des métabolites 22 et 25 - Le spectre de masse en ionisation chimique (NH₃) du métabolite 22 et de son produit de méthylation 25 sont présentés dans le tableau 2.12. La masse la plus élevée observée pour 22 est de 485, soit 484, masse de la structure proposée, plus H⁺ ; le dérivé 24 est monométhylé avec un pic à 499, soit 484 + H⁺ + CH₂.

Réduction du métabolite 22 - Cette propriété est commune au métabolite 16, avec transformation quantitative en TAI de 22 en présence de mercaptoéthanol ou de faibles concentrations de dithiotréitol (en 15 min. à 37°C en présence de 100 µM de dithiotréitol). En présence de chlorure stanneux, la réaction est moins propre ; après une heure à 70°C, il y a transformation de 22 en TAI et en deux nouveaux métabolites, moins polaires, non étudiés.

2.4. Expériences de deutériation sélective.

L'évolution des métabolites de piégeage obtenus lors d'une incubation de TAI en présence de microsomes CLO, en fonction de la concentration initiale du mercaptoéthanol, montre une succession de plusieurs composés (figure 2.3, p. 32) qui commence par la formation de deux sulfoxydes de dihydrothiophène diastéréoisomères 13 et 14. Ceux-ci évoluent ensuite, sous l'action du mercaptoéthanol, en métabolite 16 par

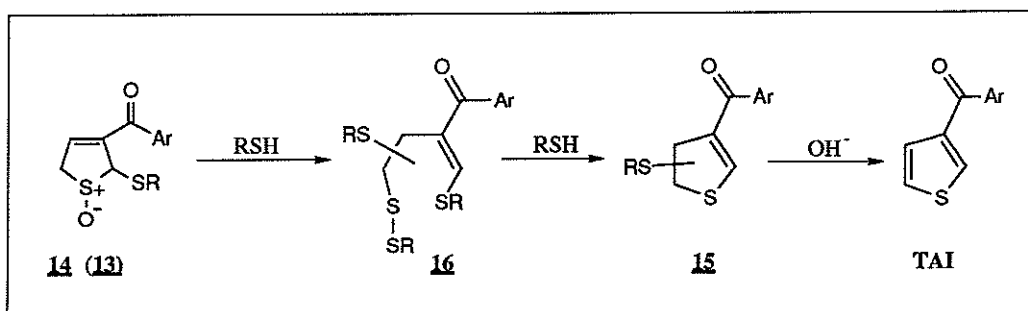


Figure 2.21 Récapitulatif des différentes structures des métabolites du TAI obtenus en présence de mercaptoéthanol au cours d'une incubation avec des microsomes CLO et retour au TAI en milieu basique.

ouverture du cycle avec perte d'une molécule d'eau et addition de deux résidus mercaptoéthanol supplémentaires puis secondairement en métabolite **15** après recyclisation au cours d'un processus de réduction (figure 2.21).

La position d'un groupe mercaptoéthanol en C4 ou en C5 pour les métabolites **16** et **15** reste indéterminée. Les métabolites **13** et **14** se deutérient facilement en position 5 et nous avons tenté de mettre à profit ce marquage du carbone 5 en conservant ces deutériums au cours de la transformation des métabolites **13** et **14** en **16**. Après transformation dans l'eau lourde (et non dans l'eau légère car il y aurait perte des deutériums), la nature des trois hydrogènes sur C4 et C5 devrait nous permettre de positionner ce mercaptoéthanol. Si le carbone C4 est la position d'addition du mercaptoéthanol, alors deux deutériums géminaux se retrouveront sur C5 (figure 2.22). Si nous supposons que les métabolites **13** et **14** sont en équilibre avec une forme ouverte de type acide sulfénique, une double liaison apparaît sur les carbones C4-C5 ; l'addition du thiol sur celle-ci dans le cas d'une addition sur C4 donnera aussi deux deutériums géminaux sur C5 tandis qu'en C5 ce sera deux deutériums vicinaux en C4 et C5 (figure 2.22).

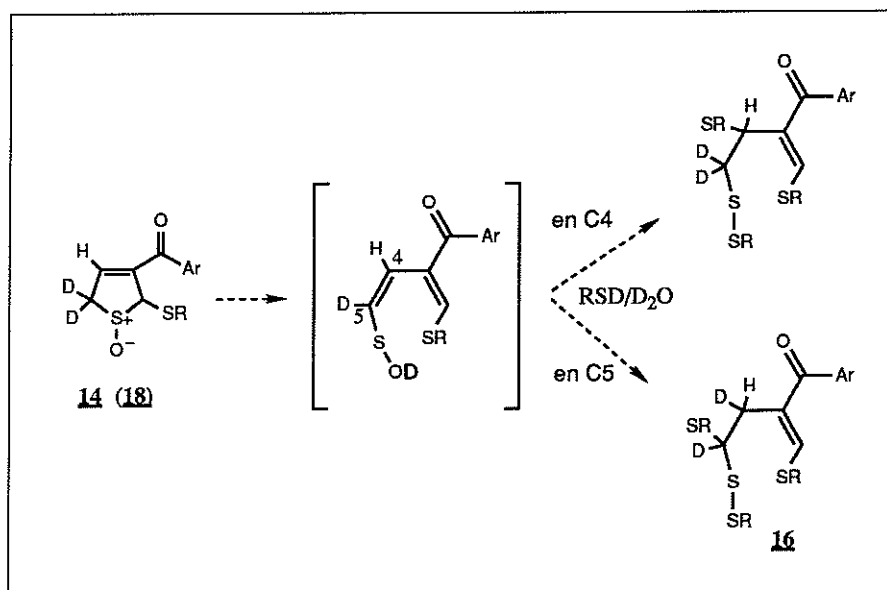


Figure 2.22 Principe de la détermination de la position du mercaptoéthanol en C4 ou C5 par une expérience de deutériation sélective.

Après avoir effectué cette première deutériation (paragraphe 2.4.1), nous avons fait évoluer le métabolite **16** deutérié en métabolite **15** deutérié puis en TAI deutérié (paragraphe 2.4.2). Enfin nous avons attribué de manière indépendante les signaux des protons thiophéniques du TAI (paragraphe 2.4.3) afin de confirmer la position du deutérium retenu au cours de cette transformation, ce qui évitait le biais d'une éventuelle deutériotropie. Il nous a paru intéressant de vérifier la position des deutériums au cours des deux autres évolutions possibles du métabolite **18** dideutéié que sont l'aromatisation en **17** et l'ouverture en **22**. Ces deux transformations ont été réalisées dans H₂O, à un pH suffisamment acide pour limiter la réaction inverse de remplacement des deutériums par des protons de l'eau. Nous avons ainsi confirmé la position des signaux H₅ en R.M.N.¹H du métabolite **14** par deux méthodes indépendantes (paragraphe 2.4.4).

2.4.1. Préparation du métabolite **16** deutérié.

Une solution dans D₂O du sulfoxyde dideutéié **18** est amenée à pH 4,5 au moyen de DCl. Après addition de mercaptoéthanol à concentration finale de 50 mM, l'apparition du métabolite **16** est suivie par H.P.L.C. L'étude en R.M.N.¹H de ce métabolite montre une disparition des signaux des protons H_{5a} et H_{5b} (figure 2.23) qui sont remplacés par deux deutériums ; comme ces deutériums se positionnent sur un même carbone, celui-ci ne peut être que C5, carbone qui portait les deutériums dans les sulfoxydes **13** et **14**. Le mercaptoéthanol-2 du métabolite **16** se positionne par défaut sur C4.

2.4.2. Transformation du métabolite **16** dideutéié en métabolite **15** dideutéié puis en TAI deutérié.

Transformation en métabolite **15** - Le métabolite **16** dideutéié est transformé quantitativement en métabolite **15** dans H₂O par le mercaptoéthanol (mercaptoéthanol 5mM, pH 7,4 tamponné par le phosphate de sodium 100 mM, 60 min. à 37°C). L'étude en R.M.N.¹H de ce métabolite montre une disparition des signaux des protons H_{5a} et H_{5b} (figure 2.24). Deux deutériums remplacent ces protons que l'on situe par filiation en C5, le groupe mercaptoéthanol restant en position 4.

Aromatisation en TAI - Le pH de la solution du métabolite **15** dideutéié est amené à 13 au moyen de soude ; la transformation en TAI est lente et nécessite plusieurs minutes de chauffage à 70°C pour s'achever. L'étude R.M.N.¹H montre la disparition du signal H₅ et donc le remplacement du proton correspondant par un deutérium (voir figure 2.26, p. 66).

2.4.3. Attribution des signaux des protons thiophéniques du TAI.

Le but est d'attribuer les trois signaux des protons thiophéniques du TAI et d'en déduire la position du deutérium sur le TAI deutérié obtenu au terme de la précédente expérience.

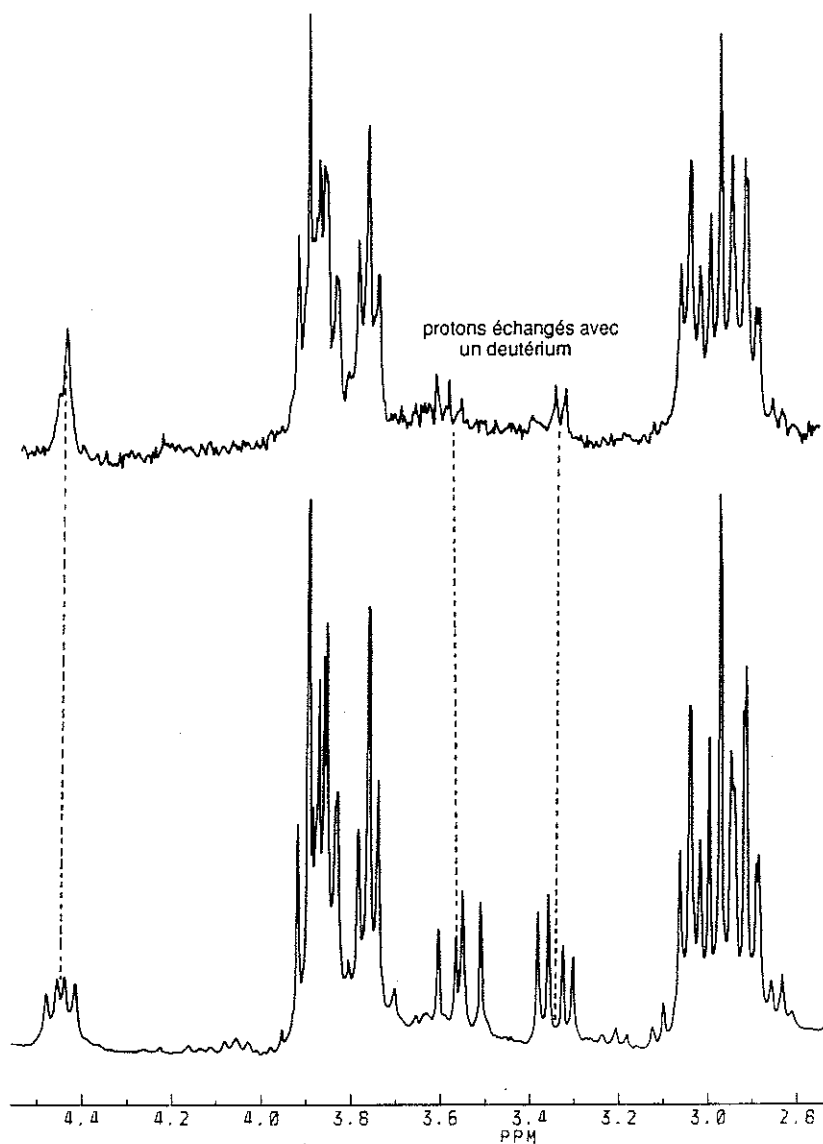
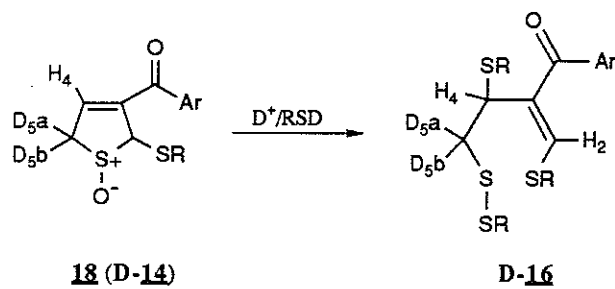


Figure 2.23 Spectre R.M.N.¹H du métabolite **16** (en bas) et après deutériation (en haut) (dans D₂O à 250 MHz sous forme de sel d'ammonium).

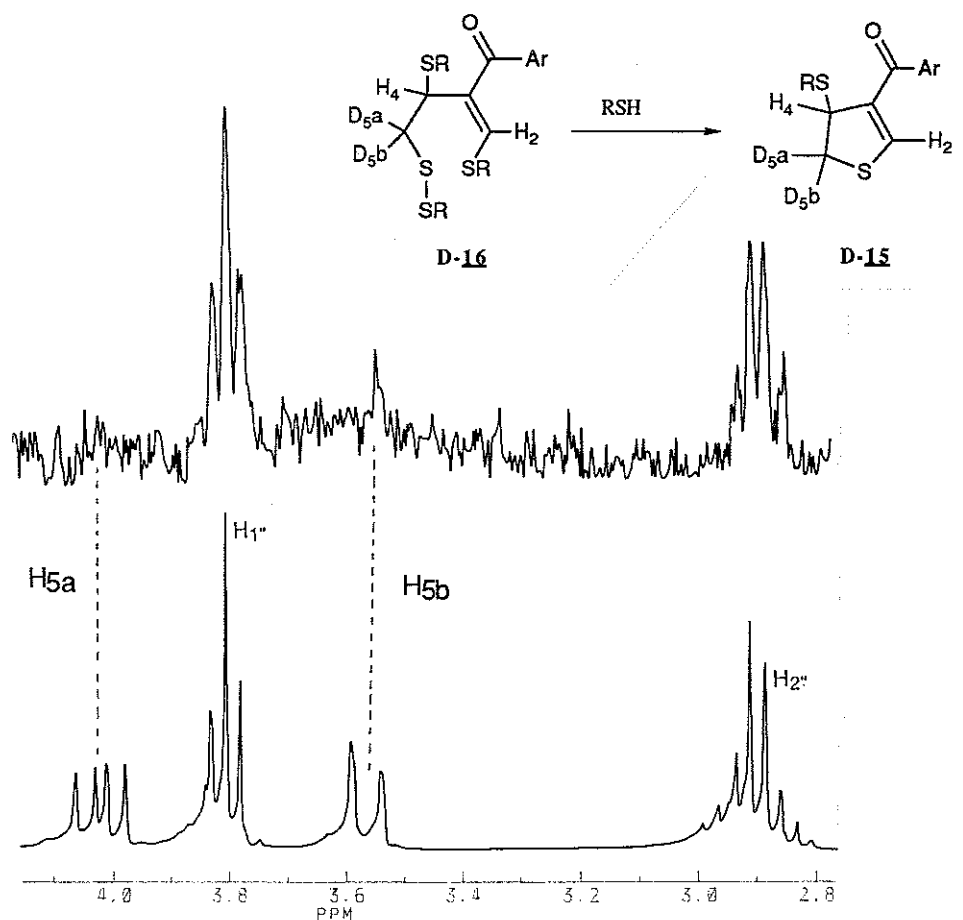


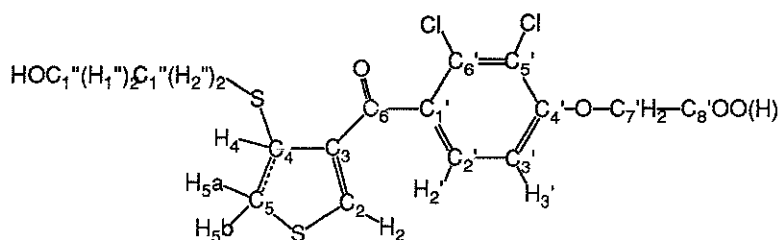
Figure 2.24 Spectre R.M.N¹H. du métabolite **15** (en bas) et après deutériation (en haut), le proton H₄ est vu après déplacement du pic de l'eau par élévation de la température à 70°C (dans D₂O à 250 MHz sous forme de sel d'ammonium) à 4,80 p.p.m.

Recherche du solvant adéquat - Que ce soit dans le méthanol deutérié (TAI sous forme acide) ou dans l'eau lourde (TAI sous forme de sel d'ammonium), deux protons thiophéniques sortent au même déplacement chimique et sont donc indifférentiables. Le DMSO-D₆ s'est révélé un solvant satisfaisant avec trois signaux indépendants non recouverts par les signaux des deux protons aromatiques¹ (tableau 2.13). Les signaux à 7,48 et 7,69 p.p.m. des protons H₄ et H₅ sont identifiés par leur constante de couplage de 5 Hz tandis que le signal à 8,12 p.p.m. est attribué au proton H₂ par son déplacement chimique à plus bas-champ et ses petites constantes de couplage en W avec les protons H₅ et H₄.

¹ Les déplacements chimiques des protons du noyau thiophène du TAI sont constants à l'opposé de ceux des protons benzéniques H_{2'} et H_{3'} et des protons OCH₂ qui montrent des variations d'autant plus importantes que l'on se rapproche de la fonction carboxyle (OCH₂ > H_{3'} > H_{2'}). Cette impossibilité de contrôler le pH des solutions R.M.N. dans le DMSO a été compensée par la vérification, pour chacun des spectres enregistrés, d'une relation linéaire entre ces variations qui reflète la contribution dépendante du pH de chacune des deux formes carboxylique et carboxylate (par exemple : $\delta_{\text{OCH}_2} - 4,30 = 2,65 \times [\delta_{\text{H}_4'} - 6,80]$ expérimentalement).

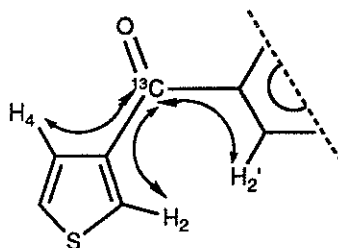
Tableau 2.13 Tables R.M.N. ^1H et ^{13}C du TAI et du métabolite **15**.

^{13}C ¹	TAI	TAI	15	^1H ²	TAI	TAI ³	15 ⁴
	D ₂ O	DMSO	D ₂ O		D ₂ O	DMSO	D ₂ O
C2	141,92 CH	137,35 CH	161,33 CH	H ₂	8,12 t ⁵	8,09 dd 3-1,5 ⁶	7,71 s
C3	143,52	141,3	139,85	H ₄	7,56 massif	7,46 dd 5-1,5	4,80 ⁸ dd 8,5-1,5
C4	131,16 CH ⁷	128,42 CH	51,37 CH	H _{5a}	7,56 massif	7,68 dd 5-3	3,58 dd 13-1,5
C5	129,92 CH ⁷	127,18 CH	45,32 CH ₂	H _{5b}			4,03 dd 13-8,5
C6	186,37	187,02	191,53	H _{2'}	7,44 d 9	7,38 d 8,5	7,29 d 8,5
C1'	134,5	131,62	134,35	H _{3'}	6,97 d 9	6,92 d 8,5	6,96 d 8,5
C2'	130,86 CH	127,71 CH	129,80 CH	OCH ₂	4,67 s	4,39 s	4,65 s
C3'	113,83 CH	111,95 CH	113,65 CH	H _{1''}			3,82 t : 6, 2H
C4'	159,29	157,06	158,44	H _{2''}			2,91 m, 2H
C5'	123	121,09	124,50				
C6'	133,35	129,41	132,42				
C7'	70,53 CH ₂	68,31 CH ₂	70,15 CH ₂				
C8'	178,03	169,26	177,70				
C1''			63,32				
C2''			35,10				



1. δ en p.p.m./ Si(^{13}C H₃)₄, multiplicité par expérience DEPT,
2. δ en p.p.m./ Si(^1H)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet,
3. 10 mg de TAI sous forme de sel d'ammonium, voir note 1 p. 63,
4. 7 mg de **15** sous forme de sel d'ammonium.
5. constantes de couplage non-déterminées car H₄ et H₅ isochrones,
6. constantes de couplage déterminées par irradiations sélectives,
7. C4 et C5 du TAI non attribués dans l'eau,
8. recouvert par le pic de HDO à 20°C.

Attribution des signaux R.M.N. des protons H₄ et H₅ du TAI - Nous avons d'abord recherché les couplages 3J ^1H - ^{13}C avec le carbone $^{13}\text{C}_6$ du carbonyle :



Cette expérience s'est heurtée à la proximité des déplacements chimiques des protons H₄ et H₂'. L'impossibilité de réaliser une impulsion sélective sur H₄ sans toucher à H₂', même à 400 MHz, a rendu impossible l'interprétation du signal intense observé sur le carbone du carbonyle après irradiation de H₄ et son absence après celle de H₅.

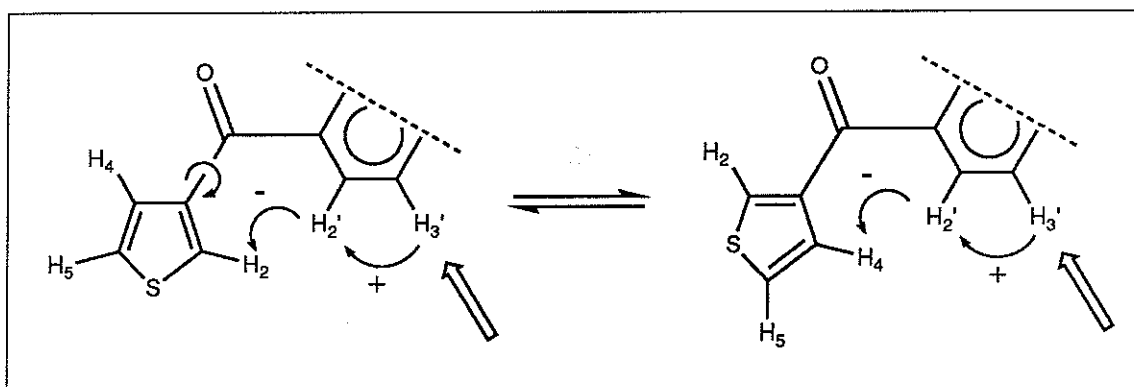


Figure 2.25 Effet Nucléaire Overhauser relais à 70°C entre H₄ et H₃'. La flèche blanche représente l'irradiation de H₃' et les flèches fines les NOE observés (+ et - leur signe).

La recherche d'un NOE entre H₄ et H₂' a rencontré la même difficulté technique. Finalement, grâce à l'intensité du NOE entre les deux protons vicinaux du noyau aromatique H₂' et H₃', nous avons recherché un NOE relais avec H₄ à partir de H₃'. A 70°C seulement, nous avons observé un signal avec H₄ (sans réponse avec H₅). Sur la figure 2.25, on voit que seul le proton porté par le carbone C4 est suffisamment proche de H₂' pour permettre un NOE relais. Nous pouvons ainsi attribuer le signal H₄ au proton H₄ porté par C4. En conclusion le ou les deutériums présents dans les composés **16**, **15** et le TAI formés à partir de **18** (**D-14**) sont portés par le carbone C5.

Deutériation par l'acide heptafluorobutyrique deutérié - La substitution électrophile sur les noyaux thiophènes est une réaction connue. Sa régiosélectivité selon la nature des différents substituants est décrite et l'on s'attend, en présence d'un groupement carbonyle en C3, à une substitution des protons des carbones C2 et C5 par un deutérium en présence de l'acide D⁺ (revue Meth-cohn, 1979). Nous avons utilisé



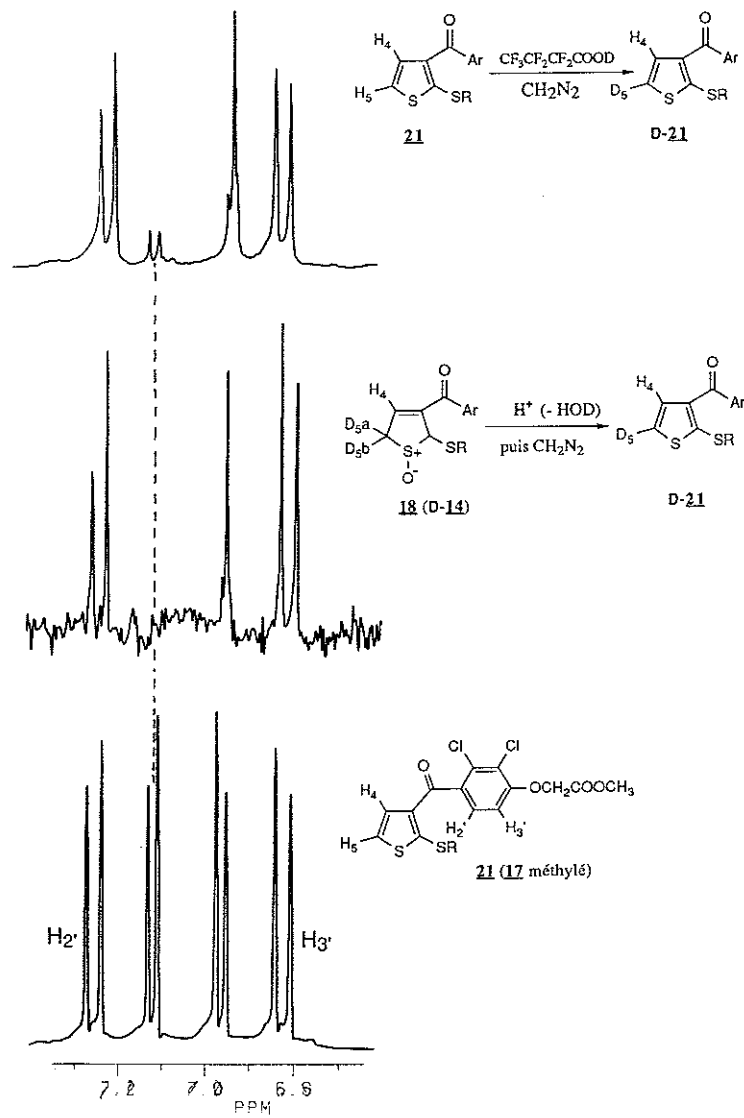


Figure 2.27 Etude R.M.N. ^1H du métabolite **21** : spectre normal (en bas), après deutériation par aromatisation du métabolite **18** puis méthylation (au milieu) et après traitement par l'acide $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{COOH}$ de **21** et nouvelle méthylation (en haut) (spectres réalisés dans le dichlorométhane deutérié).

cette méthode pour effectuer une attribution complémentaire des signaux des protons du TAI. L'acide heptafluorobutyrique deutérié a été utilisé (24 heures à 105°C, voir partie expérimentale 6.1.11, p. 140). Le signal du proton H₂ montre un échange à 50% avec un deutérium tandis que le signal à 7,48 p.p.m. a disparu et donc correspond au signal du proton H₅ (figure 2.26). Cette deuxième attribution est en accord avec le résultat obtenu par le NOE relais.

2.4.4. Transformation du métabolite **18** dideutéié en métabolite **21** deutérié et en métabolite **22** deutérié ; attribution des signaux R.M.N.

Préparation du métabolite **21** deutérié - Le sulfoxyde dideutéié **18** est traité par HCl (HCl 2N dans H₂O/CH₃OH v/v, 120 min. à 37°C) et le métabolite **17** obtenu purifié puis méthylé en **21**. L'étude par R.M.N.¹H dans le dichlorométhane deutérié de ce métabolite (conditions dans lesquelles les protons thiophéniques sont bien séparés et distincts des protons aromatiques) montre une disparition complète du signal H₅ (figure 2.27). Il y a donc rétention d'un des deux deutériums du métabolite **18**.

Attribution des protons thiophéniques du métabolite **21** - Le but est encore de déterminer le proton qui a été substitué par un deutérium dans l'expérience précédente en attribuant les signaux des deux protons thiophéniques du métabolite **21** ; nous avons employé la démarche utilisée pour le TAI. Tout d'abord nous avons recherché un NOE entre ces protons et le proton H₂' du cycle benzénique. Malheureusement les résultats obtenus montrent de nombreux NOE relais complexes qui nous ont fait renoncer à cette méthode¹. La substitution par un deutérium en milieu acide est théoriquement orientée en C5 par la présence d'un groupement carbonyle sur C3 et celle d'un thioéther sur C2 (revue Meth-Cohn, 1979). L'étude par R.M.N.¹H du métabolite **21**, traité 12 heures à 100°C en solution dans un mélange DMSO/acide heptafluorobutyrique deutérié, montre la disparition à 85% du signal le plus déblindé H₅ (partie expérimentale 6.1.11, p. 141, la fonction carboxyle a du être reméthylée). Le proton correspondant à ce signal est échangé avec un deutérium à 85% et se positionne en C5 (figure 2.27). L'aromatisation dans l'eau légère du sulfoxyde **18** dideutéié s'effectue avec rétention d'un seul deutérium que l'on retrouve en position 5 sur le cycle thiophénique de **17**. Ce résultat est en accord avec le positionnement des protons H_{5a} et H_{5b} du métabolite **14** en C5.

Préparation du métabolite **22** deutérié et transformation en TAI deutérié - Le sulfoxyde dideutéié **18** est repris par un mélange H₂O/HCl 0,1N v/v auquel on ajoute immédiatement le mercaptoéthanol à la concentration finale de 10 mM ; la réaction est suivie par H.P.L.C. La transformation du sulfoxyde se termine en 260 min. à 37°C sans apparition de métabolite **16** mais seulement d'un peu de métabolite aromatique **17** contaminant le pic du métabolite **22**. La réaction est alors arrêtée par passage sur Sep-pack puis **22** est purifié par H.P.L.C. L'étude en R.M.N.¹H dans D₂O du composé obtenu montre une disparition de 50% du signal H₅ correspondant à la rétention

¹ Le métabolite aromatique méthylé **21** a été étudié dans le dichlorométhane deutéré où les 4 protons peuvent être irradiés individuellement à 400 MHz. Plusieurs NOE sont trouvés, entre les protons OCH₂ et le proton H₃' à proximité, entre les protons vicinaux H₄ et H₅ ainsi que H₂' et H₃' et enfin entre H₄ et H₅ d'une part et H₂' et H₃' d'autre part. Malheureusement l'absence de cohérence dans les signes de ces derniers effets (impossibilité de discerner les NOE primaires des NOE secondaires) ne permet pas d'attribuer les signaux de H₄ et de H₅.

partielle d'un deutérium du métabolite **18** de départ (figure 2.28). Le métabolite **22** est dans un deuxième temps aromatisé en TAI par simple élévation du pH à 8 (NaOH) ; la réaction est rapide (3 min.). L'étude R.M.N.¹H du TAI issu de cette expérience montre la disparition de 50% du signal du proton H₅ qui correspond à la rétention partielle d'un deutérium sur C5 (figure 2.26).

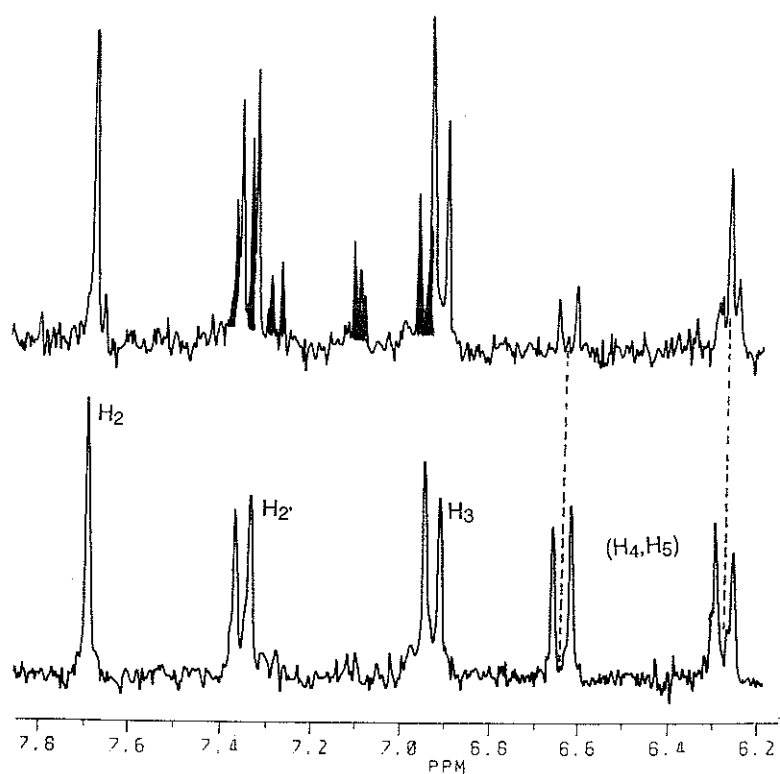
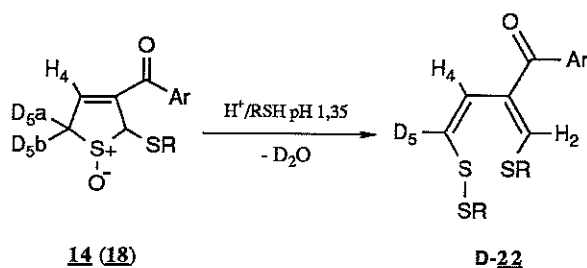


Figure 2.28 Spectre R.M.N.¹H du métabolite **22** (en bas) et après deutériation (en haut). Les signaux noircis correspondent à une contamination par **17** qui est un sous-produit de la réaction difficilement séparable de **22** par H.P.L.C., les spectres sont enregistrés dans D₂O à 250 MHz.

2.5. Discussion.

2.5.1. Récapitulatif des structures des métabolites de piégeage.

En présence de microsomes et d'un système générateur de NADPH, le TAI est métabolisé en une entité réactive que nous avons piégée au moyen d'un thiol, le mercaptoéthanol. Le résultat de ce piégeage en fonction de la concentration du mercaptoéthanol dans le milieu réactionnel (figure 2.3, p. 32) montre l'apparition de deux métabolites primaires de piégeage diastéréoisomères **13** et **14** qui peuvent évoluer sous l'action du thiol selon plusieurs voies dépendantes du pH. Nous pouvons maintenant proposer un schéma global de ces transformations (figure 2.29).

Les métabolites primaires sont des sulfoxydes de dihydrothiophène - Rappelons les points importants qui ont conduit à l'élucidation de la structure des métabolites primaires. Les données de la R.M.N.¹H indiquent la présence d'un résidu mercaptoéthanol, d'une double liaison entre les carbones C3 et C4 et de deux protons géminaux portés par le carbone 5. Nous avons vérifié la position de ces deux protons par leur corrélation au proton H₅ du TAI au moyen d'une expérience de deutériation sélective. A la chaîne carbonée obtenue nous ajoutons, en C2 ou en C5, un soufre et un élément chiral inconnu, source de la diastéréoisomérisation et des différences entre les deux protons H₅ (leurs déplacements chimiques sont distants de 0,7 p.p.m. et leurs acidités diffèrent d'au moins 3 unités de pK). L'acidité des protons H₅ et l'apparition de l'anion **19** en milieu basique ne se comprend que par la présence concomitante d'un groupement électroattracteur à proximité. Cette présence est également signée par l'importance de la constante de couplage géminale de 18 à 20 Hz des ces deux protons.

Le spectre de masse ne peut s'expliquer que par une fragmentation de la molécule pour observer une masse de 406, valeur correspondant à la masse de la structure minimale proposée par la R.M.N. moins 2 (chaîne carbonée plus le soufre mais sans l'élément chiral). C'est aussi la masse du métabolite aromatique **17** obtenu par transformation en milieu acide. La structure de ce dernier métabolite est simple, nous ne reprendrons donc pas le raisonnement qui a conduit à son élucidation.

Les cytochromes P-450 sont impliqués dans l'activation métabolique du TAI et donc dans la formation des métabolites de piégeage (voir ci-dessous). Nous pouvons émettre une hypothèse sur la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire dans les métabolites primaires. Si nous positionnons cet atome d'oxygène sur le soufre sous forme de sulfoxyde, nous observons la concordance des faits suivants : une chiralité apparaît sur le soufre, les protons H₅ en α seront échangeables avec le deutérium de l'eau lourde, leur acidité devient compatible avec le pK_a observé vers pH 8,5 et enfin il y a présence d'un groupement électroattracteur en α de C5. La perte d'une molécule d'eau conduit à la structure aromatique du métabolite **17**. Cette déshydratation a été décrite comme une réaction aisée pour les sulfoxydes de 2,5-dihydrothiophène (Cava et al, 1966), en particulier ceux possédant un groupement mésomère accepteur en position 2 ou 4 (Takaya et al, 1968). Dans le cas présent, la similitude des spectres de masse des métabolites primaires et du métabolite **17** confirme cette perte d'une molécule d'eau. L'ensemble de ces observations nous permet de conclure sur la structure

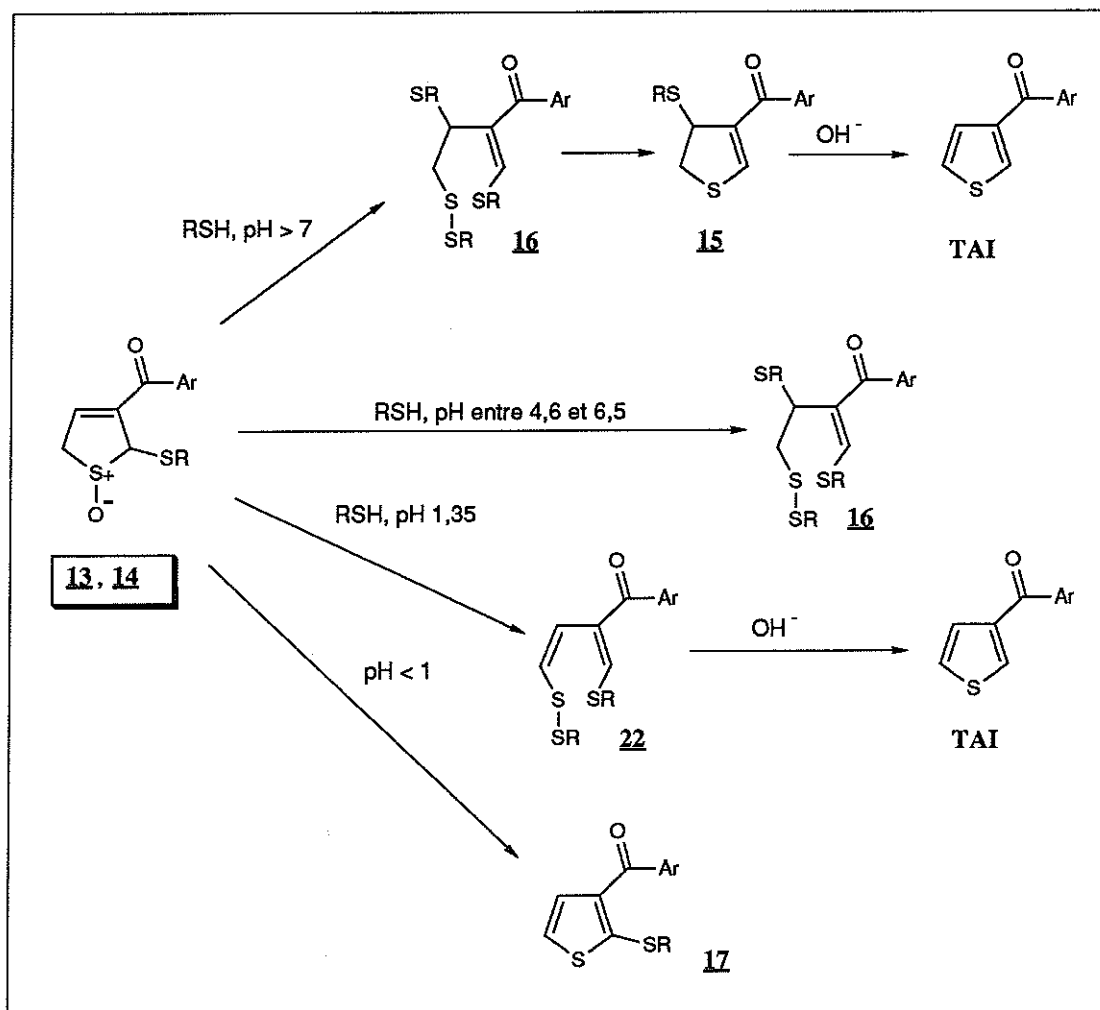


Figure 2.29 Formation d'un sulfoxyde de dihydrothiophène lors du métabolisme microsomal du TAI et différentes évolutions possibles de ce sulfoxyde en présence de mercaptoéthanol et en fonction du pH.

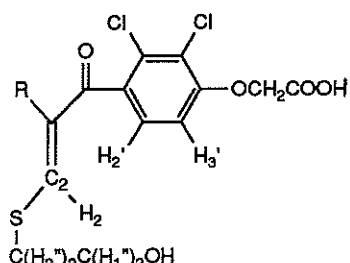
des deux métabolites **13** et **14** : deux sulfoxydes de dihydrothiophène diastéréoisomères.

Structure des métabolites **15**, **16** et **22** de transformation des métabolites primaires en présence de mercaptoéthanol - La détermination de ces structures a posé en fait 3 problèmes qui sont la position du troisième résidu mercaptoéthanol en C4 ou en C5 dans les métabolites **15** et **16** et l'existence ainsi que la position d'un pont dithioéther dans les métabolites **16** et **22**.

Grâce aux expériences de deutériation sélective, le troisième résidu mercaptoéthanol est positionné en C4. Le métabolite **16** a, après deutériation, deux deutériums géminaux dont un au moins provient de la rétention d'un deutérium en C5 de **18**. Ces deux deutériums sont retrouvés sur **15** et, après élimination du groupe mercaptoéthanol, un des deux deutériums est effectivement retrouvé sur le carbone C5 du TAI.

La différence entre la somme des masses du TAI et des résidus mercaptoéthanol et la masse du métabolite trouvée par spectrométrie est de 2 dans le cas des métabolites **16** et **22**. Ce défaut de masse reflète un degré d'oxydation supplémentaire dont la liaison dithioéther rend compte. Plusieurs faits sont en accord avec sa

présence : les arguments de masse ci-dessus, le nombre de protons portés par la chaîne carbonée et la possibilité de réduction de ces deux métabolites par différents réducteurs. L'autre indétermination est sa position, en C2 ou en C5, qui est probablement la même dans les deux métabolites car les déplacements chimiques des protons situés autour du carbone C2 sont identiques dans ces deux molécules :



Dans le métabolite **16**, H₂ est attribué par son NOE avec H_{2'} et les protons H_{2''} du résidu mercaptoéthanol-1 par leur couplage en ⁴J avec H₂, couplage qui rend peu probable la présence du dithioéther à ce niveau. Un argument mécanistique vient compléter cette attribution. La réduction du pont dithioéther dans le métabolite **16** conduit à la cyclisation en **15**. Seule sa position en C5 est compatible avec une telle réaction car le thiol libéré peut alors s'additionner en C2 sur la double liaison et éliminer en retour le mercaptoéthanol-1, réaction difficilement compréhensible avec un thiol libre sur C2 (figure 2.30).

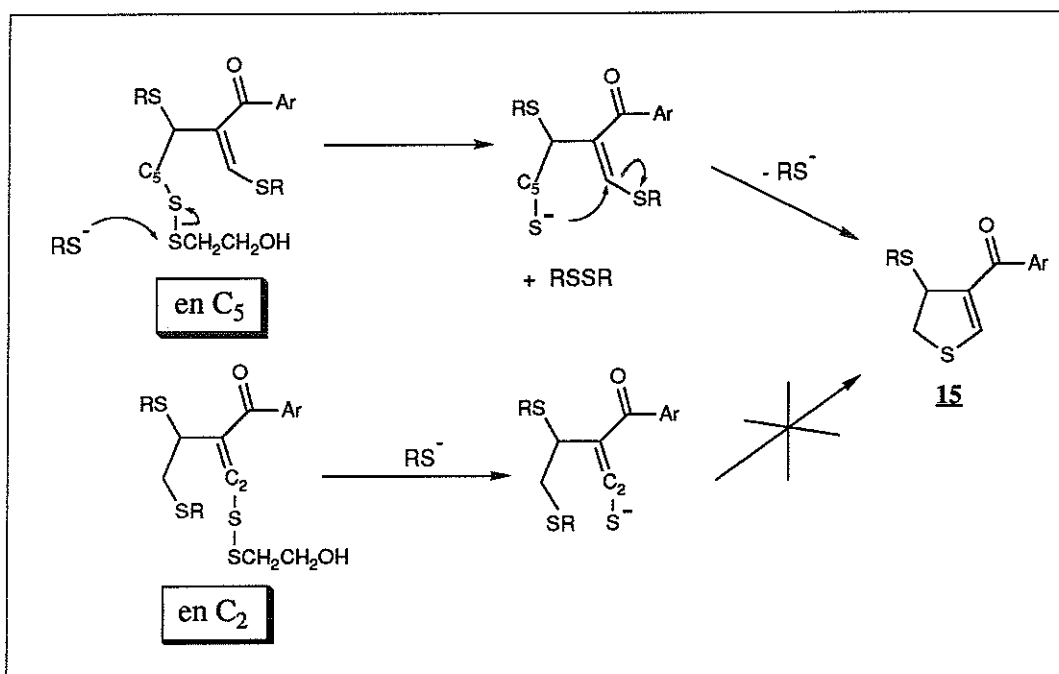


Figure 2.30 Réduction du pont dithioéther du métabolite **16 et réaction de cyclisation en métabolite **15**.** Les deux positions en C2 ou C5 sont envisagées ; seule la position en C5 du dithioéther permet une cyclisation.

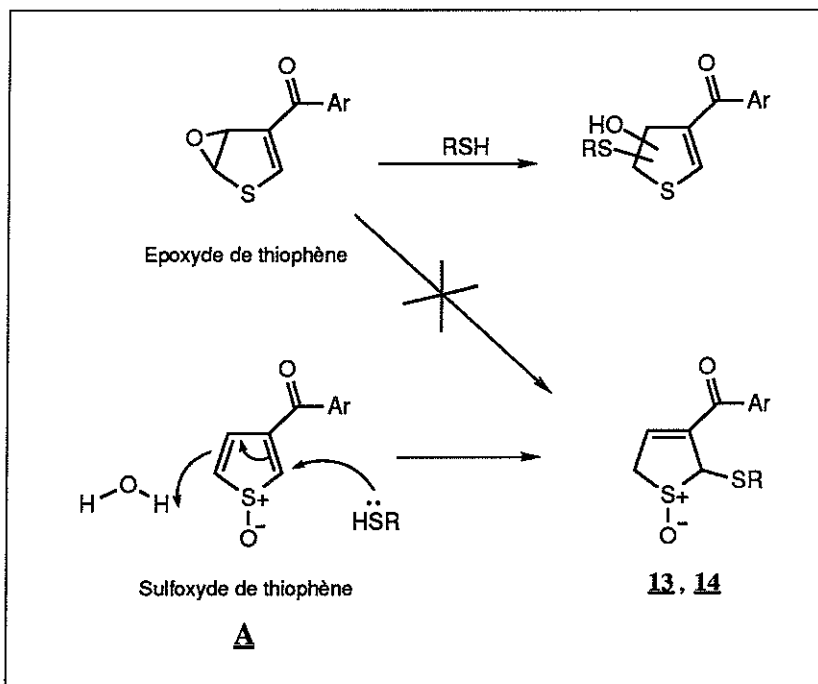


Figure 2.31 Hypothèses de piégeage soit d'un époxyde du TAI, soit d'un sulfoxyde de thiophène. Seule une addition sur le sulfoxyde de thiophène conduit à la structure observée des métabolites **13** et **14**.

2.5.2. Aspects nouveaux du métabolisme du TAI et hypothèses sur les mécanismes réactionnels

Une entité réactive issue du métabolisme du TAI par les cytochromes P-450 a été piégée par le mercaptoéthanol - Sur la figure 2.3 (p. 32) nous observons que l'apparition des métabolites primaires se fait aux dépens de la réaction de fixation covalente aux protéines microsomales. Il y a bien eu piégeage de l'entité réactive responsable de cette fixation et nous savons que celle-ci est sous la dépendance des cytochromes P-450 (Dansette et al, 1990).

Les sulfoxydes de thiophène en tant qu'entités réactives nouvelles - La connaissance de la structure des métabolites primaires de piégeage doit nous renseigner sur celle de l'entité réactive. Par exemple, l'époxyde 4-5 proposé comme entité réactive issue de l'oxydation du noyau thiophène par le système de détoxification (voir introduction, paragraphe 1.5.3, p. 17) conduirait à l'addition d'un mercaptoéthanol avec apparition d'un alcool en C4 ou C5 (figure 2.31). La présence d'un atome d'oxygène sur le soufre est en complète contradiction avec une telle hypothèse. L'élimination formelle du résidu mercaptoéthanol des métabolites primaires **13** et **14** conduit à la soustraction d'un des deux protons H5 et fait apparaître une double liaison supplémentaire. Cette structure de sulfoxyde de thiophène **A** est la véritable entité réactive initiale. Le piégeage primaire consiste donc en une addition 1-4 sur un diène activé en α (C2) par le sulfoxyde. La cétone oriente cette addition en 2 (figure 2.31).

Les sulfoxydes de thiophène forment une classe de molécules chimiques peu connues et le sulfoxyde de thiophène proprement-dit **26** n'a jamais été isolé. Par la présence du sulfoxyde, les doubles liaisons se comportent comme un diène déficient en électrons et particulièrement réactif (revue Patai, 1988). Cette difficulté rencontrée

pour les isoler explique qu'on ne leur connaît que des réactions de type Diels-Alder, soit sur eux-mêmes *in situ* soit sur des diènes ou des diénophiles présents dans le milieu (voir par exemple Torsell, 1976). Seuls ont été purifiés et caractérisés des sulfoxydes de dérivés du thiophène fortement encombrés sur les positions 2 et 5 comme le sulfoxyde de 2,5-di-*ter*-butylthiophène **27** (Mock, 1970 et figure 2.32). On comprend les difficultés rencontrées pour mettre en évidence des entités aussi instables et le présent travail montre, du moins dans le cas

du TAI, que seules des conditions particulières permettent l'isolement des entités primaires de piègeage. Le TAI est donc le premier exemple de dérivé de thiophène pour lequel un sulfoxyde ait été mis en évidence comme produit de l'oxydation catalysée par les P-450. La réaction de piègeage par le mercaptoéthanol serait la première addition nucléophile décrite sur un sulfoxyde de thiophène.

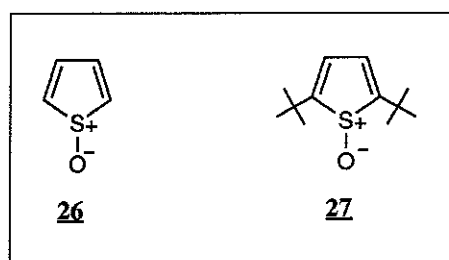
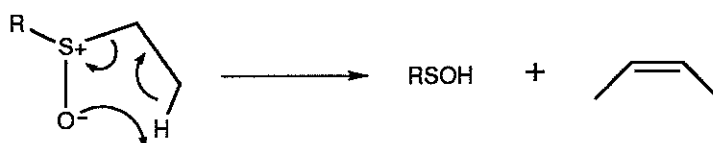


Figure 2.32 Structure du sulfoxyde de thiophène **26** et du sulfoxyde de 2,5-di-*ter*-butylthiophène **27**.

Isomérisie et forme anionique, hypothèse d'un acide sulfénique - L'acidité des protons H₅ des métabolites **13** et **14** s'explique par le caractère électroattracteur du sulfoxyde et la délocalisation de l'anion correspondant. Par contre le passage de **13** à **14** et de **14** à **13** en milieu basique semble plus difficile à comprendre. L'échange avec des deutériums des protons situés en α d'un sulfoxyde est connu pour se faire avec rétention de configuration au niveau du sulfoxyde (par exemple Hutchinson et al, 1969). La seule solution pour expliquer l'isomérisie autour de la liaison S-C2 est un mécanisme où il y a rupture de cette liaison. De telles coupures en α d'un sulfoxyde ont déjà été décrites sous le nom de *cis*-élimination (Kingsbury et al, 1960) :



Dans le cas présent, la configuration des métabolites **13** et **14** ne permet pas une telle réaction mais, par l'intermédiaire de la double liaison C3-C4, l'arrachement d'un proton H₅ en milieu basique pourrait conduire à une ouverture du cycle avec libération d'un ion sulfénate :



De telles ouvertures en milieu basique de sulfoxydes de dihydrothiophène ont déjà été proposées comme réactions intermédiaires avant méthylation des sulfénates libérés (Crumbie et al, 1981). Pour interpréter le passage du métabolite **14** au métabolite **13** en milieu basique, nous proposons un équilibre du métabolite majoritaire **14** avec l'anion majoritaire **19** qui pourrait, après ouverture, conduire à un sulfénate ouvert **B**. Ce sulfénate serait en équilibre avec le diastéréoisomère **C** de l'anion **19** qui, après protonation, conduirait au métabolite **13** (figure 2.33). Toutes ces réactions sont renversables et expliquent aussi le passage du métabolite **13** au métabolite **14** en milieu basique. Une telle hypothèse est en accord avec les variations observées des proportions des métabolites **13** et **14** selon le pH de leur solution. La protonation des anions est une réaction rapide et la neutralisation puis l'injection en H.P.L.C. d'une solution des métabolites **13** et **14** verrait, pour un pH de la solution initiale très basique, essentiellement l'équilibre des anions **19** et **C** et, pour un pH autour de 8,5, l'équilibre des métabolites **13** et **14**. L'équilibre des deux anions est déplacé au profit de **19** et **C** n'a jamais été détecté comme de même le sulfénate **B**.

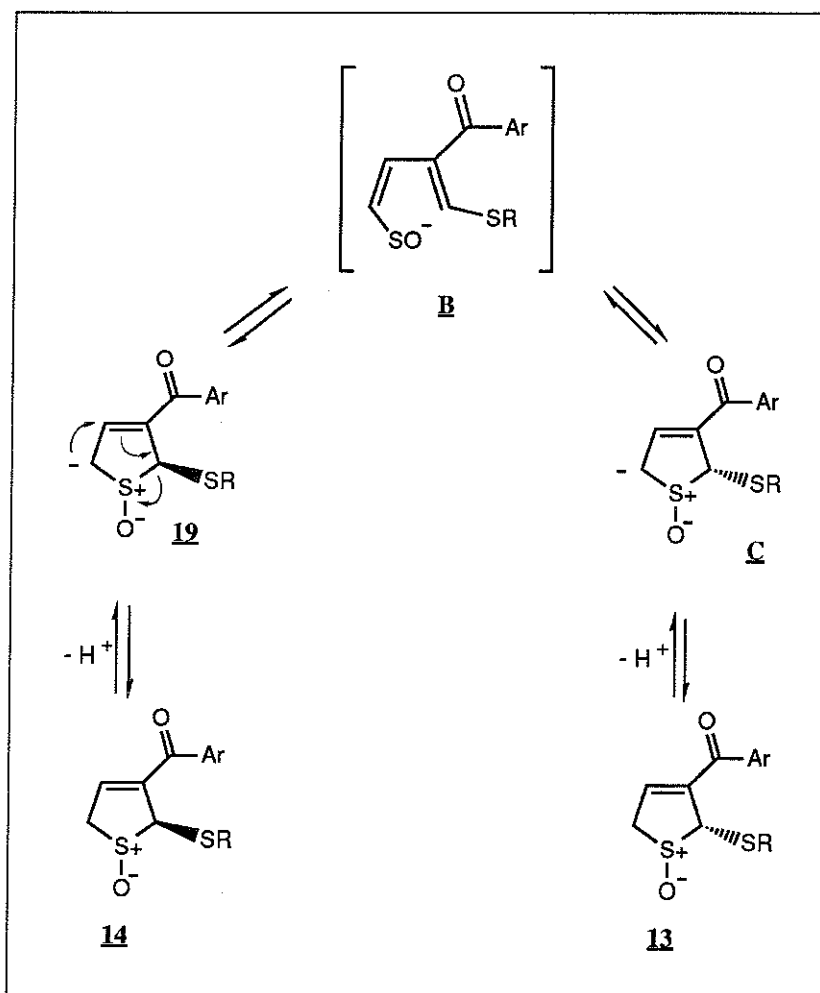


Figure 2.33 Proposition d'ouverture des anions des métabolites **13** et **14** en milieu basique avec formation d'un sulfénate. La succession des équilibres permet une isomérisation des métabolites **13** et **14** (la stéréochimie de la liaison sulfoxyde est arbitraire sur ce schéma mais fixée au cours des équilibres)

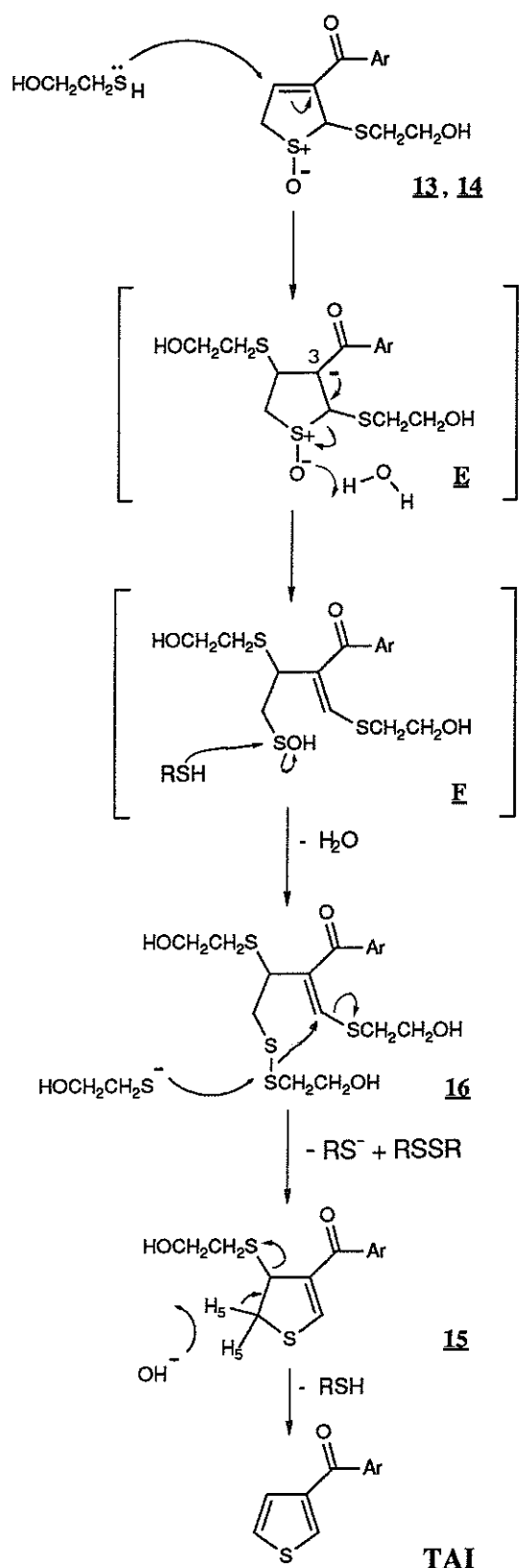


Figure 2.34 Proposition d'un mécanisme de formation du métabolite **16** par addition de Michaël d'un mercaptoéthanol en $C4$ des sulfoxydes de dihydrothiophène **13** et **14**. Une réduction de **16** par un mercaptoéthanol conduit au métabolite **15**.

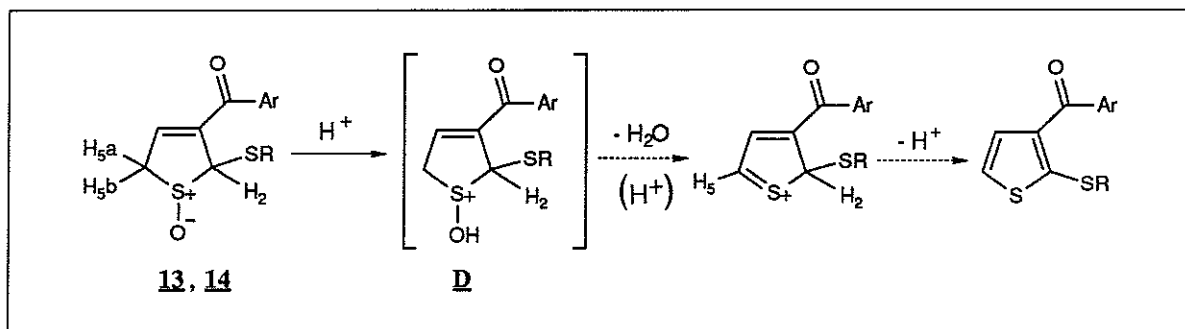


Figure 2.35 Mécanisme possible pour l'aromatisation des métabolites **13** et **14** catalysée par H^+ .

Aromatisation par déshydratation - La facilité de déshydratation des sulfoxydes de dihydrothiophène est, rappelons-le, une réaction connue (Cava et al, 1966). En particulier, elle dépend de la nature des substituants (Takaya et al, 1968) et une cétone en position 3 est un facteur favorable. La première étape de cette réaction est vraisemblablement une protonation du sulfoxyde en intermédiaire **D** ; une possibilité réactionnelle est l'élimination consécutive d'une molécule d'eau favorisée par la labilité du proton H_5 suivie d'un réarrangement du sulfonium obtenu avec perte du proton H_2 (figure 2.35).

Deuxième addition de Michaël, formation d'un dithioéther et sa réduction - La structure des métabolites **13** et **14** présente une cétone α,β -insaturée et donc une possibilité d'addition de type Michaël en C4. Le sulfoxyde pourrait être un groupe partant qui favoriserait cette réaction. Les acides sulféniques sont connus pour réagir facilement avec les thiols en donnant un dithioéther (Hogg, 1979) qui, dans le cas présent, n'est autre que le métabolite **16**. Nous proposons une addition de Michaël du mercaptoéthanol en C4 des métabolites **13** et **14** avec formation d'un acide sulfénique **E**, intermédiaire qui réagit rapidement avec un deuxième mercaptoéthanol en formant un dithioéther **16** (figure 2.34). Cette réaction d'ouverture est fondamentalement la même que celle proposée pour l'isomérisation des métabolites primaires puisqu'elle fait intervenir deux intermédiaires pareillement chargés négativement ($-\delta$ sur C3 de l'intermédiaire **E**).

Retour au TAI en milieu basique - L'arrachement de H_5 de **15** en milieu basique conduit à l'élimination du résidu mercaptoéthanol et à l'aromatisation du dihydrothiophène (figure 2.34).

Formation du métabolite **22** - La transformation du sulfoxyde dideutéié **18** en **22** est environ 6 fois plus lente que celle de **14**. Il s'agit probablement d'un effet isotopique qui montre que l'arrachement d'un H_5 est une étape limitante à la formation du métabolite **22**. Un mécanisme possible serait une ouverture du sulfoxyde de dihydrothiophène après arrachement de H_5 suivie d'un piégeage de l'acide sulfénique **G** libéré (figure 2.36). Si la concentration en HCl est supérieure à 1 M, la protonation du sulfoxyde suivie de la perte d'une molécule d'eau devient majoritaire.

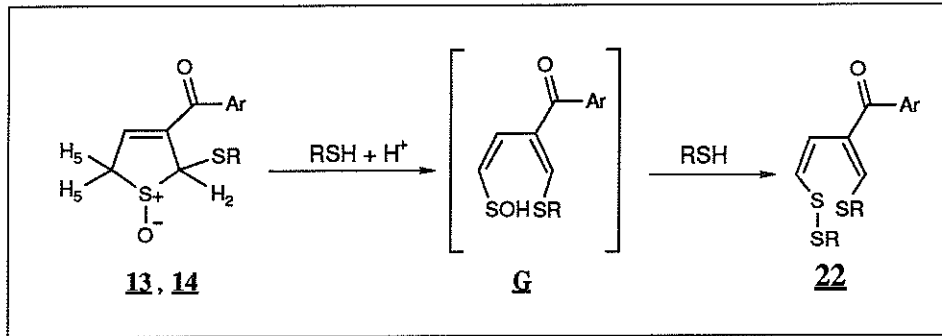


Figure 2.36 Mécanisme probable de la formation du métabolite **22**.

2.5.3. Bilan métabolique du TAI et conséquences sur le métabolisme des composés contenant un noyau thiophène.

Bilan métabolique du métabolisme du TAI - Nous pouvons maintenant écrire le schéma métabolique globale de l'oxydation du TAI par les cytochromes P-450 avec piégeage par le mercaptoéthanol dans les conditions d'incubation à pH 7,4 (figure 2.37). La première étape est la S-oxydation du noyau thiophène ; cette première réaction concerne probablement la totalité du TAI métabolisé par les P-450. En effet, aux fortes concentrations en mercaptoéthanol, la presque totalité de ce métabolisme est déviée vers la formation de métabolites de piégeage. Dans le chapitre suivant nous confirmerons l'intervention et la nature des cytochromes P-450 impliqués dans l'activation métabolique du TAI par le foie humain.

La deuxième étape est une addition en position 2 du mercaptoéthanol. Cette réaction apparaît dès les plus faibles concentrations en mercaptoéthanol testées (50 μ M) et les métabolites **13** et **14** qui en résultent sont majoritaires jusqu'à une concentration de thiol de 250 μ M. La complexité des structures découvertes souligne le bien-fondé du choix d'un thiol simple, le mercaptoéthanol, pour piéger l'entité réactive. Nous savons que la N-acétylcystéine ou le glutathion réalisent ce piégeage *in vitro* puisqu'en leur présence la fixation aux protéines microsomales s'effondre (Dansette et al,1990). Avec une concentration de l'ordre de 5 mM, le glutathion intrahépatique doit également réaliser ce piégeage *in vivo*.

La troisième étape est l'addition d'un deuxième mercaptoéthanol en C4 avec ouverture du cycle et attaque du mercaptoéthanol sur un acide sulfénique intermédiaire. Ce résultat confirme l'extrême complexité du métabolisme des dérivés thiophéniques. L'entité réactive, dans le cas des dérivés 3-aroyle, est donc capable d'additionner plusieurs nucléophiles.

La dernière étape est la réduction de la liaison dithioéther avec cyclisation en métabolite **15**. Le bilan de ces deux dernières étapes est une réduction du sulfoxyde par deux molécules de mercaptoéthanol (RSH) avec échange de la position du thiol de C2 en C4 :



Dans le chapitre suivant nous étudierons la nature des métabolites urinaires éliminés chez le rat consécutivement à une administration de TAI. Plus exactement nous essayerons de savoir dans quelle mesure l'entité réactive, le piégeage et les réactions de transformation observés *in vitro* en présence de mercaptoéthanol se

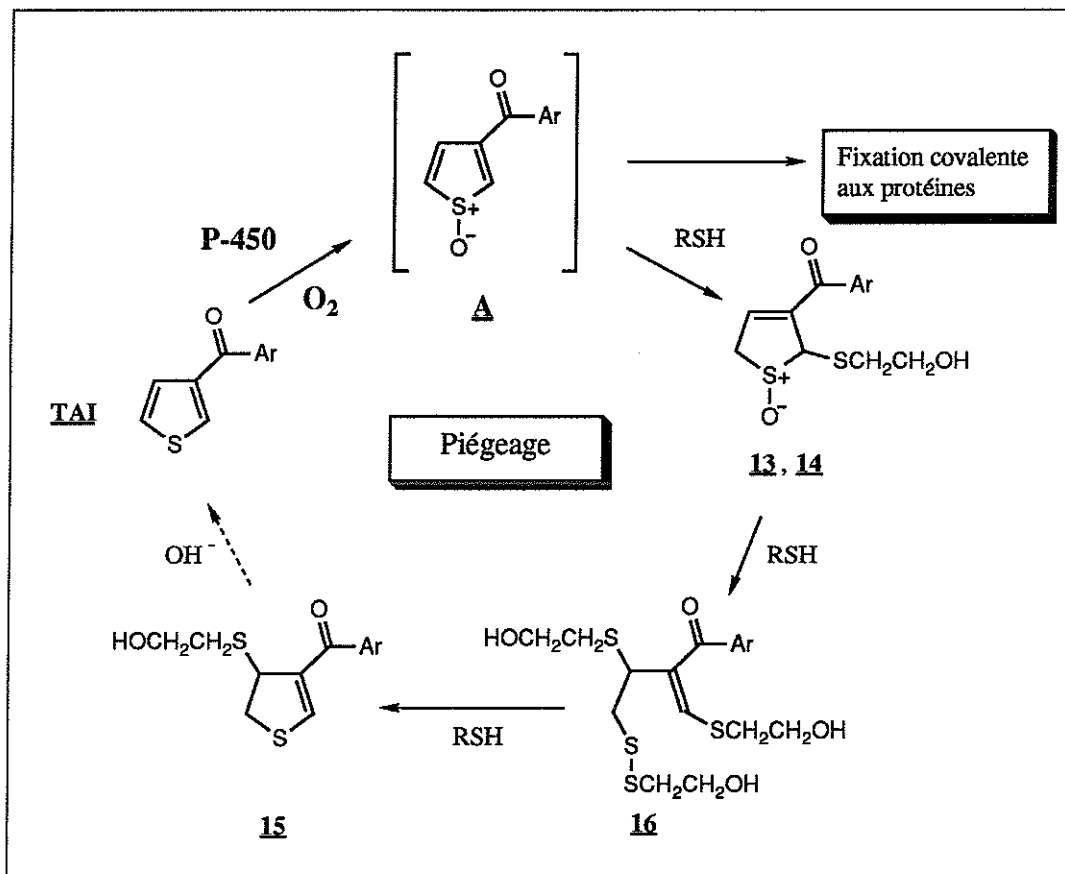


Figure 2.37 Métabolisme *in vitro* du TAI en présence de P-450 et de mercaptoéthanol.

produisent *in vivo* chez un animal de laboratoire. Il est probable que les thiols des cystéines sont impliqués au premier plan dans les réactions de fixation covalente du TAI aux protéines intracellulaires. Nous essayerons de répondre également à cette question.

Analogie avec le benzothiophène - Une étude a été conduite en parallèle au laboratoire avec le benzothiophène **3**. Une oxydation métabolique au niveau du soufre, proposée dans la littérature (voir introduction), est confirmée. De plus, le sulfoxyde de benzothiophène **3e** obtenu est réactif vis à vis des thiols et peut additionner une N-acétylcystéine (NAC) en β du sulfoxyde pour donner **3f** (figure 2.38). Ces faits confirment deux résultats importants observés avec le TAI, à savoir que l'oxydation du noyau thiophène ou de ses dérivés conduit à des dérivés de type sulfoxyde de thiophène qui sont réactifs vis à vis des nucléophiles comme les thiols.

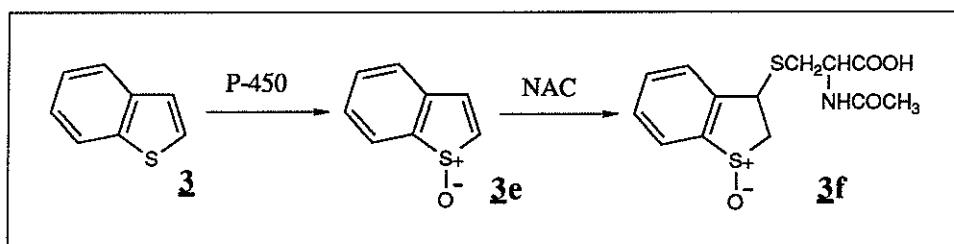


Figure 2.38 Métabolisme du benzothiophène mis en évidence au laboratoire (Mansuy et al, 1991 et travaux en cours).

Cas des dérivés 2-aryltiophènes - Nous allons envisager le cas de l'acide tiénilique. Il semble logique de proposer le sulfoxyde de l'acide tiénilique comme produit de son oxydation par les cytochromes P-450. De même que pour le sulfoxyde du TAI, la fonction sulfoxyde et la cétone activeraient le diène obtenu, en particulier la position 5. La nucléophilie d'un ion hydroxyde pourrait être alors suffisante pour réaliser la première addition de Michaël et la déshydratation du sulfoxyde de dihydrothiophène obtenu (par exemple un 4,5-dihydrothiophène) conduirait à un dérivé aromatique qui n'est autre que le dérivé 5-hydroxylé **6** de l'acide tiénilique (figure 2.39). Dans une telle hypothèse de métabolisme, l'oxygène du dérivé **6** proviendrait de l'eau et non de l'air. Toutefois les diverses tentatives de piégeage de l'entité réactive de l'acide tiénilique sont restées pour l'instant infructueuses. En particulier, le mercaptoéthanol, dans une gamme de concentration similaire à celle testée pour le TAI, conduit au contraire à une augmentation de la 5-hydroxylation au dépend de la fixation covalente aux protéines. Ce résultat ne peut être compris que si un piégeage primaire d'un sulfoxyde de thiophène conduit secondairement soit au dérivé **6**, soit à de l'acide tiénilique à nouveau métabolisé. Le mécanisme de la 5-hydroxylation des dérivés 2-aryltiophènes est loin d'avoir délivré tous ses secrets.

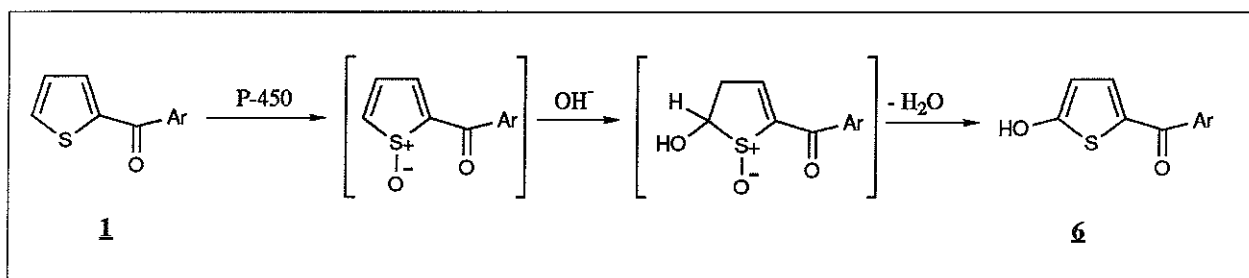


Figure 2.39 Proposition d'un mécanisme pour la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique.

CHAPITRE TROISIEME

**ETUDE DE L'OXYDATION
MICROSOMALE DU TAI**

In vivo, le glutathion est le thiol endogène responsable du piégeage des entités électrophiles générées par les cytochromes P-450 (voir introduction). Le métabolisme du TAI, tel que nous pouvons le concevoir dans la cellule hépatique avec les résultats du chapitre précédent, pourrait donc comporter trois étapes qui sont 1) oxydation du TAI par les P-450 en sulfoxyde de TAI, 2) réaction de ce sulfoxyde avec les nucléophiles des protéines et en particulier avec les thiols des cystéines ou 3) réaction de ce sulfoxyde avec le glutathion et formation de métabolites de piégeage secondairement éliminés. L'objectif de ce chapitre est de préciser ce métabolisme microsomal en essayant de répondre aux questions que nous nous étions posés dans l'introduction, à savoir : quelle est la nature de l'entité réactive *in vivo* chez le rat et *in vitro* chez l'homme, quels sont le ou les P-450 responsables chez l'homme de ce métabolisme et quels sont le ou les acides aminés impliqués dans la réaction de fixation covalente aux protéines ?

Dans une première partie, nous avons essayé de mettre en évidence une S-oxydation du TAI d'abord *in vivo* chez le rat, par la recherche de métabolites de piégeage par le glutathion sous la forme de dérivés mercapturiques dans les urines recueillies après une administration de TAI, et *in vitro* sur un lot de microsomes humains par la recherche des métabolites de piégeage du sulfoxyde de TAI par le mercaptoéthanol. Pour identifier le ou les cytochromes P-450 responsables de ce métabolisme chez l'homme, nous avons employé la technique de l'expression hétérologue chez la levure. Il est particulièrement délicat d'étudier un cytochrome P-450 donné au sein des nombreuses isoenzymes présentes dans la fraction microsomale hépatique. L'oxydation de l'AT est, chez l'homme, sous la dépendance de la sous-famille IIC qui comporte au moins 7 isoenzymes dont certaines sont associées au polymorphisme d'hydroxylation de la méphénytoïne (voir introduction, p. 13). Au début de ce travail, 2 P-450 étaient bien décrits¹, les P-450 IIC8 et IIC9, ainsi que de nombreux variants alléliques (revue Nebert et al, 1991). L'équipe de F.P. Guengerich

¹ Depuis, trois nouveaux gènes humains ont été découverts qui codent pour les P-450 IIC17, IIC18 et IIC19 (Romkes et al, 1991). Le P-450 IIC18 pourrait être responsable de l'hydroxylation de la méphénytoïne.

(Nashville, E.U.) a exprimé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* deux P-450 de cette famille, les protéines MP4 (IIC9) et MP8 (IIC10), probablement issues de gènes alléliques, qui diffèrent par seulement 2 acides aminés. La protéine MP8 est fonctionnelle dans ce système d'expression et a une activité importante d'hydroxylation du tolbutamide mais pas de la méphénytoïne (Brian et al, 1989). Grâce à une collaboration avec F. Guengerich et Ph. Beaune (C.H.U. Necker, Paris), nous possédons ces deux levures et nous avons recherché une activité vis à vis de l'AT et du TAI dans leur fraction microsomale.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la réaction de fixation covalente *in vitro* des métabolites du TAI aux protéines microsomales hépatiques. Dans un premier temps, nous avons dosé les thiols des cystéines de la fraction microsomale et identifié les nucléophiles des protéines qui sont capables de réagir avec le sulfoxyde de TAI. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les propriétés chimiques des métabolites fixés aux protéines microsomales à celles des produits du piégeage du sulfoxyde de TAI par le mercaptoéthanol.

L'étude du métabolisme du TAI *in vivo* chez le rat est le fruit d'une collaboration avec Claudine Amar (URA 400, CNRS). Le travail sur les levures exprimant les P-450 IIC9 et IIC10 a été réalisé avec l'aide puis développé par Pilar Lopez (URA 400, CNRS). Les résultats de l'étude du métabolisme du TAI par les microsomes humains ont été obtenus dans le cadre du D.E.A. d'Eric Bonierbale.

PREMIERE PARTIE

RECHERCHE D'UNE S-OXYDATION MICROSOMALE DU TAI *IN VIVO* CHEZ LE RAT ET *IN VITRO* CHEZ L'HOMME

3.1. Mise en évidence d'une S-oxydation du TAI *in vivo* chez le rat.

Après la caractérisation des métabolites de piégeage *in vitro* du sulfoxyde de TAI par de la N-acétylcystéine (NAC), nous rechercherons ces acides mercapturiques dans les urines de rats recueillies après une administration unique de TAI.

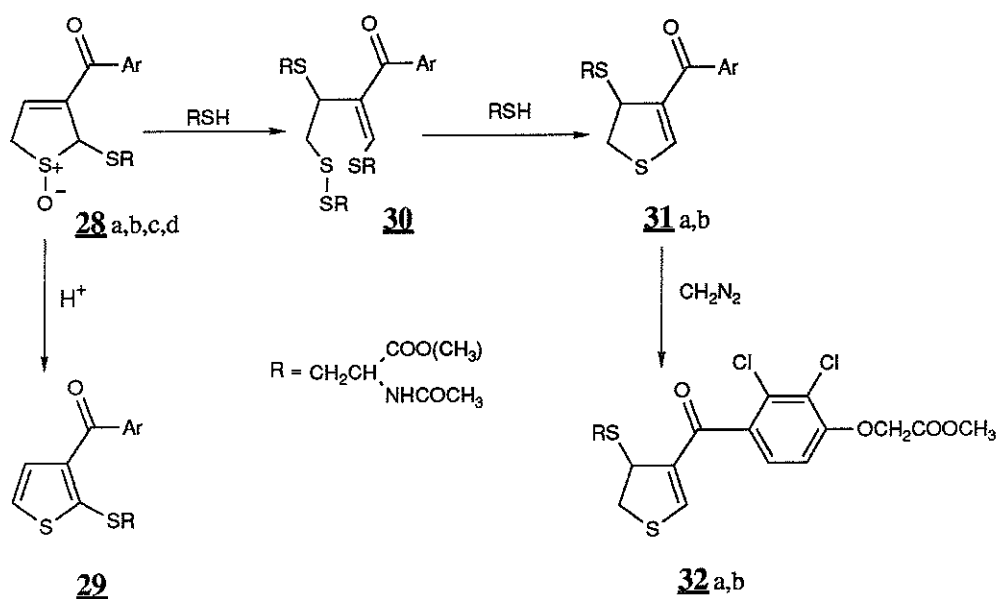
3.1.1. Etude du métabolisme de piégeage du TAI *in vitro* par la N-acétylcystéine.

L'étude des métabolites de piégeage par la N-acétylcystéine conduit à des résultats similaires à ceux obtenus avec le mercaptoéthanol. A la concentration de 100 μM en N-acétylcystéine, 4 métabolites diastéréoisomères **28_{a,b,c,d}** apparaissent sur l'éluogramme sous la forme de deux composés majoritaires et deux composés mineurs aux spectres d'absorption U.V. semblables à ceux des métabolites **13** et **14** (voir figure 3.1 et conditions d'incubation dans la partie expérimentale 6.2.1, p. 141). Leur structure de sulfoxyde de dihydrothiophène a été établie par leur propriété caractéristique de déshydratation en milieu acide (HCl 1N, 2 heures à 37°C, conditions expérimentales dans le paragraphe 6.2.1, p. 141). Le métabolite aromatique **29** obtenu présente en R.M.N.¹H les signaux attendus pour un TAI substitué en 2 sur le noyau thiophène par un résidu N-acétylcystéine (tableau 3.2) et une masse M de 491 en accord avec cette structure (m/z (NH_3) : 509 [50%, M + NH_4^+], 492 [100%, M + H^+]).

Avec 1 mM de N-acétylcystéine, un seul pic est présent sur l'éluogramme (temps de rétention de 12,5 min. en gradient H.P.L.C. A, figure 3.1) qui correspond probablement aux 2 diastéréoisomères **30** d'un métabolite ouvert substitué par 3 N-acétylcystéines (spectre d'absorption U.V. similaire à celui du métabolite **16**).

En présence de 5 mM de N-acétylcystéine un nouveau pic **31** apparaît sur l'éluogramme (temps de rétention de 16 min. en gradient H.P.L.C. A, figure 3.1) avec un spectre d'absorption U.V. superposable à celui de **15**. En fait ce pic présente un aspect dédoublé mais les métabolites correspondant, **31_a** et **31_b**, ne sont séparables par H.P.L.C. qu'après méthylation en **32_a** et **32_b** (voir conditions préparatives dans la partie expérimentale 6.2.1, p. 142). Les dérivés méthylés **32_a** et **32_b** purifiés ont en R.M.N.¹H les caractéristiques attendues pour deux 4,5-dihydrothiophènes substitués en 4 par une N-acétylcystéine avec un système de trois protons H₄-H_{5_{a,b}} couplés deux à deux comme dans le métabolite **15** (tableau 3.2) et un pic de masse à 522 (M + H^+) en accord avec la masse M attendue de 521 (tableau 3.3).

	28 _{a,b,c,d}	29	30	31 _{a,b}	32 _{a,b}
Temps rétention H.P.L.C A (min.)	13,7 et 13,9 14,1 et 14,3	16,5	12,5	16,0	11,5 et 13,0 (CH ₃ CN/H ₂ O 45/55 v/v)
λ_{max} (nm) (ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹))	284 289	{ 278 (11000) 358 (17000)	319	334 334	330 330



[NAC] au début de l'incubation	28 _{a,b,c,d}	30	31 _{a,b}	fixation covalente	métabolisme total
0	0*	0	0	15,6	59
100 μM	71	traces	traces	5,8	90
1 mM	6	62	2	2,3	90
5 mM	0	73	6	1,0	89
10 mM	0	68	8	0,7	86

* nmol/ml d'incubat

Tableau 3.1 Caractéristiques du métabolisme de piégeage du TAI par la N-acétylcystéine
(série d'incubations conduites en présence de différentes concentrations en N-acétylcystéine, P-450
CLO 1 μM , TAI 100 μM , incubation 20 min. à 37°C, voir partie expérimentale 6.2.1, p. 141).

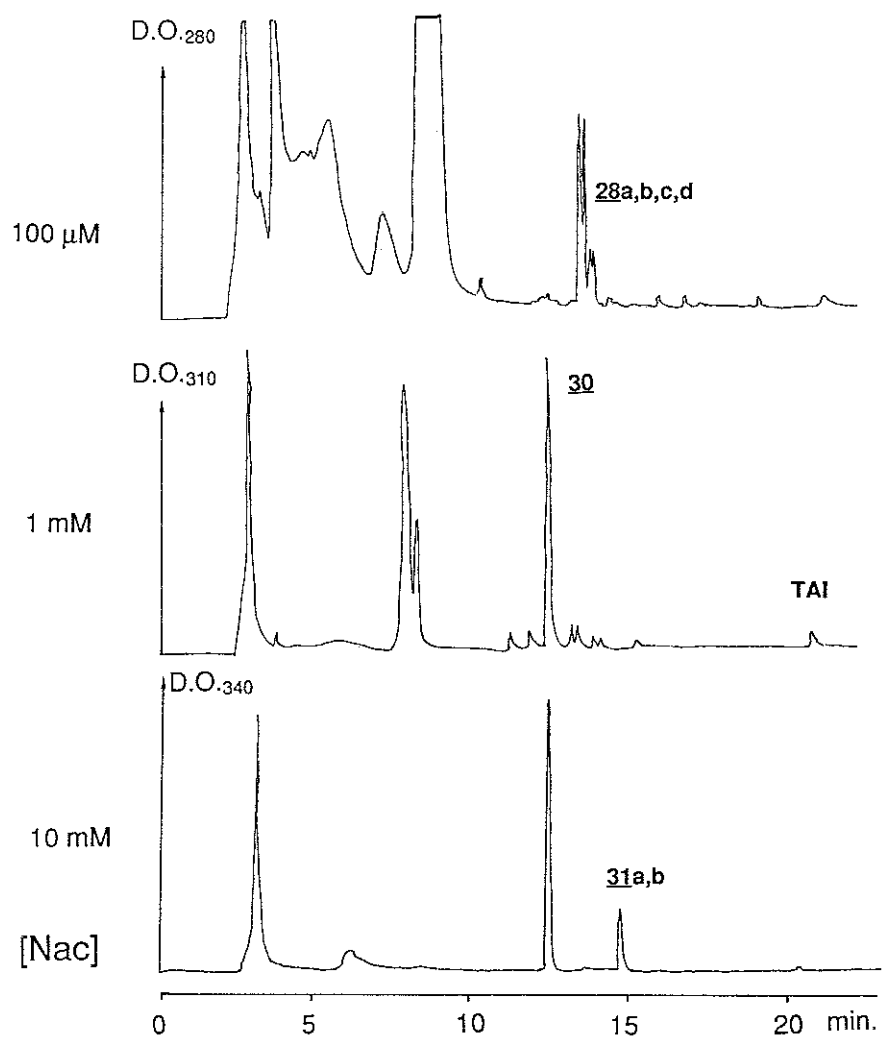


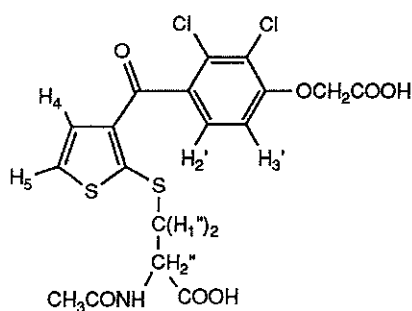
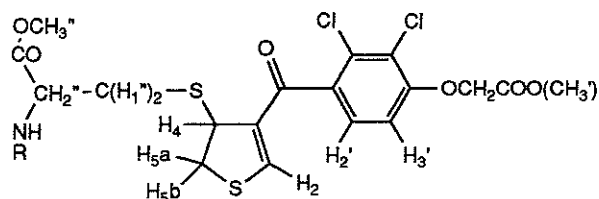
Figure 3.1 Eluogrammes d'incubations de TAI conduites en présence de microsomes CLO et de diverses concentrations en N-acétylcystéine (incubation 20 min. à 37°C, TAI 100 μM, P-450 CLO 1 μM, H.P.L.C. selon le gradient A).

Le piégeage du sulfoxyde de TAI réalisé par la N-acétylcystéine est donc identique à celui observé avec le mercaptoéthanol. L'ensemble des caractéristiques recueillies sur ce métabolisme est résumé dans le tableau 3.1. Les variations, en fonction de la concentration en N-acétylcystéine dans le milieu réactionnel, du métabolisme total, de la fixation covalente aux protéines microsomales et de la concentration en fin d'incubation des divers métabolites de piégeage se superposent à celles observées avec le mercaptoéthanol (voir figure 2.3, p. 32). Seule la dernière étape de transformation du métabolite **30** en **31** est plus lente, de l'ordre d'un facteur 15.

Tableau 3.2 Caractéristiques en R.M.N¹H. des métabolites **29**, **32a**, **32b** et **33**.

	H ₂ '	H ₃ '	OCH ₂	OCH ₃ '	OCH ₃ "	COCH ₃	NH
29 DMSO	7,28 d : 8,5	6,86 d : 8,5	4,32 s, 2H			1,83 s, 3H	7,60 * d ; 6
32a CD ₂ Cl ₂	7,18 d : 9	6,80 d : 9	4,78 s, 2H	3,80 s, 3H	3,78 s, 3H	2,00 s, 3H	6,48 dd : 5 - 2
32b CD ₂ Cl ₂	7,21 d : 9	6,81 d : 9	4,79 s, 2H	3,80 s, 3H	3,72 s, 3H	2,11 s, 3H	7,43 d : 10
33 CD ₂ Cl ₂	7,28 d : 8	6,81 d : 8	4,79 s, 2H	3,80 s, 3H	3,76 s, 3H		**

	H ₁ "	H ₂ "	H ₂	H ₄	H _{5a}	H _{5b}
29 DMSO	3,28 *** 3,51 ***	4,12 dd : 5-3		6,90 d : 4,5	7,34 d : 4,5	
32a CD ₂ Cl ₂	3,23 dd : 14-5 3,14 dd : 14-5	4,83 dd : 5-2	7,12 s	4,69 dd : 8-1,5	3,94 dd : 13-8	3,45 dd : 13-1,5
32b CD ₂ Cl ₂	3,27 dd : 15-5 3,01 dd : 14-5	5,02 dt : 10-5	7,17 s	4,70 dd : 8-1	3,95 dd : 13-8	3,48 dd : 13-1
33 CD ₂ Cl ₂	3,04 dd : 14-5 3,13 dd : 14-5	4,54 **** t : 5	7,20 s	4,89 dd : 8-1,5	3,96 dd : 13-8	3,51 dd : 13-1,5

**29**R = COCH₃ **32a** et **32b**R = H **33**

δ en p.p.m./Si(CH₃)₄, J en Hz, s = singulet, d = doublet, t = triplet, dt = doublet de triplets.

* échangeable avec un deutérium de l'eau lourde,

** NH₂ sous le pic de l'eau à 1,55 p.p.m., l'irradiation de ce pic voit les signaux des H₂' s'affiner par perte d'une petite constante de couplage en ⁴j de l'ordre de 1 Hz,

*** 2 protons H₁" situés de part et d'autre de la base du pic de l'eau et vus par irradiations sélectives de chaque côté du pic de l'eau ; il s'agit probablement de 2 doublets de doublets,

**** massif 1H prenant l'aspect d'un triplet après échange des NH₂ dans l'eau lourde.

Tableau 3.3 Comparaison des spectres de masse des métabolites 32a et 32b avec ceux des métabolites I et II (en ionisation chimique (NH₃)).

Pics observés	32a	I	32b	II
539	0,25 *	0	4	3
522	4	3	35	20
362	10	5	5	40
345	100	80	80	90
178			100	100
Masse proposée	521	521	521	521

* en % du pic de base (100%),

3.1.2. Recherche de dérivés mercapturiques dans les urines de rats.

Traitement des rats - Deux rats mâles Sprague-Dawley reçoivent une injection intrapéritonéale d'une solution de TAI à la dose de 30 mg/kg (0,1 µCi/µmol chez l'un des deux). Les urines sont recueillies pendant 24 heures avant sacrifice. 20% de la dose injectée sont récupérés dans les urines avec un pic d'excrétion maximale entre 2 et 4 heures (voir figure 3.2 et partie expérimentale 6.2.2, p. 142).

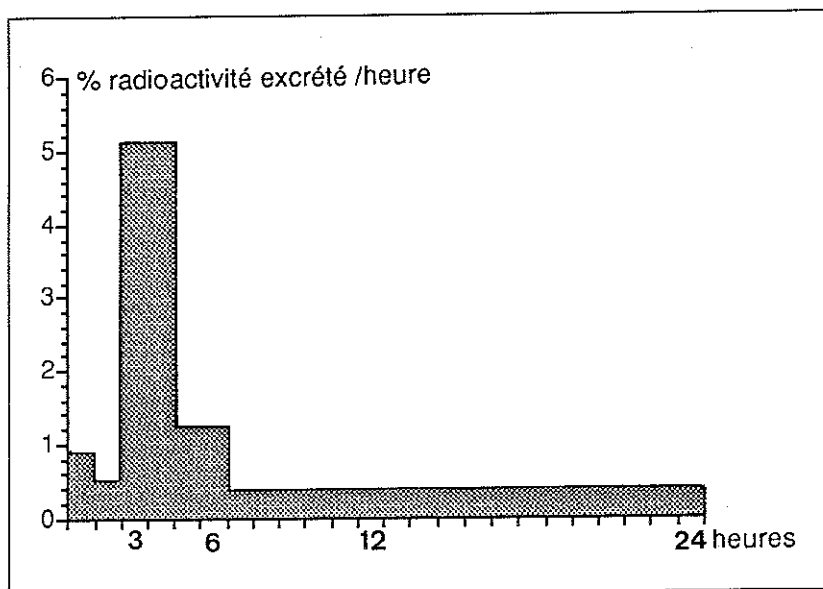


Figure 3.2 Elimination urinaire de la radioactivité consécutive à une injection i.p. de TAI radioactif chez le rat Sprague-Dawley (exprimée en % de la dose totale injectée excrétée et ramenée à un taux horaire moyen).

Extraction par Sep-pack - Chaque fraction est purifiée par passage sur un système Sep-pack, la radioactivité est retrouvée sans perte dans cette nouvelle fraction (partie expérimentale 6.2.2, p. 142). Un aliquot de la fraction 2-4 heures contenant le pic de radioactivité est étudié par H.P.L.C. selon la méthode de gradient A (figure 3.3) ; la fraction issue des urines du rat n'ayant pas reçu de TAI radioactif donne un éluogramme similaire. Quatre pics de radioactivité sont individualisables sur le radiochromatogramme dont un pic de TAI non métabolisé comptant pour 25% et un pic de temps de

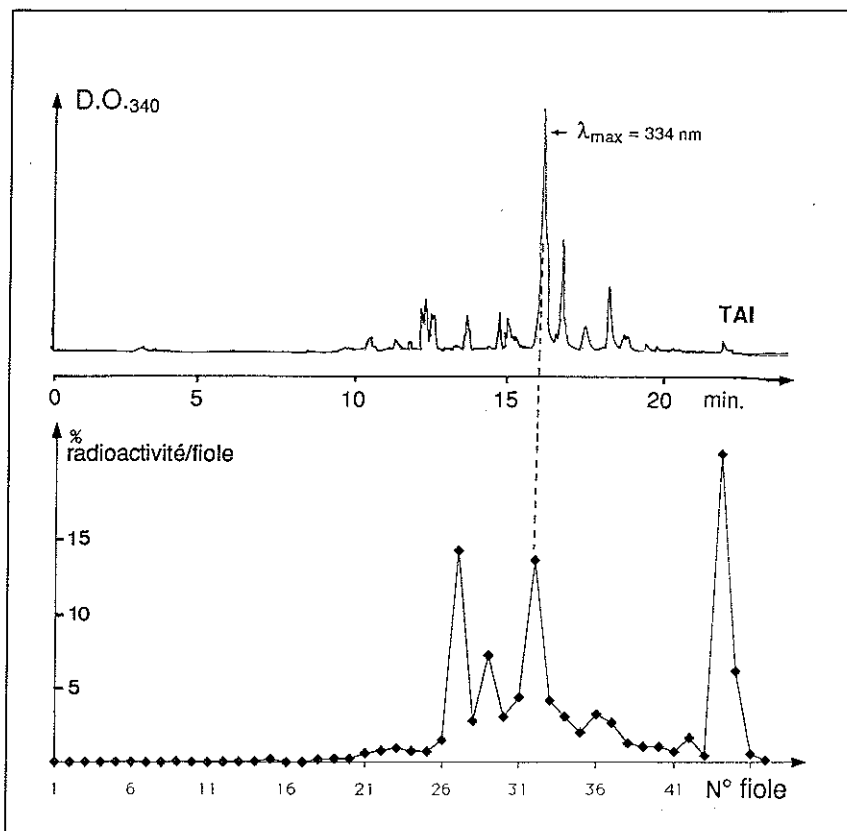


Figure 3.3 Analyse de la fraction 2-4 heures par H.P.L.C. Elugramme avec détection à 340 nm (en haut) et radiochromatogramme correspondant (en bas) avec en ordonné le % de la radioactivité de l'ensemble de la fraction 2-4 heures pour chaque collection de 30 s.

rétenion (16 min.) et d'absorption U.V. (λ_{\max} 334 nm) identiques à ceux des métabolites finaux **31_a** et **31_b** de piégeage par la N-acétylcystéine.

Extraction et méthylation - Les éluats des Sep-pack sont rassemblés et le méthanol évaporé sous flux d'azote. Le résidu est repris par un peu d'eau puis acidifié à pH 1 au moyen d'HCl. Les métabolites sont alors extraits par de l'acétate d'éthyle. 8% de la radioactivité ne sont pas extractibles par cette méthode mais un contrôle par H.P.L.C. montre que le pic absorbant à 334 nm se retrouve dans la phase organique. Cette phase est alors méthylée au diazométhane et les métabolites obtenus étudiés par H.P.L.C. en conditions isocratiques 45 ou 50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ v/v.

Résultats de l'étude H.P.L.C. - Sur l'élugramme et le radiochromatogramme de la figure 3.4, cinq pics apparaissent entre 5 et 20 min. qui sont successivement le métabolite **I** de temps de rétenion et d'absorption U.V. identiques à ceux du métabolite de piégeage **31_a** (7% de la fraction méthylée), le métabolite **II** avec les mêmes remarques vis à vis du métabolite **31_b** (4%), le métabolite **III** immédiatement après, de même chromophore U.V. (6%), un métabolite **IV** inconnu à 13 min. absorbant à 303 nm (5%) et enfin le TAI non-métabolisé méthylé (35%). Avec détection à 280 nm, l'élugramme ne montre pas de contamination de ces métabolites par d'autres composés.

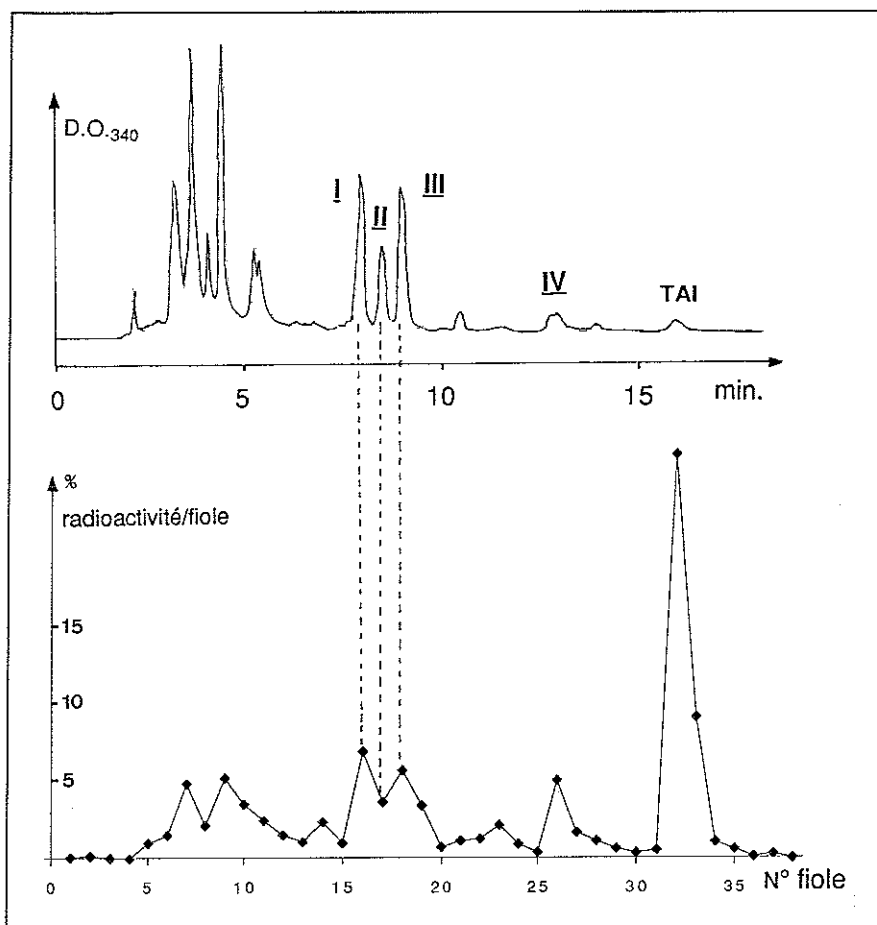


Figure 3.4 Analyse par H.P.L.C. des métabolites extraits des urines de rat par Sep-Pack puis par l'acétate d'éthyle et méthylés. Elugramme avec détection à 340 nm et radiochromatogramme correspondant (exprimé en % de la radioactivité totale de la fraction méthylée par collection de 30 s), chromatographie en conditions isocratiques ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ v/v).

Etude du métabolite I - Ce métabolite a été purifié par H.P.L.C. préparative (mêmes conditions que l'analytique) puis étudié en R.M.N.¹H en solution dans le dichlorométhane deutérié et en spectroscopie de masse. Il possède les mêmes caractéristiques d'absorption U.V., le même temps de rétention en H.P.L.C., des signaux R.M.N. superposables (malgré la présence d'impuretés probablement issues des urines donnant des signaux à haut-champ) (tableau 3.2 et figure 3.5) et un même spectre de masse (tableau 3.3) que le métabolite **32_a**. Le métabolite final de piégeage du sulfoxyde de TAI par la N-acétylcystéine est donc retrouvé dans les urines d'un rat ayant reçu une injection de TAI. Ce métabolite représente 1,3% de la dose totale injectée, 6,5% de la radioactivité excrétée par les urines et 9,6% des métabolites urinaires.

Etude du métabolite II - Des résultats identiques sont obtenus ; la R.M.N.¹H est toutefois de mauvaise qualité car les quantités disponibles sont faibles mais indiscutablement les signaux du métabolites **32_b** sont présents. Le métabolite final de piégeage par la N-acétylcystéine **32_b** est retrouvé dans les urines d'un rat traité par le TAI. Ce métabolite représente 0,75% de la dose totale injectée, 3,6% de la radioactivité excrétée par les urines et 5,4% des métabolites urinaires.

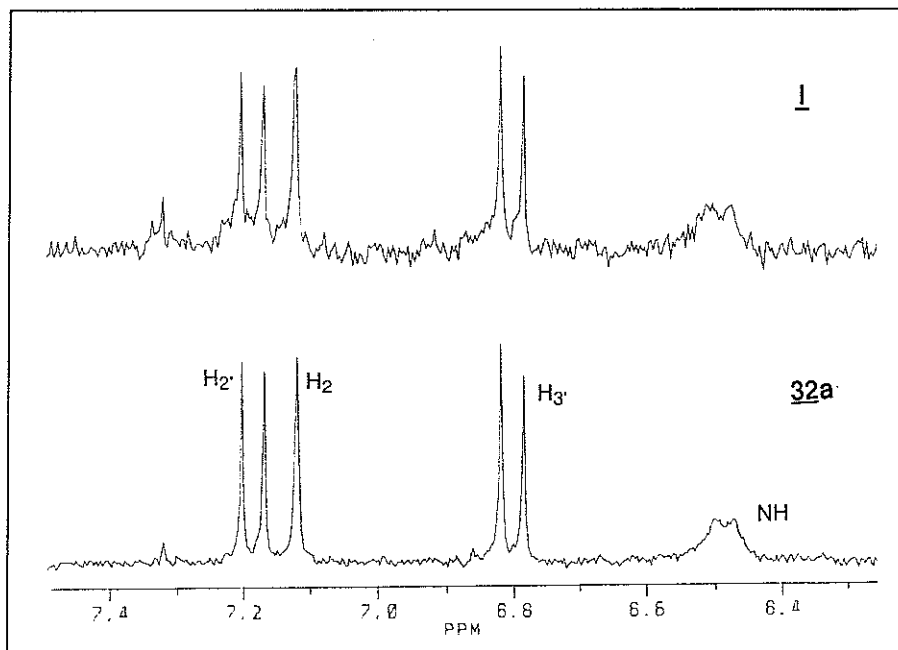


Figure 3.5 Comparaison des spectres R.M.N.¹H des métabolites **32a** et **I** en solution dans le dichlorométhane deutérié sur la partie à bas-champ du spectre.

Etude du métabolite III (33) - L'étude en R.M.N.¹H indique une structure de 4,5-dihydrothiophène substitué en 4 par un thioéther qui était déjà suggérée par son spectre d'absorption U.V., identique à celui des deux autres métabolites **I** et **II**. Tous les signaux attendus pour une N-acétylcystéine sont présents sauf le singulet de l'acétyl. Inversement, les signaux de plusieurs protons échangeables avec les deutériums de l'eau lourde et couplés avec le proton H₁' sont situés sous le massif du pic de l'eau, vers 1,55 p.p.m. Ces données sont en accord avec un métabolite substitué par une cystéine n'ayant pas subi l'action de la N-acétyl-transférase (voir tableau 3.2, p. 88 et figure 1.12, p. 14). Ce métabolite s'est révélé peu stable sous forme non-protonée en se transformant rapidement en TAI. Le métabolite **33** représente 1,1% de la dose totale injectée, 5,5% de la radioactivité excrétée par les urines et 8,1% des métabolites urinaires.

3.1.3. Conclusion.

In vitro, la N-acétylcystéine réalise un piégeage du sulfoxyde de TAI, issu de la métabolisation du TAI par les microsomes de rat, identique à celui obtenu avec le mercaptoéthanol. La présence d'un carbone asymétrique supplémentaire entraîne un dédoublement diastéréoisomérique : 4 sulfoxydes de dihydrothiophène, un seul produit d'aromatisation et deux diastéréoisomères finaux de transformation en présence du thiol. Nous n'avons pas établi la structure du métabolite intermédiaire **30** à trois N-acétylcystéines mais nous pouvons supposer sa nature grâce aux éléments suivants : 1) il existe un intermédiaire réactionnel entre les métabolites primaires de piégeage **28**_{a,b,c,d} et les métabolites finaux **31**_{a,b} qui occupe la même position que le métabolite **16** dans le schéma réactionnel de transformation des métabolites de piégeage par le mercaptoéthanol et 2) son spectre d'absorption U.V. indique la présence d'un chromophore identique à celui du métabolite **16**. La réduction de ce

métabolite en métabolite final **31** par la N-acétylcystéine est environ 15 fois plus lente que la réduction du métabolite **16** par le mercaptoéthanol. Ce fait peut être interprété en terme d'encombrement stérique plus important autour du soufre de la N-acétylcystéine.

In vivo chez le rat, 20% d'une dose de TAI (30 mg/kg) administrée par voie i.p. sont retrouvés dans les urines de 24 heures. 14% sont éliminés rapidement sous la forme d'un pic d'excrétion maximale environ 160 min. après l'injection. Un tiers de cette excrétion se fait sous forme de TAI non-métabolisé, on note la présence d'un pic de radioactivité de même temps de rétention et d'absorption U.V. que les métabolites finaux de piégeage par la N-acétylcystéine. Ce pic est extrait en milieu acide et après méthylation, il se sépare par H.P.L.C. en 3 composés possédant le chromophore recherché. Les deux premiers correspondent aux deux métabolites finaux **32_{a,b}** de piégeage par la N-acétylcystéine, le troisième n'est pas N-acétylé. Ces trois métabolites représentent 23% des métabolites urinaires du TAI. Le TAI est donc métabolisé, du moins en partie, en sulfoxyde de thiophène *in vivo* chez le rat. Ce sulfoxyde est piégé par le glutathion et les métabolites primaires de piégeage subissent l'ensemble des transformations chimiques qui ont été mises en évidence avec le mercaptoéthanol. Il est probable qu'une grande partie des métabolites dérivés de ces transformations est éliminée avec les fèces. En comparant les données recueillies *in vivo* et *in vitro*, la S-oxydation du TAI *in vivo* pourrait représenter plus que les 5,2% de la dose injectée retrouvés dans les urines. Le dérivé 5-hydroxylé **6** de l'acide tiénilique, excrété dans les mêmes conditions (Mansuy et al, 1984), représente 32% de la dose totale injectée chez le rat ; hors, ce sont les mêmes cytochromes P-450 qui métabolisent le TAI et l'AT et *in vitro* l'oxydation du TAI est plus importante que celle de l'AT pour une même quantité de P-450.

3.2. Etude du métabolisme du TAI avec des microsomes hépatiques humains.

Notre motivation a été de montrer que l'oxydation du TAI catalysée par les microsomes hépatiques humains est une S-oxydation comme avec les microsomes de rat. Nous avons recherché ce métabolisme avec des microsomes hépatiques provenant d'un seul individu.

3.2.1. Méthode d'étude.

Origine du foie humain SP1 - Un fragment de foie immédiatement congelé dans l'azote liquide a été prélevé sur un homme de 53 ans décédé accidentellement et dont le foie était récusé pour la greffe hépatique.

Préparation de la fraction microsomale du foie humain SP1 - Le protocole est identique à celui utilisé pour préparer les microsomes de rat (voir partie expérimentale 6.1.2, p. 135) à part un broyage à l'Ultra-Turrax avant l'homogénéisation par l'appareil de Potter-Elvehjem. Les caractéristiques des ces microsomes sont P-450 0,17 nmol/mg protéines et cytochrome b5 0,084 nmol/mg protéines.

Réalisation et analyse des incubations - Le protocole employé pour ces incubations, leurs analyses par H.P.L.C., la réalisation des radiochromatogrammes ainsi que la mesure du taux de fixation covalente aux protéines microsomales sont identiques aux

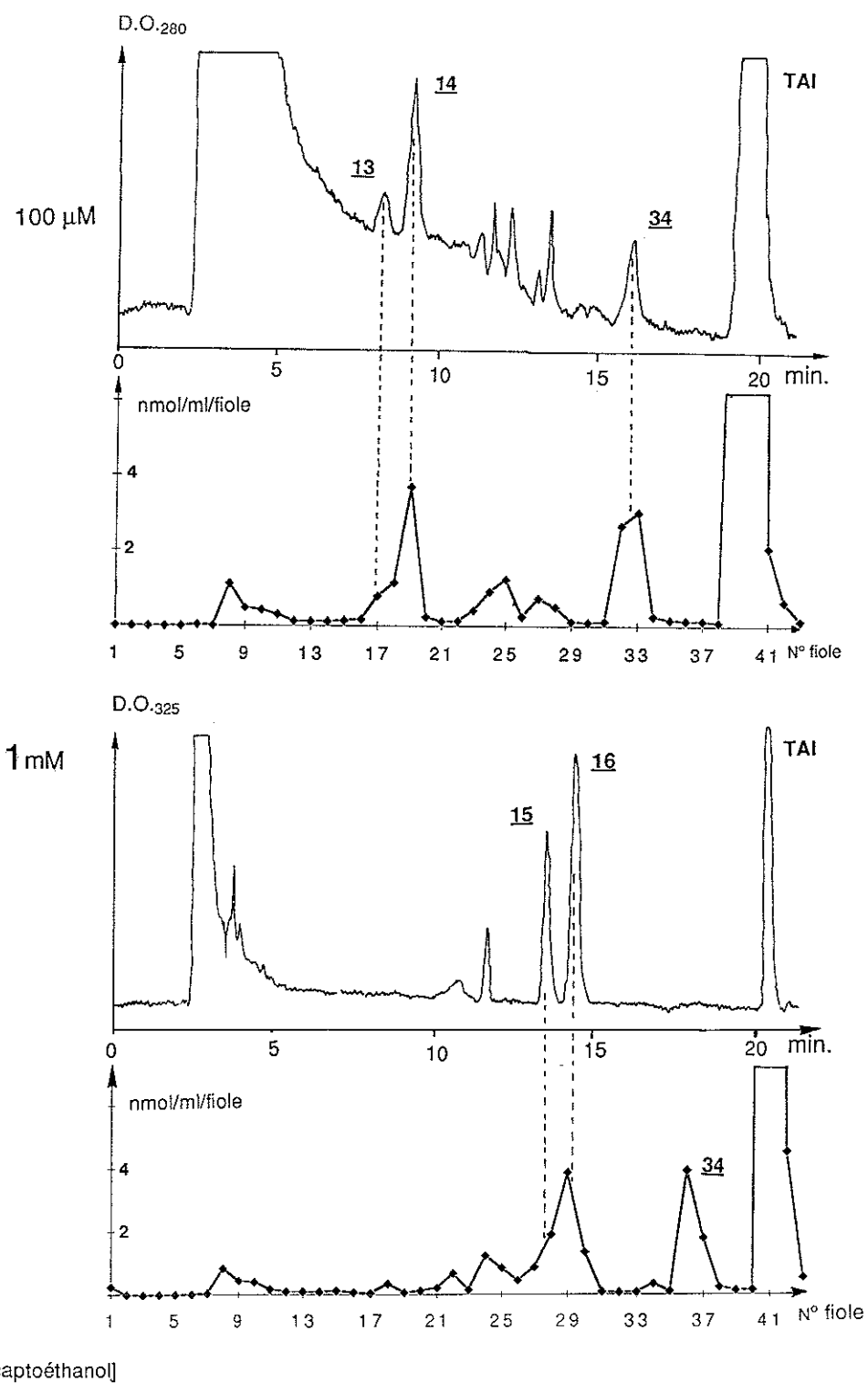


Figure 3.6 Analyse par H.P.L.C. d'incubations de TAI en présence de microsomes SP1 et de différentes concentrations de mercaptoéthanol (TAI 100 μM, P-450 SP1 0,4 μM, mercaptoéthanol 100 μM et 1 mM, incubation 20 min. à 37°C).

Tableau 3.4 Métabolisme du TAI en présence de microsomes SP1 et de mercaptoéthanol (TAI 100 μ M, P-450 SP1 0,4 μ M, incubation 20 min. à 37°C).

[mercaptoéthanol]	13	14	16	15	34	fixation covalente	métabolisme total
0	0*	0	0	0	5,8	3,8	9,6
100 μ M	1,1	4,5	0	0	5,6	1,3	12,5
1 mM	0	0	5,2	2,8	5,7	0,5	14,2
5 mM	0	0	1,3	5,6	5,4	0,3	12,6

* nmol/ml d'incubat

méthodes utilisées pour les microsomes de rat (partie expérimentale 6.1.4 à 6, p. 138). Nous avons utilisé une concentration plus faible en P-450, de 0,4 μ M, par souci d'économie de ces microsomes. Les expériences d'inhibition par les anticorps anti-LKM2 sont conduites selon le protocole décrit par Catherine Pons (Pons, 1989) : différents volumes des sérums (0, 20 et 50 μ l de sérum/nmol de P-450) ont été préincubés 20 min. à 4°C en présence de microsomes SP1 (P-450 0,4 μ M) et de TAI (100 μ M) pour un volume final de 150 μ l. Après addition de mercaptoéthanol (5 mM), le milieu réactionnel a été préincubé 3 min. à 37°C puis la réaction amorcée par l'addition du système générateur de NADPH. Au bout de 20 min., les échantillons H.P.L.C. ont été préparés selon le protocole décrit pour les microsomes de rat (partie expérimentale 6.1.5, p. 138).

3.2.2. Métabolisme du TAI en présence de microsomes SP1.

Métabolisme en absence de mercaptoéthanol - Le TAI (100 μ M, 25 μ Ci/ μ mol) est incubé 20 min. à 37°C en présence de microsomes SP1 (P-450 0,4 μ M). A coté d'une importante réaction de fixation covalente aux protéines microsomales (2,4 \pm 0,7 nmol/mg/20 min.) et de nombreux métabolites solubles non-caractérisables (métabolisme total de 4,8 \pm 1 nmol/mg/20 min.), un nouveau métabolite **34** est présent, immédiatement avant le TAI sur les chromatogrammes, absorbant peu dans l'U.V. (λ_{max} 280 nm). Ce métabolite représente 2,4 \pm 0,3 nmol/mg/20 min., soit la moitié du métabolisme total (figure 3.6 et tableau 3.4).

Métabolisme en présence de mercaptoéthanol - Au fur et à mesure que l'on augmente la concentration du mercaptoéthanol dans le milieu réactionnel, des métabolites de piégeage de mêmes temps de rétention et de mêmes spectres d'absorption U.V. que les métabolites étudiés *in vitro* avec les microsomes de rat apparaissent. La fixation covalente aux protéines microsomales est fortement inhibé tandis que le métabolisme total augmente (5,4 \pm 0,6 nmol/mg/20 min. avec mercaptoéthanol 5 mM) (tableau 3.4 et figure 3.6).

Comparaison du métabolite **34** avec l'alcool obtenu par réduction de la fonction cétone du TAI - Le métabolite **34** est issu d'une réduction de la cétone du TAI en alcool. En effet, ces deux composés présentent un même spectre d'absorption U.V., un temps de rétention en H.P.L.C. et une masse (en ionisation chimique (NH₃)) identiques ainsi que des spectres en R.M.N.¹H analogues (voir partie expérimentale 6.2.3, p. 142). La nature de ce nouveau métabolite nous a été suggérée par son caractère peu polaire, absorbant peu dans l'U.V. et par l'existence chez l'homme et le chien d'un métabolisme de l'AT similaire (Mansuy et al, 1984).

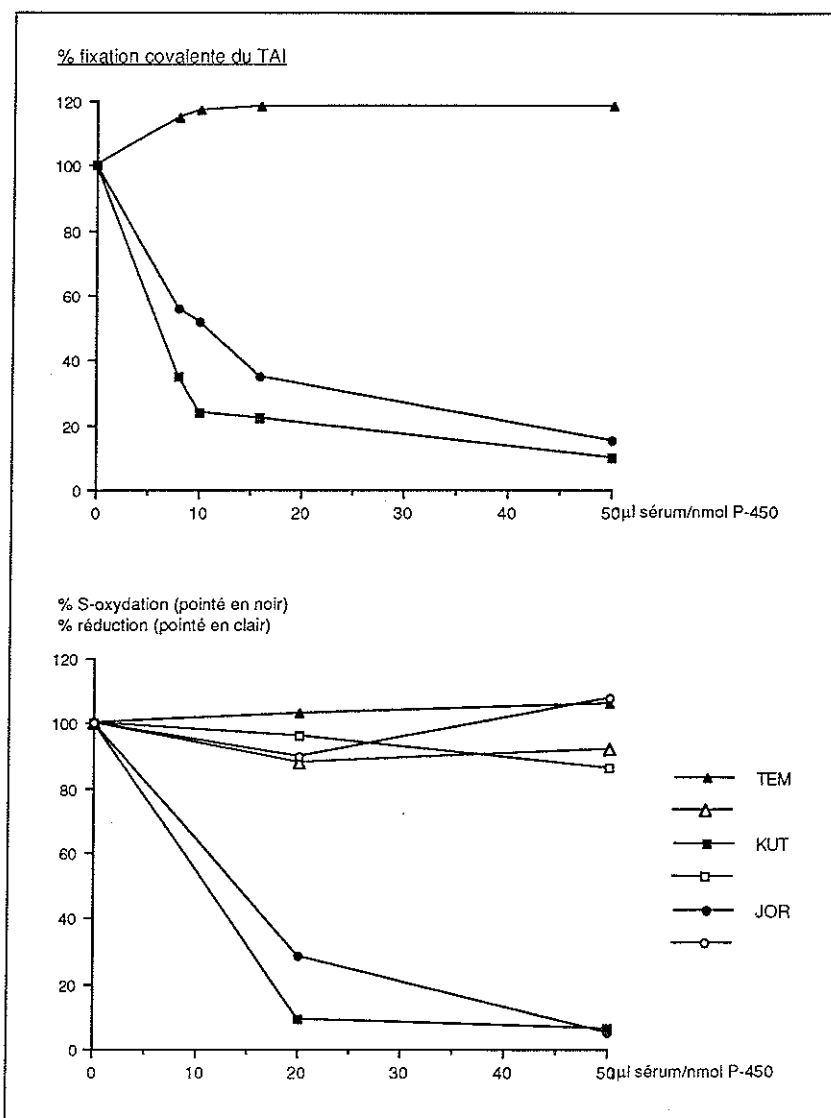


Figure 3.7 Inhibition par les anticorps anti-LKM2 de la S-oxydation du TAI catalysée par les microsomes humains mise en évidence sur la réaction de fixation covalente aux protéines microsomiales (microsomes H97, Pons 1989, en haut) et sur la formation des métabolites de piégeage **16 et **15** en présence de mercaptoéthanol 5 mM (microsomes SP1, en bas).**

3.2.3. Inhibition de la S-oxydation du TAI par les anticorps anti-LKM2.

Nous avons testé deux sérums contenant des anticorps anti-LKM2 (KUT et JOR) ainsi qu'un sérum témoin (TEM). L'utilisation d'une forte concentration de mercaptoéthanol au cours des incubations nous a permis de mesurer la partie du métabolisme provenant de la S-oxydation du TAI par simple dosage des métabolites de piégeage **16** et **15**. Après chromatographie par H.P.L.C. selon le gradient A, ces métabolites ont été dosés par intégration de l'absorption à 325 nm de leur pic commun et le pourcentage d'inhibition calculé par rapport aux résultats obtenus sur l'incubation ne contenant aucun sérum. Un traitement identique a été effectué pour le métabolite réduit **34** par intégration à 280 nm de son pic sur l'éluogramme.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 3.7 et comparés à ceux obtenus par Catherine Pons qui avait effectué des inhibitions analogues en

mesurant seulement le taux de fixation covalente aux protéines microsomales au cours d'incubations en absence de thiol (microsomes H97 P-450 1,33 μM , TAI 100 μM , volume d'incubation 150 μl , incubation 20 min. à 37°C, Pons, 1989). De même que pour la réaction de fixation covalente, la formation des métabolites de piégeage est spécifiquement inhibée à plus de 90% par les anticorps anti-LKM2 (aucune inhibition par le sérum témoin). Il n'y a pas d'inhibition de la formation du métabolite réduit **34**.

3.2.4. Conclusion.

La métabolisation du TAI par les microsomes hépatiques humains se fait selon deux voies métaboliques catalysées par des enzymes différentes. Une voie réductrice conduit à une réduction de la cétone du TAI en alcool. Cette réaction n'est pas inhibée par les anticorps anti-LKM2 et représente la moitié du métabolisme sur le lot de microsomes étudié. Une voie oxydative conduit à une activation métabolique responsable d'une importante fixation covalente aux protéines microsomales et est inhibée par les anticorps anti-LKM2. Nous savons que cette activité est sous la dépendance des cytochromes P-450 de la famille IIC qui hydroxylent également l'AT en position 5 (Pons, 1989, Dansette et al, 1991). En présence de différentes concentrations de mercaptoéthanol, nous retrouvons, aux dépens de la fixation covalente aux protéines microsomales et pour des concentrations du thiol équivalentes, la succession des métabolites de piégeage constatée *in vitro* chez le rat. Les anticorps anti-LKM2 inhibent la formation de ces métabolites. Nous pouvons conclure que l'activation métabolique du TAI est réalisée *in vitro* par les cytochromes P-450 humains de la sous-famille IIC et implique une oxydation au niveau du soufre avec formation d'un sulfoxyde de thiophène.

3.3. Etude préliminaire de la S-Oxydation du TAI et de la 5-hydroxylation de l'AT par des levures exprimant les P-450 IIC9 et IIC10.

Deux souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* qui contiennent le plasmide pAAH5 portant soit le gène de la protéine MP4 (cyp 2C9), soit celui de la protéine MP8 (cyp 2C10) sous la dépendance du promoteur de l'alcool déshydrogénase, ainsi qu'une levure témoin ne possédant que le vecteur seul, nous ont été données par F.P. Guengerich (Nashville, E.U.) et Ph. Beaune (C.H.U. Necker, Paris). Après avoir reproduit la culture des cellules et la préparation de la fraction des microsomes, nous avons recherché une activité de 5-hydroxylation de l'AT et de S-oxydation du TAI.

3.3.1. Cultures des cellules, préparation de la fraction microsomale et réalisation des incubats.

Il s'agit de souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* D12, anaérobies et auxotrophes pour la leucine. La composition des milieux de culture, les conditions de culture ainsi que la conservation des souches sont décrites dans la partie expérimentale 6.2.4 (p. 144). La préparation de la fraction microsomale et le dosage des cytochromes P-450 sur cellules entières sont réalisés selon les protocoles décrits par Oeda (Oeda et al, 1985) (partie expérimentale 6.2.4, p. 144). Le dosage du P-450 de la fraction microsomale est identique à celui utilisé pour les microsomes de rat (partie expérimentale 6.1.3, p. 136).

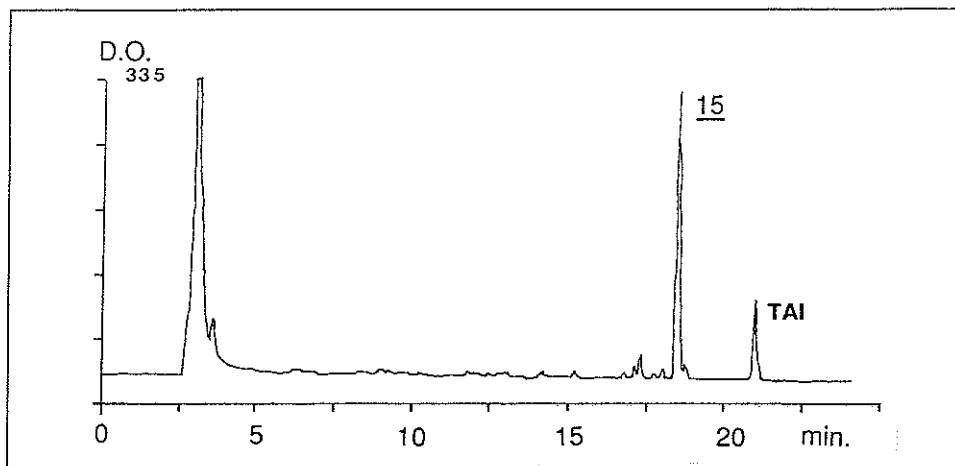


Figure 3.8 Analyse par H.P.L.C. d'une incubation de TAI avec des microsomes de la levure exprimant le P-450 MP8 en présence de mercaptoéthanol 5 mM (gradient H.P.L.C. A, élugramme avec détection à 310 nm, TAI 100 μ M, P-450 MP8 0,2 μ M, mercaptoéthanol 5 mM, 60 min. à 37°C).

A l'arrêt des cultures, la quantité en P-450 est de l'ordre de 80 pmol/10⁹ cellules. Les préparations microsomales ont une quantité de P-450 de 0,05 \pm 0,01 nmol/mg de protéines. Le rendement de purification est de 40 \pm 10%. Les microsomes issus des levures témoins ne montrent pas de pic d'absorption à 450 nm en présence de CO.

Réalisation et analyse des incubations - Le protocole des incubations est identique à celui utilisé pour les microsomes de rat. Les microsomes sont utilisés à la concentration en P-450 de 0,2 μ M (ou une quantité égale de protéines pour les microsomes issus des levures témoins). Du glycérol est également présent (10% en volume) avec pour effet une augmentation des activités obtenues, probablement par stabilisation des membranes microsomales des levures à 37°C (P. Lopez et al, publication en préparation). La durée de l'incubation est de 10 min. Les expériences d'inhibition par les anticorps anti-LKM2 ont été conduites selon le protocole décrit par Catherine Pons (Pons, 1989). Pour les incubations en présence d'AT (100 μ M), du GSH est présent à la concentration de 5 mM. La forte turbidité des suspensions microsomales de levure nous a empêché de mesurer la 5-hydroxylation de l'AT directement en U.V. selon la méthode d'E. Neau (Neau et al, 1990). Nous avons donc développé un nouveau test qui repose sur un dosage du dérivé **6** en fin d'incubation par spectroscopie d'absorption U.V. après précipitation des protéines et destruction du NADPH (partie expérimentale 6.2.4, p. 145). Pour les incubations en présence de TAI (100 μ M), différentes concentrations en mercaptoéthanol ont été employées ; la préparation des échantillons H.P.L.C ainsi que leur analyse et la mesure de la fixation covalente aux protéines microsomales sont identiques aux méthodes décrites pour les microsomes de rat (partie expérimentale 6.1.4 à 6, p. 138).

3.3.2. Mise en évidence d'une 5-hydroxylation de l'AT et d'une réaction de fixation covalente du TAI aux protéines microsomales.

Les incubations d'AT avec les microsomes de levure contenant les P-450 MP4 ou MP8 montrent l'apparition d'un pic d'absorption à 390 nm dépendant de la présence du système générateur de NADPH et de celle des P-450 (absence de ce pic en l'absence du système générateur ou en présence de microsomes de levure témoin). Ce pic

en rapport avec une formation de dérivé **6** et donc à une 5-hydroxylation de l'AT (Neau et al, 1990). Il n'y a pas de différence significative entre les activités des P-450 MP4 ($20,2 \pm 0,2$ nmol **6**/nmol P-450/10 min.) et MP8 ($20,4 \pm 3,1$ nmol **6**/nmol P-450/10 min.). De la même manière, le TAI est métabolisé sous la forme d'une importante réaction de fixation covalente aux protéines microsomales (MP4 : $23,7 \pm 9,4$ nmol/nmol P-450/10 min. et MP8 : $25,3 \pm 9,4$ nmol/nmol P-450/10 min.).

Inhibition par les anticorps anti-LKM2 - L'effet des anticorps anti-LKM2 est une inhibition de l'activité de 5-hydroxylation de l'AT des deux P-450, MP4 et MP8. Cet effet atteint un plateau avec 20 μ l sérum/nmol de P-450 pour le sérum KUT qui donne une inhibition maximale de 90% de la 5-hydroxylation de l'AT et avec 50 μ l sérum/nmol de P-450 pour le sérum de JOR dont l'inhibition maximale de 80% est légèrement plus faible. Il n'y a pas d'inhibition en présence de sérum témoin.

3.3.3. Mise en évidence d'une S-oxydation du TAI.

Nous avons recherché un piégeage par le mercaptoéthanol de l'entité réactive du TAI responsable de la fixation covalente aux protéines microsomales. A la concentration de mercaptoéthanol 100 μ M, ni l'élugramme ni le radiochromatogramme ne sont modifiés par rapport à ceux d'une incubation témoin sans thiol. En présence de 5 mM de mercaptoéthanol, la fixation covalente s'effondre et les métabolites de piégeage **15** et **16** apparaissent sur l'élugramme (**15** majoritaire pour une durée de l'incubation de 60 min., figure 3.8).

3.3.4. Conclusion.

Les P-450 IIC9 et IIC10 que l'on sait fonctionnels dans ce système d'expression ont une activité vis à vis de l'AT et du TAI. Ces activités sont identiques à celles qui dépendent des cytochromes P-450 dans les microsomes humains, c'est à dire 5-hydroxylation de l'AT et réaction de fixation covalente aux protéines microsomales pour le TAI. Il n'y a pas de différence significative entre les activités des protéines MP4 et MP8 comme le suggérait la très forte homologie de leur séquence d'acides aminés. L'oxydation du TAI se fait au niveau du soufre comme le prouve l'apparition des métabolites de piégeage **16** et **15** en présence de mercaptoéthanol 5 mM. Toutefois, nous n'avons pas observé les métabolites primaires **13** et **14** avec, dans le milieu d'incubation, du mercaptoéthanol à la concentration de 100 μ M. La faible concentration des P-450 dans les préparations microsomales obtenues à partir de ces levures recombinées nous a obligé à réaliser des incubations contenant une forte concentration de protéines. Le dosage des thiols libres protéiques par le réactif d'Ellman (partie expérimentale 6.2.4, p. 144) trouve une concentration de 50 nmol de SH libres/mg protéines microsomales. Dans les conditions d'incubation employées (0,2 μ M P-450, 4 mg protéines/ml), la concentration en cystéines libres est donc de l'ordre de 200 μ M. Avec une concentration de 100 μ M, le mercaptoéthanol est en quantité moindre que celle des thiols protéiques, les métabolites **13** et **14** ne peuvent alors se former et la fixation aux protéines reste prépondérante. Avec une concentration de 5 mM, le mercaptoéthanol est en quantité suffisante pour réaliser le piégeage du sulfoxyde de TAI et les métabolites **15** et **16** apparaissent.

3.4. Discussion.

Que ce soit avec des microsomes hépatiques humains ou de rat, le TAI est capable de se fixer de façon covalente aux protéines (voir introduction). En présence de mercaptoéthanol à différentes concentrations dans les milieux d'incubation, nous observons une succession de métabolites aux propriétés caractéristiques dont les structures ont été établies dans le chapitre précédent. L'entité réactive mise en jeu dans ces deux types de microsomes est donc le sulfoxyde de TAI qui se fixe sur les protéines en l'absence de mercaptoéthanol ou est piégé sous forme de sulfoxyde de dihydrothiophène en sa présence.

L'étude du piégeage de ce sulfoxyde par la N-acétylcystéine met en évidence des métabolites de structures analogues. La détection, dans les urines de rats ayant reçu du TAI, du métabolite final de piégeage par la N-acétylcystéine nous permet d'affirmer qu'un piégeage de sulfoxyde de TAI par le glutathion se produit *in vivo*, probablement au niveau du foie. Ce résultat nous indique que l'activation métabolique du TAI *in vivo* chez le rat est une formation de sulfoxyde de TAI ; il nous permet également d'expliquer la déplétion en glutathion intrahépatique que l'on observe au cours d'une administration de fortes doses de TAI.

L'activité enzymatique des cytochromes P-450 qui conduit à la formation de sulfoxyde de TAI est une S-oxydation. Ce résultat, observé avec les microsomes de rat dans le chapitre précédent, est aussi vrai pour les microsomes humains puisque nous mettons en évidence les mêmes métabolites de piégeage avec le mercaptoéthanol. Cette activité est inhibée par les anticorps anti-LKM2. Ce résultat est analogue à l'inhibition par les anticorps anti-LKM2 constatée sur la réaction de fixation covalente aux protéines microsomales du TAI par Catherine Pons (Pons, 1989). Ces deux activités ont donc la même origine : une S-oxydation du TAI catalysée par les cytochromes P-450 de la sous-famille IIC. Nous avons obtenu deux P-450 fonctionnels (IIC9 et IIC10) à partir de levures possédant chacune un gène de P-450 intégré dans un plasmide et mis en évidence dans ce modèle d'étude les activités de 5-hydroxylation de l'AT et de S-oxydation du TAI. Ces deux activités sont effectivement inhibées par les anticorps anti-LKM2 qui donc reconnaissent ces deux protéines. Nous avons donc identifié deux P-450 de la sous-famille IIC, les P-450 IIC9 et IIC10, responsables de la métabolisation de l'AT et de son isomère chez l'homme. Les caractéristiques de ces activités sont en cours d'étude au laboratoire (Pilar Lopez). Nous espérons dans un proche avenir disposer de l'ensemble des P-450 humains de la famille IIC exprimés dans des levures et déterminer les éventuelles autres isoenzymes capables de métaboliser l'AT et son isomère.

DEUXIEME PARTIE

**ETUDE PRELIMINAIRE
DE LA FIXATION COVALENTE DU TAI
AUX PROTEINES MICROSOMALES**

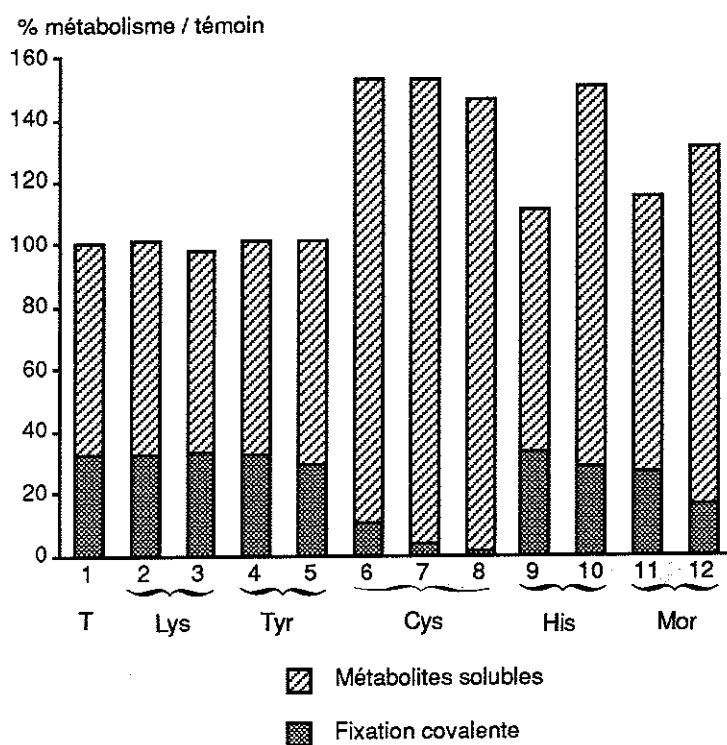
Le mercaptoéthanol est un bon nucléophile vis à vis du sulfoxyde de TAI. La fonction thiol est à l'origine de cette propriété que l'on retrouve avec la N-acétylcystéine et le glutathion. En l'absence de thiol ajouté au milieu réactionnel, le sulfoxyde de TAI se fixe aux protéines microsomales, ce sont donc les nucléophiles de ces protéines qui réalisent le piégeage dans ces conditions et les cystéines qui possèdent une fonction thiol libre pourraient être impliquées au premier plan. Les questions que nous nous sommes posés sont de savoir d'une part quels types d'acides aminés sont impliqués dans cette réaction et d'autre part quelle est la structure de ces métabolites fixés de façon covalente ? Nous avons tenté d'aborder ce problème par 3 approches différentes. Premièrement nous avons dosé les thiols libres des cystéines sur la fraction microsomale hépatique de rats induits par le clofibrate. La raison du choix de ce type de microsomes est encore une fois leur activité importante vis à vis du TAI qui en fait un moyen de produire le sulfoxyde de TAI en quantité appréciable. Le résultat de ce dosage est identique à celui des microsomes de levures, soit 52 ± 2 nmol thiols libres/mg protéines microsomales (partie expérimentale 6.2.4, p. 146). Deuxièmement nous avons recherché les acides aminés capables de réagir avec le sulfoxyde de TAI et essayé de quantifier leur réactivité. Enfin dans un troisième temps, nous avons comparé les propriétés des métabolites fixés de manière covalente aux protéines avec celles des composés **13** et **14** pour déterminer la part de ceux qui potentiellement auraient une structure semblable.

3.5. Etude de la réactivité du sulfoxyde de TAI avec différents nucléophiles.

Nous nous sommes intéressés aux acides aminés qui possèdent des groupements nucléophiles impliqués dans des réactions de fixation covalente. Ce sont principalement la cystéine, la lysine et l'histidine. Nous avons également étudié les effets d'une amine secondaire, la morpholine, ainsi que ceux de la tyrosine.

3.5.1. Protocole d'étude.

Le sulfoxyde de TAI est produit au cours d'une incubation de TAI (100 μ M, 25 μ Ci/ μ mol) en présence de microsomes CLO (P-450 1 μ M). Les acides aminés, sous forme N-acétylée (série L), et la morpholine sont préincubés avec les microsomes avant l'addition du système générateur de NADPH. Le protocole des incubations ainsi



Nucléophiles	métabolites solubles	fixation covalente	métabolisme total
1 Témoin (T)	68	32	100% *
2 N-acétyllysine (Lys) 1 mM	69	32	101
3 10 mM	65	33	98
4 N-acétyltyrosine (Tyr) 1 mM	69	32	101
5 10 mM	72	29	101
6 N-acétylcystéine (Cys) 100 µM	143	10	153
7 1 mM	149	4	153
8 10 mM	145	1,2	146
9 N-acétylhistidine (His) 1 mM	78	33	111
10 10 mM	122	28	150
11 Morpholine (Mor) 1 mM	88	27	115
12 10 mM	115	16	131

* résultats en % du métabolisme total du témoin.

Tableau 3.5 Effets de différents nucléophiles sur le métabolisme du TAI
(TAI 100 µM, P-450 CLO 1 µM, 20 min. à 37°C).

que leur analyse sont identiques à ceux décrits dans la partie expérimentale 6.1.4 à 6 (p. 138 et suivantes).

3.5.2. Résultats.

Dans le tableau 3.5 est présenté l'ensemble des résultats de cette série d'expériences. La N-acétyllysine et la N-acétyltyrosine sont sans effet, même à la concentration de 10 mM, sur la fixation covalente du TAI et ont des effets négligeables sur les métabolites solubles (apparition de nouveaux métabolites très minoritaires). La N-acétylcystéine donne les résultats que l'on sait : inhibition importante de la fixation covalente dès les plus faibles concentrations (100 μ M) et apparition des métabolites de piégeage avec augmentation du métabolisme total. La morpholine donne un résultat similaire mais il faut une concentration 100 fois plus forte (10 mM) pour voir la fixation covalente diminuer. Les élugrammes d'H.P.L.C. montrent l'apparition, à partir de 1 mM en morpholine, de quatre nouveaux métabolites : **35a** (temps de rétention en gradient H.P.L.C. A 13 min., λ_{\max} = 292 nm), **35b** (13,5 min., λ_{\max} = 315 nm, \approx 10% du métabolisme total avec 1 ou 10 mM de morpholine, compté avec **35a**), **35c** (15 min., λ_{\max} = 304 nm, 4% du métabolisme total avec 1 mM de morpholine et 8 avec 10 mM) et le métabolite **35d** sortant dans la queue du pic du TAI non métabolisé, au spectre d'absorption U.V. particulier avec plusieurs maxima dont un situé au delà de 350 nm qui rappelle celui du métabolite aromatique **17**. Avec la N-acétylhistidine, plusieurs métabolites apparaissent dont un majoritaire **36** (19 min., λ_{\max} 275 nm, 16% du métabolisme total avec 10 mM de N-acétylhistidine) de temps de rétention et de spectre d'absorption U.V. identique à un métabolite minoritaire présent en l'absence de nucléophile. Nous avons tenté d'étudier ce métabolite qui malheureusement se dégrade rapidement après la purification ou se transforme en TAI au cours de son extraction et de sa méthylation par le diazométhane.

3.5.3. Conclusion.

La cystéine est l'acide aminé le plus réactif vis à vis du sulfoxyde de TAI. La morpholine montre une réactivité environ 100 fois plus faible mais appréciable. Toutefois, on ne trouve pas d'amines secondaires libres dans les protéines à l'exception des rares prolines N-terminales. L'histidine réagit également, dans un domaine de concentrations similaire à celui de la morpholine. La lysine et la tyrosine ne sont probablement pas impliquées dans la réaction de fixation covalente du sulfoxyde de TAI aux protéines microsomales dans les conditions étudiées.

3.6. Propriétés des métabolites du TAI fixés aux protéines microsomales.

Nous nous sommes intéressés à 2 propriétés particulières des métabolites **13** et **14** qui sont leur réactivité vis à vis du mercaptoéthanol et leur déshydratation en milieu acide. En présence de mercaptoéthanol ces deux métabolites évoluent vers le composé **15** avec un fait particulier qui est la rupture de la liaison entre le noyau dihydrothiophène et le mercaptoéthanol ayant réagi en premier avec le sulfoxyde de TAI. Si une cystéine des protéines réagit avec le sulfoxyde de TAI pour donner un métabolite de structure analogue aux métabolites **13** et **14**, on peut s'attendre à un décrochage de ce

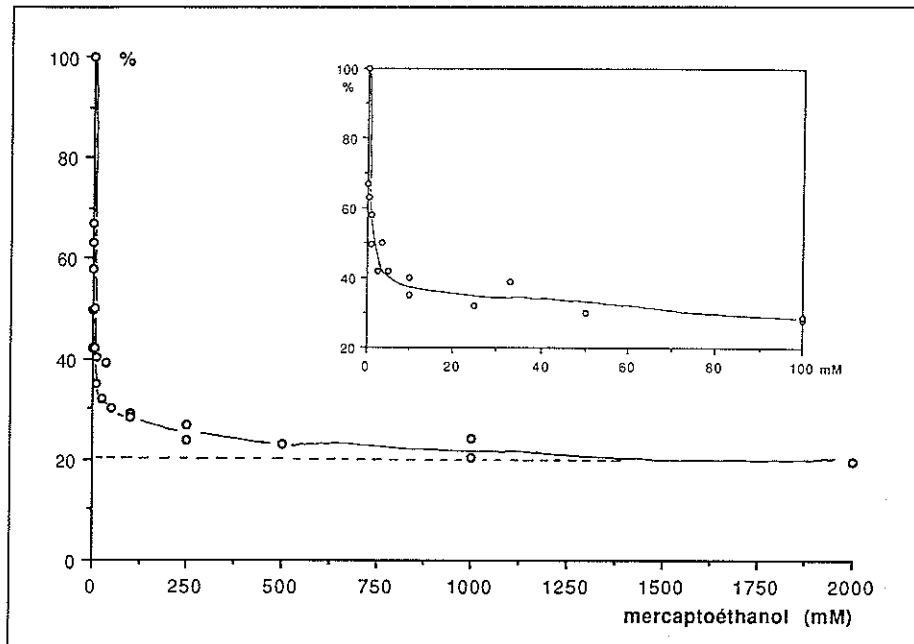


Figure 3.9 Influence du mercaptoéthanol sur la fixation covalente des métabolites du TAI aux protéines microsomiales (résultats exprimés en % de métabolites encore fixés aux protéines après un traitement par du mercaptoéthanol à différentes concentrations, incubation 30 min. 37°C, TAI 100 μ M, P-450 CLO 1 μ M, puis traitement au mercaptoéthanol 60 min. à 37°C).

métabolite en présence d'un excès de mercaptoéthanol avec formation du composé **15**. Après traitement en milieu acide, le métabolite fixé pourrait s'aromatiser devenant alors non-réactif vis à vis du mercaptoéthanol. Pour effectuer ce travail nous avons conduit les expériences en deux temps qui sont d'abord une incubation initiale de TAI (100 μ M) avec des microsomes CLO (P-450 1 μ M) afin de fixer les métabolites sur les protéines, et ensuite un traitement de ces métabolites fixés selon différentes conditions.

3.6.1. Méthodes et résultats.

Les protocoles sont décrits dans la partie expérimentale 6.2.5 (p. 146).

Effet du mercaptoéthanol sur la fixation covalente du TAI - Le taux de fixation covalente est mesuré en fin de première incubation, du mercaptoéthanol est alors ajouté et après une deuxième incubation on mesure à nouveau la fixation covalente. On étudie donc l'effet du mercaptoéthanol sur les métabolites fixés.

La première incubation est de 30 min. à 37°C. Des aliquots sont alors mélangés avec une solution de mercaptoéthanol à différentes concentrations (100 μ M à 2 M) et, deuxième temps de l'expérience, l'incubation est poursuivie pendant 60 min. à 37°C avant la deuxième mesure de la fixation covalente. Dans ces conditions, la fixation covalente chute rapidement de 60% entre 0,1 et 5 mM de mercaptoéthanol. Au dessus de 5 mM en mercaptoéthanol, elle continue à diminuer progressivement jusqu'à un plateau à 20% de sa valeur initiale, atteint avec 250 mM en mercaptoéthanol (figure 3.9).

Une expérience semblable est réalisée où l'on ajoute du SDS 3% (sodium dodecyl sulfate) en plus du mercaptoéthanol. Le but est de dénaturer les protéines afin

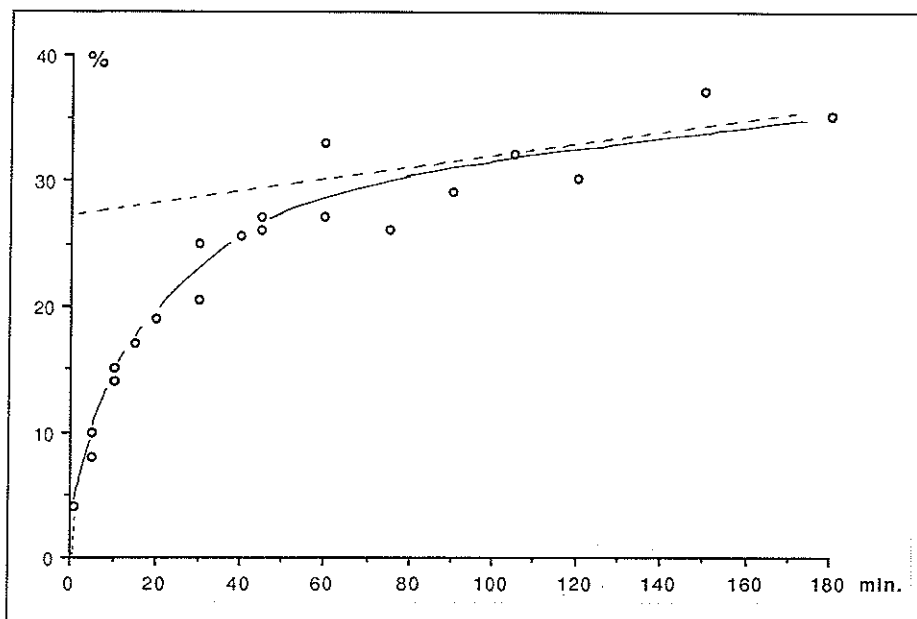


Figure 3.10 Evolution en fonction du temps d'incubation du pourcentage de métabolites fixés aux protéines non-libérés par le traitement au mercaptoéthanol (P-450 CLO 1 μ M, TAI 100 μ M, incubation à 37°C, temps d'incubation variable, puis traitement par le mercaptoéthanol 1 M 30 min. à 37°C)

que l'ensemble des métabolites fixés de façon covalente montre la même accessibilité vis à vis du mercaptoéthanol. Ses résultats sont identiques à ceux présentés sur la figure 3.9, en particulier le S.D.S. ne modifie pas la valeur du plateau de 20%.

Influence de la durée de la première incubation sur la stabilité des métabolites fixés vis à vis du mercaptoéthanol - Une partie des métabolites fixés de façon covalente aux protéines microsomales n'est pas décrochée par le mercaptoéthanol (plateau de 20% dans l'expérience précédente). S'agit-il de métabolites qui réagissent en donnant directement une structure où la liaison covalente avec les protéines n'est pas rompue en présence d'un excès de mercaptoéthanol ou au contraire s'agit-il d'une évolution secondaire, lente, de ces métabolites ? Autrement dit, le plateau de 20% est-il constant quelle que soit la durée de l'incubation ou contraire présente-t-il des variations, comme par exemple une augmentation au cours de l'incubation (qui serait le reflet de réactions secondaires de transformations des métabolites fixés) ? Pour répondre à cette question nous avons fait varier la durée de la première incubation (de 1 min. à 3 heures) et, dans le deuxième temps de l'expérience, traité les métabolites fixés par une forte concentration de mercaptoéthanol de manière à atteindre le plateau observé dans l'expérience précédente.

A différents temps de la première incubation, on mesure la fixation covalente aux protéines, on ajoute alors du mercaptoéthanol 1 M et au bout de 30 min. à 37°C on mesure à nouveau la fixation covalente. Pour chaque temps on calcule la valeur du plateau en faisant le rapport entre la fixation covalente mesurée en fin de traitement par le mercaptoéthanol et celle mesurée juste avant traitement. Sur la figure 3.10, on voit que le pourcentage de métabolites fixés non-libérés par le mercaptoéthanol augmente rapidement durant les premières 60 min. d'incubation en passant de 0 à

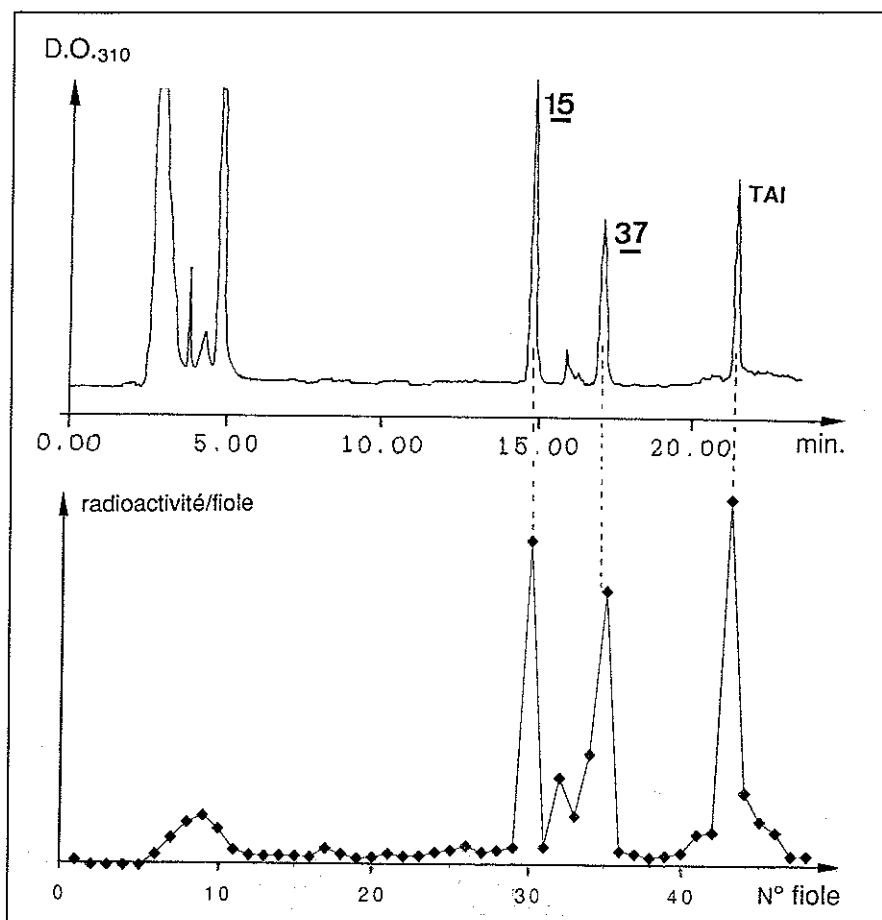


Figure 3.11 Analyse par H.P.L.C. des métabolites libérés par traitement au mercaptoéthanol de protéines ayant fixé des métabolites du TAI (H.P.L.C. selon le gradient B, élugramme avec détection à 310 nm, radiochromatogramme correspondant, TAI 100 μ M, P-450 CLO 1 μ M, 30 min. à 37°C, lavage des protéines au méthanol puis traitement par le mercaptoéthanol 500 mM, 60 min. 37°C).

27%. Au delà de cette première heure, le plateau augmente progressivement et linéairement pour atteindre la valeur de 35% au bout de 3 heures d'incubation.

Etude par H.P.L.C. des composés libérés par le traitement des protéines microsomiales par le mercaptoéthanol - La connaissance des métabolites libérés par le mercaptoéthanol doit nous renseigner sur la nature de la fixation covalente initiale, en particulier un métabolite fixé sur une cystéine, avec une structure analogue à celle des métabolites **13** et **14**, évoluera vers le métabolite **15** en présence d'une forte concentration de mercaptoéthanol.

Des protéines incubées ont été lavées plusieurs fois par du méthanol dans des conditions où l'ensemble du TAI non-métabolisé et de ses métabolites non-fixés est éliminé. Ces protéines sont, dans un deuxième temps, incubées pendant 60 min. à 37°C en présence de mercaptoéthanol 500 mM. Après séparation des protéines par centrifugation, le surnageant a été analysé par H.P.L.C. (gradient B). L'élugramme montre 3 pics principaux, retrouvés sur le radiochromatogramme, qui sont successivement le métabolite **15** (25%), un métabolite inconnu **37**, de spectre d'absorption U.V. semblable à celui du métabolite **36** de piégeage par la N-acétylhistidine (30%), et enfin du TAI (34% de la radioactivité récupérée) (figure 3.11).

Stabilité des métabolites fixés, vis à vis du mercaptoéthanol, après un traitement par HCl - Pour étudier l'effet d'un traitement par HCl sur les métabolites fixés aux protéines, et en particulier pour savoir si dans ces conditions la liaison covalente devient stable vis à vis du mercaptoéthanol, l'expérience est conduite en trois temps qui sont incubation du TAI avec les protéines microsomales, traitement des protéines par HCL, puis par le mercaptoéthanol.

Les protéines incubées (20 min., 37°C) sont déposées sur des filtres de fibres de verre que l'on immerge dans de l'HCl 1 N pendant 60 min. à 37°C puis dans une solution tamponnée (pH 7,4) de mercaptoéthanol 1 M pendant 30 min. à 37°C. Le taux de fixation covalente est mesurée par comptage de la radioactivité retenue sur les filtres. On réalise également une mesure sans le traitement par HCl (remplacé par du tampon phosphate de sodium, pH 7,4).

Les filtres traités par HCl puis par le mercaptoéthanol donnent des résultats de fixation covalente qui ne sont que légèrement inférieurs aux mesures obtenues en l'absence de tout traitement (11,7 contre 12,8 nmol/nmol P-450). Dans les filtres témoins où l'HCl est remplacé par du tampon pH 7,4, on retrouve une fixation covalente résiduelle de 30%.

Echecs expérimentaux - Nous n'avons pas réussi à doser l'évolution de la concentration des thiols libres au cours d'une incubation, ni à bloquer les thiols au préalable sans altérer les activités P-450. L'étude par H.P.L.C. de l'hydrolysate de protéines incubées (hydrolyse acide par HCl) est ininterprétable.

3.6.2. Conclusion.

Les résultats de la première expérience nous indiquent que les métabolites du TAI fixés sur les protéines se répartissent en 3 groupes suivant leur réactivité vis à vis du mercaptoéthanol. Environ 60% de ces métabolite sont réactifs avec le mercaptoéthanol à une concentration inférieure à 5 mM. Ces réactions s'accompagnent d'un décrochage de ces métabolites des protéines. 20% sont également libérés par le mercaptoéthanol mais dans un domaine de concentrations supérieures, entre 5 et 250 mM. L'étude des métabolites libérés par le mercaptoéthanol met en évidence 3 composés principaux dont deux sont connus : le TAI (34%) et le métabolite **15** (25%). Si au préalable, on traite les protéines par de l'HCl, alors ces métabolites ne sont pas libérés. Enfin les 20% restant correspondent à des métabolites dont la liaison covalente avec les protéines persiste en présence de mercaptoéthanol. Cette stabilité est en relation avec une évolution secondaire, sur les protéines, de ces métabolites. En effet, aux temps courts de l'incubation, la proportion de métabolites non-décrochés par le mercaptoéthanol est plus faible pour être, par extrapolation, nulle au temps 0.

En conclusion plusieurs structures sont présentes au sein des métabolites fixés aux protéines. Au moins 15% (25% x 60%) de ceux-ci ont des propriétés identiques à celles des métabolites **13** et **14** qui sont 1) une réactivité avec le mercaptoéthanol à une concentration inférieure à 5 mM, 2) une transformation en composé **15** en présence de mercaptoéthanol et 3), après traitement par HCl, une absence de rupture de la liaison covalente entre le premier nucléophile et le sulfoxyde de TAI en présence de mercaptoéthanol.

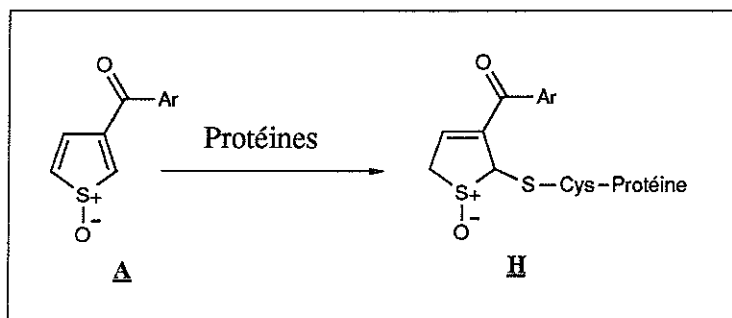


Figure 3.12 Hypothèse de structure du premier métabolite de piégeage **H** du sulfoxyde de TAI par les cystéines des protéines.

3.7. Discussion.

Les résultats obtenus sur le piégeage *in situ* du sulfoxyde de TAI par différents nucléophiles nous permet de les classer par ordre de réactivité décroissante. Les thiols comme le mercaptoéthanol ou la N-acétylcystéine sont les meilleurs nucléophiles. Les amines secondaires de pKa relativement bas comme la morpholine (pKa 8,33) ou l'histidine (pKa 6,05) viennent ensuite avec une réactivité environ 100 fois plus faible. Les amines primaires (N-acétyllysine ou acides aminés non N-acétylés (résultats préliminaires non-montrés)) ne sont pas réactives dans nos conditions expérimentales. Nous n'avons pas observé de réactivité appréciable avec la N-acétyltyrosine.

Ces résultats sont toutefois incomplets car la N-acétylarginine et la N-acétylméthionine n'ont pas été testées à la concentration de 10 mM (la N-acétylarginine ne modifie pas le métabolisme du TAI à la concentration de 1 mM, résultat préliminaire non-montré) mais sont parfois impliquées dans des réactions de fixation covalente de métabolites électrophiles aux protéines (Hinson et al, 1992).

Parmi les nucléophiles présents dans les protéines que nous avons testés, la cystéine sera donc l'acide aminé le plus réactif ; l'histidine vient ensuite avec une réactivité au moins 100 fois plus faible. Ces résultats ne sont probablement valables que pour des acides aminés situés à la surface des protéines. Dans le cœur des protéines, les valeurs des pKa peuvent varier, en particulier la lysine peut être sous une forme non-protonée. Il n'est pas exclu qu'elle puisse réagir avec le sulfoxyde de TAI et une telle éventualité pourrait se produire au sein même du P-450 où le sulfoxyde est généré.

Le dosage des thiols des cystéines libres des protéines microsomales hépatiques permet d'estimer leur concentration à environ 40 μ M au cours des incubations. Dans ce domaine de concentrations, le mercaptoéthanol piège largement le sulfoxyde de TAI sous forme de sulfoxyde de dihydrothiophène (voir figure 2.3, p. 32). La concentration en protéines microsomales est d'environ 0,67 mg/ml au cours des incubations, soit, en comptant un poids moléculaire moyen de 100 Daltons par acide aminé, une concentration équivalente en acides aminés de l'ordre de 6,7 mM. L'histidine est un acide aminé peu représenté au sein des protéines, sa proportion par rapport aux autres acides aminés est inférieure à 2% (Lehninger, 1970), ce qui représente une concentration équivalente en histidine de l'ordre de 134 μ M lors des incubations. L'histidine est environ 100 fois moins réactive que la cystéine, les 134 μ M d'histidine sont donc

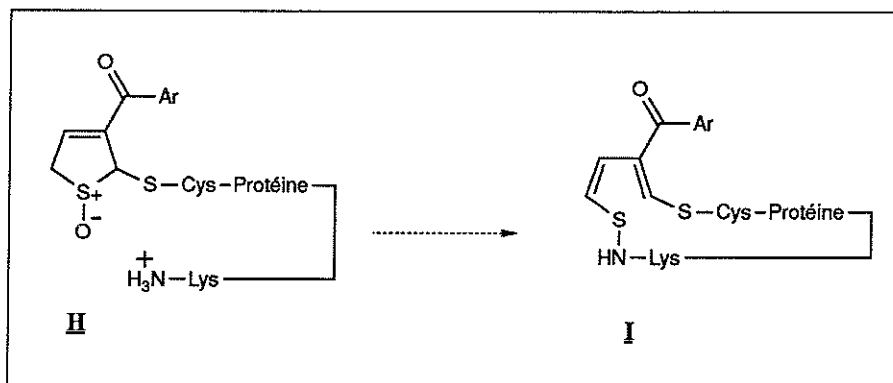


Figure 3.13 Proposition d'évolution du métabolite **H** en présence d'une lysine à proximité sur la protéine.

équivalents, du point de vue de la réactivité avec le sulfoxyde de TAI, à 1,4 μM de cystéine. Dans nos conditions expérimentales, la cystéine est donc l'acide aminé majoritairement impliqué dans la réaction de fixation covalente du sulfoxyde de TAI aux protéines microsomales.

Ces résultats nous permettent de comparer avec raison les propriétés des métabolites fixés avec celles des composés **13** et **14**, composés résultant de la réaction d'un thiol, le mercaptoéthanol, avec le sulfoxyde de TAI. L'attaque de ce sulfoxyde par le thiol du mercaptoéthanol ou celui de la N-acétylcystéine a lieu en position 2 avec une régiosélectivité de 100%. Il en est donc probablement de même avec le thiol des cystéines protéiques et la structure **H** de sulfoxyde de dihydrothiophène substitué en 2 par le thiol d'une cystéine doit apparaître en premier sur les protéines (figure 3.12). La présence de ce motif **H** doit s'accompagner de 3 propriétés qui sont 1) la rupture de la liaison avec la protéine en présence d'une concentration en mercaptoéthanol inférieure à 5 mM, 2) l'apparition du composé **15** dans ces conditions et 3) l'absence de rupture après traitement par HCl. Seuls 15% des métabolites fixés possèdent ces 3 propriétés et ont donc une structure de sulfoxyde de dihydrothiophène. Les 80% restants résultent donc d'une évolution secondaire du sulfoxyde de dihydrothiophène à la surface des protéines. Ces évolutions sont au moins au nombre de 3 transformations majoritaires qui sont 1) évolution lente vers des métabolites qui restent liés de façon covalente aux protéines, même en présence de fortes concentrations en mercaptoéthanol, 2) évolution vers un métabolite libéré sous forme de TAI en présence de mercaptoéthanol et 3) évolution vers un métabolite libéré sous forme du composé inconnu **37** en présence de mercaptoéthanol.

Le piégeage du sulfoxyde de TAI par la cystéine met en évidence un métabolite final analogue à celui obtenu avec du mercaptoéthanol ou de la N-acétylcystéine. Par contre, l'étude préliminaire des métabolites intermédiaires (résultats non-montrés) montre des différences avec en particulier, à la concentration de cystéine de 100 μM , un métabolite majoritaire de piégeage qui se présente sous la forme d'un pic en H.P.L.C. d'absorption U.V. très différente de celle des composés **13** ou **14** (maximum à 305 nm). La seule libération de l'amine de la N-acétylcystéine conduit à un métabolisme intermédiaire entre le sulfoxyde de TAI et les composés finaux **31a** et **31b** différent. Ce résultat nous montre l'importance que pourrait avoir la présence de lysines à proximité de la structure **H** sur son évolution. Une possibilité est une

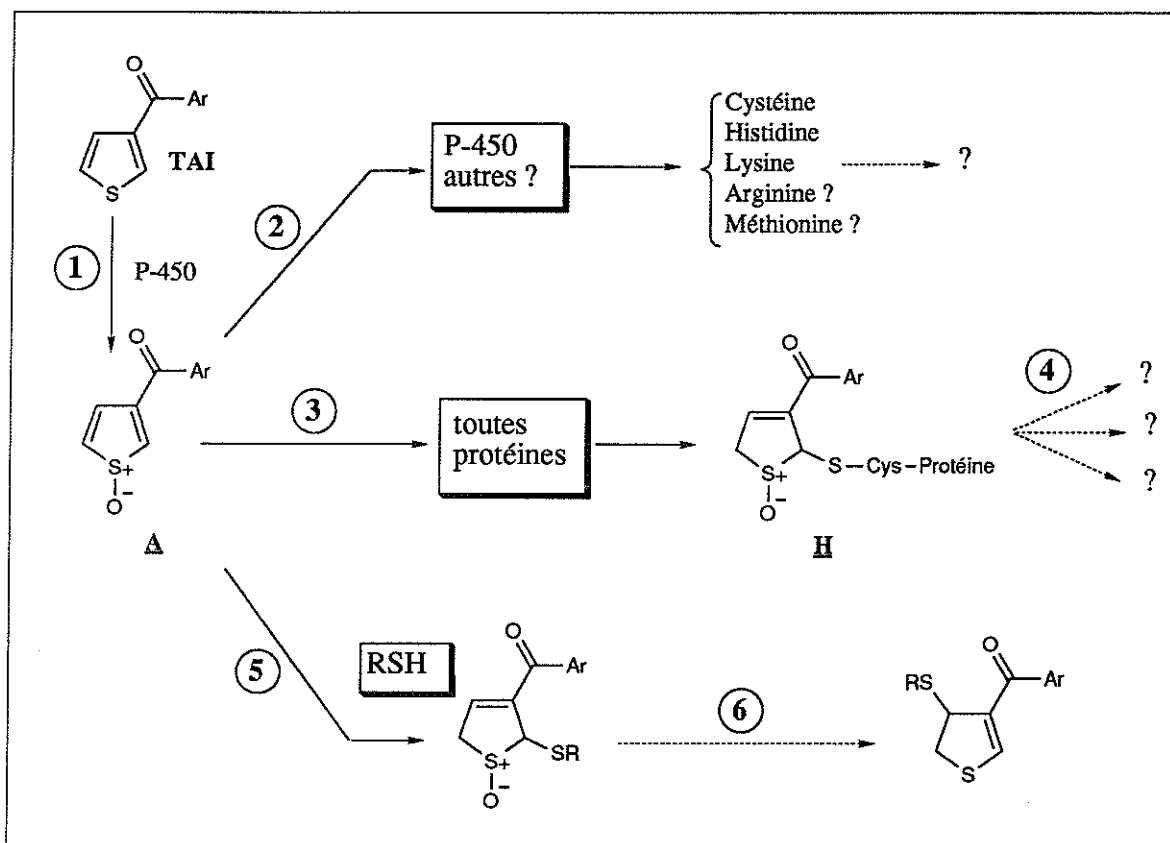


Figure 3.14 Récapitulatif du métabolisme microsomal du TAI.

- 1 - activation métabolique du TAI en sulfoxyde de TAI **A** réalisée par les P-450,
- 2 - fixation covalente de **A** dans des sites protéiques spécifiques (ex. P-450 ?),
- 3 - fixation covalente de **A** à la surface des protéines par formation majoritaire du composé **H**,
- 4 - évolution de **H** par au moins 3 voies majoritaires,
- 5 - piégeage *in situ* de **A** par un thiol présent dans le milieu réactionnel (ex. GSH *in vivo*),
- 6 - évolution du sulfoxyde de dihydrothiophène vers un dihydrothiophène substitué en 4.

ouverture de **H** en acide sulfénique qui pourrait alors réagir avec les amines des lysines en donnant la structure **I** (figure 3.13), structure analogue au composé **22** qui en présence de mercaptoéthanol devrait redonner le TAI.

Nous allons pour conclure récapituler le métabolisme microsomal du TAI tel que nous pouvons maintenant le comprendre. Le TAI est activé en sulfoxyde par les P-450 (étape 1 sur la figure 3.14). Au sein du P-450, ou dans des sites privilégiés ayant une affinité particulière pour ce métabolite, le sulfoxyde peut potentiellement se fixer de manière covalente (étape 2). Les acides aminés qui peuvent être impliqués dans cette étape sont la cystéine, l'histidine, la lysine, mais encore l'arginine ou la méthionine dont nous n'avons pas étudié la capacité de piégeage du sulfoxyde de TAI. Dans le milieu réactionnel, le sulfoxyde réagit majoritairement avec les cystéines des protéines pour donner la structure **H** (étape 3). Cette structure est instable sur la protéine et va évoluer par au moins 3 voies différentes (étape 4). En présence de thiols (étape 5), le sulfoxyde est piégé sous forme de sulfoxyde de dihydrothiophène ; ce sulfoxyde va évoluer, sous l'action du thiol, vers un dihydrothiophène substitué en 4 qui est le composé final de ces transformations (étape 6).

In vivo, RSH est le glutathion. Sa concentration intracellulaire hépatique de 5 mM fait de l'étape 5 la voie prépondérante de transformation du sulfoxyde de TAI,

c'est par elle que passe la toxicité du TAI en entraînant une déplétion du glutathion intracellulaire. Si les intermédiaires de l'étape 6 restent à déterminer, ces transformations peuvent aller jusqu'au composé dihydrothiophène substitué en 4 que l'on retrouve dans les urines. L'étape 3 doit être minoritaire puisque la majeure partie du sulfoxyde est piégée par le glutathion. Il reste l'étape 2 que l'on peut penser être moins influencée que l'étape 3 par la présence de glutathion puisqu'il s'agit d'une fixation covalente du sulfoxyde dans des sites privilégiés. En fait, nous ne pouvons que supposer l'existence de cette étape dans le cas du TAI, par contre, dans le cas de l'AT nous savons qu'il y a une réaction de fixation covalente spécifique au niveau des P-450. C'est par cette voie que passerait l'immunotoxicité de l'AT. Les acides aminés proposés ne sont évidemment pas valables pour l'intermédiaire réactif de l'AT que nous n'avons pas réussi à piéger jusqu'à présent. L'étape 4 du métabolisme du TAI montre que, dans l'environnement particulier des protéines, l'évolution du métabolite de piégeage peut être complètement différente de celle observée dans le milieu réactionnel. La raison pour laquelle l'intermédiaire réactif de l'AT peut se fixer sur les protéines, jusqu'à totaliser par cette voie 30% du métabolisme, sans que l'on puisse le piéger par un thiol ajouté au milieu réactionnel pourrait là peut-être trouver son origine. Une approche pour piéger l'intermédiaire serait d'utiliser des dipeptides comme par exemple Cys-Lys.

CHAPITRE QUATRIEME

PREPARATION D'ANTICORPS ANTI-ACIDE TIENILIQUE

Catherine Pons avait tenté au laboratoire d'obtenir des anticorps (Ac) polyclonaux dirigés contre les métabolites de l'acide tiénilique fixés de façon covalente sur les protéines hépatiques (Ac anti-AT)¹ (Pons, 1989). Des hépatocytes en survie, de rats traités par du clofibrate puis par de l'AT, expriment à la face externe de leur membrane plasmique des néoantigènes reconnus par les anticorps anti-LKM2 (Pons et al, 1991, voir introduction). Des métabolites de l'AT sont-ils fixés sur ces néoantigènes ? Les anticorps anti-LKM2 reconnaissent-ils ces métabolites ? L'intérêt de posséder des anticorps anti-AT est de nous aider à répondre à ces deux questions. L'existence d'anticorps anti-médicament n'a en fait jamais été rapportée pour l'acide tiénilique mais est une conséquence fréquente de l'activation métabolique (revue Park et al, 1987). Cette réponse n'est pas dirigée contre le médicament lui-même mais contre le motif chimique constitué par un métabolite réactif fixé de façon covalente sur les protéines, ce qui fait toute la difficulté de sa mise en évidence. Si l'on obtient des anticorps qui reconnaissent ce motif dans le cas de l'AT, la protéine modifiée qui aura servi à immuniser les animaux ressemblera par symétrie à ce motif (figure 4.1). Elle pourra donc à son tour être utilisée pour détecter et étudier la présence éventuelle d'anticorps anti-médicament dans le sérum des patients atteints d'hépatite autoimmune induite par l'AT. L'intérêt de produire des anticorps anti-AT est donc double, c'est d'une part se donner un outil puissant d'étude des protéines hapténisées par les métabolites réactifs de l'AT et c'est d'autre part se donner un moyen de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-médicament dans les sérums anti-LKM2.

L'échec des premiers anticorps produits par C. Pons s'explique par le mode de couplage retenu, un couplage entre les lysines de l'albumine et la fonction carboxyle de l'AT (figure 4.2). Il est clair que l'activation métabolique de l'AT ou de son isomère

¹ Dans la suite de cet exposé, le terme anticorps anti-AT désignera des anticorps capables de reconnaître le motif chimique constitué par un métabolite de l'AT fixé de façon covalente sur les protéines.

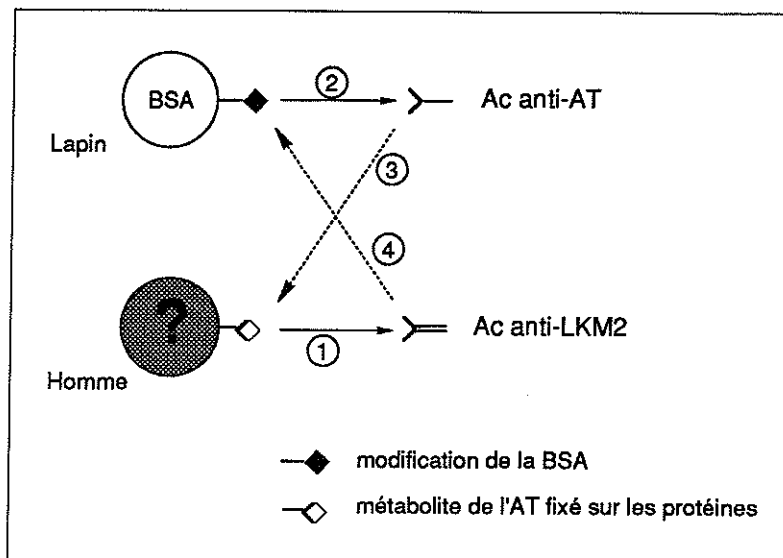


Figure 4.1 Hypothèse de reconnaissance croisée entre les Ac anti-LKM2 et les Ac anti-AT.

- 1 - les métabolites fixés de l'AT entraînent peut-être l'apparition d'Ac anti-médicament présents dans les Ac anti-LKM2,
- 2 - l'immunisation par la BSA modifiée entraîne l'apparition d'Ac anti-AT,
- 3 - si les Ac anti-AT reconnaissent le motif chimique constitué par un métabolite fixé sur une protéine,
- 4 - alors il est possible que les Ac anti-LKM2 reconnaissent la BSA modifiée.

se fait au niveau du noyau thiophène et les nucléophiles protéiques doivent réagir avec l'entité réactive de l'AT pour donner des structures qui pourraient ressembler à celles mises en évidence pour son isomère dans le chapitre II. Compte tenu de ces remarques, il nous faut coupler l'AT à une protéine porteuse au niveau du noyau thiophène pour espérer avoir une reconnaissance des métabolites de l'AT fixés aux protéines.

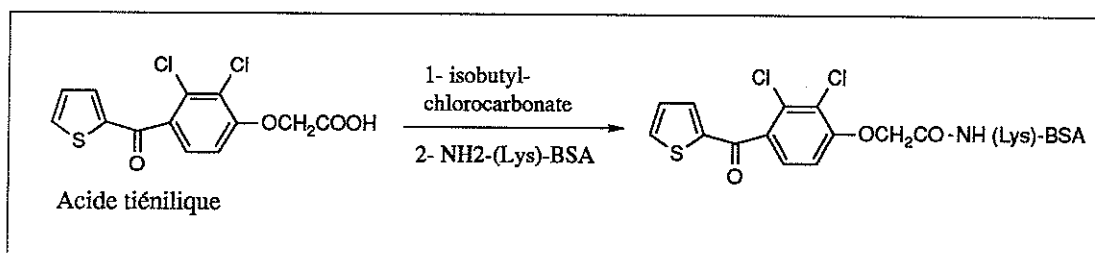


Figure 4.2 Principe du couplage de l'AT à l'albumine par sa fonction carboxyle (Pons, 1989).

4.1. Couplage de l'acide tienilique à la BSA au niveau du noyau thiophène.

4.1.1. Stratégie de couplage.

L'ensemble des métabolites de piégeage du TAI a une structure commune qui comprend une double liaison conjuguée avec la cétone et la partie 2,3-dichlorophénoxyacétique. Ce motif est présent dans la structure d'un diurétique de la même famille, l'acide éthacrynique **36** (figure 4.3) et aussi dans le dérivé **6** de l'AT. Nous devons construire un haptène qui possède ce motif, l'idéal serait une substitution en 5

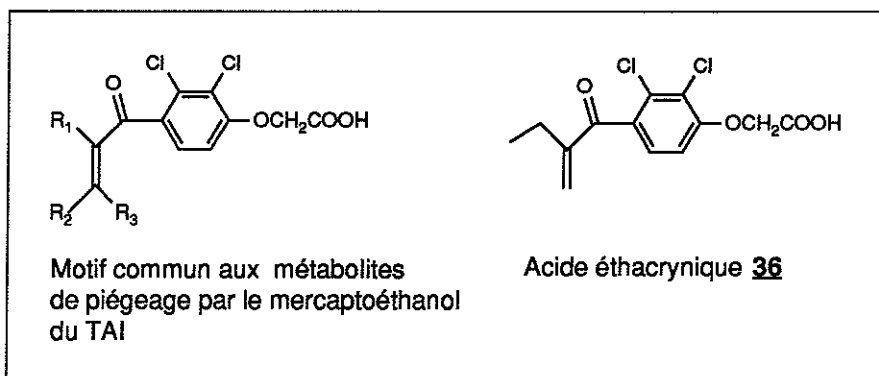


Figure 4.3 Motif chimique commun à l'ensemble des métabolites de piégeage du TAI et analogie avec la structure de l'acide éthacrynique.

de l'AT par un thioéther qui pourrait mimer un éventuel piégeage du sulfoxyde de l'AT par le thiol d'une cystéine suivi d'une aromatisation par perte d'une molécule d'eau (voir figure 2.40, p. 80, proposition d'un mécanisme de 5-hydroxylation de l'AT). Patrick Dansette avait montré au laboratoire que le chlore du dérivé 5-chloro-AT **39** peut être substitué par un thiol en milieu aqueux vers pH 10. Pour réaliser un couplage entre ce dérivé et la BSA, nous avons choisi de fixer en préalable des thiols sur l'albumine par la méthode au N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) (Carlsson et al, 1978) puis de les faire réagir avec **39** dans un deuxième temps. Le SPDP est un réactif bifonctionnel avec un acide 3-mercaptopropionique à la fonction acide activée par un groupe N-succinimide ester et un thiol bloqué dans une liaison dithioéther facilement réductible. La première étape est la formation à pH neutre d'une liaison amide entre le carboxyle activé et les amines libres des lysines de la BSA suivie immédiatement d'une libération des thiols par addition de dithiotréitol (DTT) (figure 4.4). Après purification, la BSA thiolée est mise à réagir avec le 5-chloro-AT **39** en anaérobiose à pH 10,3 et en fin de réaction, les éventuels thiols libres sont bloqués par l'iodoacétamide. Cette méthode fournit théoriquement une BSA substituée au niveau des lysines par de l'AT en position 5 via une chaîne intermédiaire de 4 atomes (BSA-AT) qui répond aux contraintes fixées par la stratégie de couplage.

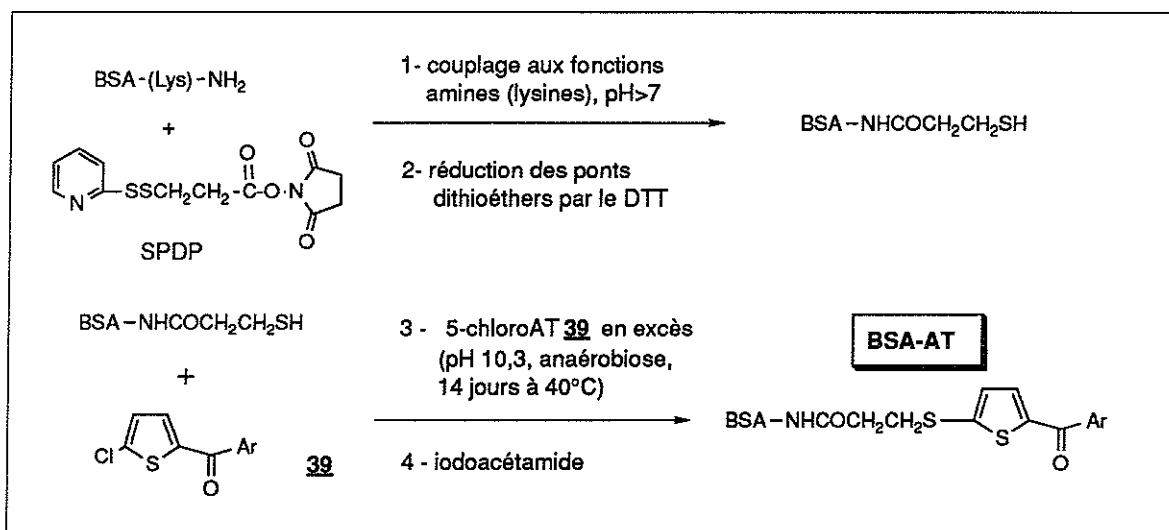


Figure 4.4 Principe de la méthode de couplage de l'AT à la BSA au niveau du noyau thiophène.

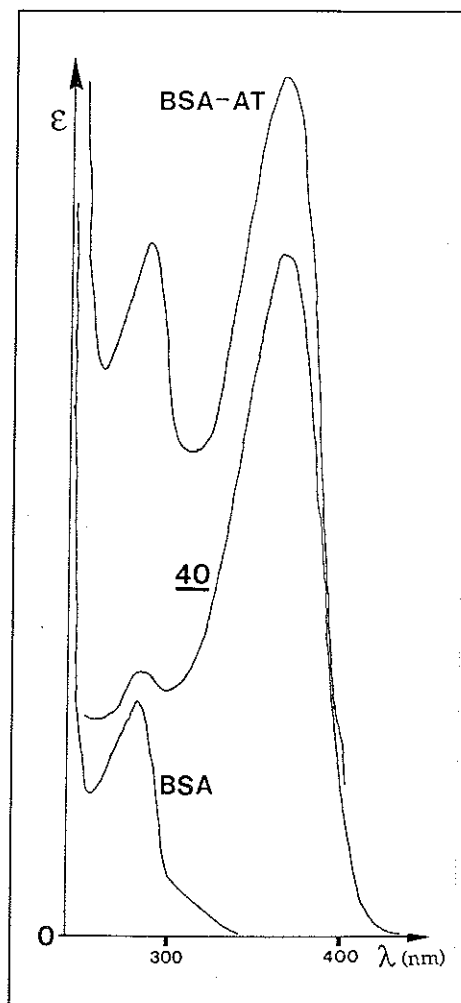
4.1.2. Résultats.

Synthèse de la BSA-AT - Les conditions expérimentales sont décrites dans le paragraphe 6.3.1 (p. 147). A la fin de première étape, il y a fixation quantitative des 30 équivalents de thiols mis à réagir avec l'albumine (dosage par le réactif d'Ellman, Ellman, 1959). L'utilisation de dérivé **39** radiomarké a permis la quantification de la deuxième étape, soit 14,6 molécules d'AT fixées par molécule de BSA-AT.

Caractérisation de la BSA-AT - La comparaison du spectre d'absorption U.V. de la BSA-AT à celui de la BSA montre, à côté de la bande d'absorption à 280 nm des acides aminés aromatiques, un pic d'absorption intense à 364 nm (coefficient d'absorption molaire par AT de $15300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le dérivé 5-S-mercaptoéthanol-thiophène¹ **40**, obtenu par substitution du chlore du composé **39** par le mercaptoéthanol, possède une bande d'absorption U.V. similaire à 362 nm (coefficient d'absorption molaire de $15700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (figure 4.5).

Figure 4.5 Comparaison des spectres d'absorption U.V. de la BSA-AT, de la BSA et du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-thiophène **40** (seuls les spectres de la BSA et de la BSA-AT sont à la même échelle).



4.2. Protocole d'immunisation et obtention des sérums chez le lapin. Mise en évidence d'une sérologie anti-acide tiénilique et choix du lapin meilleur répondeur.

4.2.1. Méthodes et résultats.

Immunisation des animaux, obtention des sérums - Cinq lapines New Zealand âgées de 3 mois, numérotées de 1 à 5, ont été immunisées contre la BSA-AT. Le sang est prélevé 10 à 15 jours suivant chaque rappel et les sérums préparés (partie expérimentale 6.3.2, p. 148). Cinq prélèvements ont été ainsi collectés : prélèvement 0 (sérums préimmuns, avant toute immunisation) puis I à IV.

¹ le terme "mercaptoéthanol" doit être considéré comme une abréviation et non comme une nomenclature (voir également les composés **17** et **45**).

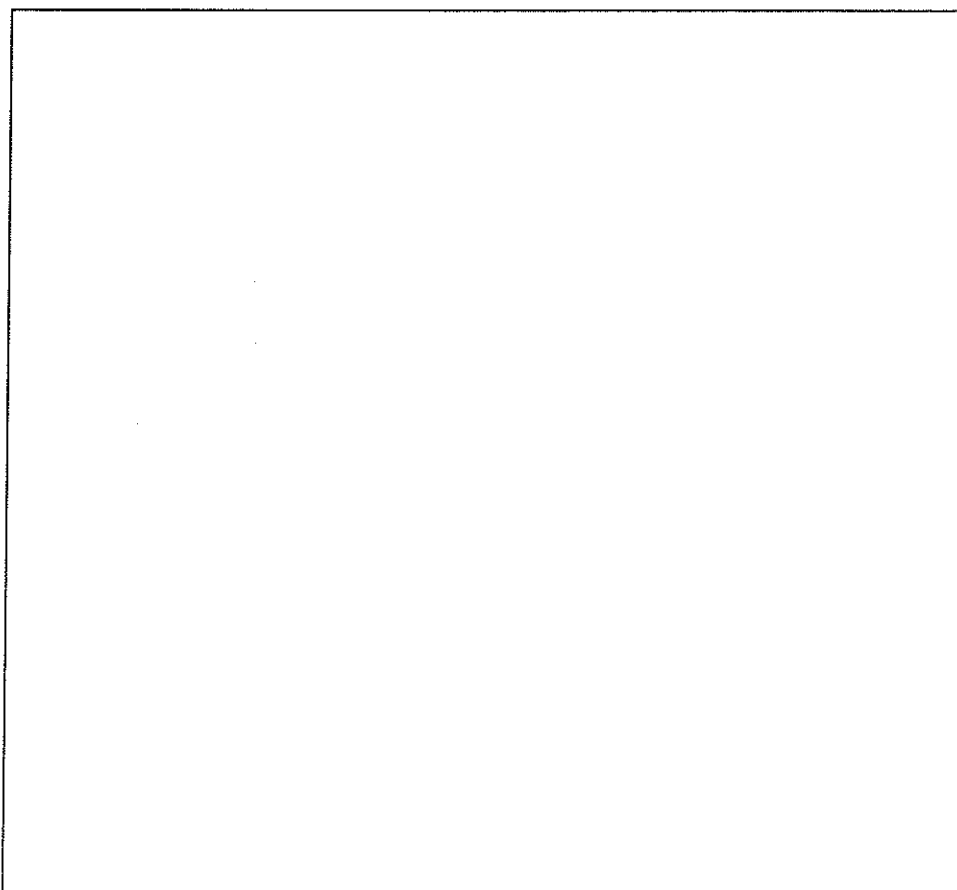


Figure 4.6 Arcs de précipitation (technique d'Ouchterlony) entre la BSA-AT ou la BSA et les sérums du prélèvement IV.

Etude de la réponse anti-BSA-AT par double diffusion en gel d'agarose - Nous avons utilisé la méthode de double diffusion en gel d'agarose (technique d'Ouchterlony) pour étudier la réponse anti-BSA-AT sur les différents prélèvements. Des gels d'agar tamponnés à pH 7,4 ont été coulés sur une plaque de Gel-bond avec une épaisseur de 1,5 mm. A l'aide d'une empreinte, les puits destinés aux sérums à tester ont été creusés selon un maillage hexagonal centré par un puits où a été déposé soit une solution de BSA-AT, soit une solution de BSA à différentes concentrations (1 mg/ml à 31,5 µg/ml dilué de 2 en 2). Nous avons également étudié l'influence, sur l'apparition des arcs de précipitation du prélèvement IV, de l'AT (1 mM) ou du 5-S-mercaptoéthanol-AT **40** (1 mM) préincubé 60 min. avec les sérums à tester et incorporé au sein du gel d'agar. Après un jour à 4°C, les arcs de précipitation sont révélés au bleu de Coomassie (partie expérimentale 6.3.3, p. 149).

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.1. Tous les sérums issus du prélèvement IV donnent, en présence de BSA-AT, un arc de précipitation intense et confluent, maximum pour les lapins 2 et 4 (arcs fins pour 1 mg BSA-AT/ml) (figure 4.6). En présence d'AT ou de **40**, ces arcs n'apparaissent pas. Il existe un deuxième arc, moyennement intense, présent chez les lapins 2 et 5. Une réponse anti-BSA, peu intense, est détectée chez les lapins 1, 2, 4 et 5 (arcs fins pour BSA 62 µg/ml). Les sérums préimmuns (prélèvement 0) ne donne aucun arc de précipitation avec la BSA-AT.

Tableau 4.1 Analyse semi-quantitative des arcs de précipitation mis en évidence par la technique d'Ouchterlony entre les différents sérums et la BSA-AT ou la BSA.

Lapin	1	2	3	4	5
Prélèvement O BSA-AT	o	o	o	o	o
Prélèvement IV BSA-AT	+++ (1000) ¹	++++ (1000) + (250)	+ (500)	++ (500)	+++ (1000) +/- (125)
+ AT ou 40 1 mM BSA	o +/- (31)	o +/- (31)	o	o +/- (31)	o +/- (31)
Prélèvement I BSA-AT	+++ (1000) +/- (62)	++++ (1000) +/- (250) + (62)	++ (500) +/- (62)	++ (500)	+++ (1000) +/- (250)
BSA	o	o	o	+ (62) + (62)	+ (62) + (62)

¹ l'intensité des arcs de précipitation est appréciée à l'œil nu selon une échelle de 7 valeurs (0, +/-, +, ++, +++, ++++), entre parenthèses est donnée la concentration de BSA-AT ou de BSA qui donne l'arc le plus fin et le plus médian, en µg/ml

Les arcs donnés par le prélèvement I se différencient de ceux donnés par les autres prélèvements par un dédoublement des réponses anti-BSA-AT et anti-BSA (tableau 4.1).

Mise en évidence par test Elisa d'une réponse dirigée contre les métabolites du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales - Nous avons d'abord travaillé avec le TAI à cause des quantités importantes de métabolites fixés sur les protéines microsomales que l'on peut obtenir avec ce substrat. Dans un premier temps, nous avons préparé des protéines microsomales avant de les fixer sur les plaques Elisa.

Les métabolites du TAI fixés sur les protéines de manière covalente sont instables ; pour résoudre ce problème, nous avons utilisé un résultat du chapitre précédent, à savoir qu'un traitement par HCl stabilise ces métabolites, en particulier vis à vis d'une attaque nucléophile.

Une incubation (20 min. à 37°C) de TAI (100 µM) en présence de microsomes CLO (P-450 1 µM) avec ou sans système générateur de NADPH a été traitée par de l'HCl (2N) pendant une heure à 37°C. Après plusieurs lavages au méthanol, les protéines microsomales ont été remises en solution dans de la soude 0,1N avant dilution choisie dans le tampon de sensibilisation de l'Elisa (partie expérimentale 6.3.4, p. 149). L'utilisation de TAI radioactif a permis de quantifier les différentes étapes. La quantité de métabolites fixés aux protéines issues de l'incubation en présence de système générateur de NADPH est comparable à celle mesurée par la technique de précipitation sur filtre. Le lavage au méthanol s'est révélé efficace puisque la quantité de radioactivité présente dans les protéines issues de l'incubation en l'absence de système générateur de NADPH est négligeable. Toutefois nous n'avons pas réussi à doser correctement les protéines ayant subi le traitement par HCl (voir partie expérimentale 6.3.4, p. 149).

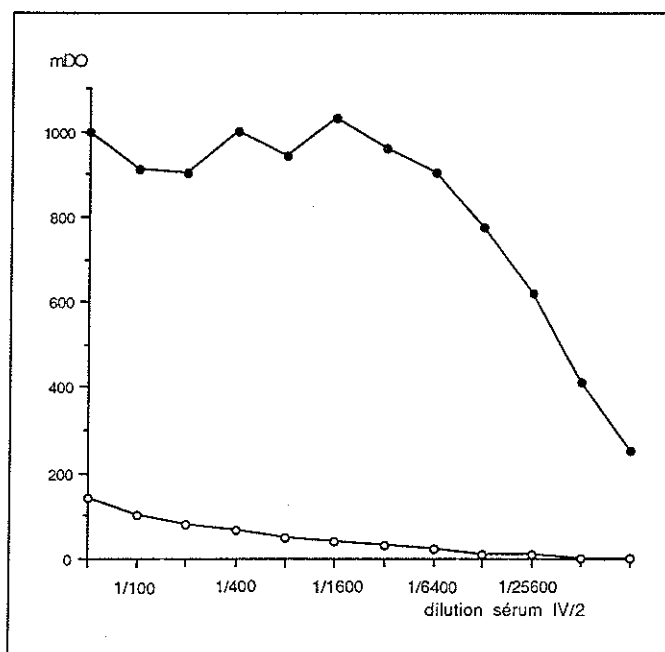


Figure 4.7 Courbes Elisa obtenues avec le prélèvement IV du lapin 2. les puits sont activés avec des protéines issues d'incubations de TAI avec des microsomes CLO en présence (●) ou en absence (○) de système générateur de NADPH (75 pmol de métabolites du TAI fixés aux protéines par puits) ; voir également les courbes de calibration du test Elisa sur la figure 6.6, p. 151.

Le protocole des tests Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay) est détaillé dans la partie expérimentale 6.3.4 (p. 149). Les puits ont été activés par 75 pmol de métabolites de TAI fixés de manière covalente aux protéines microsomales traitées selon le protocole précédent. Les puits témoins contiennent une quantité équivalente de protéines microsomales issues des incubations sans système générateur. La fixation non-spécifique des anticorps anti-AT a été bloquée par de la gélatine. Les complexes antigène-anticorps ont été révélés par des anticorps anti-Ig de lapin marqués à la peroxydase avec l'ABTS comme substrat (20 min. à 37°C). Tous les prélèvements ont été testés avec des dilutions de 4 en 4, du 1/200ième au 1/204800ième. Chaque mesure a été réalisée en duplicat.

Tous les sérums immuns donnent un signal intense (en moyenne 1 unité de D.O. avec les sérums dilués au 1/200ième) dans les puits sensibilisés par des protéines microsomales issues d'incubation de TAI en présence de système générateur en NADPH, au contraire des puits témoins où la coloration est au moins 10 fois plus faible et disparaît plus rapidement au fur et à mesure des dilutions. L'ensemble des titres (définis par la dilution du sérum qui donne une coloration d'intensité moitié de l'intensité maximale) est résumé dans le tableau 4.2. Ces titres sont compris entre 1/5000ième et 1/50000ième (prélèvement IV, lapin 2). Les lapins 1 et 2 donnent les titres les plus forts, le sérum préimmun du lapin 2 ne donne aucun signal (figure 4.7).

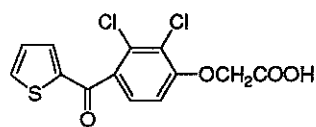
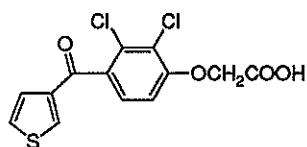
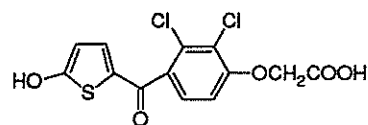
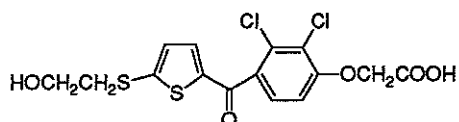
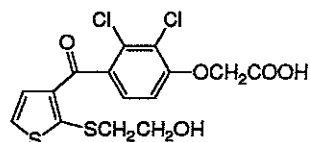
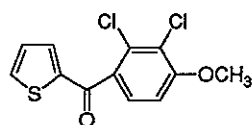
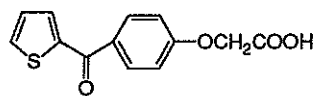
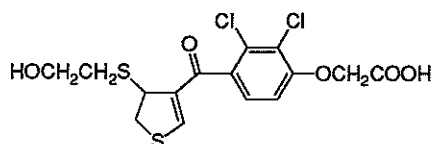
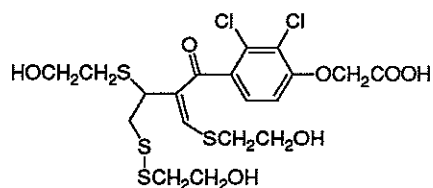
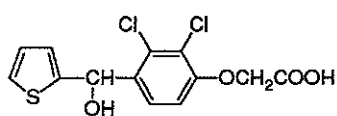
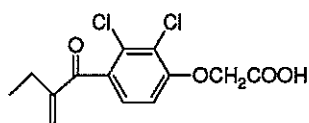
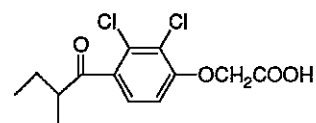
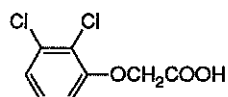
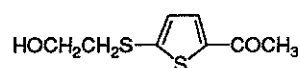
AT 1TAI 105-hydroxy-AT 65-S-mercaptoéthanol-AT 402-S-mercaptoéthanol-TAI 174142151612Ac. éthacrynique 38Ac. dihydroéthacrynique 43Ac. 2,3-dichlorophénoxyacétique 4445

Figure 4.8 Structure des inhibiteurs testés.

Tableau 4.2 Titres Elisa observés sur l'ensemble des prélèvements.

Lapin	1	2	3	4	5
Prélèvement O		pas de titre			
Prélèvement I	1/8000	1/20000	1/5000	1/4000	1/5000
Prélèvement II	1/13000	1/25000	1/12000	1/13000	1/10000
Prélèvement III	1/8000	1/15000	1/5000	1/6000	1/5000
Prélèvement IV	1/14000	1/50000	1/6000	1/8000	1/5000
Titre moyen	1/10000	1/27000	1/7000	1/8000	1/6000

4.2.2. Conclusion préliminaire.

L'immunisation chez le lapin contre la BSA-AT conduit à l'apparition d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'haptène fixé sur la BSA-AT puisque la reconnaissance est inhibée par l'AT et le dérivé **40**. Ces anticorps n'existaient pas avant l'immunisation. Il existe une réponse faible dirigée contre la protéine porteuse. La présence d'un deuxième arc, moins intense, chez les lapins 2 et 5 dans les derniers prélèvements, inhibée par l'AT, peut s'interpréter en terme de reconnaissance de l'haptène et de la séquence protéique sous-jacente au niveau d'un épitope différent de celui reconnu dans l'arc principal. Le dédoublement des arcs obtenus avec les sérums du prélèvement I est probablement dû à des immunoglobulines M de la réponse immunitaire primaire.

Par la technique de l'Elisa, les sérums immuns reconnaissent très spécifiquement les protéines microsomaux hépatiques de rat sur lesquelles le TAI s'est fixé de manière covalente après activation métabolique en présence des P-450 et d'un système générateur de NADPH. Avec les sérums du prélèvement IV, nous avons également mesuré l'affinité des anticorps pour le TAI et la quantité d'immunoglobulines (Ig) capables de reconnaître le TAI présente (voir annexe 7.2, p. 158).

Les sérums prélevés sur le lapin 2 donnent les arcs de précipitation les plus intenses en Ouchterlony et les meilleurs titres en Elisa. Nous avons regroupé l'ensemble des prélèvements de ce lapin meilleur répondeur (à l'exception des prélèvements 0 et I) et préparé la fraction des immunoglobulines par précipitation au sulfate d'ammonium (partie expérimentale 6.3.2, p. 148).

4.3. Caractérisation de l'épitope de l'acide tiénilique reconnu par les anticorps anti-AT.

Pour identifier la nature des déterminants chimiques reconnus par les anticorps anti-AT, nous avons testé la capacité de différents analogues de structure de l'AT à inhiber par compétition, dans le test Elisa mis au point précédemment, la reconnaissance de métabolites du TAI ou de l'AT fixés sur les protéines microsomaux. Le but est premièrement de déterminer la nature de l'épitope reconnu par ces anticorps et deuxièmement de déterminer les critères structuraux qui feront qu'un métabolite de l'AT ou du TAI sera ou non reconnu par ces anticorps.

4.3.1. Méthodes.

Les Ig du lapin 2 sont préincubées une nuit à 4°C en présence de l'inhibiteur à différentes concentrations (entre 1 nM et 1 mM selon les inhibiteurs), de tween et de gélatine (mêmes concentrations que dans l'Elisa). Dans un deuxième temps, un test Elisa est réalisé et la concentration pour laquelle l'inhibiteur diminue de 50% le signal obtenu en l'absence de tout inhibiteur est déterminée.

Les plaques ont été sensibilisées par des protéines microsomales ayant fixé des métabolites soit du TAI soit de l'AT et traitées par HCl (partie expérimentale 6.3.4, p.149). Les blancs ont été réalisés par sensibilisation des puits au moyen de protéines microsomales issues d'incubations sans système générateur en NADPH. Les tests Elisa ont été calibrés pour donner le meilleur signal (partie expérimentale 6.3.4, p.149). La nomenclature et les formules des inhibiteurs testés sont présentées dans la figure 4.8, l'origine et les différentes synthèses d'inhibiteurs sont décrites dans la partie expérimentale 6.3.5 (p.152). Pour les plaques sensibilisées par du TAI, chaque point est le résultat de 8 mesures (4 signaux, 4 blancs, en 2 expériences réalisées en duplicat sur des séries de plaques manipulées des jours différents) (4 mesures pour les plaques sensibilisées par l'AT).

4.3.2. Résultats.

Avec 20 pmol/puits de métabolites du TAI fixés de manière covalente aux protéines microsomales, les Ig du lapin 2 diluées au 1/20000ième et une révélation à l'ABTS de 20 min. à 37°C, le test Elisa donne une coloration reproductible de 500 mDO. En présence de concentrations croissantes des différents inhibiteurs, le signal décroît régulièrement jusqu'à abolition complète selon une courbe sigmoïde (figure 4.9) sauf pour le dérivé 45 dont le caractère peu soluble limite son utilisation au delà

Tableau 4.3 Inhibition compétitive par des analogues de l'AT de la reconnaissance par les Ac anti-AT. (concentration en nM pour laquelle chaque analogue diminue le signal de l'Elisa de 50% ; les plaques sont activées avec des protéines microsomales ayant fixé soit des métabolites du TAI, soit des métabolites de l'AT).

Inhibiteur	Plaques activées par des métabolites		
		du TAI	de l'AT
		(nM)	(nM)
5-S-mercaptoéthanol-AT	40	2,3	
AT	1	7,5	4,5
TAI	10	17	4,5
2-S-mercaptoéthanol-TAI	17	31	
	15	39	
Ac. éthacrynique	38	50	13,5
5-hydroxy-AT	6	80	
Ac. dihydroéthacrynique	43	150	
	16	260	
	12	1400	
	41	8800	
	42	10600	4600
Ac. dichlorophénoxyacétique	44	32800	29700
	45	460000	4600

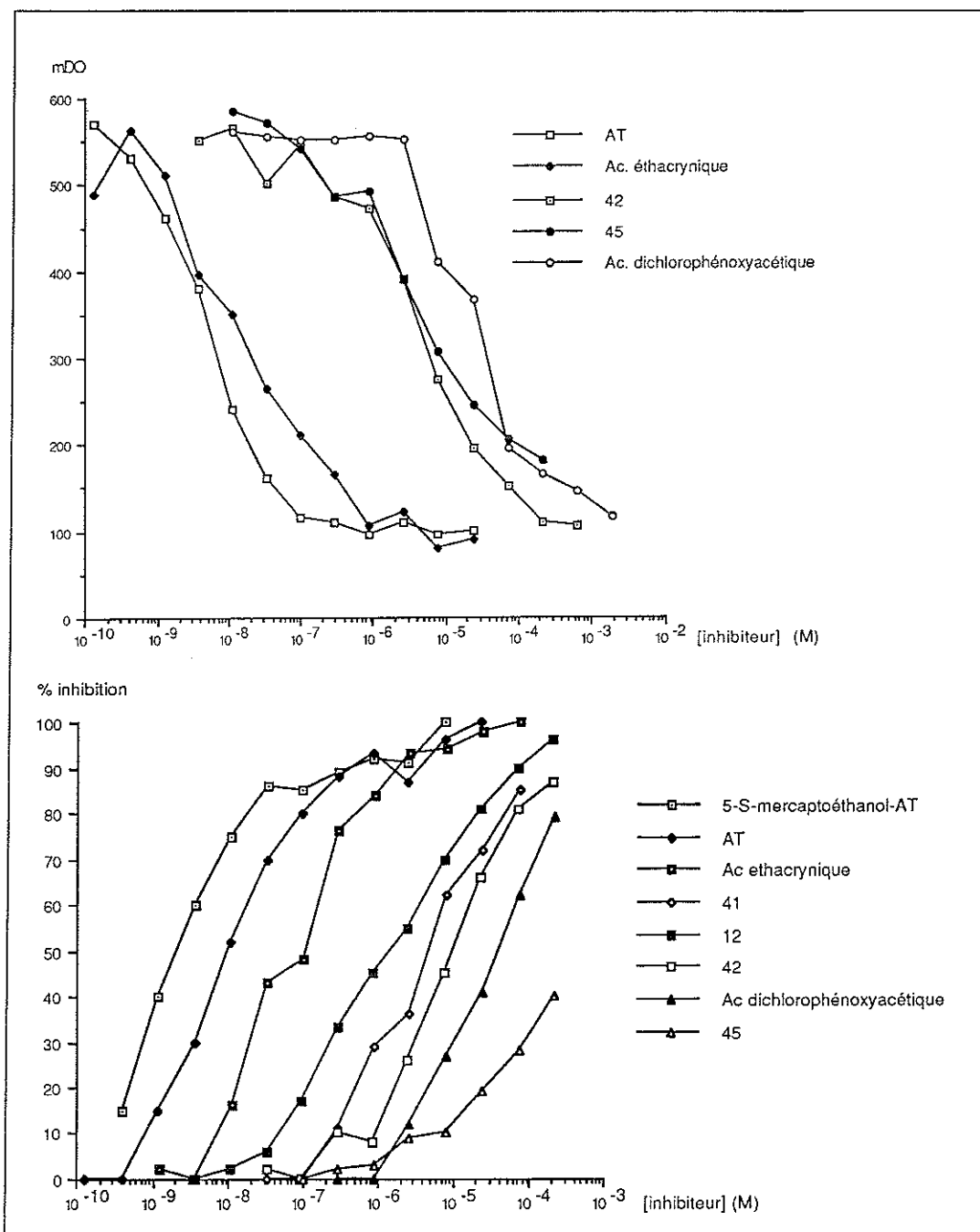


Figure 4.9 Courbes d'inhibition compétitive du test Elisa (en haut les puits sont activés par des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales et en bas avec ceux du TAI).

de 210 μ M. Dans le tableau 4.3 est indiquée la concentration de chacun des inhibiteurs qui diminue le signal de 50% (point d'inflexion de la sigmoïde), cette valeur a été extrapolée pour le dérivé **45**.

Dans le cas de l'AT fixé de manière covalente aux protéines microsomales (10 pmol/puits, Ig du lapin 2 diluées au 1/5000ième), le signal est de 550 mDO en l'absence d'inhibiteur (révélation à l'ABTS 20 min. à 37°C) et décroît régulièrement aux concentrations croissantes de chacun des inhibiteurs testés jusqu'à un plateau de 100 mDO (figure 4.9). Les valeurs des concentrations qui inhibent 50% de l'amplitude du signal (amplitude de 325 mDO entre la valeur mesurée sans inhibiteur et le plateau

de 100 mDO) sont du même ordre de grandeur que celles observées avec les métabolites du TAI fixés aux protéines microsomales sauf pour le dérivé **45** qui est un meilleur inhibiteur dans cette expérience.

4.4. Discussion.

Nous nous sommes donnés pour but de produire des anticorps polyclonaux chez le lapin capables de reconnaître les métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines microsomales après activation métabolique réalisée par les cytochromes P-450. Pour cela il nous fallait fixer sur une protéine porteuse un haptène dont la structure devait ressembler à celle des métabolites de l'AT. La nature de l'entité réactive de l'AT est pour l'instant inconnue mais nous savons 1) qu'il s'agit probablement du sulfoxyde de l'AT, 2) qu'un métabolite de l'AT, le composé **6**, possède un noyau thiophène substitué en 2 et 3) que l'ensemble des métabolites du TAI, issus des transformations du sulfoxyde de TAI, a un motif structural commun qui est l'acide éthacrynique. Le dérivé 5-S-mercaptoéthanol-thiophène **40** diffère de l'AT au niveau du noyau thiophène, il est substitué en position 2 du noyau thiophène et il possède le motif de l'acide éthacrynique. Ce composé est donc le meilleur haptène compte tenu de nos connaissances sur les métabolismes de l'AT et du TAI. Pour construire ce motif sur la BSA, nous avons dans un premier temps fixé 30 thiols sur la BSA puis fait réagir cette BSA thiolée avec le composé **39**. Le spectre d'absorption U.V. de la protéine obtenue (BSA-AT) comporte une bande d'absorption à 364 nm en plus de la bande à 280 nm des acides aminés aromatiques. Cette bande a les mêmes caractéristiques que le spectre du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-thiophène **40**. L'AT est donc bien fixé par l'intermédiaire d'une chaîne comportant un soufre qui substitue le noyau thiophène en position 5. Le nombre de molécules fixées par molécule de BSA, 14,6, est suffisant pour envisager une immunisation.

Pour étudier les sérums immuns, nous avons développé un test Elisa dans lequel les plaques ont été sensibilisées par des protéines microsomales ayant fixé ou non les métabolites réactifs du TAI (en présence ou en absence de système générateur de NADPH). Les sérums immuns reconnaissent très spécifiquement les protéines issues d'incubations conduites en présence de système générateur de NADPH. Nous pouvons conclure que l'ensemble des lapins a répondu en produisant des anticorps spécifiques des métabolites du TAI fixés de manière covalente aux protéines microsomales. Les sérums du lapin 2 donnent le meilleur titre dans ce test, par la suite nous avons uniquement travaillé avec la fraction des Ig des sérums immuns de ce lapin. Une reconnaissance des métabolites de l'AT fixés de manière covalente aux protéines microsomales est également observée avec ces Ig, il y a donc reconnaissance croisée entre les métabolites du TAI et ceux de l'AT.

Dans un deuxième temps nous avons étudié la nature des déterminants chimiques reconnus par ces anticorps par inhibition compétitive du test Elisa par des analogues de l'AT. Dans les expériences d'inhibitions où des métabolites du TAI sont fixés aux protéines microsomales, tous les inhibiteurs (à part le cas particulier du dérivé **45**) inhibent complètement, à fortes concentrations, la fixation des anticorps anti-AT. L'épitope reconnu sur ces métabolites est donc unique (il n'y a qu'un seul site de reconnaissance de ces métabolites par les anticorps anti-AT). Le dérivé **40** qui

présente le plus d'analogie avec l'haptène de la BSA-AT est le meilleur compétiteur. L'AT, le TAI et le dérivé **17** forment le groupe des inhibiteurs où la partie thiophénique est aromatique et le noyau phénoxyacétique présent. Ces composés inhibent à 50% la fixation des anticorps pour une concentration moyenne de 16 nM. La présence du résidu mercaptoéthanol est donc peu importante dans la reconnaissance des métabolites par les Ac anti-AT. Le rapport des concentrations qui inhibent le signal de 50% pour deux inhibiteurs est un moyen souvent utilisé pour estimer l'affinité relative des anticorps vis à vis de l'élément de structure qui les différencie (voir par exemple Potter et al, 1989). La comparaison des inhibitions réalisées par le dérivé **40** et par l'AT montre une différence d'un facteur 3. On peut donc estimer à 3 la contribution du résidu mercaptoéthanol dans la reconnaissance du dérivé **40** par les anticorps anti-AT.

Un deuxième groupe est constitué par les dérivés qui comportent le motif acide éthacrynique, ce sont les dérivés **15**, **16** et l'acide éthacrynique **38**. Ces composés inhibent le test Elisa de 50% à la concentration moyenne de 116 nM, ce sont donc de bons inhibiteurs. Ce résultat montre que nous avons atteint l'objectif défini avec la stratégie de couplage, à savoir que nous voulions des anticorps capables de reconnaître le motif commun à l'ensemble des métabolites de piégeage du TAI (figure 4.3). Par comparaison avec les dérivés du premier groupe, la disparition du noyau thiophène diminue l'affinité des Ac anti-AT d'un facteur de l'ordre de 7 ($116/16 \approx 7$). Le dérivé **6**, malgré la présence d'une charge négative sur sa partie thiophénique, reste un bon inhibiteur (80 nM).

La double liaison de l'acide éthacrynique intervient pour un facteur 3 estimé par comparaison des inhibitions réalisées par l'acide éthacrynique et l'acide dihydroéthacrynique ($43/38 = 150/50 = 3$). Le noyau thiophène contribue donc pour un facteur de l'ordre de 20 ($\approx 3 \times 7$). La perte de la fonction cétone s'accompagne d'une diminution importante de l'affinité des anticorps d'un facteur d'environ 200 que l'on trouve soit en comparant l'AT réduit **12** avec l'AT ($1400/7,5 \approx 190$), soit en comparant l'acide dichlorophénoxyacétique **44** avec l'acide dihydroéthacrynique **43** ($32800/150 \approx 220$). Les deux chlores fournissent une contribution importante de l'ordre de 1400, soit environ 40 par atome de chlore. Mais le facteur le plus grand provient du groupe carboxylique qui est, en comparant le dérivé **41** avec l'AT, de l'ordre de 1200 (figure 4.10). En conclusion, les anticorps anti-AT que nous avons obtenu reconnaissent les métabolites du TAI par la partie non-thiophénique du TAI, c'est à dire par le motif 4-céto, 2,3-dichlorophénoxyacétique. Trois déterminants chimiques sont à l'origine de cette reconnaissance, ce sont la fonction cétone, les deux atomes de chlore et le groupe carboxyle ; le noyau benzénique intervient probablement en fixant une orientation spatiale précise à l'ensemble.

Dans le cas des expériences d'inhibition réalisées avec des plaques sensibilisées par des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales, l'inhibition n'est jamais complète mais garde l'aspect d'une sigmoïde avec un plateau identique pour chacun des inhibiteurs. Il paraît plus vraisemblable que cette D.O. résiduelle soit un artefact, par exemple dû à la plus forte concentration en anticorps anti-AT utilisée dans cette expérience, plutôt que le reflet d'une fixation sur d'autres déterminants chimiques que l'AT ne pourrait pas inhiber.

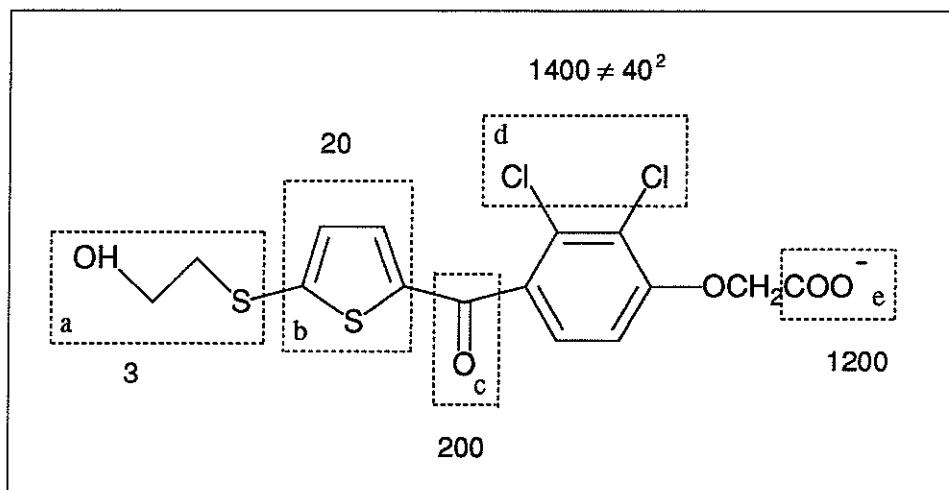


Figure 4.10 Effets des différents déterminants chimiques du dérivé 40 sur la reconnaissance par les Ac anti-AT estimés par les expériences d'inhibition du test Elisa. Les valeurs données sont calculées en comparant la capacité de divers analogues de structure à inhiber compétitivement la fixation des Ac anti-AT dans le test Elisa, soit a) AT comparé à 40, b) acide dihydroéthacrynique comparé à l'AT, c) 12 comparé à l'AT, d) 42 comparé à l'AT et e) 41 comparé à l'AT.

Le dérivé 45 est un bien meilleur inhibiteur dans ce test. Ce motif pourrait participer à la reconnaissance des métabolites de l'AT fixés aux protéines microsomales par les anticorps anti-AT. Autrement dit la structure 5-thioéther, 2-aryltiophène pourrait faire partie de l'épitope reconnu dans les protéines incubées avec l'AT et être absent de celui présent dans les protéines incubées avec le TAI.

Les anticorps obtenus par immunisation chez le lapin par de la BSA-AT reconnaissent spécifiquement les métabolites de l'AT ou du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales. Cette reconnaissance se fait principalement par l'intermédiaire du motif 4-céto-2,3-dichlorophénoxyacétique. Ce motif est probablement présent dans l'ensemble de ces métabolites qui sont donc à priori tous reconnus par les Ac anti-AT. Ces anticorps vont pouvoir servir d'outil pour étudier les protéines modifiées par ces composés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Des résultats préliminaires laissent penser qu'ils sont plus sensibles, par la technique d'immunotransfert, que l'autoradiographie au moyen d'AT radioactif. Des résultats préliminaires ont été également obtenus sur la reconnaissance par les Ac anti-LKM2 de la protéine BSA-AT qui sont en faveur de la présence d'Ac anti-médicament dans les sérums de patients victimes d'une hépatite autoimmune induite par la prise d'AT.

CHAPITRE CINQUIEME

CONCLUSION

L'acide tiénilique a été retiré du marché français au début de 1992, ce qui fait une quinzaine d'années d'existence pour ce médicament controversé qui semble disparaître sans que son métabolisme ne soit connu. Qui semble seulement, et c'est là le résultat important de ce travail, car nous avons maintenant des arguments positifs qui nous donnent presque la certitude de penser que le métabolisme oxydatif des dérivés thiophéniques passe par une oxydation du soufre en **sulfoxyde de thiophène**.

Le premier objectif que nous cherchions à atteindre était d'étudier *in vitro* le piégeage par le mercaptoéthanol de l'entité réactive de l'isomère de l'acide tiénilique, dérivé du thiophène également toxique. Quatre métabolites, **13**, **14**, **15** et **16**, ont été isolés, purifiés et caractérisés. Les métabolites **13** et **14** apparaissent pour de faibles concentrations en mercaptoéthanol et se transforment successivement en composé **16** puis en composé **15**. Les deux métabolites **13** et **14** sont diastéréoisomères et, en milieu acide, ils perdent facilement une molécule d'eau en donnant un composé unique **17** qui possède une structure de noyau thiophène substitué en 2 par un résidu mercaptoéthanol. Les données de R.M.N.¹H, de masse et d'I.R. recueillies sur les composés **13** et **14** sont en accord avec une structure de sulfoxyde de 2,5-dihydrothiophène substitué en 2 par un résidu mercaptoéthanol.

La détermination de ces structures nous permet de proposer le **sulfoxyde de TAI** comme produit de l'oxydation du TAI réalisée par les P-450. Il s'agit de la première caractérisation de la S-oxydation d'un thiophène et la réactivité particulière de ce nouveau métabolite vis à vis des nucléophiles rend compte de ses évolutions successives en présence de thiols.

Trois propriétés singulières des composés **13** et **14** sont à l'origine de la diversité de leurs évolutions. Ce sont 1) la perte d'une molécule d'eau en milieu acide, propriété des sulfoxydes de dihydrothiophène, 2) la présence en position 4 d'un centre électrophile sur lequel un mercaptoéthanol peut réaliser une addition et 3) un équilibre entre le sulfoxyde cyclique et un acide sulfénique ouvert. La forme acide sulfénique, que nous n'avons jamais isolée, peut réagir avec le

mercaptoéthanol pour donner des structures qui comportent un dithioéther. Ainsi le composé **16** a une structure ouverte substituée par 2 résidus mercaptoéthanol en 2 et en 4 et un dithioéther en 5 sur lequel est présent un troisième résidu mercaptoéthanol. Pour déterminer la position du motif mercaptoéthanol en 4, nous avons effectué une deutériation sélective du composé **14** en position 5 et repéré la position de ce deutérium au cours des différentes évolutions de **14**.

Le métabolisme du TAI *in vitro* en présence de mercaptoéthanol se résume ainsi : le TAI est métabolisé par un P-450 en sulfoxyde. Une première addition de Michaël d'un mercaptoéthanol en position 2 du sulfoxyde de TAI conduit aux composés **13** et **14**. Une deuxième addition de Michaël en position 4 peut ouvrir le cycle et la formation d'une liaison dithioéther entre l'acide sulfénique libéré et un mercaptoéthanol fait apparaître le composé **16**. La réduction de cette dernière liaison par le mercaptoéthanol entraîne une cyclisation qui conduit au composé **15**, métabolite final de ce métabolisme.

L'idée suivante était par voie de conséquence de généraliser la formation du sulfoxyde de TAI à différents modèles d'étude de l'oxydation microsomale réalisée par les P-450. Nous avons tout d'abord poursuivi notre étude *in vivo* chez le rat où nous avons isolé dans les urines des acides mercapturiques contenant le motif structural 4,5-dihydrothiophène substitué en 4 par un thioéther, motif présent dans le composé **15**. Pour obtenir ce résultat, nous avons étudié le piégeage du sulfoxyde de TAI *in vitro* sur la fraction microsomale de foie de rat par la N-acétylcystéine qui s'est avéré identique à celui réalisé par le mercaptoéthanol. Ces deux observations nous permettent de conclure que 1) le TAI est activé par les P-450 *in vivo* en sulfoxyde de TAI et 2) ce sulfoxyde est y alors piégé par le glutathion en sulfoxyde de 2,5-dihydrothiophène qui va ensuite évoluer, sous l'action de la forte concentration en GSH intracellulaire, vers la structure finale du composé **15**. Le nombre et la complexité des réactions rendent compte de la faible quantité de métabolite final récupérée dans les urines (au moins 9 étapes entre le TAI et l'acide mercapturique).

Notre attention s'est ensuite portée sur la métabolisation *in vitro* avec des microsomes humains. Sur un lot de microsome issu d'un seul individu, nous avons caractérisé 2 voies métaboliques distinctes et d'égale importance qui sont une **voie réductrice** impliquant la réduction de la fonction cétone de TAI et une **voie oxydative** catalysée par les P-450 de la sous-famille IIC. Par piégeage au moyen de mercaptoéthanol, nous avons retrouvé l'ensemble des composés précédemment observés avec les microsomes de rat. La S-oxydation du TAI est donc une voie métabolique commune à l'ensemble des P-450 que l'on sait impliqués dans le métabolisme oxydatif du TAI.

Pour affiner ces résultats et essayer d'identifier le ou les P-450 responsables chez l'homme du métabolisme de l'AT et de son isomère, notre intérêt s'est porté sur un système d'expression hétérologue que constitue la levure recombinée avec un gène de P-450 inséré dans un plasmide. Nous avons obtenu de F. Guengerich

(Naschville, U.S.A.) 2 souches de levures possédant un gène de P-450 de la famille IIC. Ces deux P-450, que l'on sait fonctionnels dans ce système d'expression, sont la protéine MP8 (IIC10) et la protéine MP4 (IIC9). Nous avons pu mettre en évidence 3 activités sur la fraction microsomale de ces levures : une activité de 5-hydroxylation de l'AT ($20,2 \pm 0,2$ nmol μ /nmol MP4/10 min., respectivement $20,4 \pm 3,1$ pour MP8), une fixation covalente du TAI aux protéines microsomales ($23,7 \pm 9,4$ nmol/nmol MP4, respectivement $23,7 \pm 9,4$ pour MP8) et une formation des métabolites de piégeage du TAI **15** et **16** en présence de mercaptoéthanol 5 mM dans le milieu d'incubation. Il n'y a pas de différence significative entre les activités portées par ces deux P-450 qui ne diffèrent en fait que par 2 acides aminés et qui proviennent probablement de gènes alléliques. Nous confirmons ainsi le rôle des P-450 IIC chez l'homme dans le métabolisme de l'AT et par là même nous avons identifié un des P-450, parmi les 7 au moins que compte la sous-famille P-450 IIC humaine, capable d'hydroxyler l'AT. Cette activité va de pair avec une métabolisation du TAI. Grâce à la mise en évidence pour le TAI des mêmes métabolites de piégeage par le mercaptoéthanol qu'*in vitro* chez le rat, nous pouvons affirmer que les P-450 IIC9 et IIC10 réalisent une S-oxydation du TAI.

Le sulfoxyde de TAI est responsable de la réaction de fixation covalente aux protéines microsomales. Nous avons essayé d'identifier les acides aminés impliqués dans cette activité. S'il ne s'agit pour l'instant que de résultats incomplets et préliminaires, plusieurs constatations méritent d'être soulignées. Premièrement, la concentration en cystéines libres dans le milieu d'incubation, de l'ordre de 40 μ M avec une concentration en protéines microsomales de 0,7 mg/ml, est largement suffisante pour piéger efficacement le sulfoxyde de TAI. Parmi les principaux nucléophiles des protéines, la cystéine est la plus réactive. Parmi les autres acides aminés, seule l'histidine semble pour l'instant avoir une capacité de piégeage importante, toutefois au moins 100 fois plus faible que celle de la cystéine. Il n'est pas exclu que dans le cœur des protéines comme par exemple au sein du P-450, le sulfoxyde puisse se fixer sur des acides aminés autres que la cystéine et l'histidine comme par exemple la lysine. A partir de la comparaison entre les propriétés des métabolites de piégeage **13** et **14** et celles des métabolites fixés, nous avons identifié au moins 15% de ces derniers sous forme de sulfoxyde de dihydrothiophène substitué en 2 par le thiol d'une cystéine protéique. En l'absence de thiol présent dans le milieu réactionnel, la cystéine semble être l'acide aminé majoritairement responsable de la réaction de fixation covalente du sulfoxyde de TAI aux protéines microsomales.

L'apparition de métabolites de l'AT fixés aux protéines hépatiques est une étape clé dans la survenue des hépatites autoimmunes induites par l'AT. Pour étudier ces néoantigènes et leur reconnaissance par les anti-LKM2, nous nous sommes donnés comme dernier but d'obtenir des anticorps capables de reconnaître ces métabolites. Compte tenu de l'échec d'une précédente tentative où l'AT

était fixé à la protéine porteuse par sa fonction carboxyle et compte tenu des nouveaux éléments dont nous disposons sur le métabolisme des dérivés aroylthiophènes, nous avons défini une stratégie de couplage qui devait répondre à 3 critères : 1) le motif de l'acide éthacrynique doit être présent dans la structure de l'haptène (motif présent dans tous les métabolites connus de l'AT ou du TAI), 2) l'haptène doit être fixé de façon covalente à la protéine porteuse au niveau du noyau thiophène (où il est activé), 3) idéalement la partie thiophénique est aromatique et substituée en 5 par un thiol (comme le suggère un possible piégeage d'un sulfoxyde de l'AT en 5 par un thiol suivi de la perte d'une molécule d'eau). Nous avons choisi de fixer dans un premier temps des thiols sur de la BSA puis de les faire réagir avec le dérivé 5-chloro-AT. La protéine obtenue possède environ 15 molécules d'AT substituées par les thiols sur la position 5 du thiophène. Cette protéine est immunogène chez le lapin et entraîne l'apparition d'anticorps qui reconnaissent l'haptène. Nous avons développé un test Elisa de reconnaissance des métabolites fixés de façon covalente sur les protéines microsomales. Les titres obtenus sont forts et spécifiques des protéines provenant d'incubations avec un système générateur de NADPH. Il y a donc reconnaissance spécifique des métabolites fixés par les anticorps anti-AT. Par compétition avec des analogues de structure de l'AT, nous pouvons affirmer que cette reconnaissance se fait essentiellement par la partie céto-dichloro-phénoxyacétique de la molécule. Ce motif est probablement présent dans tous les métabolites de l'AT et du TAI qui, par conséquent, doivent être tous être reconnus par nos anticorps. Ces anticorps anti-AT sont en cours d'application au laboratoire.

 CHAPITRE SIXIEME

 PARTIE EXPERIMENTALE

Cette partie expérimentale reprend le plan des trois chapitres II à IV.

6.1. Mise en évidence de la formation d'un sulfoxyde de thiophène *in vitro*.

6.1.1. Produits chimiques.

L'origine des produits chimiques utilisés est précisée dans le tableau 6.1.

6.1.2. Induction des animaux et préparation de la fraction microsomale de foie de rat.

Origine des animaux - Il s'agit de rats mâles de souche Sprague Dawley (Iffa Credo) pesant environ 200 g. Après une période d'acclimatation de 10 jours (température constante de 24°C, éclairage nyctéméral, nourriture (AO4 de chez UAR) et eau *ad libitum*), un protocole d'induction spécifique de 3 jours est institué. Après une dernière nuit de jeûne, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis exsanguinés par section carotidienne. Le foie est immédiatement prélevé et la fraction microsomale préparée.

Protocole d'induction au phénobarbital - On pratique une injection intrapéritonéale journalière à la dose de 80 mg/kg, soit 1 ml d'une solution à 16 mg/ml dans du sérum physiologique par jour pendant trois jours.

Protocole d'induction au clofibrate - Quatre injections intrapéritonéales (i.p.) de clofibrate à partir d'une solution à 10% v/v dans l'huile de maïs (1 ml équivalent à 100 mg de clofibrate) selon le protocole suivant :

Jø.	18h.	250 mg/kg (i.p.)
J1.	10h - 18h.	500 mg/kg (i.p.) en 2 injections
J2.	16h.	1000 mg/kg (i.p.)
J3.	10h.	†.

Protocole de préparation des microsomes - 3 à 6 foies de rat sont traités à chaque préparation. Le protocole employé est décrit sur la figure 6.1 ; l'étape de lavage au pyrophosphate permet l'élimination de l'hémoglobine (Kremers et al, 1981).

Tableau 6.1 Origine des produits chimiques.

Produit chimique		origine
6		Amphar-Rolland
12		P. Dansette (URA 400)
39 et [¹⁴ C ₂] 39 (25 μCi/μmol)		Amersham
40		P. Dansette (URA 400)
41		Amphar-Rolland
2-Acétyle-5-chlorothiophène		Aldrich
Acide azino-2-2' di(éthyl-3' benzthiazoline sulfonique (ABTS)		Sigma
Acide chlorhydrique 9,46N		Merck
Acide 2,3-dichlorophénoxyacétique		Janssen
Acide éthacrynique		Sigma
Acide tiénilique	AT [¹⁴ C ₂]AT (43 μCi/μmol)	Amphar-Rolland CEA-URA400 (DO CAO T.)
Adjuvants de Freund		Sigma
Agar noble		Difco
Anhydride de l'acide heptafluorobutyrique		Aldrich
DETAPAC		Sigma
Dithiotréitol		Sigma
EDTA		Sigma
Isomère de l'AT	TAI [¹⁴ COAr]TAI (25 μCi/μmol)	Amphar-Rolland Amphar-Rolland
Iodoacétamide		Merck
Glucose-6-phosphate déshydrogénase		Boehringer-mannheim
β-Mercaptoéthanol		Sigma
Merthiolate (thimérosal)		Sigma
N-acétyl-L-cystéine		Sigma
N-acétyl-L-lysine		Sigma
N-acétyl-L-histidine		Sigma
N-acétyl-L-tyrosine		Sigma
Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (NADP)		Boehringer-mannheim
N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP)		Sigma
PEG (polyéthylèneglycol) 4000		Prolabo
PMSF		Sigma
2-thiényl-4-méthoxyphénylcétone		Ega-chemie
Trizma-base		Sigma
Tween 20		Merck
Véronal		Sigma

Les autres produits chimiques utilisés sont de la meilleure qualité commercialement disponible.

6.1.3. Dosage des protéines, du contenu en cytochromes P-450 et de l'activité AT-5-hydroxylase.

Dosage des protéines - La concentration en protéines microsomales est mesurée selon la méthode de Lowry avec la sérualbumine de bœuf comme standard (Lowry et al, 1961a).

Dosage du contenu en cytochromes P-450 - Ce dosage est effectué selon la méthode de Omura et Sato (Omura et Sato, 1962) : après dilution choisie dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4, la suspension microsomale est répartie dans deux cuves à bords noirs limitant la diffusion de la lumière. On réduit les hémoprotéines par addition de 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 P-450-CO est alors mesurée par spectrophotométrie d'absorption différentielle sur un spectrophotomètre KONTRON 820 ($\epsilon_{450-490} = 91 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$).

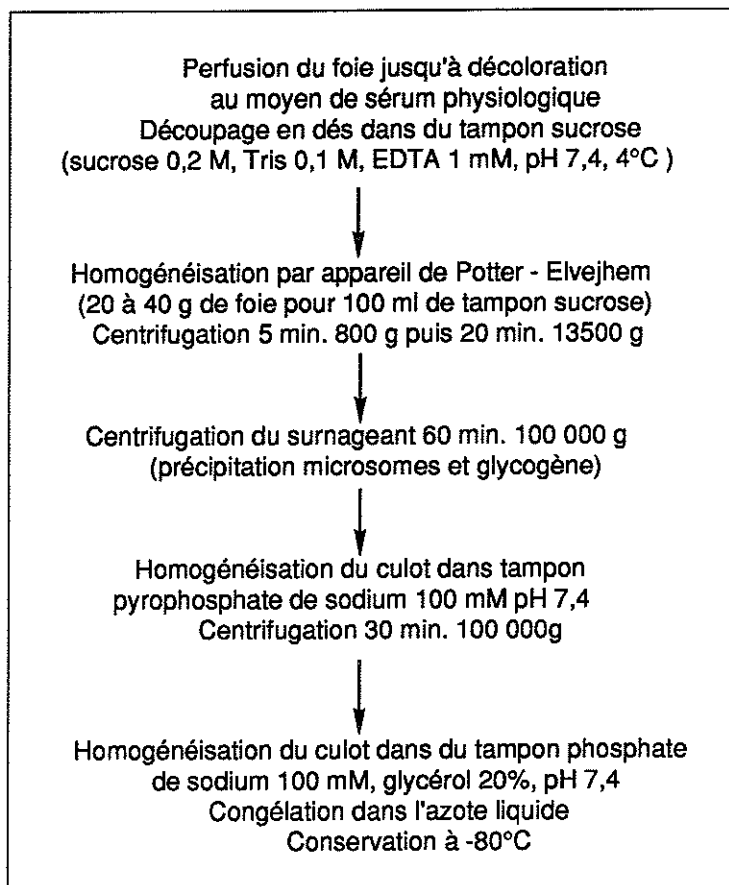


Figure 6.1 Préparation de la fraction microsomale de foie de rat. Toutes les manipulations sont effectuées à 4°C, le contenu en cytochrome b5 est immédiatement dosé ($\epsilon_{427-410} = 181 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ sur seule réduction de la cuve échantillon), puis celui en cytochrome P-450 ($\epsilon_{450-490} = 91 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)

Dosage de l'activité de 5-hydroxylation de l'acide tiénilique - Ce dosage est pratiqué selon la méthode mise au point par Elisabeth Neau (Neau, 1989) : une suspension microsomale fraîchement préparée, à la concentration en P-450 de 1 μM , additionnée du système générateur en NADPH (voir ci-dessous), est répartie dans deux cuves à bords noirs de 1 cm de trajet optique maintenues à une température constante de 37°C. La réaction est démarrée par l'addition de 1% en volume d'une solution méthanolique d'acide tiénilique 10 mM dans la cuve échantillon, et est immédiatement suivie par enregistrement successif de spectres d'absorption différentielle entre 380 et 450 nm. La vitesse initiale d'apparition du dérivé **6** est mesurée à 390 nm où se situe son maximum d'absorption ($\epsilon_{390} = 27000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

Caractéristiques des préparations microsomales - Les caractéristiques des principales préparations utilisées dans ce travail sont regroupées dans le tableau 6.2. Les microsomes contrôles (CONT) sont préparés à partir de foies de rats qui ne reçoivent aucune injection. Les préparations de microsomes CLO ont été multiples car utilisées pour la préparation de grandes quantités des différents métabolites. Seules celles employées pour l'étude du métabolisme total et de la réaction de fixation covalente aux protéines microsomales ont été complètement caractérisées.

Tableau 6.2 Caractéristiques des préparations microsomales.

Induction	nombre de rats	P-450 nmol/mg protéines	b5 nmol/mg	5-hydroxylation nmol $\frac{6}{\text{min}}$ /nmol P-450
CONT	3	1,05	0,48	1,2
PB	6	2,46	0,54	
	5	2,60	0,57	0,42
	6	2,64	0,62	0,56
CLO	10	1,40	0,41	4,4
	5	1,61	0,49	3,7
SP1 ¹	-	0,17	0,084	0,37

¹ Microsomes humains (voir paragraphe 3.2.1, p. 93).

6.1.4. Réalisation des incubats et des échantillons H.P.L.C.

Incubations analytiques - Les incubations sont réalisées dans des tubes à hémolyse pour un volume final de 150 μl par mélange à 4°C, dans un tampon phosphate de sodium (0.1 M, DETAPAC 1 mM, pH 7.4), de microsomes fraîchement décongelés à la concentration en P-450 de 1 μM , de substrat (TAI 100 μM à partir d'une solution aqueuse 5 mM) et d'un éventuel piègeur. Après préincubation de 3 min. à 37°C sous agitation, la réaction est démarrée par l'addition du système générateur de NADPH (glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) 2 U/ml, glucose-6-phosphate (G6P) 10 mM et NADP 1 mM). Le système générateur, obtenu par mélange d'une solution de G6PDH à 100 U/ml et d'une solution de G6P à 200 mM et NADP à 20 mM dans des proportions 2/5 v/v, est également préincubé 3 min. afin de réduire le NADP en NADPH. Le milieu réactionnel est agité vivement pendant 20 minutes à 37°C en présence de l'oxygène de l'air. Les incubations témoins sont réalisées en l'absence de système générateur de NADPH (remplacé par du tampon phosphate pH 7,4).

Préparation des échantillons H.P.L.C. - L'incubation est arrêtée soit en milieu neutre par addition d'un demi-volume d'acétonitrile, soit en milieu acide à pH 4,0 final par un mélange acétonitrile-acide acétique ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 72,5/7,5 v/v) dans un rapport de 80 μl pour 150 μl d'incubat. Après 10 min. à 4°C, les protéines sont séparées au moyen d'une centrifugation à 14000 g de 10 min. (centrifugeuse Mikroliter de chez Hettich pour microtubes). L'acétonitrile est évaporé du surnageant par un flux d'azote et le résidu repris par un excès de tampon acétate de sodium 100 mM pH 4,6 et conservé à -80°C avant l'analyse par H.P.L.C.

Incubations préparatives et prépurification sur Sep-Pack - Des volumes de 10 à 50 ml permettent la préparation de quantités utiles des métabolites. L'incubation est agitée doucement durant 20 à 60 min. à 37°C afin de limiter la floculation des microsomes, puis refroidie à 4°C avant une centrifugation de 10 min. à 2000 g. Le surnageant est passé sur une petite colonne (C18, système Sep-Pack) et, après rinçage à l'eau pure, les métabolites sont élués par 2 ml de méthanol. Le bilan réactionnel et les rendements sont calculés grâce à un marquage faible du TAI à 0,5 Ci/mol.

6.1.5. Réalisation des élugrammes H.P.L.C. et des radiochromatogrammes.

Les échantillons sont chromatographiés sous haute pression (H.P.L.C.) dans une colonne à polarité de phase inverse (MOS HYPERSIL C18 5 μm , 250 x 4,6 mm) éluee

Tableau 6.3. Méthodes de gradient H.P.L.C.

[colonne MOS HYPERSIL C18 5 μ m, 250 x 4,6 mm, 1 ml/min., tampon A CH₃COONa 100 mM pH 4,6, solvant B H₂O/CH₃CN v/v].

Méthode H.P.L.C. A (gradient continu)	0-100% solvant B en 20 min. (départ à t = 60 s)
Méthode H.P.L.C. B (gradient étagé)	33% isocratique à t = 0 45% à t = 6 min. 45-100% continu en 7 min. à t = 13 min.

au débit de 1 ml/min. par un mélange de deux solvants A et B. Le solvant polaire A est un tampon acétate de sodium 100 mM pH 4,6 (excepté pour la préparation des sulfoxydes **13** et **14**, voir ci-dessous), et le solvant B, un mélange eau-acétonitrile 50/50 v/v. Les deux conditions de gradients utilisées, décrites dans le tableau 6.3, sont un gradient continu (gradient A) et un gradient étagé (gradient B). Le gradient B a un meilleur pouvoir séparateur sur les composés élués entre 15 et 20 min. par le gradient A, mais est seulement utilisable sur de faibles quantités de produits. Des conditions isocratiques ont parfois été employées.

En sortie de colonne, les éluogrammes sont enregistrés par spectrophotométrie d'absorption U.V. ou visible multilongueur d'onde en temps réel au moyen du système Spectra FOCUS de chez Spectra-Physics. Une collection par fractions de 0,5 ml chaque 30 secondes dans des tubes de propylène de 3 ml, après addition de 2 ml de liquide scintillant (Picofluor 30, Packard), fournit le radiochromatogramme par comptage de la radioactivité au moyen d'un compteur à scintillation Packard Tri-carb 4500 (correction de l'extinction par étalonnage externe).

6.1.6. Mesure de la fixation covalente aux protéines microsomiales.

La méthode employée est une adaptation de la technique décrite par Fenselau et Wallin (Fenselau, 1970 et Wallin et al, 1981). Des aliquots de 50 μ l d'incubat sont déposés sur des filtres de fibres de verre (GF/B de chez Whatman) qui sont immergés immédiatement dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 10 % qui précipite les protéines. Après transfert dans deux bains de lavage au méthanol de 10 min. et un dernier bain dans de l'acétate d'éthyle (bains de 100 ml pour une vingtaine de filtres), les filtres sont séchés à l'air libre puis déposés chacun dans une fiole de polyéthylène. La radioactivité est comptée après addition de 3 ml de toluène scintillant (Packard). Chaque mesure est effectuée en duplicat.

6.1.7. Etudes en Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.).

Les échantillons purifiés par H.P.L.C. sont lyophilisés et repris par 0,3 ml de solvant deutérié (selon les solubilités : D₂O 100%, CD₂Cl₂ 100%, DMSO-D₆ 100%, CD₃CN 100% sur carbonate de potassium...). Le tube est éventuellement scellé après dégazage sous vide avant la recherche des NOE.

Les spectres de R.M.N.¹H sont enregistrés sur un spectromètre 250 MHz (Brucker WM 250) ou 400 MHz (Brucker AM 400 à l'Ecole Normale Supérieure de Paris). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en p.p.m. par rapport au signal du tétraméthylsilane Si(CH₃)₄.

Pour les spectres réalisés dans l'eau lourde, il a été parfois nécessaire d'éliminer le pic de l'eau légère résiduelle (HOD à 4,80 p.p.m.), soit par présaturation du pic de l'eau ou par des techniques de relaxation différentielle (expérience de type WEFT) ou encore par déplacement de ce pic à haute température (70°C).

6.1.8. Autres techniques spectroscopiques.

Les spectres d'absorption U.V.-visible sont enregistrés sur un appareil KONTRON 820 ; les spectres d'absorption infrarouge ont été réalisés sur un appareil Nicolet NIC 5DX (pastille KBr) ou sur un Perkin FT IR (lubrol). Les spectres de masse sont obtenus sur un appareil NERMAG R10-10 par impact électronique ou par ionisation chimique (NH₃). Les résultats sont exprimés en pourcentage du pic de base (100%) ; le terme Cl₂ indique la présence un fragment dichloré identifié par un triplet isotopique (M, M + 2, M + 4) dans un rapport 9/6/1 correspondant à la distribution naturelle des isotopes ³⁵Cl et ³⁷Cl.

6.1.9. Préparation des métabolites **13** et **14**.

Préparation des métabolites **13** et **14** - L'utilisation de mercaptoéthanol à la concentration de 100 µM, de TAI 70 µM et de P-450 CLO à la concentration de 1,2 µM pour une durée d'incubation de 35 min. permet un rendement de 60 % en métabolites **13** et **14**, soit 45 nmol/ml d'incubat. Le volume des incubations varie entre 20 et 40 ml. Ce type d'incubation s'est révélé de plus intéressant par la pureté des métabolites obtenus ; ainsi, après évaporation par un flux d'azote du méthanol de l'éluat du Sep-pack, reprise par de l'eau du résidu, légère acidification au moyen d'HCl (pH 3 afin de protoner le carboxylate) et extraction par l'acétate d'éthyle, l'éluogramme de la figure 6.2 est couramment observé. Cette fraction a été un point de départ couramment employé pour l'obtention de l'ensemble des métabolites de piégeage décrits dans le chapitre II.

Séparation des métabolites **13** et **14** - Les deux métabolites sont collectés ensemble au temps de rétention de 15,5 min. avec la méthode de gradient H.P.L.C. A, puis séparés par un gradient de faible pente 25-33 % de solvant B en 20 min. Pour éviter leur dégradation au décours de l'étape de lyophilisation, il est nécessaire d'utiliser un solvant A ne contenant que de l'acétate de sodium 50 mM. L'utilisation de ce solvant abaisse le seuil de saturation de la colonne qui n'autorise plus la séparation dans des quantités préparatives. Des solutions pour analyse R.M.N. presque pures en métabolites **13** ou **14** ont été obtenues par répétition de l'étape de purification utilisant le gradient de faible pente et le solvant A acétate de sodium 50 mM. Un traitement intermédiaire à pH 8,5 pendant 3 à 4 min. à 37°C du métabolite **14** permet sa conversion partielle en **13** dont le rendement est ainsi augmenté.

6.1.10. Préparation du métabolite **17**.

La fraction contenant les métabolites **13** et **14** issue de la première purification par H.P.L.C. (gradient A) est reprise par un excès d'HCl 2N et incubée 2 heures à 37°C. L'extrait par de l'acétate d'éthyle de cette nouvelle incubation est ensuite purifié par H.P.L.C. selon la méthode de gradient A et conduit à l'isolement du métabolite **17** (temps de rétention de 18,5 min.). Une variante consiste au traitement direct de l'incubation par l'acide chlorhydrique. Le rendement atteint 50% du TAI initial avec

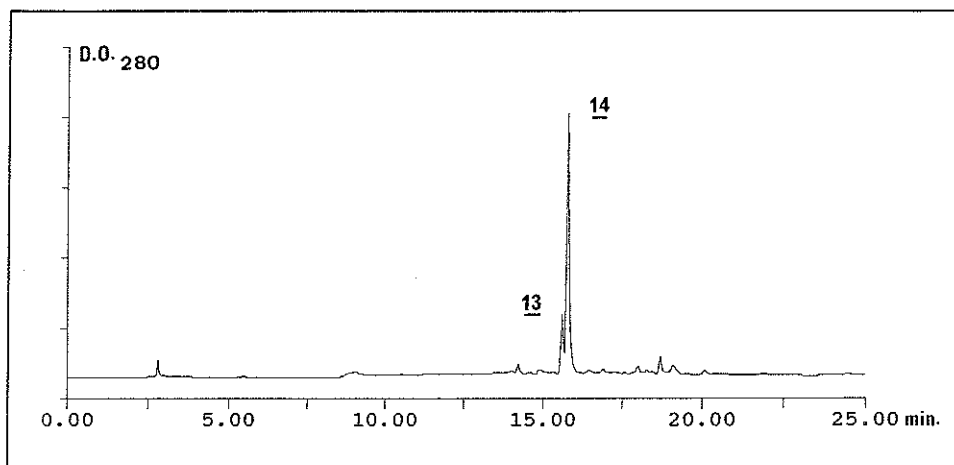


Figure 6.2 Etude H.P.L.C. d'une incubation préparative de **13** et **14** [méthode de gradient HPLC.type A, éluogramme avec détection à 280 nm].

des microsomes CLO, les quantités obtenues varient de quelques μg à 1 mg selon la quantité de sulfoxydes **13** et **14** traitée.

6.1.11. Deutériation du TAI et de **21 par l'acide heptafluorobutyrique deutérié.**

Préparation de l'acide heptafluorobutyrique deutérié - Cet acide est obtenu par mélange équimolaire de l'anhydride commercial et de D_2O .

Deutériation du TAI - 5 mg de TAI sont dissous dans 400 μl d'acide heptafluorobutyrique deutérié. Après chauffage 24 heures à 105°C (la réaction est suivie en R.M.N. ^1H), l'acide est évaporé sous vide et le résidu repris par 500 μl d'ammoniaque 0,5N puis par du DMSO-D_6 après lyophilisation. Toutes les manipulations ont été effectuées dans le tube utilisé pour l'étude en R.M.N. ^1H .

Deutériation du métabolite **21** - 1 mg du composé **21** est porté 12 heures à 100°C en solution dans 400 μl d'un mélange DMSO-D_6 /acide heptafluorobutyrique deutérié v/v. Après lyophilisation, le résidu est méthylé au diazométhane puis remis en solution dans du CD_2Cl_2 . Toutes les manipulations ont été effectuées dans le tube utilisé pour l'étude en R.M.N. ^1H .

6.2. Etude de la S-oxydation du TAI *in vivo* chez le rat et *in vitro* chez l'homme.

L'origine des produits chimiques utilisés dans le chapitre II est précisée dans le tableau 6.1 (p. 135).

6.2.1. Métabolisme du TAI en présence de N-acétylcystéine *in vitro* chez le rat.

Incubations analytiques en présence de N-Acétylcystéine - Les incubations ont été réalisées et analysées selon les mêmes protocoles que ceux décrits précédemment avec le mercaptoéthanol comme piège (paragraphes 6.1.4 à 6.1.6). Les microsomes proviennent de rats induits par le clofibrate et sont à la concentration de 1 μM en P-450.

Préparation du dérivé 29 - La méthodologie est identique à celle employée pour préparer le dérivé 17 (partie expérimentale 6.1.10, p. 140). Le volume d'incubation est de 20 ml (P-450 CLO 1 μ M, TAI 100 μ M, NAC 100 μ M). Au bout de 30 min., le milieu est acidifié par de l'HCl jusqu'à la concentration de 1 M et l'incubation poursuivie 120 min. Le métabolite 29 est d'abord purifié sur Sep-pack puis par H.P.L.C. selon le gradient A.

Préparation des dérivés méthylés 32a et 32b - Un milieu réactionnel de 40 ml contenant du TAI (100 μ M), de la N-acétylcystéine (5 mM) est incubé 120 min. à 37°C en présence de microsomes CLO (P-450 2 μ M). Après purification sur Sep-pack, l'éluat au méthanol est évaporé sous flux d'azote, repris par 0,5 ml d'eau puis acidifié au moyen d'HCl (jusqu'à pH 1). Les métabolites sont alors extraits par de l'acétate d'éthyle et immédiatement méthylés par le diazométhane. Les métabolites 32a et 32b sont séparés et purifiés par H.P.L.C. en conditions isocratiques CH₃CN/H₂O 45%/55% v/v. Le métabolite 30 méthylé, présent en quantité importante, n'a pas été étudié.

6.2.2. Métabolisme du TAI *in vivo* chez le rat.

Traitement des rats - Deux rats mâles Sprague-Dawley de 300 g ont reçu une injection intrapéritonéale d'une solution de TAI (sel de tris, Trizma, Sigma) à la dose de 30 mg/kg. Du TAI radioactif (0,1 μ Ci/ μ mol) a été utilisé chez l'un des 2 rats. Les rats sont immédiatement placés chacun dans une cage munie à sa partie inférieure d'un système d'entonnoir qui assure la collection des urines. L'eau et l'alimentation sont données *ad libitum*. A différents temps, le système de collection est rincé par de l'eau qui est recueillie puis complétée à un volume final de 22 ml. Le comptage, sur un aliquot de chaque fraction, a permis la mesure de l'élimination urinaire de la radioactivité au cours du temps. Cinq fractions ont été ainsi collectées : 0-1h, 1-2h, 2-4h, 4-6h et enfin 6-24h. Les rats sont alors sacrifiés.

Traitement des recueils urinaires - Chaque fraction est purifiée par passage sur un système Sep-pack. Les métabolites retenus sont élués par 2 ml de méthanol et la radioactivité est retrouvée sans perte dans cette nouvelle fraction. Après analyse H.P.L.C., les éluats des Sep-pack sont rassemblés et le méthanol évaporé sous flux d'azote. Le résidu est repris par un peu d'eau, acidifié à pH 1 au moyen d'HCl et enfin extrait par de l'acétate d'éthyle. Cette phase est alors méthylée au diazométhane et les métabolites obtenus étudiés par H.P.L.C.

6.2.3. Etude du métabolisme du TAI par des microsomes hépatiques humains.

Préparation d'un échantillon authentique de l'alcool 34 obtenu par réduction de la fonction cétone du TAI - A une solution isopropanolique de TAI (5 mg dans 2 ml), on ajoute NaBH₄ en large excès. La réaction est arrêtée au bout de 360 min. à température ambiante par de l'eau (1 ml). Après évaporation partielle de l'alcool sous flux d'azote, le pH est descendu à 1 au moyen d'HCl et les produits de la réaction extraits par de l'acétate d'éthyle. Une chromatographie sur plaque de silice (toluène/acétate d'éthyle/acide acétique 15/60/5 v/v/v) conduit à un produit majoritaire (rf = 0,42) qui répond aux caractéristiques attendues pour un produit de réduction de la cétone en alcool avec une masse M de 332 (m/z (NH₃) = 315 (20%, Cl₂, M - H₂O + H⁺), 332 (2%, Cl₂, M - H₂O + NH₄⁺) et m/z (E.I., impact électronique) = 332 (10%, Cl₂, M), 247 (10%, Cl₂, perte du noyau thiophène et de deux hydrogènes)). Le spectre R.M.N.¹H du sel

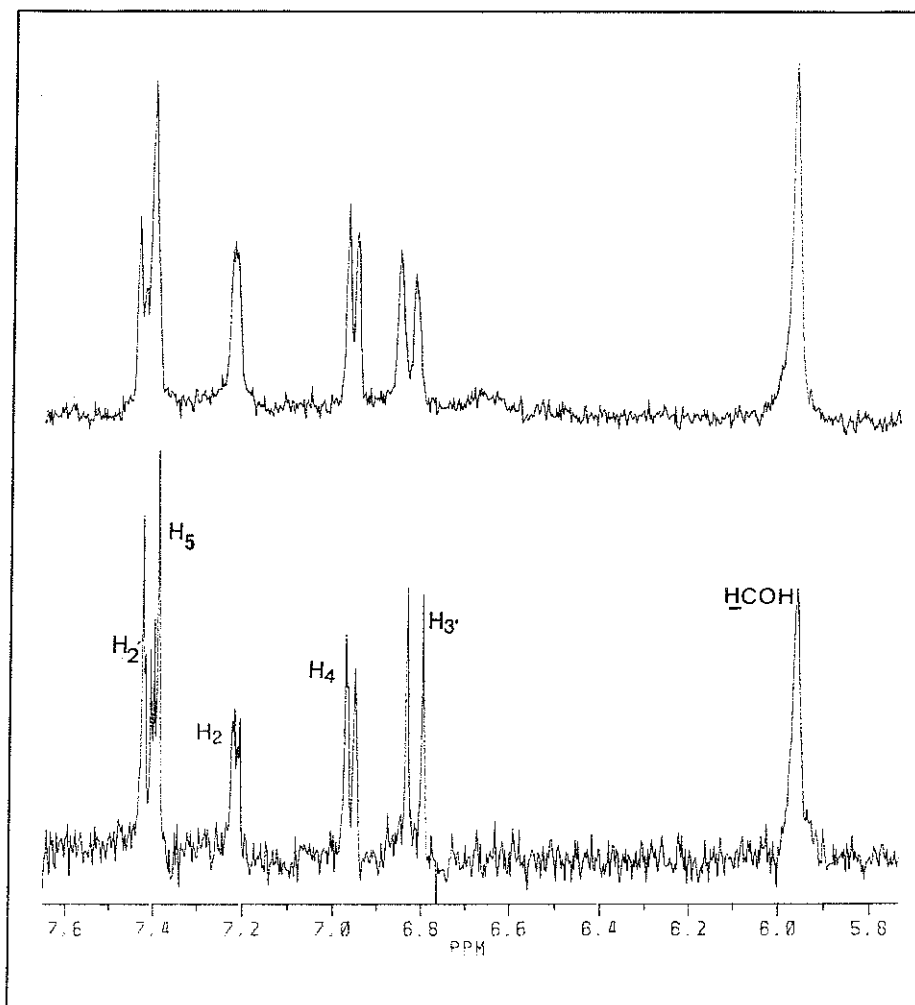


Figure 6.3 Comparaison des spectres R.M.N.¹H du métabolite **34** (en haut) et d'un authentique obtenu par réduction de la fonction cétone du TAI (en bas) (en solution dans le DMSO-D₆ sous forme de sels d'ammonium).

d'ammonium de ce composé en solution dans le DMSO-D₆ comporte le signal d'un proton supplémentaire en singulet (1H) à 5,98 p.p.m. à côté des signaux du groupe phénoxyacétate (OCH₂ (4,16 p.p.m., s, 2H), H₂' (7,41 p.p.m., 1 H, d 9 Hz) et H₃' (6,81 p.p.m., 1H, d 9 Hz)), et de ceux des trois protons du noyau thiophène (H₂ (7,21 p.p.m., 1H, dd 1,5-3 Hz), H₄ (6,96 p.p.m., 1H, dd 1,5-5 Hz) et H₅ (7,40 p.p.m., 1H, dd 3-5 Hz)) (figure 6.3).

Préparation du métabolite 34 - Du TAI (100 μM) est incubé en présence de microsomes SP1 (P-450 0,4 μM, voir paragraphe 3.2.1, p. 93), d'un système générateur de NADPH et de mercaptoéthanol (5 mM) pendant 30 min. à 37°C (volume de l'incubation 25 ml). Les métabolites sont prépurifiés par passage sur un système seppack et séparés par H.P.L.C. selon le gradient A. Le métabolite **34** est recueilli et analysé en R.M.N.¹H en solution dans le DMSO-D₆ et en spectrométrie de masse. Le spectre de masse en ionisation chimique (NH₃) retrouve les fragments à 315 (100%, Cl₂, M - H₂O + H⁺) et à 332 (20%, Cl₂, M - H₂O + NH₄⁺) tandis que l'étude en R.M.N.¹H montre un spectre superposable à celui de l'authentique (figure 6.3).

Tableau 6.4 Composition des milieux de culture (Brian et al, 1989, Ph. Beaune, communication personnelle).

Composition du mélange aa-mix (en mg, acides aminés série L)			
Phénylalanine	100	asparagine	80
Sérine	750	lysine (1 HCl)	60
Tyrosine	60	arginine (HCl)	40
Cystéine	80	valine	300
Tryptophane	80	alanine	80
Proline	80	ac. aspartique	200
Histidine	40	glycine	80
Glutamine	80	glutamate	200
Isoleucine	80	(monosodique)	
Méthionine	40	uracile	40
Thréonine	400	adénine (hémisulfate)	83

Composition et préparation du milieu minimum			
Ajouter dans l'ordre :			
1 - Yeast Nitrogen Base (Difco)	6,7 g		
2 - aa-mix	1,3 g		
3 - H ₂ O	900 ml		
4 - autoclaver 30min. à 120°C			
5 - Glucose 20% autoclavé	100 ml		
			1000 ml

6.2.4. Etude de la S-Oxydation du TAI par des levures exprimant les P-450 IIC9 et IIC10.

Conservation des souches - Les souches originelles données par F. Guengerich (Nashville, E.U.) et Ph. Beaune (C.H.U. Necker) ont été conservées à - 80°C à partir de cultures initiales auxquelles ont été ajoutées 15% de glycérol v/v avant congélation. Des réensemencements successifs sur milieu solide dans des boîtes de Petri conservées à 4°C mettent les souches à disposition en permanence.

Composition et préparation du milieu de culture - Il s'agit d'un milieu minimum stérile qui contient du glucose, une source d'azote et un mélange d'acides aminés exempt de leucine comprenant également de l'uracile et de l'adénine (mélange aa-mix) (composition et préparation des milieux dans le tableau 6.4). Quelques colonies sont prélevées sur une boîte de Petri au moyen d'une anse de platine préalablement stérilisée à la flamme et servent à ensemercer une préculture de petit volume (50 à 100 ml). La pousse des cellules se fait en anaérobiose partielle à 28°C dans des fioles de type Erlenmeyer, à moitié remplies et agitées régulièrement, et est suivie par estimation de la turbidité en mesurant l'absorbance à 600 nm (en phase exponentielle de croissance, le temps de division cellulaire est de l'ordre de 140 min.). En fonction de la pousse de la préculture, on ensemece les cultures de grand volume (1,5 l) qui sont arrêtées par refroidissement à 4°C lorsque la densité optique atteint 1,8 à 2 de D.O. (trajet optique de 1 cm).

Dosage du P-450 sur cellules entières - L'utilisation de souches anaérobies rend possible le dosage des P-450 sur cellules entières par l'absence des hémoprotéines mitochondriales absorbant dans cette région (Oeda et al, 1985). Après lavage, les

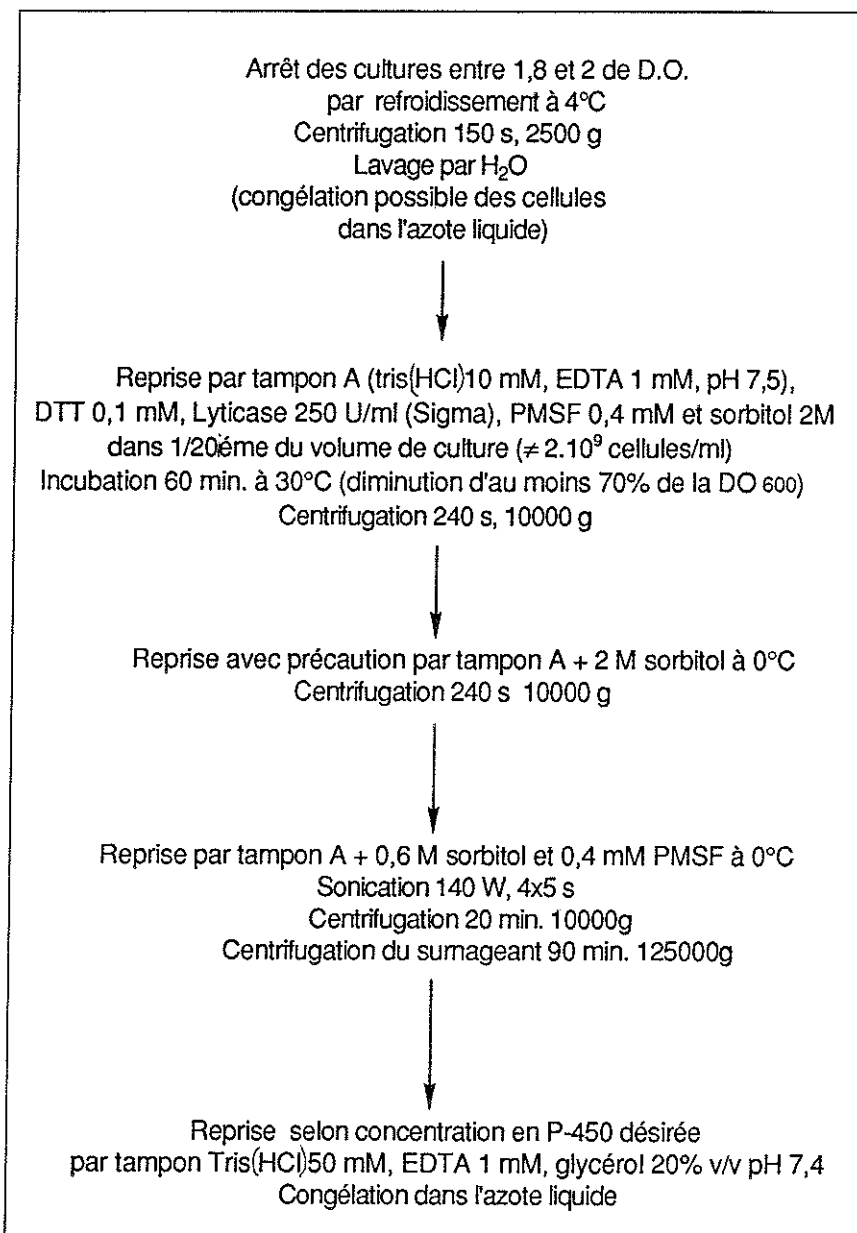


Figure 6.4 Préparation de la fraction microsomale de levure (Oeda et al, 1985 et Brian et al, 1989).

cellules sont reprises dans de l'eau pure à la concentration de 10^9 cellules/ml (en comptant 1 unité de $D.O._{600} = 3.10^7$ cellules) puis transférées dans deux cuves à bords noirs de 1 cm de trajet optique qui sont disposées près de la source lumineuse (appareil UVIKON 820). L'addition de dithionite de sodium ("une pointe de spatule") dans les deux cuves puis un bullage de CO dans la cuve échantillon après mise en mémoire de la ligne de base permet d'enregistrer un spectre de type P-450 similaire à celui reporté pour les souches MP4 ou MP8 (Brian et al, 1989).

Préparation de la fraction microsomale - La fraction microsomale est préparée selon une méthode initialement décrite par Oeda (Oeda et al, 1985) (figure 6.4).

Nouvelle méthode de dosage de la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique - Les incubations d'AT (de volume $150 \mu l$) sont arrêtées par l'addition d'un mélange

acétonitrile/acide acétique 75/7,5 v/v (addition de 80 µl pour 150 µl d'incubat, pH 4 final régulièrement contrôlé) puis transférées dans des microtubes. Après 10 min. à 4°C, les protéines sont séparées par centrifugation 5 min. à 14000 g et le surnageant est incubé 120 min. à 37°C. Le dérivé **6** de l'AT est alors dosé par absorption U.V. à 390 nm après transfert dans des microcuvettes de 100 µl de volume. En l'absence d'acidification, ce dosage est peu précis à cause de l'absorbance importante du NADPH. Le NADPH est instable en milieu acide (Lowry et al, 1961b) et, dans un mélange tampon phosphate 100 mM, pH 7,4/acétonitrile/acide acétique 150/75/7,5 v/v/v pH 4 final, il disparaît avec un temps de demi-vie de 17 min. Après 120 min. d'incubation à 30°C, le NADPH est complètement détruit alors que le dérivé **6** reste stable sous sa forme ionisée. Nous avons obtenu par cette méthode des résultats avec des microsomes de rat CLO comparables à ceux donnés par la méthode d'E. Neau (Neau et al, 1990).

Dosage des thiols libres microsomaux - Ce dosage utilise la méthode d'Ellman à l'acide (5,5'-dithiobis)2-nitrobenzoïque (DTNB) (Ellman, 1959). 50 µl de préparation microsomale sont mélangés avec 150 µl de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, 200 µl d'une solution de DTNB 1 mg/ml dans le même tampon et 500 µl d'acétonitrile. Après 10 min. à 4°C, les protéines sont éliminées par centrifugation 5 min. à 14000g. Les thiols sont dosés par spectrophotométrie d'absorption visible à 412 nm ($\epsilon/\text{thiol} = 13600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, non modifié par la présence de l'acétonitrile) ; la référence est réalisée par séparation des protéines après précipitation à l'acétonitrile et centrifugation avant l'addition de la solution de DTNB. La concentration des thiols libres des protéines microsomaux de levures mesurée par cette méthode est de 50 ± 5 nmol SH/mg de protéines microsomaux. Un protocole identique a été employé pour le dosage des thiols libres des microsomes CLO. La valeur obtenue sur trois lots différents est de 52 ± 2 nmol SH/mg de protéines microsomaux.

6.2.5. Propriétés des métabolites du TAI fixés aux protéines microsomaux.

Réalisation des incubations - Toutes les incubations sont conduites avec des microsomes CLO (P-450 1 µM) et du TAI à la concentration de 100 µM (25 µCi/µM). Le taux de fixation covalente aux protéines microsomaux est mesuré en duplicat par prises d'essai de 50 µl sur filtres Whatman (partie expérimentale 6.1.6, p. 139).

Effet du mercaptoéthanol sur la fixation covalente du TAI - Au bout de 30 min. d'incubation (150 µl, 30 min. à 37°C), des aliquots de 70 µl d'incubat sont mélangés avec un volume équivalent d'une solution de mercaptoéthanol à différentes concentrations (100 µM à 2 M dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,4) contenant éventuellement du SDS 6%. Après 60 min. d'incubation à 37°C, on mesure le taux de fixation covalente du TAI aux protéines microsomaux. Une série de filtres issus d'incubations en l'absence de système générateur est traitée selon le même protocole. Une expérience a été réalisée avec SDS et une sans SDS.

Etude par H.P.L.C. des composés libérés par traitement au mercaptoéthanol de protéines microsomaux ayant fixé les métabolites du TAI - Les protéines d'une incubation de volume 5 ml (30 min. à 37°C) sont précipitées par un mélange CH₃CN/CH₃COOH (partie expérimentale 6.1.4, p. 138). Après centrifugation 10 min. à 1000 g, le culot est lavé trois fois à 4°C par 10 ml d'un mélange H₂O/CH₃OH v/v. Les protéines sont alors incubées à 37°C pendant 60 min. en présence de 0,5 ml d'une

solution de mercaptoéthanol 500 mM dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4. Après centrifugation à 14000 g, le surnageant est étudié par H.P.L.C. L'expérience a été faite 2 fois.

Influence du temps d'incubation sur la stabilité des métabolites fixés vis à vis du mercaptoéthanol - A différents temps de l'incubation (incubation de 150 μ l, 37°C), une mesure de la fixation covalente aux protéines est effectuée et des aliquots de 70 μ l sont mélangés avec du mercaptoéthanol 2 M dans du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4. Après 30 min. d'incubation à 37°C, la fixation covalente aux protéines est mesurée. Une série de filtres issue d'incubations en l'absence de système générateur en NADPH est traitée selon le même protocole.

Stabilité des métabolites fixés, vis à vis du mercaptoéthanol, après un traitement par HCl - Les protéines d'un aliquot de 50 μ l de chaque incubation (150 μ l, 30 min. à 37°C) sont déposées sur des filtres de fibres de verre whatman que l'on dépose chacun dans un tube à hémolyse de 7 ml. On ajoute alors 4 ml d'HCl 1 N par tube. Après 60 min. d'incubation à 37°C, les filtres sont traités par du mercaptoéthanol 1 M (dans du tampon phosphate pH 7,4 contrôlé après immersion des filtres) 30 min. à 37°C avant mesure de la radioactivité (paragraphe 6.1.6, p. 139). Une série de filtres issue d'incubations en l'absence de système générateur en NADPH est traitée selon le même protocole.

6.3. Préparation d'anticorps anti-acide tiénilique.

L'origine des produits chimiques utilisés dans le chapitre III est précisée dans le tableau 6.1 (p. 136).

6.3.1. Synthèse de la BSA-AT par la méthode au SPDP.

Thiolation de la BSA - Dans un ballon, on mélange successivement 3 ml de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,5, dégazé sous argon, 33 mg de BSA puis 300 μ l, goutte à goutte, d'une solution méthanolique de SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)propionate, 4,65 mg soit 30 équivalents par rapport à la BSA). Après 60 min. à température ambiante, en atmosphère neutre et sous agitation douce, on ajoute 1,1 ml d'une solution de DTT 100 mM et on laisse à nouveau réagir pendant 60 min. La BSA thiolée est alors purifiée sur une colonne (IBF 16G400, \varnothing 2 cm, 2 ml/min) contenant un gel de trisacryl GF05M élué par du tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 5, dégazé sous argon, NaCl 100 mM et DTT 0,1 mM. La protéine sort dans la fraction de tête (10 min.) sous un volume de 18 ml. Les thiols sont alors dosés par le réactif d'Ellman (voir p. 146) avec le tampon d'élution comme référence et la concentration de BSA est mesurée par son absorption dans l'U.V. à 278 nm ($A_{278} = 0,63$ unité de D.O. pour une solution de BSA à 1 mg/ml). On trouve 32 thiols par molécule de BSA, soit une fixation quantitative du SPDP.

Couplage avec l'acide 5-chloro-tiénilique 39 - Le pH de la fraction contenant la BSA thiolée est amené à 9,3 au moyen de K_2CO_3 . Après addition d'un ml d'une solution aqueuse de **39** 20 mM (0,2 μ Ci/ μ mol), le milieu réactionnel est agité doucement à l'abri de la lumière. Au troisième jour le pH est monté à 10,3 et la température à 40°C;

au huitième, une anaérobiose stricte est obtenue par surpression d'argon, la réaction est arrêtée au quatorzième jour. Le nombre de molécules d'acide tiénilique fixées par molécule de BSA est mesuré régulièrement sur des aliquotes par précipitation des protéines en milieu acide sur filtre Whatman et comptage de la radioactivité retenue (partie expérimentale 6.1.6, p.139). En fin de réaction, le pH est redescendu à 7 au moyen d'acide acétique et la BSA-AT est purifiée sur la même colonne éluée par un tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,5. Le pH de la fraction qui contient les protéines (à 10 min.) est amené à 10 (Trizma, Sigma) et on ajoute de l'iodoacétamide 3 mM. Après 30 min. à 40°C, on lave les protéines par deux fois 30 volumes de tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,5 après concentrations successives par ultrafiltration (Système Aminko, membrane d'exclusion à 30000 Daltons). Après lyophilisation, on récupère 13 mg de BSA-AT avec un rendement de 40% par rapport à la BSA initiale. Il existe une deuxième fraction, qui sort au temps d'élution de 60 min., contenant également des protéines mais qui ne sont pas retenues par la membrane d'ultrafiltration, il s'agit donc de peptides issus de coupures de la BSA.

6.3.2. Protocole d'immunisation, obtention des sérums et de la fraction des immunoglobulines.

Le protocole et les techniques employés pour cette immunisation sont usuels (Catty et al, 1988, Dresser, 1986).

Immunisation - Une solution dans du sérum physiologique de BSA-AT est émulsionnée avec un même volume d'adjuvant de Freund avant d'être administrée en de multiples points d'injection sous-cutanée au flanc de chaque lapin. La première injection contient 500 µg de BSA-AT et de l'adjuvant complet, les rappels sont effectués tous les deux mois avec de l'adjuvant incomplet et 500 µg de BSA-AT pour le premier rappel puis 100 µg pour les suivants. A partir du deuxième rappel, le sang est collecté 10 à 15 jours après l'injection (respectivement 10, 14, 12 et 14 jours pour les prélèvements I à IV).

Réalisation des prélèvements et préparation des sérums - Le revêtement cutané de l'oreille est désinfecté au moyen d'alcool à 70°. La veine externe est vasodilatée par du toluène appliqué avec un morceau de coton puis sectionnée franchement au moyen d'une lame de bistouri. 40 à 50 ml de sang sont collectés par lapin. Les prélèvements sont ensuite incubés 60 min. à 37°C puis une nuit à 4°C. Les sérums sont séparés des coagulums et conservés par congélation à -20°C.

Obtention de la fraction des immunoglobulines du lapin 2 - Les immunoglobulines sont fractionnées en une étape par précipitation au sulfate d'ammonium (méthodologie selon Ternick et Avrameas, 1987). A 60 ml de sérum du lapin 2 (prélèvements II, III et IV), on additionne 40 ml de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM (PBS) puis, goutte à goutte, 133 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. La précipitation s'achève à 4°C en 10 min. Le précipité est centrifugé 20 min. à 3000 g puis repris par 100 ml d'une solution de sulfate d'ammonium à 40% de saturation. Après un deuxième lavage par 50 ml de cette solution, la fraction des immunoglobulines est remise en solution dans 30 ml de PBS puis dialysée pendant 24 heures contre du PBS. On récupère les immunoglobulines dans un volume de 60 ml que l'on ajuste par ultrafiltration à un volume moitié du volume de sérum initial soit 30 ml. Le dosage des protéines selon la méthode de Lowry (Lowry et al, 1961a) est de

40,6 mg/ml, soit le chiffre habituel de 20 g Ig/l de sérum. 4 ml de cette préparation ont été conservés à 4°C en présence d'azote de sodium (10 mM) puis utilisés pour l'étude de la réponse anti-AT ; le reste a été congelé.

6.3.3. Technique de double diffusion sur gel d'agarose (Ouchterlony).

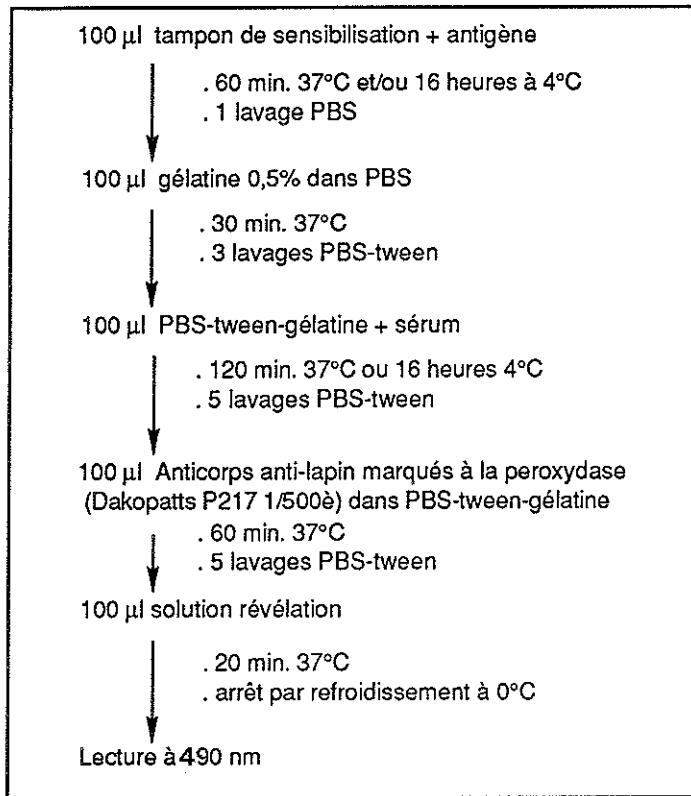
Sur une plaque de Gel-bond disposée sur une table mise à niveau, on coule un gel d'agar 125x125x1,5 mm (soit 23 ml) tamponné par du véronal à pH 7,4 de composition donnée dans le tableau 6.6. Dès qu'il est solidifié, on creuse 6 séries de 12 puits au moyen d'une empreinte : puits de 3 mm de diamètre distants des plus proches voisins de 5 mm selon un maillage hexagonal (figure 4.6, p. 117). Dans les puits externes sont déposés 8 µl des différents sérums à tester et dans les 2 puits centraux 8 µl soit d'une solution de BSA-AT (dans du PBS), soit de BSA. Après une nuit d'incubation à 4°C sous atmosphère saturée en vapeur d'eau, les gels sont lavés dans du sérum physiologique (2x60 min.). L'eau du gel est ensuite absorbée par plusieurs épaisseurs de papier filtre (5x Wattman 3mm) disposées sur le gel et maintenues sous pression. Après séchage complet au sèche-cheveux, les arcs de précipitation sont révélés au bleu de Coomassie (solution colorante : MeOH/CH₃COOH/H₂O 5/1/5 v/v plus quelques grammes de bleu de Coomassie (≠ 5 g/l), solution décolorante : idem sans le bleu, la coloration est réversible).

Tableau 6.6 Composition des gels d'agar utilisés dans la technique double-diffusion.

Pour 200 ml d'eau :	
Véronal 60 mM (tampon Sigma, pH ajusté par HCl)	2430 mg
Merthiolate 0,01%	20 mg
Agar noble 1,25% (Difco)	2500 mg
PEG 4000 2%	4000 mg

6.3.4. Techniques Elisa.

Préparation des métabolites du TAI ou de l'AT fixés aux protéines microsomales - Les métabolites du TAI fixés aux protéines microsomales ont été traités en fin d'incubation par de l'HCl afin de les stabiliser, le traitement des métabolites de l'AT fixés aux protéines a été de même. Du TAI (ou de l'AT) 100 µM est incubé en présence de microsomes CLO (P-450 1 ou 2 µM) et de système générateur de NADPH (de tampon dans les incubations de référence) à 37°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée par de l'HCl 2N. Après une heure d'incubation à 37°C, les protéines sont centrifugées 30 min. à 700 g dans des tubes en polypropylène. Le culot est ensuite lavé 3 fois par 20 ml de méthanol (lavages alternés par des centrifugations de 15 min. à 10000 g dans des tubes en polycarbonate). Le culot est alors dissous dans de la soude 0,1N (moitié du volume de l'incubation initiale) par sonication à 75 Watts 0,5 s/s à 0°C pendant 10 min. (la solution dans la soude des protéines issues des incubations d'AT présentent une couleur jaune). Deux aliquots sont prélevés pour le dosage des protéines et du taux de fixation covalente avant dilution choisie dans du tampon de sensibilisation pH 9,5 de l'Elisa et congélation immédiate. Le dosage de la



PROTOCOLE ELISA

PBS tampon phosphate pH 7,4 salin
pour 1000 ml, 100 ml tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4,
8,7 g de NaCl, compléter à 1 l par de l'eau pure.

PBS-tween 0,1%
tween 20 1 ml pour 1000 ml de PBS

Gélatine 5%
25 g de gélatine alimentaire dissous à chaud dans 500 ml d'eau pure,
réchauffage au four à microondes avant emploi.

PBS-gélatine-(tween)
gélatine 5% 1 ml à compléter à 10 ml par du PBS-(tween)

Tampon de sensibilisation pH 9,5 (bicarbonate 0,05 M)
dans 1 l d'eau pure :

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g

Solution de révélation
(préparée immédiatement avant emploi)

ABTS (Sigma)	20 mg
H ₂ O ₂ 30%	20 µl
tampon citrate pH 5,6	25 ml

Tampon citrate pH 5,6

Na ₂ HPO ₄	20,6 g
Ac. citrique	4,45 g
eau pure	500 ml

ajuster le pH par HCl concentré

Figure 6.5 Protocole des tests Elisa avec la composition des solutions employées (les sels proviennent de chez Merck). (N.B. il semble à postériori que la concentration en eau oxygénée soit environ trois fois trop élevée avec pour conséquence une diminution de l'intensité du signal de l'Elisa)

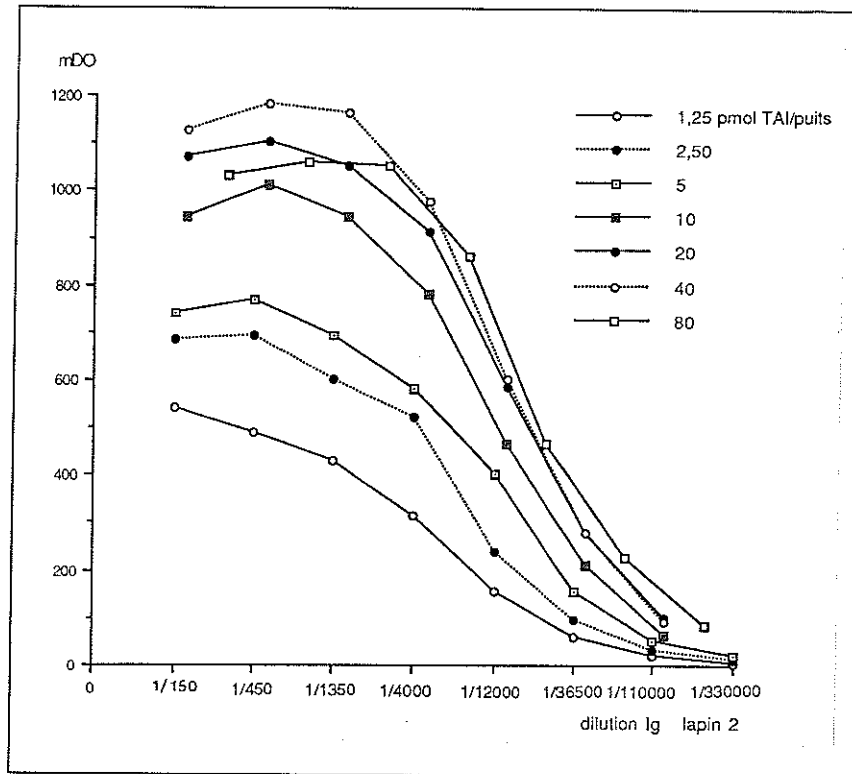


Figure 6.6 Calibrage de la sensibilisation des plaques Elisa par les protéines microsomiales contenant des métabolites du TAI fixés de façon covalente (chaque mesure est corrigée par la valeur du puits témoin et est effectuée en duplicat).

attendues (19,25 et 18,8 nmol TAI/nmol P-450 et 3,5 nmol AT/nmol P-450) avec une absence de fixation sur les protéines des incubations de référence (0,12 (TAI) et 0,13 (AT) nmol/nmol P-450). Le dosage des protéines, que se soit par la méthode de Lowry ou la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA-kit, Pierce), ne retrouve que 60% des protéines attendues. Il semble que ce phénomène apparaisse à la suite du traitement par HCl et ne serait pas dû à une perte des protéines au cours des différents lavages (observation sur des expériences en cours au laboratoire) comme le montre les chiffres de la fixation covalente.

Protocole des tests Elisa - Ces tests ont été réalisés sur des plaques de 96 puits (Nunc, 4-68667) selon le protocole de Ternynck et Avrameas (Ternynck et al, 1987 et figure 6.5). Les puits ont été sensibilisés soit par de la BSA-AT avec de la BSA dans les puits témoins, soit par des protéines microsomiales contenant des métabolites du TAI ou de l'AT fixés de manière covalente selon le protocole décrit dans le précédent paragraphe (protéines issues des incubations sans système générateur de NADPH à la même dilution dans les puits témoins). Le PBS employé ne contient que des sels de sodium, la révélation utilise l'ABTS comme substrat de la peroxydase, la lecture est faite par mesure de l'absorbance à 490 nm sur un appareil Microplate (Bio-tek instruments). Chaque mesure est corrigée de l'absorbance du puits témoin et est faite en duplicat.

Calibrage des tests Elisa - Au préalable de l'étude de la reconnaissance de l'AT par les Ig du lapin 2, les plaques Elisa ont été calibrées pour la meilleure sensibilisation par les protéines microsomiales. Des courbes de titrage en fonction de la dilution des Ig (exprimée en équivalent de dilution des sérums) ont été réalisées en sensibilisant les

plaques par des protéines microsomaux soit contenant des métabolites du TAI fixés aux protéines sur une gamme de 1,25 à 80 pmol/puits, soit des métabolites de l'AT de 1,25 à 40 pmol/puits (figure 6.6). Les anticorps anti-IgG de lapin marqués à la peroxydase sont utilisés à la dilution recommandée par le fabricant (Dakopatts P217 au 1/500^{ième}) et la révélation à l'ABTS standardisée sur 20 min. à 37°C.

Pour les métabolites du TAI fixés, le meilleur signal est obtenu avec 20 pmol/puits avec une D₀max de 1,1, 20 fois supérieure au signal du blanc, et un titre de 1/16000^{ième}. Pour les métabolites de l'AT, le meilleur signal est obtenu avec 10 pmol/puit avec une D₀max de 1,0, 10 fois supérieure au blanc, et un titre de 1/9000^{ième}.

6.3.5. Origine et synthèse des inhibiteurs.

Les composés **15**, **16** et **17** ont été préparés selon les protocoles décrits précédemment, **15** et **16** ont été repurifiés avant leur utilisation afin d'éliminer toute trace de TAI éventuellement apparue par décomposition. **45**, **42** et **43** ont été synthétisés (voir ci-dessous), l'origine des autres inhibiteurs est précisée dans le tableau 6.1 (p. 136).

Synthèse du 2-acétyl, 5-S-mercaptoéthanol-thiophène **45** - 20 mg de 2-acétyl-5-chlorothiophène en solution dans 2 ml de méthanol sont mis à réagir avec du mercaptoéthanol (100 µl). Une pincée de carbonate de potassium démarre la réaction qui est suivie pendant 300 min. à 50°C par chromatographie sur plaque de silice (éluant dichlorométhane). A côté du produit de départ (rf 0,7), apparaît un nouveau produit plus polaire (rf 0,25) qui se présente après purification sur plaque préparative de 1 mm d'épaisseur sous l'aspect d'un solide blanc (13,8 mg). Sa solution dans le dichlorométhane deutérié présente en R.M.N.¹H les caractéristiques attendues pour le produit **45**, soit deux protons vinyliques en doublet (J = 3,7 Hz) à 7,54 et 7,68 p.p.m., un acétyl en singulet (3H) à 2,48 p.p.m. et les 5 protons du résidu mercaptoéthanol en deux triplets (2H, J = 6 Hz) à 3,13 et 3,79 p.p.m. dont le plus déblindé est couplé avec un singulet élargi à 1,91 p.p.m., échangeable avec un deutérium de l'eau lourde correspondant au proton de la fonction alcool. La spectrométrie de masse en ionisation chimique (NH₃) est en accord avec cette structure de masse M égale à 202 (m/z (NH₃) : 203 (100%, M + H⁺) et 220 (65%, M + NH₄⁺).

Synthèse de l'acide dihydroéthacrynique **43** - 117 mg d'acide éthacrynique en solution dans 2 ml de méthanol réagissent avec de l'hydrogène en surpression (80 cm d'eau) en présence de 11 mg de palladium (10% sur charbon). La réaction d'hydrogénation est suivie par chromatographie sur plaque de silice (solvant MeOH/CH₃COOH/acétate d'éthyle 1/1/9 v/v/v). Après 180 min. à température ambiante et agitation douce, l'acide éthacrynique (rf 0,7) s'est complètement transformé en un nouveau produit moins polaire migrant à la limite du front de solvant. La purification préparative sur plaque de silice de 1 mm (solvant : hexane/CH₂Cl₂/acétate d'éthyle/CH₃COOH 50/45/4/1 v/v/v/v, rf 0,5) conduit à une huile jaune. Sa solution dans le dichlorométhane deutérié présente en R.M.N.¹H les caractéristiques de l'ester de méthyle du produit attendu avec deux protons aromatiques à 7,27 (d, 9 Hz) et 6,79 p.p.m. (d, 9 Hz), le OCH₂ en singulet intégrant pour deux protons à 4,77 p.p.m., un acétyl en singulet 3H à 2,40 p.p.m., un doublet 3H à 0,91 p.p.m. (J = 3,5 Hz), un triplet 3H à 1,14 p.p.m. (J = 3,5 Hz), un quintuplet 1H à 3,17 p.p.m. (J = 3 Hz) et deux

massifs 1H à 1,41 et 1,75 p.p.m. L'ester de méthyle est hydrolysé par la soude 0,5N dans le méthanol en 300 min. à température ambiante ; la réaction est totale (suivie par H.P.L.C.). On récupère 70 mg d'une poudre blanche (homogène par chromatographie sur plaque de silice), de maximum d'absorption U.V. à 264 nm et de spectre de masse en accord avec la structure recherchée **43** (m/z (NH_3) : 322 (100%, Cl_2 , $\text{M} + \text{NH}_4^+$) et 305 (35%, Cl_2 , $\text{M} + \text{H}^+$), 247 (40%, Cl_2 , aroylium) et 264 (40%, Cl_2 , aroylium + NH_3) avec $\text{M} = 304$).

Synthèse de 42 - Selon une méthode utilisée pour la synthèse de l'acide tiénilique (Herbert et al, 1976), le produit **42** a été synthétisé en 2 étapes à partir du 2-thiényl-4-méthoxyphénylcétone **50** : le monochloracétate de sodium est condensé sur le sel de sodium du composé **51** obtenu par déméthylation de **50** par action du chlorure d'aluminium dans le benzène à reflux (synthèse selon Herbert et al, 1976, effectuée par Quang Nguyen N. au laboratoire ; R.M.N.¹H (CDCl_3) **51** : 1H 7,82 p.p.m. (dd 3-1,5 Hz), 1H 7,53 p.p.m. (dd 5-1,5 Hz), 1H 7,35 p.p.m. (dd 3-5 Hz), 1H 7,24 p.p.m. (s), 2H 7,30 p.p.m. (d 9 Hz) et 2H 6,84 p.p.m. (d 9 Hz) ; m/z (NH_3) : 205 (100%, $\text{M} + \text{H}^+$ avec $\text{M} = 204$) et 222 (15%, $\text{M} + \text{NH}_4^+$)).

A 2 ml de DMF anhydre sont successivement ajoutés 30 mg d'hydrure de sodium, 35 mg de **51** et 40 mg de monochloracétate de sodium. Après 1080 min. à 100°C, l'hydrure de sodium est détruit par de l'eau et les produits de la réaction extraits à l'éther après acidification (HCl). La purification sur plaque de silice (solvant toluène/acétate d'éthyle/ CH_3COOH 15/60/5 v/v/v) conduit à coté du produit de départ (rf 0,63) à un nouveau produit (rf 0,31) qui est remis en solution dans de l'ammoniaque 0,1N. Après extraction d'impuretés provenant de la plaque de silice par l'acétate d'éthyle puis lyophilisation, on récupère avec 33% de rendement un produit pur qui répond aux caractéristiques attendues pour le produit **42** : spectre d'absorption U.V. superposable à celui de l'acide tiénilique de maximum à 310 nm, en R.M.N.¹H (DMSO-D_6) : 2H 7,79 p.p.m. (d 9 Hz), 2H 6,92 p.p.m. (d 9 Hz), 1H 8,04 p.p.m. (d 5 Hz), 1H 7,70 p.p.m. (d 5 Hz), 1H 7,26 p.p.m. (t 5 Hz) et OCH_2 4,67 p.p.m. (s) et en spectrométrie de masse : m/z (NH_3) : 263 (100%, $\text{M} + \text{H}^+$ avec $\text{M} = 262$) et 280 (65%, $\text{M} + \text{NH}_4^+$).

CHAPITRE SEPTIEME

ANNEXE

7.1. Méthylation des métabolites 13 et 14.

Le composé 46 est obtenu par traitement au diazométhane des métabolites 13 et 14. L'étude de ce composé est présentée dans cette annexe.

Préparation et purification du métabolite 46 - Après acidification au moyen d'HCl à pH 3, la fraction des métabolites 13 et 14 isolée par H.P.L.C. A (paragraphe 6.1.9, p. 140) est extraite par de l'acétate d'éthyle puis traitée par le diazométhane. La purification par H.P.L.C. en conditions isocratiques (H₂O/CH₃CN 60/40 v/v) permet l'isolement d'un métabolite unique 46 au temps de rétention de 7,0 min. ayant un maximum d'absorption U.V. à 266 nm. Le rendement globale est de 53% par rapport au TAI initial pour des quantités des métabolites 13 et 14 de l'ordre de 1,5 µmol.

Etude en R.M.N.¹H du métabolite 46 - L'étude est réalisée dans du chloroforme deutérié ; à 85°C le spectre se modifie réversiblement, probablement par rupture d'une liaison hydrogène intramoléculaire, les protons sont alors mieux individualisés (tableau 7.1). Les deux protons aromatiques, le OCH₂, un groupement méthyle sont identifiés, ainsi que le résidu mercaptoéthanol avec le proton de la fonction alcool caractérisé par son déplacement chimique à 1,73 p.p.m., son caractère échangeable avec un deutérium de l'eau lourde et son couplage avec les protons H₁". Il reste six protons, H₁ à H₆, avec H₆ en singulet isolé à 4,53 p.p.m. et cinq protons, H₁ à H₅, en réseau complexe de couplage présenté sous forme de diagramme dans le tableau 7.1. Les protons H₁ et H₂ sont géminaux avec une constante de couplage négative indiquée par l'intensité des pics de corrélation vus sur une expérience de COSY 45. D'une manière semblable, les protons H₁ et H₃ ainsi que H₂ et H₃ sont vicinaux avec des constantes de couplage positives. La proximité des déplacements chimiques de H₃ et H₄ et d'un écho de couplage commun avec le proton H₅ empêche l'attribution du signe de la constante de couplage de 14 Hz entre H₄ et H₅.

Tableau 7.1 Caractéristiques en R.M.N. ^1H du métabolite **46** (CDCl_3 à 85°C) et diagramme de couplage des protons H_1 à H_6 .

H_2'	H_3'	OCH_2	CH_3	H_1''	H_2''	OH
7,48 d : 8,75	6,80 d : 8,75	4,80 s, 2H	3,82 s, 3H	3,50 * massif, 2H	2,70 dt : 15 - 6 2,50 dt : 15 - 6	1,73 ** massif, 1H

H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
1,57 ddd : 1,5 -5 : +9	2,62 dd : 5 : -5	2,92 ddd : 5 +5 : +9	3,01 d : 14	3,39 ddd : 1,5 5 : 14	4,53 s

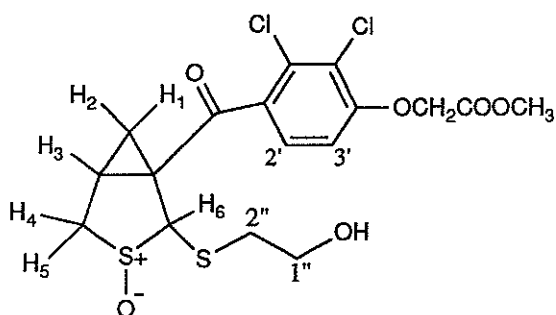
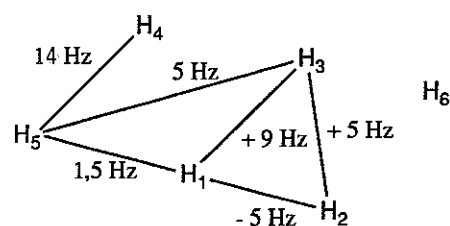
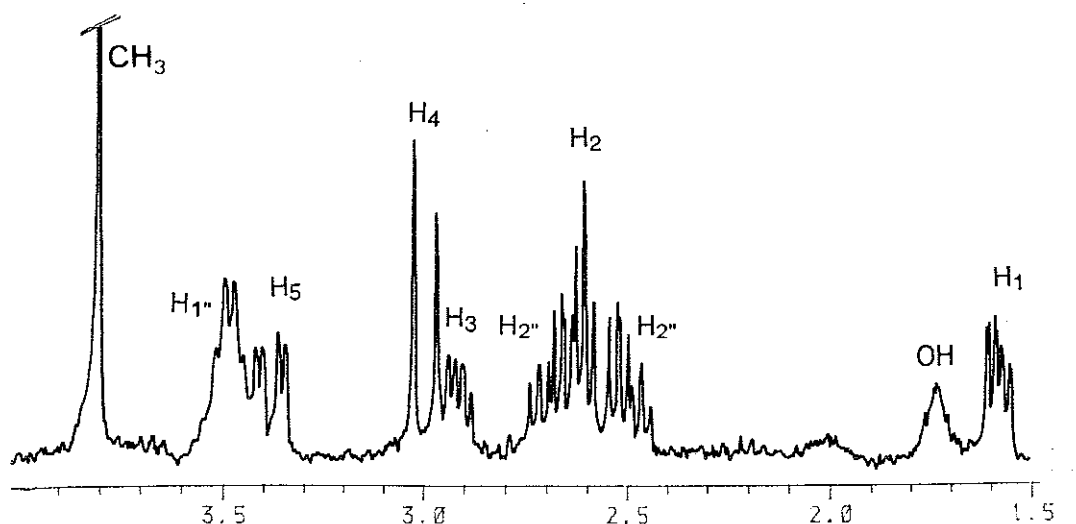
**44**

Diagramme de couplage



δ en p.p.m./ $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, J en Hz, s = singulet, d = doublet, dd doublet de doublets, ddd = doublet de doublets de doublets, dt = doublet de triplets (valeurs des couplages déterminées par irradiations sélectives et signes d'après l'intensité des pics de corrélation d'une expérience de COSY 45).

* H_1'' en massif qui s'affine après échange de OH en OD en présence de D_2O ,

** échangeable avec un deutérium de D_2O .

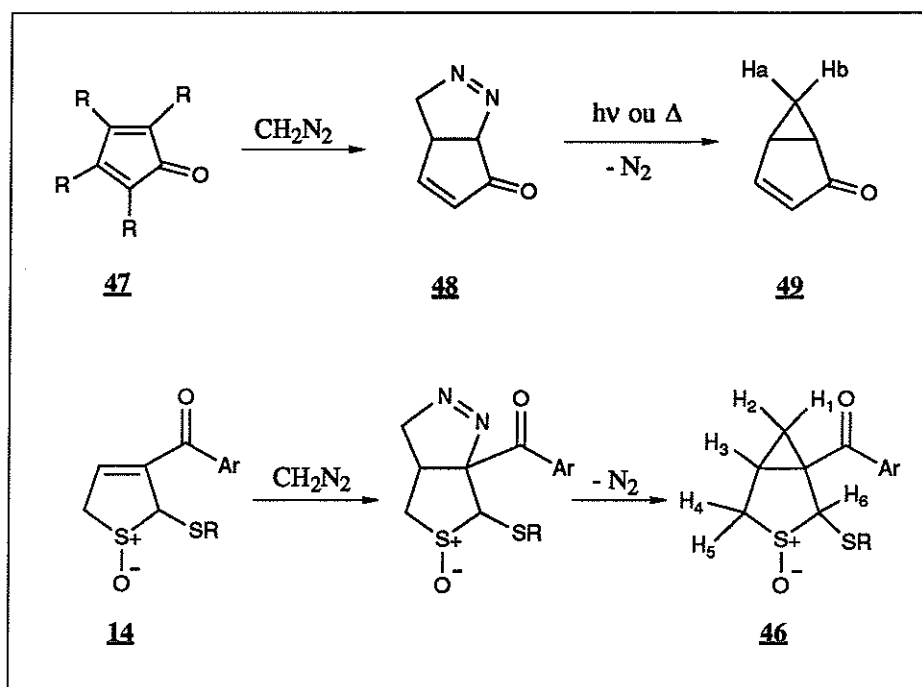


Figure 7.1 Formation d'un cyclopropane par cycloaddition 1-3 dipolaire du diazométhane sur une double liaison (en haut) selon Dürr et al, 1968 et hypothèse de formation du métabolite **46** (en bas).

Le carboxyle de l'acide dichlorophénoxyacétique est présent sous sa forme méthylée (singulet à 3,82 p.p.m. intégrant pour 3 protons). La présence de deux protons en plus des quatre protons des sulfoxydes **13** et **14**, intégrés dans un réseau complexe de couplage, ne peut avoir comme origine que l'introduction d'un motif CH₂ supplémentaire. Cette deuxième méthylation par le diazométhane pourrait avoir lieu sur l'autre fonction acide de la molécule, en C5 ou sur l'une ses formes mésomères, mais le groupement méthyle obtenu donnerait alors un singulet en R.M.N.¹H ; le motif CH₂ est donc incorporé au cycle du dihydrothiophène. Les deux protons H₄ et H₅, couplés par une constante de 14 Hz et distants de 0,38 p.p.m. ressemblent aux deux protons géminaux H_{5a,b} de **13** et **14**. Le proton H₃ est, de par ses couplages, situé entre les protons H₄ et H₅ et les deux protons géminaux H₁ et H₂. Ces deux derniers protons appartiennent probablement au motif CH₂ issu du diazométhane. Seul un cyclopropane branché sur C3 et C4 admet une chaîne monocarbonée partant de C3 avec disparition de la double liaison C3-C4 (figure 7.1). Les déplacements chimiques à haut-champ des protons H₁, H₂ et H₃ de **46** ainsi que la petite constante géminale de -5 Hz entre H₁ et H₂ sont en accord avec ceux proposés par la littérature pour un cyclopropane (Jackman et al, 1969). Cette hypothèse est compatible avec une cycloaddition 1-3 dipolaire sur la double liaison C3-C4 du sulfoxyde de dihydrothiophène **14**. Cette réaction du diazométhane a été décrite sur une double liaison en α d'une cétone **47** (Dürr et al, 1968) et dans un cas semblable au nôtre, sur un sulfoxyde de 2,5-dihydrothiophène (Takaya et al, 1967). Après formation d'une Δ¹-pyrazoline **48** instable, un cyclopropane **49** est formé par thermolyse ou photolyse ; cette réaction est encore connue sous l'appellation de synthèse de Büchner-Curtius (Elguero, 1984) (figure 7.1). De plus, une des incubations préparatives du métabolite **46** a conduit à l'isolement d'un intermédiaire instable, qui s'est transformé en métabolite **46**, probablement sous l'action de la lumière U.V.

Tableau 7.2 Spectre de masse du métabolite 46.

En ionisation chimique (NH ₃)		
m/z	% pic de base	fragment proposé avec M = 452
359	80%, Cl ₂ *	TAI + H ⁺ + 2CH ₂
376	30%, Cl ₂	TAI + NH ₄ ⁺ + 2CH ₂
405	20%, Cl ₂	
435	35%, Cl ₂	M + H ⁺ - H ₂ O
453	100%, Cl ₂	M + H ⁺
470	10%, Cl ₂	M + NH ₄ ⁺
En impact électronique		
m/z	% pic de base	fragment proposé avec M = 452
261	100%, Cl ₂	
359	10%, Cl ₂	TAI + H ⁺
452	8%, Cl ₂	M

* Cl₂ indique un triplet isotopique correspondant à la présence de deux chlores.

Spectre de masse du métabolite 46 - Le spectre de masse est réalisé en impact électronique et en ionisation chimique (NH₃) ; son résultat est détaillé ci-dessus (tableau 7.2). La diméthylation est visible sur le pic du TAI qui sort à 359, soit sa masse plus 2CH₂ + H⁺. Le pic de masse la plus élevée à 453 est en accord avec la structure proposée de masse 452 et se décompose en 453 = 424 + 2x14 + 1 = M + 2CH₂ + H⁺ avec M égal à 424, masse des métabolites **13** ou **14** qui apparaît ici sans perte d'une molécule d'eau. Cette perte est malgré tout visible sur le métabolite **46** avec un fragment de masse 435 (453 - 18).

7.2. Estimation de l'affinité des anticorps anti-AT pour le TAI.

La mesure de l'affinité d'un anticorps par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium (méthodologie décrite par Steward, 1986) est de réalisation simple pour peu que l'on dispose d'un antigène radioactif. Nous avons appliqué cette méthode aux différents sérums du prélèvement IV et estimé l'affinité des anticorps anti-AT pour le TAI, dans le but de compléter les éléments du choix du lapin meilleur répondeur.

Méthode - On mélange, dans des tubes Eppendorf de 400 µl, 10 µl de sérum avec 40 µl de solution de TAI (25 µCi/µmol) dans du PBS dans une gamme de concentrations de 1,25 à 17,5 µM. Au bout de 60 min. à 4°C, on additionne 50 µl d'une solution de sulfate d'ammonium saturée à température ambiante. Après précipitation des Ig et centrifugation 3 min. à 14000 g, le culot est lavé 2 fois par 100 µl d'une solution de sulfate d'ammonium à 50% de la saturation à 4°C. Le culot est ensuite remis en solution dans du PBS et la radioactivité retenue comptée. La fixation non-spécifique du TAI sur les Ig est mesurée à partir d'expériences analogues réalisées avec les sérums préimmuns (prélèvement 0). Chaque mesure est réalisée en duplicat.

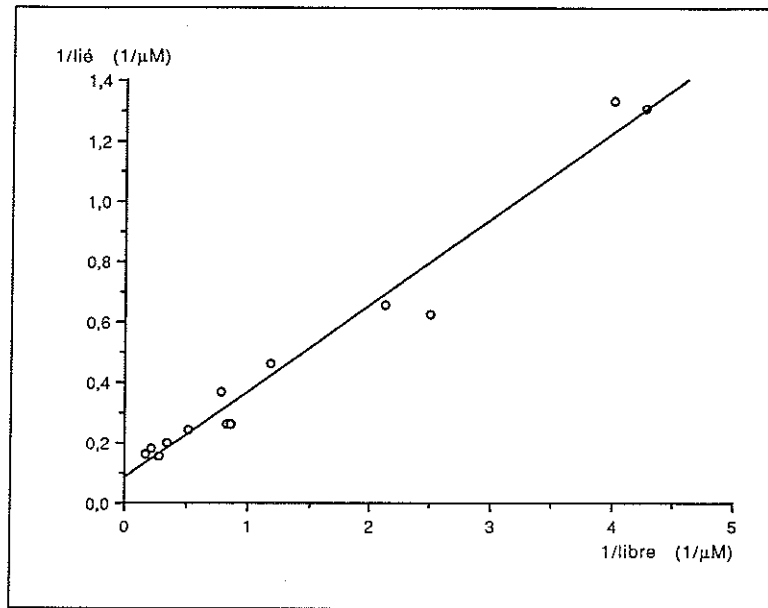


Figure 7.2 Estimation de l'affinité des Ac anti-AT pour le TAI par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium (sérum IV du lapin 2, échelle des ordonnées en rapport avec une dilution au 1/5ième du sérum).

Résultats - Le comptage fournit la fraction liée (concentration de TAI lié aux Ig mesurée par différence avec la valeur obtenue avec le sérum préimmun) ; la fraction libre est calculée par soustraction de la fraction liée à l'ensemble du TAI présent.

Le signal non-spécifique obtenu avec les sérums préimmuns est entre 30 et 40 fois inférieur au signal obtenu avec les sérums immuns. La représentation de l'inverse de la fraction liée en fonction de l'inverse de la fraction libre met en évidence, pour chacun des sérums, une linéarité qui reflète l'équilibre antigène-anticorps (figure 7.2). La capacité de fixation maximale du sérum pour le TAI correspond à la fraction liée extrapolée pour une concentration de TAI infinie (lorsque la droite de régression coupe l'axe des ordonnées, c'est à dire pour une valeur de l'inverse de la fraction libre égale à 0) et la constante d'affinité à l'inverse de la concentration qui donne la moitié de cette fixation maximale (tableau 7.3). En supposant 2 sites de fixation par Ig, on peut calculer la concentration en Ig G spécifiques du TAI présente dans chaque sérum (avec un poids moléculaire de 150000 Daltons par Ig G, les autres Ig ont été négligées).

Tableau 7.3 Fixations maximales des sérums et constantes d'affinité K_{aobs} des Ac anti-AT pour le TAI mesurées sur les sérums du prélèvement IV par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.

Lapin	fixation maximale	Ig G	$K_{a obs.}$
1	15 μ M	2,25 mg/ml	$1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$
2	45	6,75	$5 \cdot 10^5$
4	10	1,5	$1,5 \cdot 10^6$
5	25	3,75	$1,4 \cdot 10^6$

Conclusion - Les sérums des lapins immunisés par la BSA-AT ont une affinité spécifique pour le TAI avec une capacité maximale de fixation importante surtout pour le lapin 2. Les K_a observés sont faibles, de l'ordre de 10^6 mais ne préjugent pas de la présence de sous-populations d'Ig G d'affinité beaucoup plus importante (la méthode utilisée considère essentiellement les anticorps de faible affinité).

7.3. Publications issues de ce travail.

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",
Biochem. Pharm., **41**, 553, 1991 ;

Mansuy D., Valadon Ph., Erdelmeier I., Lopez-Garcia P., Amar C., Girault J-P., and Dansette P.,
"Thiophene S-oxyde as new reactive metabolites: Formation by cytochrome P450 dependent oxidation and reaction with nucleophiles",
J.A.C.S., **113**, 7825, 1991.

BIBLIOGRAPHIE

- Bax A.,
"Structure determination and spectral assignment by pulsed polarization transfer via long-range proton-carbon-13 couplings",
 J. Magn. Reson., **57**, 314, 1984 ;
- Beaune Ph., 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 P-450 that hydroxylates the drug",
 Proc. Natl. Acad. Sci., **84**, 551, 1987 ;
- Bourdi M., Larrey D., Nataf J., Bernuau J., Pessayre D., Iwasaki M., Guengerich F.P., Beaune P.H.,
"Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2",
 J. Clin. Invest., **85**, 1967, 1990 ;
- Bray H.G., Carpanini F. M. B., and Waters B.D.,
"The metabolism of thiophen in the rabbit and the rat",
 Xenobiotica, **1**, 157, 1971 ;
- Brian W.R., Srisvastava P.K., Umbenhauer D.R., Lloyd R.S., and Guengerich F.P.,
"Expression of a human liver cytochrome P-450 protein with tolbutamide hydroxylase activity in Saccharomyces cerevisiae",
 Biochem., **28**, 4993, 1989 ;
- Cagniant P., Cagniant D., Paquer D. and Kirsch G.,
"The Chemistry of heterocyclic compounds, thiophene and its derivatives",
 Salo Gronowitz (Ed), John Wiley and Sons, New York, 1985, 44 part 2, 119, 1985 ;
- Calmus Y., Biour M., et Poupon R.,
"Les tests "in vitro" dans le diagnostic des hépatites médicamenteuses",
 Gastroenterol. Clin. Biol., **11**, 586, 1987 ;
- Carlsson J., Drevin H. and Axen R.,
"protein thiolation and reversible protein-protein conjugation",
 Biochem. J., **173**, 723, 1978 ;
- Catty D. and Raykundalia C.,
"ANTIBODIES : a practical approach",
 Catty D. Ed, 2 vol., IRL press, Oxford, 1988 ;
- Cava M.P., Pollack N.M.,
"A Novel Synthesis of Isothianaphtenes",
 J.A.C.S., **88**, 4112, 1966 ;
- Conney A H.,
"Pharmacological implications of microsomal enzyme induction",
 Pharmacol. Rev., **19**, 317, 1967 ;
- Cripps R.E.,
"The Microbial Metabolism of Thiophen-2-carboxylate",
 Biochem. J., **134**, 353, 1973 ;
- Crumbie R.L. and Riddley D.D.,
"Reactions of 2-5-dihydrothiophen and S-substitued derivatives with bases. Preparations of 1-(alkylthio)buta-1,3-dienes and the corresponding sulfoxides and sulfones",
 Aust. J. Chem., **34**, 1017, 1981 ;
- Damani L.A.,
"Sulphur-containing drugs and related organic compounds",
 volume 1 à 3, Damani Ed, Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 1989 ;
- Dansette P.M., Amar C., Smith C., Pons C. and Mansuy D.,
"Hydroxylation and formation of electrophilic metabolites during metabolism of tienilic acid and its isomer by rat liver microsomes",
 Biochem. Pharmacol., **39**, 911, 1990 ;
- 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",
 Biochem. Pharm., **41**, 553, 1991 ;
- Descotes J.,
"évaluation précoce de l'immunotoxicité",
 Médecine-Sciences, **7**, 719, 1991 ;

- Doroz Ph.,
guide pratique des MEDICAMENTS, 9^e éd.,
Maloine ed., 310, 1989 ;
- Dresser D. W.,
"Immunisation of experimental animals",
Handbook of Experimental Immunology, vol. I,
chap. 8, 4^e ed. , Weir M. Ed., Oxford, 1986 ;
- Dürr H. und Heitkämper P.,
"Synthese, Photolyse und Thermolyse von p-
disubstituierten Tetraphenyl-bocicyclo[3.1.0]-
hexenonen",
Liebigs Ann. Chem., **716**, 212, 1968 ;
- Edwards R.J., Murray B.P. et Davies D.S.,
"Identification and location of alpha-helices in
mammalian cytochromes P450",
Biochem., **28**, 3762, 1989 ;
- Elguero J.,
Comprehensive Heterocycle Chemistry,
volume 5, p. 254, Katrisky A.R., Pergamon
Press, Oxford, 1984 ;
- Ellman,
Arch. Biochem. Biophys., **82**, 70 ;
- Fenselau A., 1970,
"Nicotinamide dinucleotide as an active site
director in glyceraldehyde 3-phosphate dehy-
drogenase modification",
J. Biol. Chem., **245**, 1239, 1959 ;
- Fenton Schaffner M.D.,
"Autoimmune Chronic Active Hepatitis : Three
Decades of Progress",
Progress in Liver Diseases, **8**, 485, 1986 ;
- Gandolfi A., White R.D., Sipes I.G., and Pohl
L.R.,
"bioactivation and covalent binding of
halothane *in vitro*: Studies with (³H) and (¹⁴C)-
halothane",
J. Pharmacol. Exp. Ther., **214**, 721, 1980 ;
- Ged C.,
"Les cytochromes P-450 IIIA et IIC chez
l'homme",
Thèse de doctorat de l'Université Paris VI,
Paris, 1990 ;
- Gonzalez F.J.,
"The molecular biology of Cytochrome P450s",
Pharmacol. Rev., **40**, 243, 1989 ;
- Gordon Gibson G. et Skett P.,
"Introduction to DRUG METABOLISM",
Chapman and Hall, London, 1986 ;
- Groves J.T., Hanshalter R.C., Nakatura M.,
Nemo T.E., and Evans B.J.,
"High Valent Iron-Porphyrin Complexes Rela-
ted to Peroxydases and Cytochrome P-450",
J.A.C.S., **103**, 2884, 1981 ;
- Guengerich F., Dannan G.A., Wright S.T.,
Martin M.V., and Kaminsky L.S.,
"Purification and Characterisation of Liver Mi-
crosomal Cytochromes P-450 : Electrophoretic,
Spectral, Catalytic, and Immunochemical
Properties and Inducibility of Height Isozymes
Isolated from Rats Treated with Phenobarbital
or beta-Naphtoflavone",
Biochem., **21**, 6030, 1982 ;
- Guengerich F.
"Mammalian Cytochromes P-450",
chapitre 1, vol. 1 p.2, Guengerich Ed., CRC
Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986 ;
- 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,
1989 ;
- Gueguen M., Boniface O., Bernard O., Clerc F.,
Cartwright T. and Alvarez F.,
"Identification of the main epitope on human
cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver
kidney microsome antibody",
J. Autoimm., **4**, 607, 1991 ;
- Herbert M. et Pichat L.,
"Synthèse d'un diurétique marqué au carbone
14 : l'acide dichloro-2,3 [thénoyl-2 (¹⁴C=O)] -4
phénoxyacétique (D.C.I. acide tiénilique)",
J. Lab. Comp. Rad., **XII**, 3, 437, 1976 ;
- Hinson J.A., Pohl L.R., Monks T.J., Gillette
J.R.,
"Acetaminophen-induced hepatotoxicite",
Life Sciences, **29**, 107, 1981 ;
- Hinson J.A., Roberts D.W.,
"Role of covalent and noncovalent interactions
in cell toxicity: effects on proteins",
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **32**, 471, 1992;
- Hogg D.R.,
"Sulfenic acids and their derivatives",
Comprehensive Organic Chemistry, **3**, 11.16
p.261 ; Barton D. and Ollis D.W., Pergamon
Press, London, 1979 ;
- Holder G., Haruhiko Y., Dansette P., Jerina
D.M., Levin W., Lu A.Y., and Conney A.H.,
"Effects of inducers and epoxyde hydrase on
the metabolism of benzo[a]pyrene by liver mi-
crosomes and a reconstituted system: analysis
by high pressure liquid chromatography"
Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 4356, 1974 ;

- Homberg J.C., Andre C., Abuaf N.,
"a new anti - liver - kidney - microsome antibody (anti - LKM2) in tienilic acid - induced hepatitis",
 Clin. Exp. Imm., **55**, 561, 1984 ;
- Homberg J.C. and col.,
"Chronic Active Hepatitis Associated with Anti-liver/Kidney Microsome Antibody Type 1 : A Second Type of "Autoimmune" Hepatitis",
 Hepatology, **7**, 1333, 1987 ;
- Hoodi A.A. and Damani L.A.,
"Cytochrome P-450 and non-P-450 sulph-oxidations",
 J. Pharm. Pharmacol., **36**, 62P, 1984 ;
- Hutchinson B.J., Andersen K., and Katritsky A.R.,
"The conformational analysis of saturated heterocycles. XX. The stereochemistry of base-catalysed hydrogen-deuterium exchange of methylene protons α to sulfinyl group",
 J.A.C.S., **91**, 3839, 1969 ;
- Jackman L.M. and Sternhell L.S.,
"Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopie in organic chemistry",
 Pergamon Press, 1969 ;
- Jacob J., Schlodt A., Augustin C., Raab G. and Grimmer G.,
"Rat liver microsomal ring- and S-oxidation of thiaarenes with central or peripheral thiophene rings",
 Toxicology, **67**, 181, 1991 ;
- Kenna G.J.,
"The molecular basis of halothane-induced hepatitis",
 Biochem. Soc. Trans., **19**, 191, 1991 ;
- Kiffel L., Loeper J., Homberg J.C., and Leroux J.P.,
"A human cytochrome P-450 is recognized by anti-liver/kidney microsome antibodies in autoimmune chronic hepatitis",
 Biochem. Biophys. Res. Com., **159**, 283, 1989 ;
- Kingsbury C.A. and Cram D.J.,
"Studies in stereochemistry. XXXII. Mechanism of elimination of sulfoxides",
 J.A.C.S., **82**, 1810, 1960 ;
- Krawitt E.L., Kilby A.E., Albertini R.J., Schanfield M.S., Chastenay B.F., Harper P.C., Mickey R.M. and McAuliffe T.,
"Immunogenetic Studies of Autoimmune Chronic Active Hepatitis : HLA, Immunoglobulin Allotypes and Autoantibodies",
 Hepatology, **7**, 1305, 1987 ;
- Kremers P., Beaune P., Creteil P., Degraeve J., Columelli S., Leroux J.P. and Gielen J.E.,
"Cytochromes P-450 monooxygenases activities in human and rat liver microsomes",
 Eur. J. Biochem, **118**, 599, 1981 ;
- Lehninger A.L.,
"Biochimie",
 traduction française de la 2ième éd., 1977, p. 99-100, Flammarion médecine-sciences, Paris, 1970 ;
- Levron J.C., Le Fur J.M., Adnot P. and Dormard Y.,
"Pharmacokinetic study of 2,3-dichloro-4-(2-thienylketo)¹⁴Cphenoxyacetic acid",
 Eur. Jour. Drug Metab. and Pharmacol., **3**, 107, 1977 ;
- Loeper J., Descatoire V., Maurice M., Beaune P., Feldmann G., Larrey D. and Pessayre D.,
"Presence of Fonctionnal Cytochrome P-450 on Isolated Rat Hepatocyte Plasma Membrane",
 Hepatology., **11**, 850, 1990 ;
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.,
"Protein mesurement with the folin phenol reagent",
 J. Biol. Chem., **193**, 265, 1961a ;
- Lowry O.H., Passonneau J.V., and Rock M.K.,
"The stability of pyridine nucleotides",
 J. Biol.Chem., **236**, 2756, 1961b ;
- Lynch M.J., Mosher F.R., Levesque W.R., and Newby,
*"The *in vitro* and *in vivo* metabolism of morantel in cattle and toxicology species"*,
 Drug Metab Rev., **18**, 253, 1987 ;
- Mackay I.R., Taff L.I. and Cowling D.C.,
"Lupoid Hepatitis",
 Lancet, **2**, 1323, 1956 ;
- Maddrey W.,
"Subdivivions of Idiopathic Autoimmune Chronic Active Hepatitis",
 Hepatology, **7**, 1372, 1987 ;
- Manns M., Johnson E.F., Griffin K.J., Tang E.M., and Sullivan K.F.,
"Major antigen of liver kidney microsomal auto-antibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome db1",
 J. Clin. Invest., **83**, 1066, 1989 ;
- Manns M., Zanger U., Gerken G., Sullivan K. F., Meyer zum Büschenfelde K.H., Meyer U.A. and Eichelbaum M.,
"Patients with type II autoimmune hepatitis express functionally intact cytochrome P-450 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro but not in vivo",
 Hepatology, **12**, 127, 1990a ;

- Manns M., Griffin K.J., Quattrochi L.C., Sacher M., Thaler H., Tukey R.H., and Johnson E.F.,
"Identification of Cytochrome P450 IA2 as a human autoantigen",
 Arch. Biochem. Biophys., **280**, 229, 1990b ;
- Manns M., Griffin K., Sullivan K.F. and Johnson E.F.,
"LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P-450 IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase",
 J. Clin. Invest., **88**, 1370, 1991 ;
- Mansuy D.,
"Coordination chemistry of cytochrome P 450 and iron-porphyrins : relevance to pharmacology and toxicology",
 Biochimie, **60**, 909, 1978 ;
- 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, 1984 ;
- Mansuy D.,
 Cours du D.E.A. de pharmacologie moléculaire et cellulaire,
 Paris VI, 1985 ;
- 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, 1987 ;
- Mansuy D., Battioni P. and Battioni J.P.,
"Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome P-450-dependent monooxygenases",
 Eur. J. Biochem., **184**, 267, 1989 ;
- Mansuy D., Valadon Ph., Erdelmeier I., Lopez-Garcia P., Amar C., Girault J-P., and Dansette P.,
"Thiophene S-oxide as new reactive metabolites: Formation by cytochrome P450 dependent oxidation and reaction with nucleophiles",
 J.A.C.S., **113**, 7825, 1991 ;
- Meth-Cohn O.,
"Thiophens",
 Comprehensive Organic Chemistry, **4**, 3.13 p.795, Barton D. and Ollis D.W., Pergamon Press, London, 1979 ;
- Meyer zum Büschenfelde K.H., Lohse A.W., Manns M., and Poralla T.,
"Autoimmunity and Liver Disease",
 Hepatology, **12**, 354, 1990 ;
- Mock W. L.,
"Stable thiophene sulfoxides",
 J.A.C.S., **92**, 7610, 1970 ;
- Monks T.J., Anders M.W., Dekant W., Stevens J.L., Lau S.S., and van Bladeren P.J.,
"Glutathione Conjugate Mediated Toxicities",
 Toxicol. Appl. Pharmacol., **106**, 1, 1985 ;
- Neau E.,
"Oxydation hépatique des dérivés du thiophène : enzymes impliquées et réactions biomimétiques",
 Thèse de Doctorat d'Université Paris V en sciences pharmaceutiques, Paris, 1989 ;
- Neau E., Dansette P.M., Andronick V. and Mansuy D.,
"Evidence for 5-Hydroxylation of 2-arylthiophenes as a general metabolic pathway using a simple UV-visible assay",
 Biochem. Pharmacol., **39**, 1101, 1990 ;
- Nebert D.W. et coll.,
"The P450 superfamily : Updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci",
 DNA, 1989, **8**, 1, 1989a ;
- Nebert D.W., Nelson D.R. and Feyereisen R.,
"Evolution of the P450 genes",
 Xenobiotica, **19**, 1149, 1989b ;
- Nebert D.W. and coll.,
"The P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature",
 DNA and Cell Biology, **10**, 1, 1991 ;
- Nelson S.D. and Harvison P.J.,
"Mammalian Cytochromes P-450", chapitre 2, vol. 2, Guengerich Ed., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986 ;
- Nelson D.R., and Strobel H.V.,
"Evolution of cytochrome P450 proteins",
 Mol. Bio, **4**, 572, 1987 ;
- Nelson D.R. and Strobel H.W.,
"Secondary structure prediction of 52 Membrane-bound cytochromes P450 shows a strong structural similarity to P450cam",
 Biochem., **28**, 656, 1989 ;
- Noguchi T., Fong k.L., Lai E.K., Alexander S.S., King M.M., Olson L., Poyer J.L., and McKay P.B.,
"Specificity of a phenobarbital-induced cytochrome P-450 for the metabolism of carbon tetrachloride to the trichloromethyl radical",
 Biochem. Pharmacol., **31**, 615, 1982 ;

- Oeda K., Sakaki T., and Ohkawa,
 "Expression of rat liver cytochrome P-450 MC cDNA",
 DNA, **4**, 203, 1985 ;
- Omura T., Sato R.,
 "The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes",
 J. Biol. Chem., **237**, 1375, 1962 ;
- Patai S., Rappoport Z. and Stirling C.,
 "The chemistry of sulphones and sulfoxides",
 p.459, John Wiley and sons Ed., 1988 ;
- Park B.K., Coleman J.W. and Kitteringham N.R.,
 "Drug disposition and drug hypersensitivity",
 Biochem. Pharm., **36**, 581, 1987 ;
- Pedersen J.S., Toh B.H., Mackay I.R.,
 "Autoantibodies to cytoskeletal filaments actin and intermediate filaments segregate with two types of chronic active hepatitis",
 Clin. Exp. Immunol., **48**, 527, 1982 ;
- Pegg D.T., Doddrell D.M., and Bendall M.R.,
 "Proton-polarization transfert enhancement of a heteronuclear spin multiplet with preservation of phase coherency and relative component intensities",
 J. Chem. Phys., **77**, 2745, 1982 ;
- Pohl L.R., Satoh H., Christ D.D. and Kenna J.G.,
 "The immunologic and metabolic basis of drug hypersensitivities",
 Ann. Rev. Pharmacol., **28**, 367, 1988 ;
- Pons C.,
 "Origine des anticorps anti-tissus apparaissant dans des hépatites médicamenteuses de type immuno-allergique",
 Thèse de Doctorat d'Université Paris VII en toxicologie fondamentale et appliquée, Paris, 1989 ;
- Pons C., Dansette P., Amar C., Jaouen M., Wolf C.R., Gregeois J., Homberg J.C. and Mansuy M.,
 "Detection of human hepatitis anti-liver kidney microsomes (LKM2) autiantobodies on rat liver sections is predominantly due to reactivity with rat liver P-450 IIC11",
 J. Pharm. Exp. Ther., **259**, 1328, 1991 ;
- Potter D.W., Pumford N. R., Hinson J.A., Benson R.W. and Roberts D.W.,
 "Epitope characterisation of acetaminophen bound to protein and nonprotein sulfhydryl groups by an enzyme-linked immunosorbent assay",
 J. Pharm. Exp. Ther., **248**, 182, 1989 ;
- Poulos T.L. , Finzel B.C. and Howard A.J.,
 "High resolution crystal structure of cytochrome P-450 cam",
 J. Mol. Biol., **195**, 687, 1987a ;
- Poulos T.L. and Howard A.J.,
 "Crystal Structures of Metyrapone- and Phenyl-imidazole- Inhibited Complexes of Cytochrome P-450 cam ",
 Biochem., **26**, 8165, 1987b ;
- Prescott L.F.,
 "The hepatotoxicité of PARACETAMOL",
 Hépatotoxicité médicamenteuse, Fillastre J. Ed., Ed. Inserm, France, 1986 ;
- Rance D. J.,
 "Sulphur heterocycles",
 in "Sulphur-containing drugs and related organic compounds",
 volume 1b chap. 9 p. 227, Damani Ed, Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 1989 ;
- Relling M.V.,
 "Polymorphic drug metabolism",
 Clinical Pharmacy, **8**, 852, 1989 ;
- Robins J.D., Bakke J.E. and Feil V.J.,
 "Metabolism of mobam in dairy goats and a lactating cow",
 J. Agric. Food Chem., **18**, 130, 1970 ;
- Romkes M., Faletto M.B., Blaisdell J.A., Raucy J.L., and Goldstein J.A.,
 "Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily",
 Biochem., **30**, 3247, 1991 ;
- 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",
 J. Hepatol., **10**, 364, 1990 ;
- Sakaguchi M., Mihara K., and Sato R.,
 "A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 junctions both as an insertion signal and as stop-transfert sequence",
 EMBO J., **6**, 2425, 1987 ;
- Sellman R.,
 "Pharmacological and toxicological studies on tienilic acid",
 Thèse de l'Université de Turku, section Pharmacologie, Turku (Finlande), 1981 ;
- Sherlock S.,
 "The spectrum of hepatotoxicity due to drugs",
 Lancet, 23 août 1986, 440, 1986 ;

- Slatter J.G., Rashed M.S., Pearson P.G., Han D.-H., and Baillie T.A.,
"Biotransformation of methyl isocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate-mediated toxicities",
 Chem. Res. Toxicol., **4**, 157, 1991 ;
- Steward M. W.,
"Overview : introduction to methods used to study the affinity and kinetics of antibody-antigen reactions",
 Handbook of Experimental Immunology, vol. I, chap. 25, 4^e ed. , Weir M. Ed., Oxford, 1986 ;
- Takaya T., Kosaka S., Otsuji Y. and Imoto E.,
"Preparation and oxidation of dihydrothiophenes",
 Bull. Chem. Soc. Jap., **41**, 2086, 1968 ;
- Tarloff J.B., Goldstein R.S. and Hook J.B.,
"Xenobiotic biotransformation by the kidney : pharmacological and toxicological aspects",
 Progress in Drug Metabolism, **12**, 29, Ed G.G. GIGSON chez Taylor et Francis, LONDON, 1990 ;
- Ternick Th., Avrameas S.,
"Techniques immunoenzymatiques",
 Inserm Ed., Paris, 1987 ;
- Thomas P.E., Reik L.M., Ryan D.E., and Levin W.,
"Regulation of three forms of Cytochromes P-450 and Epoxyde Hydrolase in Rat Liver Microsomes",
 J. Biol. Chem., **256**, 1044, 1981 ;
- Thuillier G., Laforest J., Cariou B., Bessin P., Bonnet J., Thuiller J.,
"Dérivés hétérocycliques d'acides phénoxy-acétique, synthèse et étude préliminaire de leurs activités diurétiques et uricosuriques",
 Eur. J. Med. Chem., **9**, 625, 1974 ;
- Torsell K.,
"Diels-Alder reactions of thiophene oxides generated in situ",
 Act. Chem. Scand. B, **30**, 353, 1976 ;
- Vento S., and Eddleson A.L.W.F.,
"Immunological aspects of chronic active hepatitis",
 Clin. exp. Immunol., **68**, 225, 1987 ;
- Wächter B., Kyriatsoulis A., Lohse A.W., Gerken G., Meyer zum Büschenfelde K.-H. and Manns M.,
"Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies",
 J. Hepatol., **11**, 232, 1990 ;
- Waldenström J.L.,
"Blutproteine und Nahrungsweisss",
 Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr, **2**, 130, 1950 ;
- Wallin A., Schelin C., Tunek A. and Jergil B.,
"A rapid and sensitive method for determination of covalent binding of benzo(a)pyrene to proteins",
 Chem. Biol. Interact, **38**, 109, 1981 ;
- Waxman D.J., Dannan G.A. and Guengerich F.P.,
"Regulation of Rat Hepatic Cytochrome P-450 : Age-Dependent Expression, Hormonal Imprinting, and Xenobiotic Inducibility of Sex-Specific Isoenzymes",
 Biochem., **24**, 4409, 1985 ;
- Yeaman S.J.,
"Identification and analysis of the major antigens in the primary biliary cirrhosis",
 Biochem. Soc. Trans., **19**, 196, 1991 ;
- Ziegler D.M.,
"Metabolic Oxygenation of Organic Nitrogen and Sulfur Compounds",
 Drug Metabolism and Drug Toxicity, Mitchell and Horning Ed., Raven Press, New York, 1984.
-

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1	Structure de l'acide tiénilique	1
Figure 1.2	Les différentes phases de l'élimination d'un médicament	3
Figure 1.3	Métabolisme du benzo[a]pyrène.	4
Figure 1.4	Schématisation du cytochrome P-450 cam.	6
Figure 1.5	Structure de l'hème et états de spin du fer	7
Figure 1.6	Cycle catalytique du cytochrome P-450	8
Figure 1.7	Les principales réactions catalysées par le P-450.	9
Figure 1.8	Arbre phylogénique de la superfamille des cytochromes P-450	8
Figure 1.9	Structure des principaux inducteurs de cytochromes P-450.	11
Figure 1.10	Quantification immunologique des principaux cytochromes P-450 des microsomes de foie de rat mâle.	12
Figure 1.11	Métabolisme de l'acétaminophène.	14
Figure 1.12	Formation des acides mercapturiques	14
Figure 1.13	Métabolisme de l'halothane	15
Figure 1.14	Activation métabolique des dihaloalcane par le glutathion	16
Figure 1.15	S-oxydation de quelques composés soufrés.	17
Figure 1.16	Métabolisme du benzothiophène	17
Figure 1.17	5-Hydroxylation des dérivés 2-aryylthiophènes.	18
Figure 1.18	Métabolisme du morantel.	19
Figure 1.19	Métabolisme postulé pour le thiophène <i>in vivo</i> chez le rat	19
Figure 1.20	Structure de l'isomère en 3 de l'acide tiénilique	20
Figure 1.21	Métabolisme de l'acide tiénilique	21
Figure 1.22	Mécanisme proposé pour expliquer l'apparition de néoantigènes à la surface de la cellule hépatique	26
Figure 2.1	Incubation analytique de TAI en présence de microsomes PB ou CLO .	30
Figure 2.2	Incubations analytiques de TAI en présence de microsomes CLO et de mercaptoéthanol	31
Figure 2.3	Evolution en fonction de la concentration initiale du mercaptoéthanol présent dans le milieu réactionnel de la fixation covalente aux protéines microsomales et des concentrations finales des métabolites 13 , 14 , 15 et 16	32
Figure 2.4	Spectre d'absorption U.V. du métabolite 14	34
Figure 2.5	Spectres R.M.N. ¹ H des métabolites 13 et 14	37
Figure 2.6	Motif de structure dont la présence dans les métabolites 13 et 14 est imposée par les résultats de l'étude par R.M.N. ¹ H.	36
Figure 2.7	Propositions de structure pour les métabolites 13 et 14	43
Figure 2.8	Délocalisation d'un anion en C5	43
Figure 2.9	Hypothèse de deutériation des métabolites 13 et 14 en 18	44
Figure 2.10	Spectre d'absorption infrarouge des métabolites 13 et 14 et du TAI.	45
Figure 2.11	Spectre d'absorption U.V. du métabolite 17	45
Figure 2.12	Spectres R.M.N. ¹ H du métabolite 1	46
Figure 2.13	Déshydratation des métabolites 13 et 14	47
Figure 2.14	Evolutions de 13 et de 14 en présence de mercaptoéthanol	49
Figure 2.15	Spectre d'absorption U.V. du métabolite 16	51
Figure 2.16	Structure partielle du métabolite 16	52
Figure 2.17	Structure du métabolite 16	52

Figure 2.18	Spectre d'absorption U.V. du métabolite 15	55
Figure 2.19	Proposition de structure du métabolite 15	55
Figure 2.20	Spectre d'absorption U.V. du métabolite 26	57
Figure 2.21	Récapitulatif des différentes structures des métabolites du TAI.	60
Figure 2.22	Principe de la détermination de la position du mercaptoéthanol en C4	60
Figure 2.23	Spectre R.M.N. ¹ H du métabolite 16 avec et sans deutériation	62
Figure 2.24	Spectre R.M.N. ¹ H. du métabolite 15 avec et sans deutériation	63
Figure 2.25	Effet Nucléaire Overhauser relais à 70°C entre H4 et H3'.	65
Figure 2.26	Spectres R.M.N. ¹ H du TAI dans le DMSO-D ₆	66
Figure 2.27	Etude R.M.N. ¹ H du métabolite 21	67
Figure 2.28	Spectre R.M.N. ¹ H du métabolite 22 avec et sans deutériation sélective.	69
Figure 2.29	Formation d'un sulfoxyde de dihydrothiophène lors du métabolisme microsomal du TAI et différentes évolutions possibles de ce sulfoxyde en présence de mercaptoéthanol et en fonction du pH	71
Figure 2.30	Réduction du pont dithioéther du métabolite 16 et réaction de cyclisation en métabolite 15	72
Figure 2.31	Hypothèses de piégeage soit d'un époxyde du TA, soit d'un sulfoxyde de thiophène	73
Figure 2.32	Structure du sulfoxyde de thiophène 26 et du sulfoxyde de 2,5-di- <i>ter</i> -butyl-thiophène 27	74
Figure 2.33	Proposition d'ouverture des anions des métabolites 13 et 14	75
Figure 2.34	Proposition d'un mécanisme de formation du métabolite 16	76
Figure 2.35	Mécanisme possible pour l'aromatisation des métabolites 13 et 14	77
Figure 2.36	Mécanisme probable de la formation du métabolite 22	78
Figure 2.37	Métabolisme <i>in vitro</i> du TAI en présence de microsomes avec ou sans mercaptoéthanol	79
Figure 2.38	Métabolisme du benzothiophène	79
Figure 2.39	Proposition d'un mécanisme pour la 5-hydroxylation de l'acide tiénilique	80
Figure 3.1	Elugrammes d'incubations de TAI conduites en présence de microsomes CLO et de diverses concentrations en N-acétylcystéine.	87
Figure 3.2	Elimination urinaire de la radioactivité consécutive à une injection i.p. de TAI radioactif chez le rat Sprage Dawley.	89
Figure 3.3	Analyse de la fraction 2-4 heures par H.P.L.C.	90
Figure 3.4	Analyse par H.P.L.C. des métabolites extraits des urines de rat par Sep-Pack puis par l'acétate d'éthyle et méthylés	91
Figure 3.5	Comparaison des spectres R.M.N. ¹ H des métabolites 32_a et I	92
Figure 3.6	Analyse par H.P.L.C. d'incubations de TAI en présence de microsomes SP1 et de mercaptoéthanol.	94
Figure 3.7	Inhibition par les anticorps anti-LKM2 de la S-oxydation du TAI catalysée par les microsomes humains.	96
Figure 3.8	Analyse par H.P.L.C. d'une incubation de TAI avec des microsomes de la levure possédant le gène du P-450 MP8 en présence de mercaptoéthanol 5 mM	98
Figure 3.9	Influence du mercaptoéthanol sur la fixation covalente des métabolites du TAI aux protéines microsomales	104
Figure 3.10	Evolution en fonction du temps d'incubation du pourcentage de métabolites fixés aux protéines non-libérés par le traitement au mercaptoéthanol	105
Figure 3.11	Analyse par H.P.L.C. des métabolites libérés par traitement au mercaptoéthanol de protéines ayant fixé des métabolites du TAI	106
Figure 3.12	Hypothèse de structure du premier métabolite de piégeage H du sulfoxyde de TAI par les cystéines des protéines.	108
Figure 3.13	Une évolution possible du métabolite H en présence d'une lysine	109
Figure 3.14	Récapitulatif du métabolisme microsomal du TAI mis en évidence.	110

Figure 4.1	Hypothèse de reconnaissance croisée entre les Ac anti-LKM2 et les Ac anti-AT	114
Figure 4.2	Principe du couplage de l'AT à l'albumine par sa fonction carboxyle. . .	114
Figure 4.3	Motif chimique commun à l'ensemble des métabolites de piégeage du TAI et analogie avec la structure de l'acide éthacrynique.	115
Figure 4.4	Principe de la méthode de couplage de l'AT à la BSA au niveau du noyau thiophène	115
Figure 4.5	Comparaison des spectres d'absorption U.V. de la BSA-AT, de la BSA et du dérivé 5-S-mercaptoéthanol-thiophène 40	116
Figure 4.6	Arcs de précipitation entre la BSA-AT ou la BSA et les sérums du prélèvement IV.	117
Figure 4.7	Courbes Elisa obtenues avec le prélèvement IV du lapin 2	119
Figure 4.8	Structure des inhibiteurs testés	120
Figure 4.9	Courbes d'inhibition compétitive du test Elisa	123
Figure 4.10	Effets des différents déterminants chimiques du dérivé 40 sur la reconnaissance par les Ac anti-AT	123
Figure 6.1	Préparation de la fraction microsomale de foie de rat	137
Figure 6.2	Etude H.P.L.C. d'une incubation préparative de 13 et 14	141
Figure 6.3	Comparaison des spectres R.M.N. ¹ H du métabolite 34 et d'un authentique obtenu par réduction de la fonction cétone du TAI.	143
Figure 6.4	Préparation de la fraction microsomale de levure.	145
Figure 6.5	Protocole des tests Elisa.	150
Figure 6.6	Calibrage de la sensibilisation des plaques Elisa.	151
Figure 7.1	Formation d'un cyclopropane par cycloaddition 1-3 dipolaire du diazométhane sur une double liaison.	157
Figure 7.2	Estimation de l'affinité des Ac anti-AT pour le TAI.	159
Tableau 1.1	Principales réactions impliquées dans les biotransformations des xénobiotiques.	5
Tableau 1.2	Influence du glutathion sur la fixation covalente de métabolites de l'AT ou du TAI	21
Tableau 1.3	Classification des hépatites chroniques actives	23
Tableau 2.1	Répartition du métabolisme total du TAI	33
Tableau 2.2	Caractéristiques d'absorption U.V. des métabolites 13 et 14	34
Tableau 2.3	Caractéristiques R.M.N. ¹ H des métabolites 13 , 14 , et 19	41
Tableau 2.4	Spectre de masse du mélange des métabolites 13 et 14	42
Tableau 2.5	Caractéristiques R.M.N. ¹ H du métabolite 17 et de 21	46
Tableau 2.6	Spectres de masse des métabolites 17 et 21	48
Tableau 2.7	Caractéristiques R.M.N. ¹ H du métabolite 16 et de 23	50
Tableau 2.8	Spectres de masse des métabolites 16 et 23	53
Tableau 2.9	Caractéristiques R.M.N. ¹ H. des métabolites 15 et 24	54
Tableau 2.10	Spectres de masse des métabolites 15 et 24	56
Tableau 2.11	Caractéristiques R.M.N. ¹ H des métabolites 22 et 25	58
Tableau 2.12	Spectre de masse des métabolites 22 et 25	59
Tableau 2.13	Tables R.M.N. ¹ H et ¹³ C du TAI et du métabolite 15	64
Tableau 3.1	Caractéristiques du métabolisme de piégeage du TAI par la N-acétylcystéine.	86
Tableau 3.2	Caractéristiques en R.M.N. ¹ H. des métabolites 29 , 32a , 32b et 33	88
Tableau 3.3	Comparaison des spectres de masse des métabolites 32a et 32b avec ceux des métabolites I et II	89
Tableau 3.4	Métabolisme du TAI en présence de microsomes SP1 et de mercaptoéthanol	95
Tableau 3.5	Effets de différents nucléophiles sur le métabolisme du TAI	102

Tableau 4.1	Analyse semi-quantitative des arcs de précipitation	118
Tableau 4.2	Titres Elisa observés sur l'ensemble des prélèvements	121
Tableau 4.3	Inhibition compétitive par des analogues de l'AT de la reconnaissance par les Ac anti-AT	122
Tableau 6.1	Origine des produits chimiques.	136
Tableau 6.2	Caractéristiques des préparations microsomales.	138
Tableau 6.3	Méthodes de gradient H.P.L.C.	139
Tableau 6.4	Composition des milieux de culture	144
Tableau 6.5	Composition des gels d'agar	149
Tableau 7.1	Caractéristiques en R.M.N. ¹ H du métabolite 46	156
Tableau 7.2	Spectre de masse du métabolite 46	158
Tableau 7.3	Fixations maximales et constantes d'affinité Kaobs. pour le TAI	159

RESUME

L'acide tiénillique (AT) est diurétique responsable d'hépatites autoimmunes. Dans le sérum des patients on retrouve des autoanticorps (anti-LKM2) dirigés contre les cytochromes P-450 impliqués dans la métabolisation de l'AT et de son isomère (TAI).

La première partie concerne la détermination de la nature de l'entité réactive du TAI au moyen d'un piégeage *in vitro* chez le rat par le mercaptoéthanol. Deux sulfoxydes de dihydrothiophènes ont été caractérisés qui nous permettent de proposer un sulfoxyde de thiophène. En présence d'un excès de mercaptoéthanol, ces deux métabolites de piégeage évoluent en une succession de plusieurs métabolites. Afin de généraliser à l'ensemble des cytochromes P-450, nous avons mis en évidence ce nouveau métabolisme successivement *in vivo* chez le rat, *in vitro* chez l'homme et dans un système modèle constitué de microsomes de levures *Saccharomyces cerevisiae* recombinées exprimant le P-450 IIC9 ou le P-450 IIC10. Ces 2 cytochromes P450 possèdent une activité d'oxydation vis à vis de l'AT et du TAI.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons fixé l'AT à la sérulalbumine de bœuf. La protéine obtenue (BSA-AT) est immunogène chez le lapin et les anticorps obtenus (anti-AT) reconnaissent en Elisa les métabolites de l'AT ou du TAI fixés de façon covalente aux protéines microsomales. Ces anticorps seront un outil puissant pour étudier la fixation covalente des métabolites de l'AT.

SUMMARY

Tienilic acid (TA) is a diuretic drug responsible for autoimmune hepatitis in a few subjects. The sera of patients contain autoantibodies called anti-LKM2 which recognize cytochromes P450's. These P450's also catalyze the metabolic activation of TA and its isomer (TAI).

The first part of this study concerns the determination of the reactive intermediate of TAI by trapping it with mercaptoethanol *in vitro* in rats. Two dihydrothiophene sulfoxides have been fully characterised. They can only be derived from a new reactive metabolite : a thiophene sulfoxide intermediate. In excess of mercaptoethanol the primary metabolites are transformed into several successive metabolites. The involvement of cytochromes P450's in the thiophene sulfoxyde formation of TAI has been generalized both *in vivo* in rats and *in vitro* in human. In that case, human microsomes and yeast microsomes expressing human P450 IIC9 or IIC10 were able to produce the same reactions with TA and TAI as substrates.

The second part describes the haptening of bovine serum albumin with TA. This protein injected to rabbits produces the formation of antibodies (anti-TA) which recognize TA and TAI metabolites bound to microsomal proteins as shown by Elisa. These antibodies should be an efficient tool to investigate covalent binding of TA and TAI to P450's.

MOTS CLES acide tiénillique, hépatite autoimmune, cytochrome P450, thiophène-S-oxyde, anticorps anti-LKM2, autoimmunité.

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

URA 400 CNRS

45, rue des Saints Pères 75270 Paris Cedex 06 France

tel. 42 86 21 91 fax 33 (1) 42 86 83 87