

EFFET DE QUELQUES RADIO-PROTECTEURS SUR LE SYSTÈME ENZYMATIQUE DES MICROSOMES HÉPATIQUES DÉGRADANT L'HEXOBARBITAL*

C. LIÉBECQ, Z. M. BACQ et ALEXANDRA THOMOU†

Laboratoire de Biochimie de l'Institut supérieur d'Education physique et Laboratoire de Recherches pour la Protection des Populations civiles, Université de Liège, Belgique

(Received 10 July 1963; accepted 29 August 1963)

Abstract—Various so-called radioprotectors were tested for their ability to interfere with the metabolism of hexobarbital by sub-cellular fractions of the rat liver *in vitro*.

Cystamine (1.5×10^{-3} M) and 5-hydroxytryptamine (10^{-3} M) produced a 50 per cent inhibition of the utilization of hexobarbital by liver homogenates prepared in phosphate buffer, freed of the nuclear and mitochondrial fractions, and supplemented with NADP‡ and magnesium ions. Cystamine and histamine were less effective.

The reduction of NADP by added glucose-6-phosphate in the presence of the glucose-6-phosphate dehydrogenase§ of the 'soluble' fraction of the liver homogenate was unaffected by the compounds tested.

The reoxidation of the reduced form of NADP by oxygen in the presence of the microsomes was inhibited by cystamine and 5-hydroxytryptamine; this process was initially stimulated and later inhibited by histamine, initially unaffected and later inhibited by cystamine.

LE FOIE contient un système enzymatique, de caractère le plus souvent oxydatif, qui est capable de détoxiquer un nombre considérable de substances étrangères médicamenteuses (pour une revue, voir^{1, 2}). Ce système est localisé dans les microsomes^{3, 4} particulièrement dans les microsomes les plus 'légers'.⁵ Il requiert la présence d'oxygène, d'ions magnésium et de NADPH.^{4, 6} L'un des substrats oxydables par ce système est l'hexobarbital.^{7, 8}

Il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de divers radio-protecteurs sur ce mécanisme enzymatique; Della Bella et Bacq ont en effet observé que l'anesthésie au pentothal est de plus longue durée chez le Rat ou le Cobaye injecté de cystéamine une demi-heure au préalable (observations inédites, 1953).

Les résultats que nous rapportons ici ont été obtenus *in vitro* et indiquent que la cystamine et la 5-hydroxytryptamine, à des concentrations comparables à celles utilisées en radio-protection, sont des inhibiteurs de l'utilisation de l'hexobarbital par

* Partiellement sous contrat Université de Liège—EURATOM 006-61-8-BIAB.

† Boursière de l'Agence internationale de l'Energie atomique. Adresse actuelle: Commission grecque de l'Energie atomique, 5 Rue Merlin, Athènes, Grèce.

‡ Abréviations utilisées: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate et son produit de réduction, NADP et NADPH; tris (hydroxyméthyl) aminométhane, Tris; β -diaminoéthyl-diphénylpropylacétate, SKF 525-A; cystéamine et cystamine, CSH et CSSC.

§ D-Glucose-6-phosphate : NADP : oxydo-réductase, ou enzyme 1.1.1.49 du Rapport de la commission des enzymes de l'UNION INTERNATIONALE DE BIOCHIMIE (Pergamon Press, Oxford 1961, p. 70).

les microsomes du foie du Rat; ces résultats ont fait l'objet de communications brèves.^{9, 10}

Au moment où se travail était terminé, nous avons pris connaissance d'un mémoire de Mizrahi et Emmelot¹¹ consacré à l'effet de la cystéine et de la cystéamine sur la désalkylation de la diméthyl- et de la diéthylnitrosamine par le foie du Rat.

MÉTHODES

Préparations enzymatiques

Homogénats ordinaires pour la mesure de l'utilisation de l'hexobarbital. Les homogénats tissulaires sont préparés à partir de foies de rats mâles Epymus Albino Wistar adultes, pesant 300 à 400 g et nourris. Nous nous sommes inspirés des méthodes décrites par Quinn, Axelrod et Brodie¹² et par Roth et Bukovsky.¹³ Les animaux sont anesthésiés à l'éther puis décapités et saignés; leur foie est découpé, refroidi et finement dispersé (à l'aide d'un homogénéiseur du type Potter-Elvehjem, avec piston en téflon) dans 2 volumes de solution 0,2 M glacée de phosphate potassique de pH 7,4 et 0,03 M en nicotinamide. Nous avons utilisé la solution surnageante après 10 min de centrifugation à 1.200 g et 15 min de centrifugation à 14.000 g dans une centrifugeuse Servall SS-1A au meuble froid, préparation en principe exempte de cellules, noyaux et mitochondries intacts. Des contrôles effectués aux respiromètres de Warburg ont indiqué une activité respiratoire négligeable, non stimulée par le β -hydroxybutyrate.

Fraction 'soluble' utilisée pour la réduction du NADP. La même préparation est utilisée, centrifugée ensuite 60 min à 105.000 g à la centrifugeuse Spinco, pour la débarrasser de la plupart des microsomes.

Microsomes utilisés pour l'oxydation du NADPH. Les microsomes hépatiques sont préparés par homogénéisation dans 9 volumes de saccharose 0,25 M; les fractions nucléaire et mitochondriale sont éliminées par 15 min de centrifugation à 12.500 g et les microsomes sont sédimentés par 60 min de centrifugation à 105.000 g, lavés au saccharose 0,25 M et resédimentés dans les mêmes conditions, resuspendus finalement dans une solution 0,1 M de phosphate potassique de pH 7,4; le volume final, en millilitres, représente 1/3 du poids de tissu initial, en grammes.

Procédés analytiques

Utilisation de l'hexobarbital. Des béchers de 25 ml contenant les quantités suivantes de réactifs sont incubés avec agitation pendant 30 min, en présence d'air, à la température de 37°:

Constituants du mélange	Concentration finale
1,6 ml de solution enzymatique	115 mg de foie/ml
0,4 ml de phosphate potassique 0,2 M	env. 0,07 M
0,2 ml NADP 1 mM	0,05 mM
0,4 ml MgCl ₂ 0,15 M	0,015 M
0,8 ml hexobarbital 6 mM	1,5 mM
0,6 ml H ₂ O ou radio-protecteur	—

A la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 8 ml de solution de ZnSO₄ (100 g ZnSO₄·7 H₂O et 40 ml H₂SO₄ 6 N portés à 1 l.) puis, en agitant constamment, de 8 ml de NaOH 0,75 N. De l'eau est ajoutée pour amener le volume à 20 ml et ainsi compenser les pertes éventuelles par évaporation au cours de l'incubation. Le

précipité ayant adsorbé les protéines est éliminé par centrifugation et l'hexobarbital non utilisé est dosé sur une partie aliquote de la solution surnageante. Un blanc est effectué sans hexobarbital et la teneur initiale en hexobarbital est obtenue à l'aide d'un essai enzymatique au cours duquel l'hexobarbital est ajouté après le sulfate de zinc.

L'hexobarbital est dosé par un procédé dérivé des méthodes décrites par Brodie et collaborateurs,^{14, 15} pour le pento- et l'hexobarbital.

Une aliquote de 4 ml est acidifiée par addition de 2 ml de tampon phosphate sodique 0,1 M pH 5,5; 2 g de NaCl sont ajoutés et dissous complètement. L'hexobarbital est extrait par 45 min d'agitation en présence de 30 ml d'éther de pétrole *pro analysi* (point d'ébullition: 80–100°; exempt d'hydrocarbures aromatiques) contenant 1,5 vol % d'alcool isoamylique *pro analysi*.^{*} 20 ml de la phase étherée sont lavés 5 min à l'aide de 5 ml de la solution 0,1 M de phosphate sodique de pH 5,5 afin d'éliminer certains métabolites de l'hexobarbital. Ce dernier est finalement repris (5 min d'agitation) dans 4 ml de tampon phosphate alcalin de pH 11 (fait de 200 ml de Na₂HPO₄ 0,8 M + 8 ml NaOH 10 N). L'extinction est lue à 245 mμ à l'aide du spectrophotomètre de Beckman, modèle DU.

La déprotéinisation entraîne environ 25 pour cent de l'hexobarbital; le lavage acide en entraîne environ 20 pour cent. Ces deux pertes sont reproductibles et n'empêchent pas la proportionnalité entre la mesure de la densité optique et la teneur en hexobarbital des solutions analysées.

Réduction du NADP. La réduction du NADP est mesurée au spectrophotomètre de Beckman, en suivant l'apparition de la bande d'absorption dont le maximum est situé à 340 mμ. Les cuvettes contiennent:

- 1,0 ml de la fraction 'soluble' de l'homogénat dilué 10 fois dans du phosphate potassique 0,2 M de pH 7,4;
- 0,5 ml d'une solution contenant 1 mg de glucose-6-phosphate;
- 1,5 ml d'eau ou de radio-protecteur;
- 0,5 ml de NADP environ 0,7 mM.

La vitesse de réduction est mesurée, à la température du laboratoire, entre la 3^e et la 10^e min environ, période durant laquelle l'extinction croît de manière linéaire.

Oxydation du NADPH. Cette oxydation est également mesurée, à la température du laboratoire, au spectrophotomètre de Beckman, en suivant cette fois la disparition de la bande d'absorption dont le maximum est situé à 340 mμ. Les cuvettes contiennent:

- 0,2 ml de la suspension de microsomes diluée 10 fois dans une solution 0,1 M de phosphate potassique de pH 7,4;
- 2,7 ml de tampon Tris 0,05 M de pH 7,4;
- 0,5 ml d'eau ou de radio-protecteur;
- 0,1 ml de NADPH 2,5 mM.

Réactifs utilisés

L'hexobarbital est l'Evipan sodique Bayer (Leverkusen, Allemagne). Le phosphate d'histamine, le chlorhydrate de créatinine et le sulfate mixte de 5-hydroxytryptamine et de créatinine (sérotonine) proviennent de Hoffman-La Roche (Bâle, Suisse). Le dichlorhydrate de cystamine provient des Laboratoires Labaz (Bruxelles, Belgique).

* Les solvants sont préalablement lavés une fois par NaOH N, une fois par HCl N, et deux fois par l'eau.

TABLEAU 1. INHIBITION, PAR DIVERS RADIO-PROTECTEURS, DE L'UTILISATION DE L'HEXOBARBITAL PAR LES MICROSOMES DU FOIE DU RAT, EN PRÉSENCE DE LA FRACTION 'SOLUBLE' DU CYTOPLASME.

(Les résultats sont exprimés en pour cent. A titre de comparaison, le SKF 525A 0,2 mM inhibe à 83 pour cent; à la concentration de 0,6 mM, il inhibe à 98 pour cent).

Addition	Activité du témoin*	Concentration de l'inhibiteur (mM)						No.
		0,75	1,50	2,25	3,00	6,00	7,50	
Cystamine	7,4 7,4 3,8	—	50 53 57	—	55 57 —	—	—	5/7 23/7 26/7
Cystéamine								
(a) CSSC acide, réduite, puis neutralisée	3,1	—	—	—	10	22	—	18/5
(b) la même, vieillie avant neutralisation	5,1	—	—	—	25	42	—	28/7
(c) CSH commerciale	3,9	—	32	—	48	—	—	28/3
5-Hydroxytryptamine	4,7 6,4 3,4	— 45 —	— 55 —	— — —	72 — 44†	75 — —	— — —	16/7 20/7 30/7
Histamine	2,2 2,6 3,0 4,2	23 20 — —	— — — 28	31 22 — —	— — 27 29	— — — —	31 33 13 14	9/4 13/4 22/5 25/7

* Exprimée en μ moles d'hexobarbital utilisées par gramme de foie et par demi-heure, à 37°.

† Au cours de cet essai, on a également recherché l'influence d'une concentration équivalente de créatinine: 5 pour cent d'inhibition. La 5-hydroxytryptamine utilisée est en effet le sulfate mixte de 5-hydroxytryptamine et de créatinine.

La cystéamine est préparée par réduction électrolytique de la cystamine en milieu acide et neutralisée avant emploi (Lelièvre, méthode inédite). Occasionnellement, on a utilisé une cystéamine commerciale, le chlorhydrate de mercaptoéthylamine de California Foundation for Biochemical Research. Toutes les solutions ont été amenées à pH 7,4 avant emploi, à l'aide d'hydroxyde potassique.

Le NADP est le triphosphopyridine nucléotide (TPN) de Sigma Chemical Company (Saint-Louis, Mo., Etats-Unis d'Amérique), lot 30B-623-13. Le NADPH est préparée par réduction du NADP à l'aide de dithionite sodique selon la technique décrite par Kaplan *et coll.*¹⁶

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Utilisation de l'hexobarbital

Dans les conditions expérimentales définies plus haut, l'homogénat de foie utilise des quantités assez variables d'hexobarbital: de 20 à 70 pour cent, soit 2,2 à 7,4 μ moles/g de foie et par demi-heure (voir Tableau 1). Nous n'avons pas recherché la cause de cette variation. Il est possible qu'elle soit liée à la teneur en glucogène du foie des rats,¹⁷ et plus probablement à leur teneur en hexose-phosphates. Au cours d'un essai, nous n'avons pas observé de stimulation par le glucose-6-phosphate; l'activité de la préparation était toutefois assez élevée (5,3 μ moles/g/30 min). Des observations plus récentes de l'un de nous (C.L.) indiquent que l'utilisation de l'antipyrine par ces préparations peut être stimulée par le glucose-6-phosphate. Au cours du jeûne, la teneur en glucose-6-phosphate du foie diminue,¹⁸ de même que sa capacité de 'N-déméthyl' la mépéridine.¹³

On observe une inhibition du métabolisme de l'hexobarbital de l'ordre de 50 pour cent en présence de cystamine 1,5 mM. Une concentration 'équivalente' de cystéamine (soit 3 mM) inhibe environ 5 fois moins (10 pour cent) si la solution est fraîche, inhibe plus profondément si elle est plus ancienne et sans doute partiellement convertie en cystamine. La concentration de 5-hydroxytryptamine qui inhibe à 50 pour cent est située aux environs de 1 mM. L'inhibition produite par l'histamine 2 à 3 mM n'excède pas 30 à 35 pour cent et des concentrations plus élevées interfèrent moins encore.

Réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

L'utilisation de l'hexobarbital par les microsomes requiert la présence d'oxygène et de NADPH.³ Dans le système enzymatique que nous avons utilisé, ce dernier est

TABLEAU 2. INFLUENCE DE DIVERS RADIO-PROTECTEURS SUR LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DÉSHYDROGENASE DE LA FRACTION 'SOLUBLE' DU FOIE DU RAT.
(Les résultats sont exprimés en $\Delta E_{340\text{ m}\mu}/\text{min}$).

Addition	Concentration du radio-protecteur				No.
	néant	1,4 mM	2,9 mM	5,7 mM	
Cystamine	0,034	0,037	0,037	—	18/6
Cystéamine	0,045	—	0,049	0,050	5/6
5-Hydroxytryptamine	0,039	—	0,041	0,039	6/6
Histamine	0,033	—	0,034	0,033	7/6

produit à partir du NADP par les oxydo-réductases de la fraction 'soluble' du cytoplasme, plus particulièrement sans doute par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Aussi nous avons recherché si les radio-protecteurs utilisés influencent la réduction du NADP en NADPH par le glucose-6-phosphate en présence de la glucose-6-phosphate déshydrogénase présente dans la fraction 'soluble' de nos homogénats. Les résultats du Tableau 2 indiquent que les radio-protecteurs testés n'inhibent pas cette réaction.

Oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide réduit

Les microsomes oxydent le NADPH en présence d'oxygène avec formation d'eau oxygénée. Cette activité NADPH-oxydasique ne représente pas à proprement parler le second volet du mécanisme que nous avons voulu analyser puisque cette oxydation s'observe déjà en l'absence de tout substrat extérieur médicamenteux.⁶ Il est probable toutefois qu'elle constitue une propriété du système enzymatique qui métabolise les barbiturates pour les raisons suivantes :

(1) Il existe une corrélation très nette entre l'activité NADPH-oxydasique des sous-fractions microsomiales et leur capacité de catalyser l'utilisation de diverses substances médicamenteuses; la fraction *smooth* est 5 fois plus riche en NADPH-oxydase que la fraction *rough* et 4 fois plus active à métaboliser l'hexobarbital.⁵

(2) L'injection à l'animal de diverses substances peut, en quelques jours, accroître leur capacité de métaboliser les barbiturates. C'est ainsi que l'injection de chlorcyclizine augmente le métabolisme de l'hexobarbital; elle augmente aussi l'activité NADPH-oxydasique des microsomes.¹⁹

Il nous a paru intéressant, dans ces conditions, d'étudier l'influence des radio-protecteurs que nous avons utilisés sur l'activité NADPH-oxydasique des microsomes du foie du Rat. La Fig. 1 illustre les résultats de ces expériences.

On notera tout d'abord que, comme Gillette, Brodie et La Du,⁶ nous n'observons pas d'inhibition de cette réaction par le SKF 525A au cours des 5 à 6 premières minutes. Une inhibition nette s'installe toutefois au cours des 10 min suivantes; elle est de l'ordre de 40 pour cent pour une concentration de 0.2 mM, concentration qui inhibe l'utilisation de l'hexobarbital à raison de 83 pour cent au cours de mesures effectuées en 30 min à 37°.

La cystamine inhibe l'oxydation du NADPH. L'inhibition est de 40 pour cent pour une concentration de 1,43 mM, concentration qui inhibe l'utilisation de l'hexobarbital à raison de 50 pour cent environ.

La cystéamine n'inhibe pas la réaction au cours des 10 à 15 premières minutes. Au cours des 15 min suivantes, l'inhibition s'installe et atteint 40 pour cent pour une concentration de 2,46 mM, c'est-à-dire qu'elle devient égale à l'inhibition produite par la concentration de cystamine (1,43 mM) qui lui est équivalente. Il est probable que la cystéamine, auto-oxydable, a été transformée en cystamine à ce moment.

La 5-hydroxytryptamine inhibe l'oxydation du NADPH. L'inhibition est de 20 pour cent environ pour 1,43 mM de 5-hydroxytryptamine alors que cette concentration inhibe l'utilisation de l'hexobarbital à raison de 50 pour cent environ. L'accord n'est donc pas parfait pour ce radio-protecteur. Nous n'avons pas recherché l'influence éventuelle de la créatinine.

L'histamine accélère la réaction au cours des 10 à 15 premières minutes et l'inhibe au cours des 10–15 min suivantes. Sans doute ceci explique-t-il que l'histamine n'inhibe guère l'utilisation de l'hexobarbital et que l'inhibition n'est pas une fonction simple de la concentration en histamine.

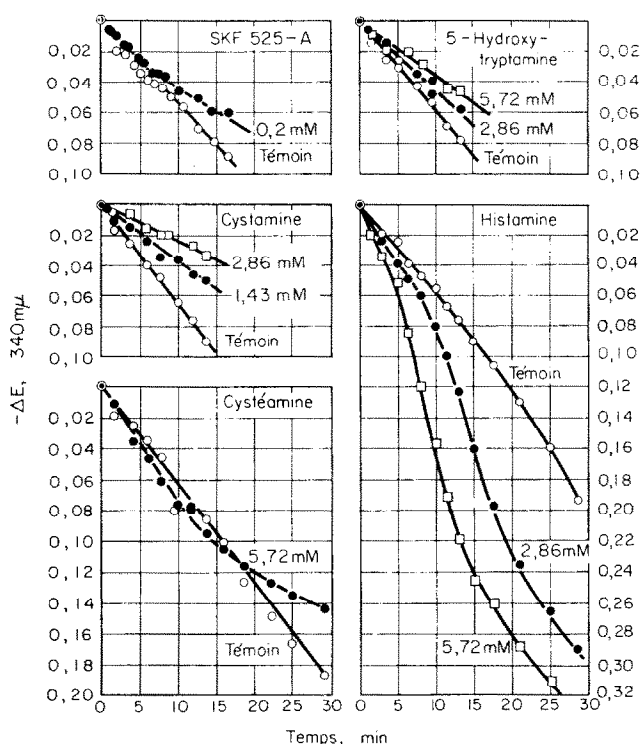


FIG. 1. Oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH, ou TPNH) par la fraction microsomiale du foie du Rat, en présence de divers radio-protecteurs. A titre de comparaison, effet du SKF 525-A.

DISCUSSION

L'inhibition, par la cystamine et la 5-hydroxytryptamine, du système enzymatique des microsomes qui oxyde l'hexobarbital—que nos expériences mettent en évidence—n'est pas nécessairement liée au caractère radio-protecteur de ces composés, même si elle est observée à des doses qui ne s'écartent pas exagérément de celles utilisées en radio-protection chez le Rat et la Souris. En admettant une distribution égale des radio-protecteurs dans les cellules de ces animaux, on arriverait en effet à :

- environ 3 mM pour la cystéamine (150 mg/kg),
- environ 1,5 mM pour la cystamine (150 mg/kg),
- environ 0,5 mM pour la 5-hydroxytryptamine (50 mg/kg),
- de 4 à 8 mM pour l'histamine (250 à 500 mg/kg).

Il n'est pas non plus permis de conclure de ces expériences réalisées *in vitro* que ces composés exerceront le même effet s'ils sont injectés à l'animal; l'expérience doit être répétée *in vivo*. On remarquera toutefois que la déméthylation de la diméthyl-nitrosamine par les microsomes du foie du Rat est inhibée par la cystéine et la

cystéamine, que ces substances soient injectées à l'animal pendant deux jours ou ajoutées directement à la suspension de microsomes.¹¹ Nos expériences suggèrent que les composés disulfures correspondants (cystine et cystamine) pourraient être les inhibiteurs réels de cette déméthylation.

Comme la cystéamine injectée à l'animal s'oxyde rapidement, il n'est pas exclu de penser que l'inhibition du métabolisme des barbiturates par les microsomes du foie pourrait expliquer, en tout ou en partie, la plus longue durée de l'anesthésie aux barbiturates observée chez le Rat et le Cobaye par Bacq et Della Bella. Ces auteurs ont d'ailleurs observé que les effets de la cystéamine sont tout à fait irréguliers si la cystéamine est injectée immédiatement avant ou immédiatement après le pentothal.

Remerciements—Nous tenons à remercier le Dr. Binon de la Division pharmaceutique Labaz de la SBA-PCM qui nous a fourni la cystamine, le Dr. Ooms du Département médical de la s.a. R.I.T. qui nous a fourni le SKF 525-A de la firme Smith, Kline & French, et le Dr. Lelièvre du Laboratoire d'Anatomo-pathologie de l'Université de Liège qui nous a préparé les échantillons de cystéam par réduction électrolytique de la cystamine.

BIBLIOGRAPHIE

1. B. B. BRODIE, J. R. GILLETTE et B. LA DU, *Ann. Rev. Biochem.* **27**, 427-454 (1958).
2. B. B. BRODIE, Dans *Ciba Foundation Symposium on Enzyme and Drug Action* (publié par J. L. Mongar & A. V. S. de Reuck), pp. 317-340. J. & A. Churchill, London (1962).
3. B. B. BRODIE, *J. Pharm. Pharmacol.* **8**, 1-17 (1956).
4. C. MITOMA, H. S. POSNER, H. C. REITZ et S. UDENFRIEND, *Arch. Biochem. Biophys.* **61**, 431-441 (1956).
5. J. R. FOUTS, *Biochem. biophys. Res. Comm.* **6**, 373-378 (1961).
6. J. R. GILLETTE, B. B. BRODIE et R. LA DU, *J. Pharm. exp. Therap.* **119**, 532-540 (1957).
7. J. R. COOPER et B. B. BRODIE, *J. Pharm. exp. Therap.* **114**, 409-417 (1955).
8. J. R. COOPER et B. B. BRODIE, *J. Pharm. exp. Therap.* **120**, 75-83 (1957).
9. A. THOMOU, C. LIÉBECQ et Z. M. BACQ, *Arch. int. Pharmacodyn.* **142**, 271-273 (1963).
10. C. LIÉBECQ, A. THOMOU et Z. M. BACQ, *Arch. int. Physiol. Bioch.* **71**, 313 (1963).
11. I. J. MIZRAHI et P. EMMELOT, *Biochem. Pharm.* **12**, 55-63 (1963).
12. G. P. QUINN, J. AXELROD et B. B. BRODIE, *Biochem. Pharm.* **1**, 152-159 (1958).
13. J. S. ROTH et J. BUKOVSKY, *J. Pharm. exp. Therap.* **131**, 275-281 (1961).
14. B. B. BRODIE, J. J. BURNS, L. C. MARK, P. A. LIEF, E. BERNSTEIN et E. M. PAPPER, *J. Pharm. exp. Therap.* **109**, 26-34 (1953).
15. J. AXELROD, J. REICHENTHAL et B. B. BRODIE, *J. Pharm. exp. Therap.* **112**, 49-54 (1954).
16. N. O. KAPLAN, S. P. COLOWICK et E. F. NEUFELD, *J. biol. Chem.* **195**, 107-119 (1952).
17. R. L. DIXON, L. G. HART et J. R. FOUTS, *J. Pharm. exp. Therap.* **133**, 7-11 (1961).
18. D. F. STEINER et R. H. WILLIAMS, *J. biol. Chem.* **234**, 1342-1346 (1959).
19. A. H. CONNEY, I. A. MICHAELSON et J. J. BURNS, *J. Pharm. exp. Therap.* **132**, 202-206 (1961).