

## RECHERCHES DANS LA SERIE DES BENZOFURANNES—XXX

### ACTION DE L'AMIODARONE SUR LES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES DE MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT

R. MICHEL et G. DELTOUR

Chaire d'Endocrinologies Faculté de Pharmacie, Paris  
and

Services de Recherches Labaz,  
Labaz, 3, avenue de Béjar, Bruxelles 12

(Received 21 December 1967; accepted 10 May 1968)

**Abstract**—Amiodarone (2-Butyl-3-(4-(2-diethylaminoethoxy)-3,5-diiodobenzoyl) benzofuran, hydrochloride) does not induce any change in the oxidative phosphorylating activity of isolated rat liver mitochondria. It thus differs from thyroxine-like substances and also from classical decoupling agents such as 2,4-dinitrophenol. This lack of effect is attributed to the blocking of the phenolic function.

UNE ETUDE systématique entreprise sur l'action respiratoire de nombreux dérivés phénoliques iodés a montré que ces produits agissaient différemment des découplants classiques.<sup>1, 2</sup> Si, comme ces derniers, ils empêchent totalement la biosynthèse de l'ATP avec des mitochondries fortement couplées, par contre, au lieu d'activer la respiration, ils l'inhibent toujours, mais en partie seulement.

La structure orthohalogénophénolique présente dans les produits thyroïdiens se retrouve dans un certain nombre de dérivés parahydroxybenzoyl-benzofuranniques dont les effets biologiques et pharmacodynamiques ont déjà fait l'objet de divers travaux.<sup>3-6</sup>

Parmi ces produits, l'amiodarone (butyl-2(diéthylaminoéthoxy-4 diiodo-3,5 benzoyl)-3 benzofuranne, chlorhydrate),\* composé dont la fonction phénol est substituée par un radical diéthylaminoéthyle, augmente le débit coronaire du coeur *in toto* et *in vitro*<sup>7, 8</sup> sans posséder d'effet calorigénique, ni provoquer d'augmentation de la consommation d'oxygène de l'organisme entier ou du myocarde<sup>5, 6</sup> quelle que soit la dose utilisée.

Il nous a paru intéressant de préciser le comportement de l'amiodarone sur les mécanismes des oxydations phosphorylantes au niveau mitochondrial dans les divers états thermodynamiques<sup>9</sup> et de le comparer à celui du butyl-2(hydroxy-4 diiodo-3,5 benzoyl)-3 benzofuranne† qui est son homologue à fonction phénol libre.

#### CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les mitochondries hépatiques de rat (MHR) sont préparées et conservées dans le saccharose 0,25 M à 0° C, la suspension renfermant 30 mg environ de protéines par

\* L. 3428, Labaz.

† L. 3373 Labaz.

ml.<sup>10, 11</sup> La consommation d'O<sub>2</sub> est mesurée polarographiquement, soit au moyen d'une électrode vibrante de platine recouverte d'une membrane de polythène,<sup>12</sup> soit simultanément avec le pH du milieu, grâce à une électrode de Clark reliée à un dispositif oxygraphique et à une électrode de verre adaptée à un pH mètre sensible avec expansion d'échelle.<sup>13</sup> Les électrodes sont fixées à une cellule de 6 ml surmontée d'un capillaire, afin de réduire la redissolution du CO<sub>2</sub> atmosphérique, la cuve étant entourée d'une enceinte thermostatée à + 25° C. L'enregistrement des phénomènes est réalisé grâce à un dispositif GME.\*

Les essais entrepris avec l'électrode vibrante ont été conduits dans un milieu dont la composition est la suivante: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  $13 \times 10^{-3}$  M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $3 \times 10^{-3}$  M, MgCl<sub>2</sub>  $6 \times 10^{-3}$  M, KCl  $58 \times 10^{-3}$  M, NaCl  $26 \times 10^{-3}$  M, NaF  $12 \times 10^{-3}$  M, succinate de Na  $6,7 \times 10^{-3}$  M (Suc), roténone 0,27 µg/ml et en présence d'ADP comme accepteur de phosphate à des concentrations comprises entre 3 et  $5,5 \times 10^{-4}$  M (volume total 1,5 ml). La solution faiblement tamponnée utilisée au cours des expériences comportant la mesure simultanée de la consommation d'O<sub>2</sub> et du pH a la composition suivante: mélange K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $5 \times 10^{-3}$  M pH 7,20, mannitol  $350 \times 10^{-3}$  M, KCl  $10^{-3}$  M, MgCl<sub>2</sub>  $10^{-3}$  M, roténone 0,7 µg/ml, ADP  $0,25 \times 10^{-3}$  M (s'il y a lieu), saccharose  $25 \times 10^{-3}$  M provenant de la suspension mitochondriale, pH final 7,20 (Volume total 6,0 ml).

L'effet de l'amiodarone et de son homologue phénolique a été comparé à celui du dinitro-2,4 phénol ou du dibromo-2,4 phénol choisis pour leur activité découplante classique. Les divers produits sont dissous dans l'éthanol aqueux à 50 %. Les solutions d'amiodarone, de dinitro-2,4 phénol et de dibromo-2,4 phénol sont ajoutées sous un volume inférieur à 50 µl au milieu réactionnel. Les concentrations finales des différents composés étudiés sont comprises entre  $10^{-5}$  et  $1,4 \times 10^{-4}$  M.

## RESULTATS et CONCLUSION

Les résultats obtenus sont traduits par des courbes qui représentent, en ordonnées, les variations de la consommation d'O<sub>2</sub> en pourcent de la saturation et celles du pH entre 7,10 et 7,30 en fonction du temps (minutes) en abscisses. Les enregistrements de la respiration mitochondriale obtenus avec l'électrode vibrante sont illustrés par la Fig. 1, ceux avec l'électrode de Clark par les Fig. 2 (a) et 3 (a). Les additions des différents réactifs aux divers temps sont indiquées sur les graphiques. Les variations du pH, en fonction du temps, des suspensions mitochondriales font l'objet des Fig. 2(b) et 3(b).

La Fig. 1 traduit l'effet respiratoire de l'amiodarone ( $1,5 \times 10^{-4}$  M) comparé à celui du dérivé à phénol libre (L. 3373) ( $2 \times 10^{-5}$  M), du solvant éthanolique (S) et du dibromo-2,4 phénol ( $1,5 \times 10^{-4}$  M), les solutions étant ajoutées dans l'état respiratoire activé ou état 3, c'est-à-dire en présence d'ADP comme accepteur de phosphate.

Sur la Fig. 2(a), l'action de l'amiodarone, à deux concentrations, sur la consommation d'O<sub>2</sub> est étudiée dans l'état contrôlé avec le succinate comme substrat (état 4); l'addition d'ADP est effectuée après celle de l'amiodarone. Les variations du pH enregistrées simultanément sont représentées par la Fig. 2(b).

\* Gilson Medical Electronics.

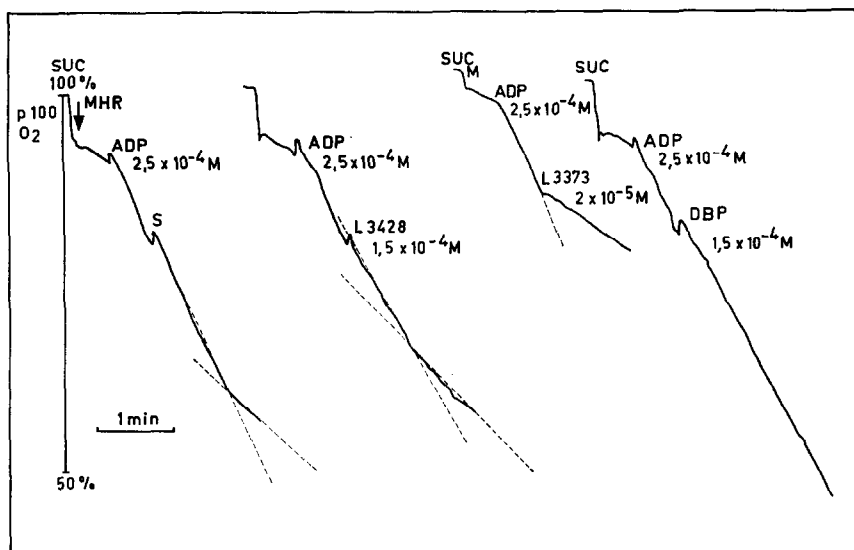


FIG. 1. Compariaison entre les tracés oxygraphiques (électrode de platine vibrante) de l'amiodarone (L. 3428)  $1,5 \times 10^{-4} M$ , de son homologue à phénol libre (L. 3373)  $2 \times 10^{-5} M$ , du 2,4-dibromophénol (DBP)  $1,5 \times 10^{-5} M$  et du solvant éthanolique (S). Les divers produits sont ajoutés après l'ADP et le substrat succinate (SUC). MHR = mitochondries hépatiques de rat.

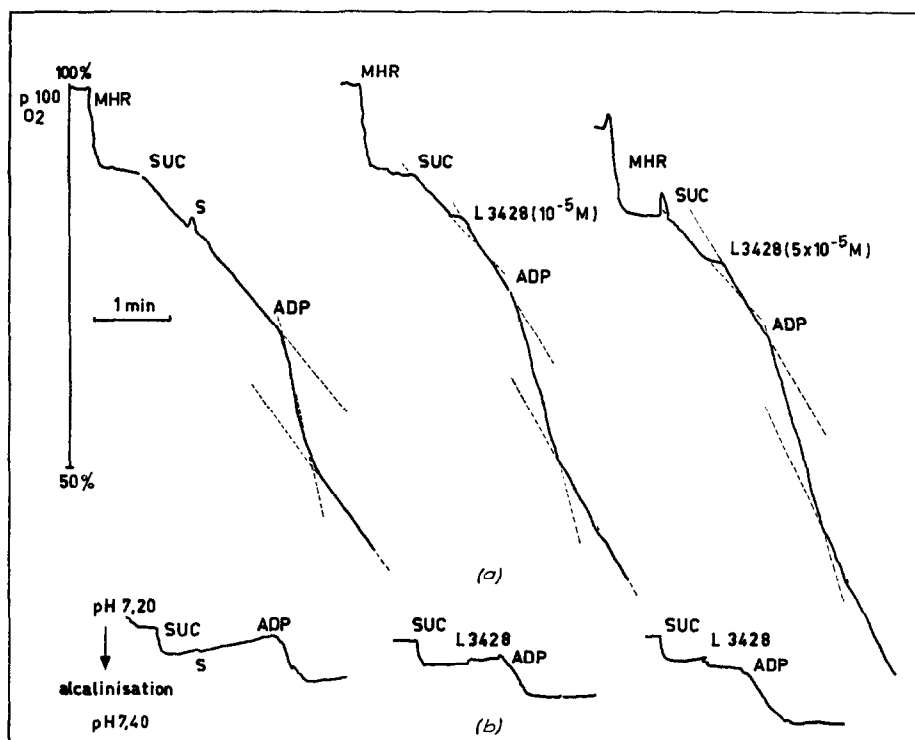


FIG. 2. Action de l'amiodarone (L. 3428) aux concentrations  $10^{-5} M$  et  $5 \times 10^{-5} M$  sur la respiration mesurée à l'électrode de Clark (partie A) et le pH du milieu (partie B) de la suspension de mitochondries hépatiques de rat (MHR); l'ADP est ajouté après le substrat succinate (SUC/et L. 3428 ou le solvant (S).

La Fig. 3 illustre les effets sur la respiration et sur le pH du milieu de l'amiodarone et du dinitro-2,4 phénol employés à même concentration ( $4,5 \times 10^{-5}$  M), les produits à tester étant ajoutés après l'ADP.

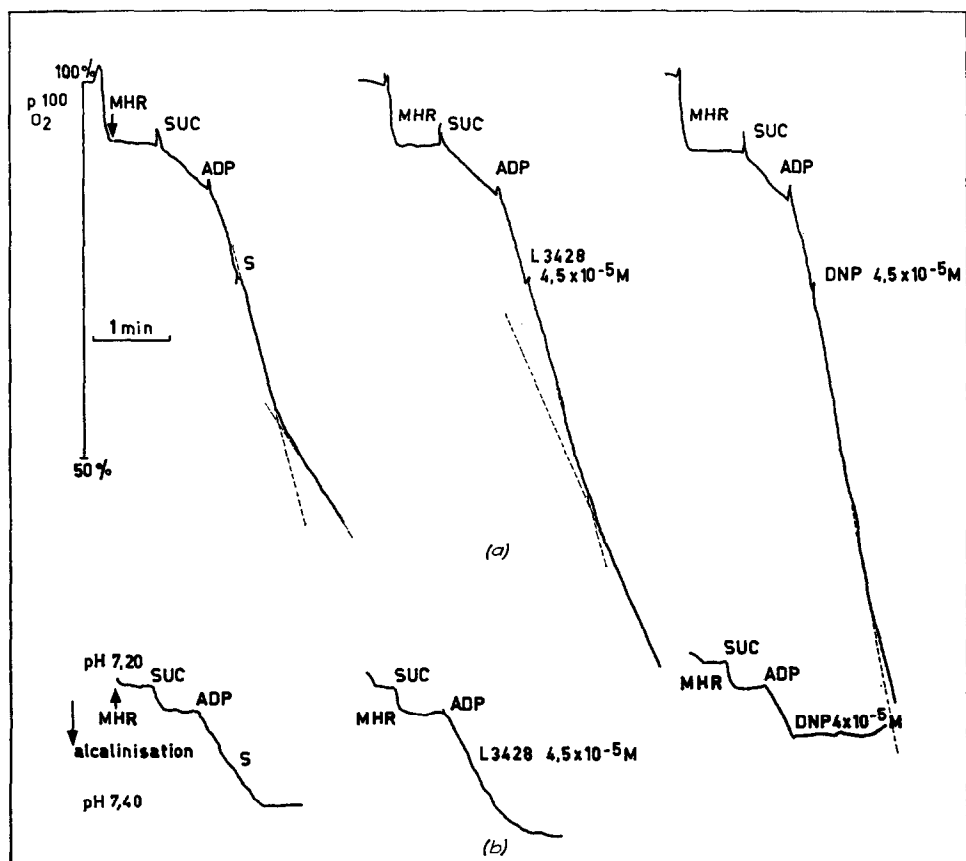


FIG. 3. Action comparée de l'amiodarone (L. 3428)  $4,5 \times 10^{-5}$  M et du 2,4-dinitrophénol (DNP)  $4,5 \times 10^{-5}$  M sur la respiration mesurée par l'électrode de Clark (partie A) et le pH du milieu (partie B) de la suspension de mitochondries hépatiques de rat (MHR), l'ADP étant ajouté après le substrat succinate (SUC) mais avant L. 3428, DNP ou le solvant (S).

Il ressort de l'examen de la Fig. 1 que l'amiodarone ne modifie pas sensiblement la consommation d'O<sub>2</sub> des mitochondries fortement couplées et n'empêche pas la phosphorylation de l'ADP. Le tracé oxygraphique obtenu avec le produit analysé est pratiquement le même que celui relevé avec le solvant éthanolique; on observe dans les deux cas, après épuisement de l'accepteur de phosphate, le retour à une respiration voisine de celle de l'état contrôlé. Dans les mêmes conditions et à  $2 \times 10^{-5}$  M le L. 3373 inhibe à la fois la consommation d'oxygène et la prise de phosphate. Le dibromo-2,4 phénol se comporte en découplant type; il ne modifie pas sensiblement la respiration activée par l'ADP, mais s'oppose à la formation d'ATP.

Si l'amiodarone—à des concentrations allant de 1 à  $5 \times 10^{-5}$  M—augmente faiblement la respiration dans l'état 4, il n'apporte cependant aucun changement

significatif du contrôle respiratoire et la phosphorylation de l'ADP s'opère normalement (Fig. 2(a)). Le pH du milieu évolue de la même façon en présence de l'amiodarone et du solvant éthanolique (Fig. 2(b)). Il n'en est pas de même avec l'homologue phénolique de l'amiodarone qui active considérablement la respiration dans l'état 4, (même à la concentration de  $1,25 \times 10^{-6}$  M) alors qu'il l'inhibe dans l'état 3.

Le dinitro-2,4 phénol, à une concentration de  $1,5 \times 10^{-5}$  M, empêche totalement la phosphorylation de l'ADP, c'est ce qui apparaît d'une part sur la courbe respiratoire qui ne présente pas de point d'inflexion (Fig. 3(a)) et d'autre part, sur l'enregistrement des variations du pH de la suspension mitochondriale, car l'alcalinisation due à la captation du proton par l'ADP au cours de la phosphorylation de l'ATP est supprimée (Fig. 3(b)). Le comportement de l'amiodarone est par contre semblable à celui du solvant qui a permis sa dissolution (Fig. 3(a) et (b)).

L'amiodarone ne possède donc pas sur les mitochondries isolées du foie de rat les effets découplants que l'on constate avec les découplants.<sup>13, 14</sup> Il se différencie également de son homologue phénolique, dont le comportement est semblable à celui des autres dérivés parahydroxybenzoyl-benzofuranniques dihalogénés possédant une fonction phénol libre, telle la benziodarone (éthyl-2(hydroxy-4 diiodo-3,5 benzoyl)-3 benzo-furanne<sup>15, 16</sup> et qui se rapproche d'ailleurs des produits thyroïdiens.

Le fait que l'amiodarone n'affecte pas les oxydations phosphorylantes aux concentrations utilisées mérite d'être rapproché de ses autres propriétés biologiques: ce composé n'augmente pas la consommation d'oxygène<sup>5, 17</sup> et ne réduit pas les réserves énergétiques (glycogène, ATP, créatine-phosphate)<sup>6</sup> du myocarde.

Il apparaît donc que l'inactivité de l'amiodarone sur les oxydations phosphorylantes, et ce contrairement à de nombreux dérivés halogénés homologues phénoliques, (et en particulier à son homologue à fonction phénol non substituée), doit être attribuée à l'absence de phénol libre, comme c'est aussi le cas dans la série des thyronines halogénées.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. J. ROCHE, R. MICHEL et A. LEBLANC, *C.r. Acad. Sc.* **260**, 1497 (1965).
2. J. ROCHE, R. MICHEL et A. LEBLANC, *C.r. Soc. Biol.* **159**, 1338 (1965).
3. G. DELTOUR, F. BINON, F. HENAU et R. CHARLIER, *Arch. int. Pharmacodyn. Thé.*, **131**, 84 (1961).
4. R. CHARLIER, *Acta Cardiologica, Suppl.* **7** (1959).
5. J. BROEKHUYSEN, G. DELTOUR, M. GHISLAIN et M. DELBRUYERE, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2077 (1967).
6. J. BROEKHUYSEN, R. LARUEL, A. DE BRUCQ-LARUEL, et G. DELTOUR, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2069 (1967).
7. G. DELTOUR, F. BINON, R. TONDEUR, C. GOLDENBERG, F. HENAU, R. SION, E. DERAY et R. CHARLIER, *Arch. int. Pharmacodyn. Thé.*, **139**, 247 (1962).
8. R. CHARLIER, G. DELTOUR et A. BAUDINE, *Arch. int. Physiol.*, **72**, 508 (1967).
9. B. CHANCE et G. R. WILLIAMS, *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
10. W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* **176**, 239 (1948).
11. J. ROCHE, J. E. RALL, R. MICHEL, O. MICHEL et S. VARRONE, *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 188 (1962).
12. B. CHANCE, *J. biol. Chem.* **240**, 2729 (1965).
13. J. B. CHAPPELL et A. R. CROFTS, *Biochem. J.* **95**, 378 (1965).
14. A. M. SNOSWELL, *Biochemistry* **5**, 1660 (1966).
15. P. HEISTRACHER, O. KRAUPP et G. SPRING, *Arzneimittel-Forsch.* **14**, 1098 (1964).
16. H. HIRCHE et J. SCHOLTHOLT, *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 1388 (1965).
17. R. CHARLIER, A. BAUDINE, F. CHAILLET et G. DELTOUR, *Acta Cardiologica*, **22**, 323 (1967).