



**HAL**  
open science

## Contribution à l'étude de l'action de l'alpha-phénylindole et de son métabolisme

Georges Morel

► **To cite this version:**

Georges Morel. Contribution à l'étude de l'action de l'alpha-phénylindole et de son métabolisme. Santé. Université Paul Verlaine - Metz, 1980. Français. NNT: 1980METZ001S . tel-01775636

**HAL Id: tel-01775636**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775636v1>**

Submitted on 24 Apr 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**SUJET**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE SCIENCES ET TECHNIQUES - METZ.	
No Inv.	1980002S
Cote	S/M <sub>3</sub> 80/L
Loc.	Magasin
Cat.	

**CONTRIBUTION A L' ETUDE DE L'ACTION  
DE L' $\alpha$ -PHENYLINDOLE ET DE SON METABOLISME**



A TOUS CEUX QUI ONT  
PARTICIPE A CE TRAVAIL

*Ce travail de Recherche a été effectué dans les Laboratoires de  
L'INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE (I.N.R.S.)  
54500 VANDOEUVRE*

*Les études sur le foie isolé et perfusé ont été réalisées au  
Laboratoire de Pharmacodynamie de l'U.E.R.  
SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
Université de NANCY I  
Professeur S. BESSON*

**PLAN**

## PLAN

### INTRODUCTION

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
|                                | 1 |
| - Propriétés physico-chimiques | 3 |
| - Propriétés toxicologiques.   | 4 |

### PREMIERE PARTIE

#### PARAMETRES BIOLOGIQUES EN RELATION AVEC L'EXPOSITION A L' $\alpha$ PHENYLINDOLE 5

#### I - METHODOLOGIE

- |  |    |
|--|----|
| I.1 Dosage et identification des noyaux indoles dans l'urine   | 5  |
| I.2 Dosage de l'acide hippurique urinaire                      | 8  |
| I.3 Dosage et identification des 5-hydroxyindoles dans l'urine | 12 |
| I.4 Dosage de la sérotonine urinaire                           | 17 |
| I.5 Dosages sanguins   | 17 |
| I.6 Expérimentations animales                                  | 18 |
| a) Animaux   |    |
| b) Expérimentations chroniques                                 | 18 |
| c) Expérimentation aiguë.                                      | 21 |

## II - RESULTATS

II.1	Expérimentation sur le Lapin - Intoxication chronique (inhalation)	24
II.2	Expérimentation sur le Rat	30
A)	Intoxication aiguë	31
a)	Bilans sanguins	31
b)	Elimination urinaire	31
c)	Prétraitement au tryptophane.	48
B)	Intoxication chronique	56
-	Acide hippurique	59
-	5-hydroxyindoles.	59
a)	Chez les témoins	59
b)	Après 3 mois de traitement	60
c)	Après 6 mois de traitement.	67

## III - DISCUSSIONS et CONCLUSIONS

69

## DEUXIEME PARTIE

### ACTION DE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE SUR LE METABOLISME DU TRYPTOPHANE

#### I - ACTION DE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE SUR LE METABOLISME DU TRYPTOPHANE

74

##### I.1 Métabolisme du tryptophane

76

1°) Voie de la cynurénine

76

2°) Voie des 5-hydroxyindoles

82



I.2	Technique de séparation des métabolites du tryptophane	84
I.3	Expérimentation animale	87
I.4	Résultats et discussions	88
	a) Etude du métabolisme du tryptophane	88
	b) Etude de la liaison de l'αphénylindole à l'albumine	95
I.5	Conclusions.	103
 <u>II - ETUDE DE L'INHIBITION DE LA MONO-AMINE-OXYDASE</u>		 106
II.1	Etude de l'enzyme	106
II.2	Méthode de mesure de l'activité mono-amine-oxydase	109
	a) Dosage de l'ammoniac dégagé	109
	b) Mesure de la consommation d'oxygène	110
	c) Techniques radiométriques et spectrophotométriques	110
	d) Technique de mesure de l'activité M.A.O.	113
	- Solutions	
	- Méthodologie	
II.3	Expérimentation	116
	a) Technique d'extraction d'un métabolite hépatique de l'αphénylindole	116
	b) Expérimentation animale	117
II.4	Résultats	117
	a) Etude du K.M. de la cynuramine	117
	b) Action de l'αphénylindole ( <i>in vivo</i> ) sur la M.A.O. de différents organes	119
	c) Etude de l'inhibition de la M.A.O. de foie de Rat <i>in vitro</i>	121
	- Action de l'iproniazide	
	- Action de l'αphénylindole	
	- Action d'un métabolite hépatique	
	- Action du même métabolite urinaire.	
II.5	Conclusions	123

## TROISIEME PARTIE

### ETUDE DU METABOLISME DE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE

<u>INTRODUCTION</u>	126
<u>I - TECHNIQUES UTILISEES</u>	127
I.1 Cathétérisme permanent chez le Rat vigile	
I.2 Mesure de l'activité des échantillons biologiques	127
I.3 Technique d'autoradiographie sur le Rat	128
I.4 Techniques de séparation des métabolites de l' $\alpha$ phénylindole des milieux biologiques	
a) Recherche des métabolites libres	128
b) Recherche et séparation des métabolites conjugués	130
I.5 Technique de séparation et de purification du métabolite principal de l'urine de Rat	131
I.6 Méthodes d'analyse du métabolite principal	133
I.7 Technique de séparation de l' $\alpha$ phénylindole et de son méta- bolite principal	134
a) Séparation à partir des tissus	
b) Séparation à partir du sang	
I.8 Technique du foie perfusé de Rat.	135
<u>II - EXPERIMENTATION ANIMALE</u>	136
II.1 Cinétiques globales	136
II.2 Autoradiographie	137
II.3 Etude des métabolites urinaires	137
II.4 Cinétique sanguine de l' $\alpha$ phénylindole et de son métabolite principal	138

II.5	Cinétiques à l'aide du foie perfusé	138
II.6	Répartition de l'αphénylindole et de son métabolite principal dans différents tissus.	139
 <u>III - RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>		<b>140</b>
III.1	Cinétique totale sur le Rat instrumenté	140
III.2	Etude autoradiographique de l'αphénylindole	143
III.2.1	Voie per os	143
III.2.2	Voie I.P.	146
III.3	Mesure de l'activité dans différents tissus après l'injection d'αphénylindole <sup>14</sup> C <sub>2</sub>	
III.4	Etude des métabolites urinaires de l'αphénylindole chez le Rat	151
a)	Recherche du nombre de métabolites urinaires	
b)	Identification du métabolite urinaire principal	153
III.5	Cinétiques de l'αphénylindole et des métabolites	160
a)	Dans le sang (in vivo)	160
b)	A l'aide du foie isolé et perfusé (in vitro)	162
1°)	Mesure de l'activité totale	162
2°)	Recherche des métabolites biliaires, hépatiques et sanguins (perfusé)	166
3°)	Cinétiques de 4 métabolites biliaires	168
4°)	Conclusions	168
III.6	Répartition de l'αphénylindole et de son métabolite principal dans quelques organes	172
III.7	Comparaison du métabolisme de l'αphénylindole et de l'indole	175
III.8	Toxicité de l'oxo-3-phényl-2-indole	176
 <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>		<b>178</b>

ABREVIATIONS UTILISEES

Acide hippurique	:	Benzoylglycine
D.L. 50	:	Dose létale 50
D.M.S.O.	:	Diméthylsulfoxyde
D.P.M.	:	Désintégration par minute
E.O.P.S.	:	Exempt d'organismes pathogènes spécifiques
G.O.T.	:	Glutamate oxaloacétate transaminase
G.P.T.	:	Glutamate pyruvate transaminase
5-HIAA	:	Acide 5-hydroxyindole acétique
5-HOI	:	5-hydroxyindoles
H.P.M.C.	:	Hydroxypropylméthylcellulose à 0,5 %
I.P.	:	Intrapéritonéale
K.M.	:	Constante de MICHAELIS
L.D.H.	:	Lactate deshydrogénase
N.A.D.	:	Nicotinamide adénine dinucléotide
N.A.D.P.	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
$\alpha \varphi I$	:	$\alpha$ phénylindole ou 2-phénylindole
P.V.P.	:	Polyvinylpyrrolidone
P.M.	:	Poids moléculaire
R*	:	Coefficient de corrélation
R.F.	:	<u>Distance parcourue par la zone</u> Distance parcourue par le solvant
Sérotonine	:	5-hydroxytryptamine
Serum physiologique	:	Solution physiologique : Na Cl à 9 ‰
T.B.	:	Témoins blancs
T.V.	:	Témoins véhicules
$\sigma$	:	Ecart type
* t	:	Valeur du test de STUDENT
m	:	Moyenne

# **INTRODUCTION**

L'αphénylindole synthétisé par BISCHLER A., en 1892, est utilisé depuis 1969 en tant que stabilisant dans la fabrication de divers produits à base de polychlorure de vinyle.

D'autres produits peuvent être utilisés à la place de l'αphénylindole pour la protection des plastiques contre les rayons ultraviolets. Mais l'αphénylindole a sur eux l'avantage de donner une coloration bleutée particulièrement intéressante pour les eaux minérales.

Les études connues sur la toxicité de l'αphénylindole n'avaient porté avant ce travail que sur la toxicité par voie orale. Selon LEFAUX R., en 1972 (63), il s'agit d'une substance faiblement toxique aux doses couramment utilisées. La dose létale 50 (D.L.50) par voie orale chez le Rat a été trouvée égale à 10 g/kg (63).

La toxicité à long terme par voie orale a été étudiée par NOTHDURFT H. et col., en 1964 (73). Ces auteurs n'ont constaté aucun trouble, ni remarqué de lésion organique.

Aucune étude n'a été conduite par voie pulmonaire.

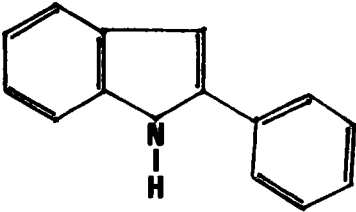
Les signes cliniques suivants observés chez des ouvriers ont été rapportés à l'exposition à l'αphénylindole :

- 1°) Dermatoses (eczéma, comédon)
- 2°) Troubles hématologiques (inversion de formule).

Compte tenu de quelques observations de laboratoire, il a paru intéressant de s'attacher à l'étude biochimique de ce composé, en l'abordant par 2 voies :

- son action ou celles de ses métabolites sur le métabolisme général
- sa métabolisation chez l'animal de laboratoire.

Ces connaissances peuvent conduire d'une part à une meilleure appréciation de sa toxicité si elle existe, d'autre part à la mise au point de dosages biologiques permettant d'évaluer l'exposition et, le cas échéant, le risque toxique.

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES	
nom	<i>α</i> phénylindole = phényl-2-indole
Formule développée	
formule brute composition en %	$C_{14} H_{11} N$ C = 87,01 %      H = 5,78 %      N = 7,24 %
structure	molécule plane
poids moléculaire	P.M. = 193,23
aspect	poudre fine de couleur crème
point de fusion	180 - 185 °C
point de sublimation	186 °C
solubilité	soluble dans les solvants organiques (Ethanol, Ether, n Butanol, ...). Très peu soluble dans l'eau et les mélanges (eau, éthanol).
produit de décomposition dans l'air à 350 °C	HCl = 47,2 %      pas de toluène CO = 1 %      résidu = 40,2 % Benzène = 5,14 % CO <sub>2</sub> = 1,7 %



PROPRIETES TOXICOLOGIQUES (Travaux I.N.R.S.)				
animal	véhicule	voie	sexe	D.L. 50 mg/kg
RAT	Labrafil	I.P.	♀	600
	"	Per. Os.	♂	> 1000
	H.P.M.C.	I.P.	♂	≈ 2000
	"	Per. Os.	♀	> 3000
SOURIS	Labrafil	I.P.	♀	400
	"	I.P.	♂	520
	"	Per. Os.	♀	500

**I<sup>ère</sup> PARTIE**

**PARAMETRES BIOLOGIQUES EN RELATION  
AVEC L' EXPOSITION A L'  $\alpha$  - PHENYLINDOLE**

# **CHAPITRE I**

## **METHODOLOGIE**

PARAMETRES BIOLOGIQUES EN RELATION  
AVEC L'EXPOSITION A L' $\alpha$ PHENYLINDOLE

METHODOLOGIE

I.1 Dosage et identification des noyaux indoles dans l'urine

Dans une étude toxicologique à caractère biochimique une des premières étapes consiste à rechercher une méthode de dosage du toxique et des métabolites dans les milieux biologiques et notamment dans l'urine. KORN O. et WOGGON H. en 1965 (58) décrivent une technique de dosage de l' $\alpha$ phénylindole par spectrophotocolorimétrie. Celui-ci en présence d' $\alpha$ -adichlorodiphénylméthane et en milieu sulfurique développe une coloration rouge. Nous avons préféré utiliser une méthode de dosage plus générale (noyaux indoles) qui nous permettait de doser les métabolites urinaires éventuels ainsi que l' $\alpha$ phénylindole. La réaction de SALKOWSKI (1883-1885) modifiée par FILET en 1961 (81) est bien connue. Cette méthode nous a permis de réaliser le bilan de l'excrétion des composés indoliques urinaires.

- Principe

Parmi toutes les réactions spécifiques du noyau indole, celle de SALKOWSKI apparaît comme la plus utilisée. C'est la réaction du noyau indole avec le chlorure ferrique en présence d'acides minéraux.

Dans certains cas, la coloration peut être modifiée selon la nature de la chaîne latérale.

- Réactifs

Solution : Peser 1,216 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , ajouter 53 ml d'eau bidistillée, après dissolution complète verser lentement, en agitant constamment sous un courant d'eau froide, 60 ml d'acide sulfurique concentré 98 %. Compléter ensuite avec 50 ml d'eau bidistillée.

- Technique

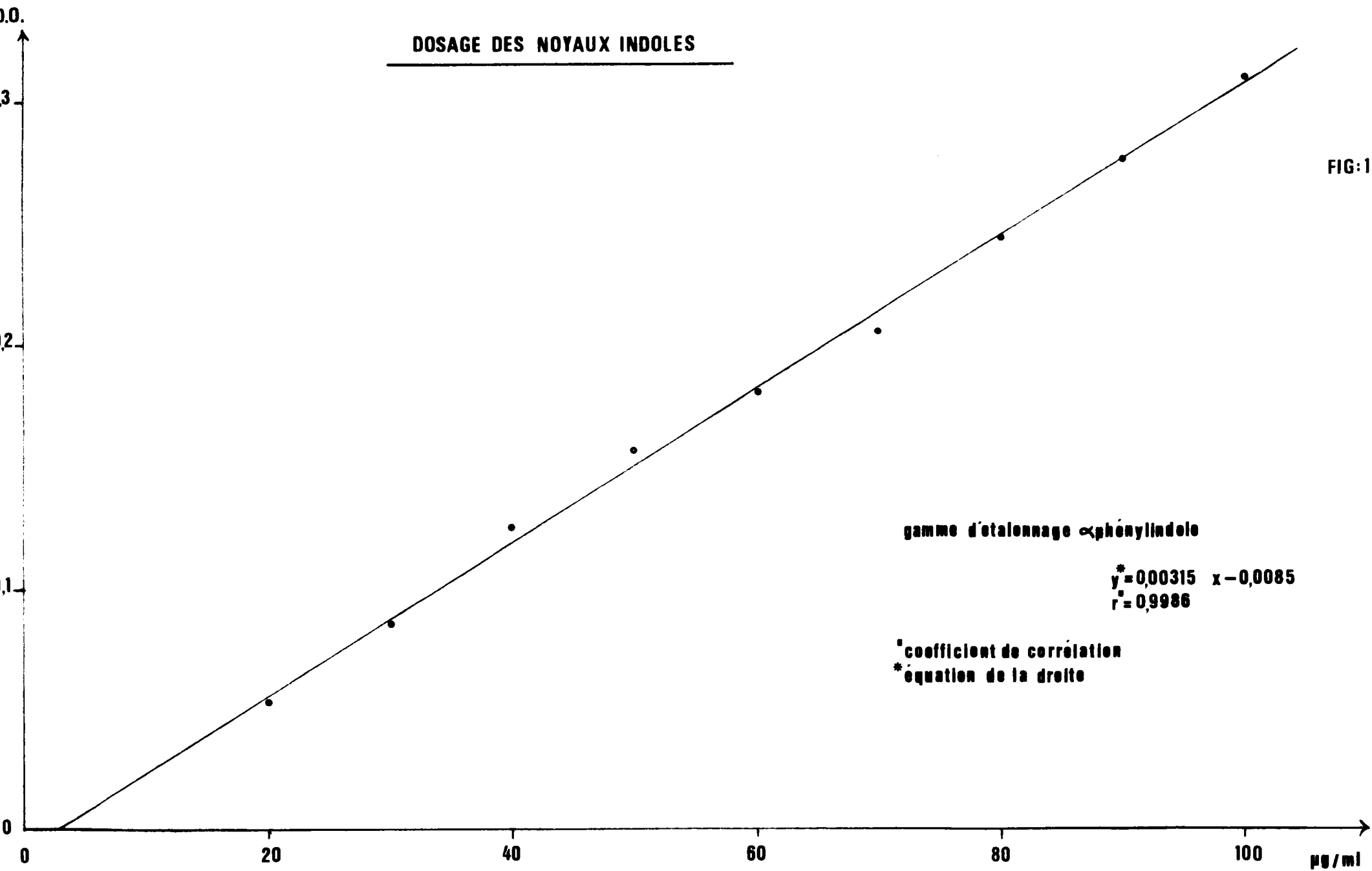
A 1 ml d'échantillon, ajouter 4 ml de réactif ci-dessus. Le mélange est chauffé 30 minutes à 40 °C. Mesurer ensuite l'absorption à 546 nm contre un blanc réactif.

La gamme d'étalonnage est effectuée avec du 2-phénylindole (fig. 1) que l'on solubilise dans de l'éthanol. L'addition du solvant n'a pas d'action sur le dosage.

- Identification des noyaux indoles par chromatographie sur couche mince

Nous avons utilisé la technique décrite par STOWE B.B. et THIMANN K.V. en 1954 (101) dans laquelle le papier Whatman n° 1 est remplacé par des plaques (cellulose) prêtes à l'emploi pour chromatographie sur couche mince (Merck). Le solvant utilisé est le suivant : Isopropanol, eau, ammoniac 28 % (8,1,1,V/V). Le réactif de révélation est le mélange : de PILET cité plus haut. Il est dilué au 1/2 (V/V) avec de l'éthanol juste avant l'emploi. STOWE B.B. et THIMANN K.V. (101) citent dans leur article, 35 dérivés indoliques dont le 2-phénylindole en précisant leurs R.f. et leurs couleurs après la réaction de SALKOWSKI.

DOSAGE DES NOYAUX INDOLES



## I.2 Dosage et identification de l'acide hippurique urinaire

Ces dernières années de nombreux auteurs ont décrit et utilisé différentes méthodes de dosages de l'acide hippurique. Toutes ces méthodes ont été réalisées pour étudier l'élimination urinaire de cet acide après diverses expositions (toluène, xylène). Nous pouvons classer ces méthodes en 3 groupes.

### 1°) Techniques utilisant la chromatographie

#### - Chromatographie en phase gazeuse

Cette technique nécessite au préalable une extraction à l'acétate d'éthyle ainsi qu'une méthylation. Elle a été décrite par BUCHET J.P. et LAUWERIS A.R., 1973 (15).

#### - Chromatographie sur colonne

SINHA S.N. et GABRIELI E.R., 1968 (98) préconisent d'utiliser une colonne de séphadex G<sub>10</sub> pour séparer l'acide hippurique et ils mesurent ensuite l'absorption à 232 nm. Cette technique n'est pas spécifique, d'autres composés peuvent être élués en même temps et absorber à cette même longueur d'onde.

#### - Chromatographie sur plaque ou sur papier

GAFFNEY G.W. et col., 1954 (36) utilisent la chromatographie sur papier Whatman n° 1 sans extraction de l'acide hippurique urinaire au préalable. La révélation est effectuée à l'aide du p. diméthylamino-benzaldéhyde en milieu anhydrique acétique.

OGATA M. et col., 1969 (75) préconisent une extraction à pH 2 avec le mélange éthanol/éther (1/1, V/V) avant la séparation chromato-

graphique, qui est effectuée soit sur papier, soit sur une plaque de gel de silice. Le mélange de migration est le suivant : toluène, acide acétique, eau 100/50/2,3 (V/V). La révélation peut être effectuée soit avec le réactif de GAFFNEY G.W. et col. (36) ou le chlorure de benzènesulfonyle.

TEUCHY H. et VANSUMERE C.F., 1969 (103) décrivent une technique qui nécessite une extraction de l'urine à l'acétate d'éthyle pH < 2. Puis une séparation sur une plaque de chromatographie préparée avec un mélange de 50 g de gel de silice et 50 g de cellulose comme support. La détection est effectuée avec le réactif de GAFFNEY G.W., 1954 (36).

Ces différentes techniques chromatographiques s'adaptent mal à l'analyse en grande série et elles nécessitent un traitement de l'urine avant le dosage (extraction, méthylation).

MATSUI H., KASAO M. et IMAMURA S., 1978 (67) décrivent une technique de dosage de l'acide hippurique par chromatographie haute pression. Cette méthode est simple, sensible et spécifique, mais elle nécessite un matériel sophistiqué pour être réalisée.

## 2°) Techniques colorimétriques

UMBERGER C.J. et FIORESE F.F., 1963 (106) décrivent une technique de dosage colorimétrique de l'acide hippurique urinaire qui utilise le chlorure de benzènesulfonyle.

TOMOKUNI K. et OGATA M., 1972 (104) pratiquent une méthode analogue.

KANEKO I. et col. en 1975 (51) la modifient à des fins d'automatisation.

Ces techniques, qui utilisent le chlorure de benzènesulfonyle sont



reconnues comme étant peu spécifiques. En effet l'acide salicylurique et quelques acides aminés interfèrent sur le dosage.

MIKULSKI P. et WIGLUSZ R. en 1970 (68) décrivent une méthode colorimétrique qui utilise le p. diméthylaminobenzaldéhyde en milieu anhydride acétique avec comme catalyseur de la réaction du chlorure ferrique anhydre. Cette technique nécessite une extraction à l'acétate d'éthyle. L'urée interfère mais elle est éliminée presque totalement lors de l'extraction. Cette méthode est longue et difficile à réaliser en grande série.

Nous avons préféré utiliser une technique plus ancienne modifiée. En 1940 DENIGES G. (26) décrit une réaction colorée pour l'acide hippurique, elle est modifiée par DEYSSON G. et ALLIOT M. en 1947 (27), puis par GRISLER R. et col. en 1978 (40).

#### PRINCIPE :

Cette méthode de dosage colorimétrique est basée sur l'action de l'hypobromite en milieu alcalin sur l'acide hippurique. En fin de réaction le composé coloré est extrait par un solvant organique. DEYSSON G. et ALLIOT M. (27) citent l'interférence de l'urée. Celle-ci réagit avec l'hypobromite (dégagement gazeux). Dans notre méthode nous ajoutons de l'hypobromite et de la soude en excès pour éliminer l'action de l'urée. La mesure de la densité optique est effectuée à 313 nm de façon à augmenter la sensibilité de la méthode. Le maximum d'absorption se situe à 260 nm, mais à cette longueur d'onde, d'autres produits, tel que la cynurénine interfèrent.

TECHNIQUE DE DOSAGE :

Réactifs :

Soude à 40 g % dans de l'eau bidistillée

. Solution A : Brome

166,5 g de bromure de potassium + 280 ml H<sub>2</sub> O  
+ 25 ml de brome.

. Solution B : Hypobromite

80 ml de soude à 40 % + 0,3 g d'iodure de potassium,  
compléter à 150 ml avec H<sub>2</sub> O. Ajouter 150 ml de solution A.

Méthodologie

Prélever 200 µl d'urine dans un tube à essais, ajouter 800 µl de soude à 40 %, puis 2,5 ml de solution B. Les tubes sont chauffés 5 minutes au bain-marie à 100 °C puis refroidis. Le composé coloré est ensuite extrait par 1 ml de tétrachlorure de carbone. La mesure de la densité optique sur la phase organique est effectuée au spectrophotomètre à 313 nm.

Une vérification par chromatographie sur plaque (gel de silice) est effectuée sur plusieurs urines contenant des quantités variables d'acide hippurique. Le solvant de migration utilisé est le suivant : chloroforme, acide acétique (80/20).

3°) Méthode de dosage par isotachophorèse

SOLLENBERG J. et BALDESTEN A., 1977 (99) décrivent une nouvelle méthode d'analyse de l'acide hippurique et de certains autres acides organiques. Elle est basée sur le principe de l'électrophorèse dans un système d'électrolytes discontinus. Cette technique est simple et spécifique, mais elle est très récente et nécessite un matériel spécial que nous ne possédions pas au moment de cette étude.

### I.3 Dosage et identification des 5-hydroxyindoles urinaires

Les méthodes de dosages de ces dérivés sont de quatre types :

#### 1°) Méthodes chromatographiques

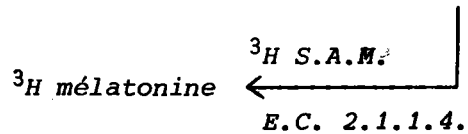
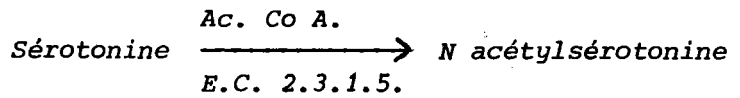
NISHINO M., NOGUCHI T. et KIDO R., 1972 (72) utilisent une technique de séparation des 5-hydroxyindoles urinaires par chromatographie d'échanges d'ions et mesurent l'absorption de chaque fraction à 275 nm.

Une technique récente décrite par HOSKINS A.J. et POLLITT R.J. en 1975 (46) utilise des standards internes d'acide 5-hydroxyindole acétique et d'acide indole acétique deutériés. Les dosages sont ensuite effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrographe de masse.

BECK O., PALMSKOG G. et HULTMAN E., 1977 (10) décrivent une méthode pour la détermination quantitative de l'acide 5-hydroxyindole acétique urinaire. Celle-ci est basée sur la chromatographie liquide haute performance à phase inverse. La détection est effectuée par fluorimétrie.

#### 2°) Méthodes isotopiques

SAAVEDRA J.M. et col., 1973 (88) décrivent une technique de dosage de la sérotonine spécifique et sensible, basée sur le principe suivant :



E.C. 2.3.1.5. = N acétyltransférase

E.C. 2.1.1.4. = hydroxyindole-O-méthyltransférase

${}^3\text{H S.A.M.}$  =  ${}^3\text{H}$  méthyl-S- adénosyl 1 méthionine

Ac. Co A. = acétyl Co enzyme A

La mélatonine formée est ensuite extraite par un solvant organique, puis la radioactivité est mesurée. C'est une méthode longue, coûteuse qui s'adapte mal aux dosages en grandes séries.

### 3°) Méthode de dosage spectrofluorimétrique

Les dérivés indoliques substitués en 3 et portant, en 5, un groupement-OH ou -OCH<sub>3</sub> présentent après excitation à 295 nm un spectre de fluorescence avec deux bandes d'absorption, une bande à 340 nm qui décroît en milieu fortement acide et une bande à 540-550 nm dont l'intensité est inversement proportionnelle au pH.

Ces méthodes ont été appliquées par :

SENTENAC ROUMANOU H. et col. en 1967 (95), DREUX C., 1968 (28), LOREZ H.P. et DA PRADA M., 1978 (64).

Cette technique nécessite une purification des dérivés indoliques. Elle peut s'effectuer soit par :

- extraction sélective (butanol)
- chromatographie d'échange d'ion
- adsorption sur florisil de certains composés acides (pigments).

Chez l'Homme cette technique est parfaitement applicable pour le sang et l'urine. Chez l'Animal (Rat) nous n'arrivons jamais à éliminer totalement les pigments urinaires, qui perturbent la spectrofluorimétrie. Nous avons donc recherché une technique colorimétrique.

#### 4°) Méthodes colorimétriques

Méthode de HANSON modifiée par SHIRARDIN H. et METAIS P. en 1960 (97).

Après extraction par l'éther en milieu acide, le solvant est récupéré puis évaporé et l'extrait sec est repris avec de l'acide chlorhydrique 0,1N. La réaction de HANSON utilise le p. aminobenzaldéhyde en milieu chlorhydrique. Malgré l'extraction, cette méthode n'est pas spécifique.

Nous avons utilisé la méthode d'UDENFRIEND S. à l'αnitroso-βnaphthol, elle a été décrite ou modifiée par : UDENFRIEND S. et col. en 1958 (105), DREUX C. et DELAUNEUX B. en 1964 (31).

#### - Principe

L'αnitrosoβnaphthol réagit avec de nombreux phénols substitués, en présence d'acide nitrique. Les 5-hydroxyindoles réagissent dans des conditions différentes, en absence d'acide nitrique mais en présence d'acide chlorhydrique ou sulfurique dilué contenant des traces de nitrite. Dans ces conditions la réaction est spécifique. Le composé formé est violet. En milieu chlorhydrique ou sulfurique, les dérivés du phénol ne réagissent pas ainsi que le tryptophane, la tryptamine, le 7-hydroxytryptophane et la 7-hydroxytryptamine. La réaction avec le 5-hydroxytryptophane, la 5-hydroxytryptamine, l'acide 5-hydroxyindole acétique et probablement la N-acétylsérotonine nous donne des chromophores avec des spectres parfaitement semblables. Lorsque nous effectuons

la réaction directement sur l'urine, nous dosons probablement ces 4 composés simultanément.

- Réactifs

- . Solution A : onitrosoβnaphhtol à 0,1 % dans l'éthanol à 95%
- . Solution B : acide nitreux préparé extemporanément, 5 ml d'acide sulfurique 2 N + 0,2 ml de nitrite de sodium à 2,5 % dans de l'eau bidistillée.

- Techniques

Les urines sont acidifiées à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique.

Prélever 2 ml d'urine, ajouter 1 ml de sol. A et 1 ml de sol. B. Chauffer 5 minutes au bain-marie à 55 °C, puis laisser refroidir. L'excès d'onitrosoβnaphhtol est ensuite éliminé par une extraction au dichloro-1-2-éthane. La mesure de l'absorption est effectuée au photomètre à 546 nm sur la phase aqueuse contre un blanc urine sans onitrosoβnaphhtol.

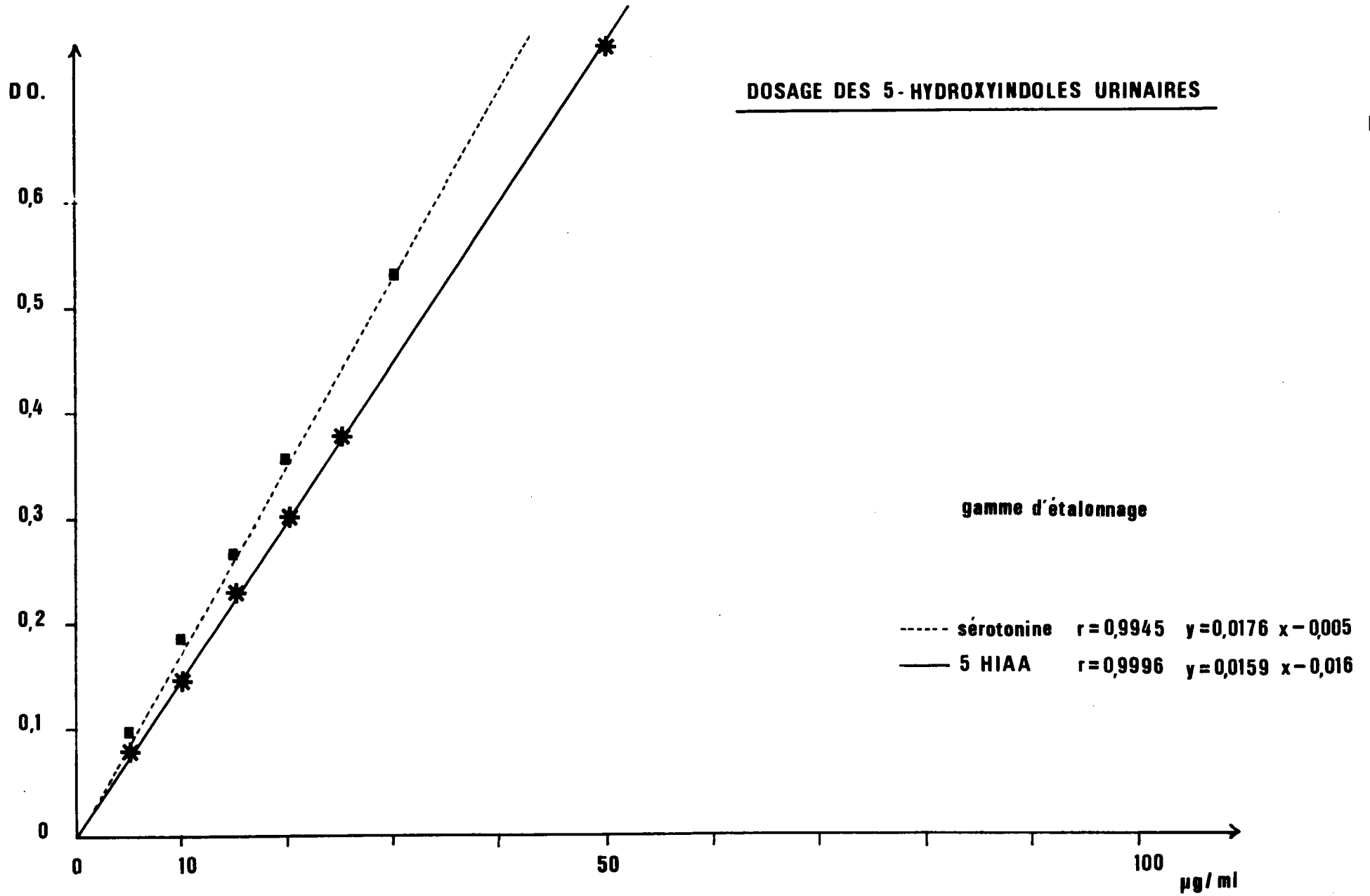
Nous avons réalisé 2 gammes d'étalonnage, l'une avec de la sérotonine, l'autre avec de l'acide 5-hydroxyindole acétique (fig. 2).

Lors des différents dosages effectués dans cette première partie nous avons utilisé principalement des techniques colorimétriques plus pratiques à réaliser; mais nous sommes conscients que ces techniques peuvent être quelque fois moins spécifiques que d'autres méthodes plus élaborées.

La révélation des plaques chromatographiques est effectuée avec la même technique (pulvérisation des 2 réactifs, puis chauffage à 55 °C).

DOSAGE DES 5-HYDROXYINDOLES URINAIRES

FIG. 2



#### I.4 Dosage et révélation de la sérotonine dans l'urine

Les méthodes de dosage utilisées sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent. Cependant avant d'appliquer ces méthodes, il est nécessaire d'extraire spécifiquement la sérotonine en éliminant les autres 5-hydroxyindoles (acide 5-hydroxyindole acétique et 5-hydroxytryptophane).

Nous avons utilisé la technique de DREUX C., 1968 (28) extraction au butanol en milieu alcalin, puis relargage en milieu aqueux par l'heptane. Le dosage colorimétrique que nous avons utilisé est identique au dosage des 5-hydroxyindoles urinaires.

La vérification de la présence de sérotonine dans les urines et dans l'extrait butanolique a été effectuée par chromatographie sur plaque de cellulose avec 1 solvant et 3 révélations différentes.

Solvant : Isopropanol, ammoniac, eau (8,1,1).

Révélation : - ninhydrine  
- composés indoliques  
- 5 HO-indoles.

#### I.5 Dosages sanguins

Les différentes techniques de dosages sont pratiquées sur le sérum. Nous avons utilisé les coffrets Boehringer non optimisés et réalisé ces dosages en microméthodes. Pour les chlorures nous avons appliqué la méthode colorimétrique au perchlorate de fer décrite par KUPCKE I., 1969 (61).



## I.6 Expérimentation animale

### a) animaux

- Lapins néozélandais, d'un poids compris entre 2,5 et 3 kg. Ces animaux ont subi une période d'adaptation en animalerie, d'une dizaine de jours avant le début de l'expérience.

- Rats E.O.P.S. albinos (souche OFAS), origine Sprague-Dawley, de sexe mâle et femelle, d'un poids compris entre 160 et 240 g.

### b) Expérimentations chroniques : Intoxication par inhalation

- Lapins

Les 2 animaux sont placés dans la même cage à intoxication.

Caractéristiques de la cage à intoxication : parallélépipède rectangle en plexiglas d'un volume de 120 litres.

Les animaux sont intoxiqués 8 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 5 semaines. Ils sont placés en cage à métabolisme la nuit et le week-end afin de récupérer les urines.

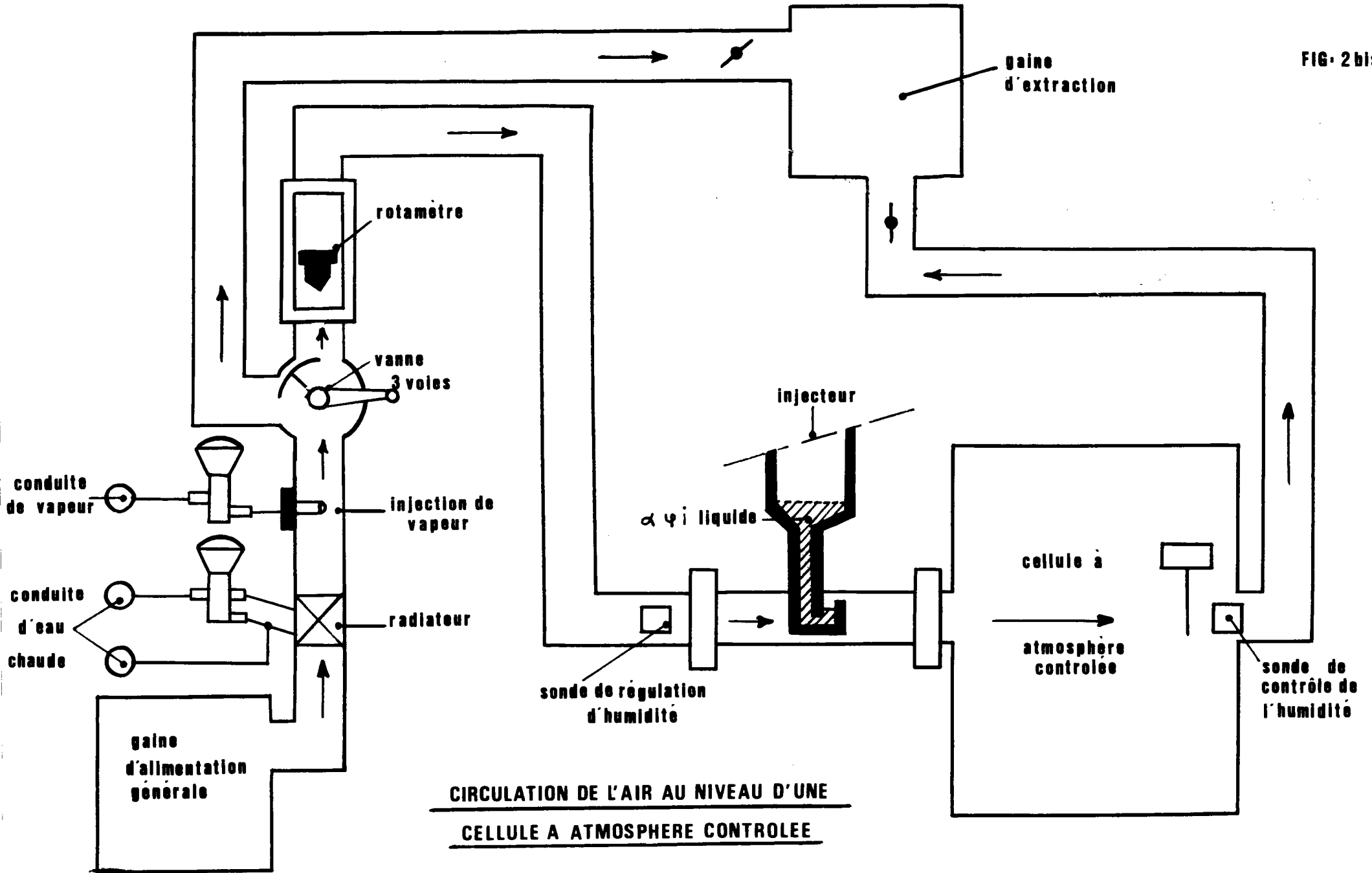
Les lapins témoins sont placés uniquement en cage à métabolisme.

- Rats

Caractéristiques des cellules à atmosphère contrôlée : Volume utile = 170 litres (fig. 2 bis).

Chaque cellule est équipée d'un séparateur "urine-fèces" en téflon. Les urines, filtrées, sont pompées au fur et à mesure de leur émission et dirigées vers un collecteur de fractions, placé dans une enceinte réfrigérée à 4 °C.

FIG. 2 bis



CIRCULATION DE L'AIR AU NIVEAU D'UNE  
CELLULE A ATMOSPHERE CONTROLEE

Les animaux sont traités 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 6 mois.

Trois lots sont constitués et traités selon le tableau suivant :

Lot N°	Nombre d'animaux	Concentration (en mg d'αphénylindole par m <sup>3</sup> )
1 - 2	2 x 12	0 Témoins
3 - 4	2 x 12	20
5 - 6	2 x 12	60

Les Rats sont exposés par groupe de 12 dans chaque cellule. La nourriture et l'eau de boisson leur sont présentées en dehors des heures d'exposition. L'αphénylindole est sublimé à 186 °C à l'aide d'injecteurs spéciaux.

- Contrôle de la concentration en αphénylindole dans l'air

Des prélèvements d'atmosphère sont effectués sur filtres, deux techniques peuvent être utilisées :

1°) filtre d'alfa et d'amiante hydrofugé, solubilisation de l'αphénylindole dans l'acétate d'éthyle, puis analyse par fluorimétrie (excitation à 315 nm);

2°) filtre de papier, solubilisation dans l'éthanol absolu et analyse par spectrophotométrie à 310 nm.

c) Expérimentation aiguë

- Animaux Rats femelles d'un poids moyen de 220 g.

1°) Bilans biochimiques sanguins

Voie d'administration : I.P. (intrapéritonéale)

Véhicule : Polyvinylpyrolidone (PM 25.000-30.000 Merck). P.V.P. en solution aqueuse à 3 %. C'est un véhicule approprié pour la réalisation de suspension d'aphénylindole à la concentration maximale de 20 %, injectable par voie intrapéritonéale.

Administration du produit : 2 lots de 30 animaux sont effectués par "Randomisation". L'un d'eux reçoit l'aphénylindole à la dose de 500 mg/kg, sous un volume de 0,5 ml/200 g. Le deuxième lot reçoit le véhicule seul sous le même volume. Dans chaque lot, 10 animaux sont sacrifiés à 24, 48 et 72 h.. Des examens biochimiques sont ensuite pratiqués sur le sérum.

Des animaux témoins, n'ayant rien reçu, sont également sacrifiés. Les animaux traités n'ont pas perdu de poids par rapport aux témoins. Aucune mortalité n'a été observée, à la dose de 500 mg/kg, pendant les 3 jours de l'expérience.

2°) Etude de l'élimination urinaire des 5-hydroxyindoles, de la sérotonine et de l'acide hippurique

- Après une injection d'aphénylindole seul

Animaux : Rats ♂ ♀ poids 220 g.

Voie : I.P.

Véhicule : Labrafil.

L'aphénylindole est solubilisé dans l'éther, cette solution est mélangée au véhicule, le solvant est ensuite évaporé sous vide. Nous

obtenons une solution d'αphénylindole dans le labrafil.

Nous formons 5 lots de 3 animaux par "randomisation" ; 1 lot témoin blanc ; 1 lot témoin, qui reçoit le véhicule sous le même volume que les animaux traités ; 3 lots d'animaux recevant des doses croissantes d'αphénylindole (250, 500, 1000 mg/kg) dans un même volume de véhicule (0,5 ml/100 g de poids corporel). Les animaux sont placés par 2 dans des cages à métabolisme, afin de recueillir l'urine toutes les 24 heures. Ils disposent de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

- Après un prétraitement au tryptophane et une injection d'αphénylindole.

Animaux : Rats ♀ poids ≈ 220 g.

Voie : I.P.

Véhicule : αphénylindole Labrafil

Tryptophane gomme arabique (5 % dans H<sub>2</sub> O).

Dose : αphénylindole 500 mg/kg

: Tryptophane 1000 mg/kg.

Volume de véhicule : 0,5 ml/100 g de poids corporel.

La solution d'αphénylindole est préparée comme ci-dessus. Nous formons 5 lots de 3 animaux par "randomisation". Le tableau ci-après nous montre le traitement de chaque lot d'animaux. Les lots 4 et 5 subissent un traitement identique.

		N° du lot	1	2	3	4	5
1 <sup>ère</sup> injection	Véhicule seul gomme arabique 5 %	x	o	o	o	o	o
	Tryptophane 1000 mg/kg	o	x	x	x	x	x
2 <sup>ème</sup> injection	Véhicule seul Labrafil	o	o	x	o	o	o
	αphénylindole 500 mg/kg	o	o	o	x	x	x

*Les animaux reçoivent la deuxième injection 5 heures après la première. Pour chaque lot, les urines sont recueillies pendant les 5 heures qui suivent la première injection, puis toutes les 24 heures pendant 5 jours.*

*Les animaux disposent de nourriture et d'eau de boisson ad libitum.*

## **CHAPITRE II**

### **RESULTATS**

## RESULTATS

### II.1 Expérimentation sur le Lapin

Cette expérimentation a pour but de réaliser le bilan de l'élimination urinaire des composés indoliques après intoxication par inhalation d'αphénylindole.

Les résultats sont exprimés en quantité d'αphénylindole excrété dans l'urine. En effet, nous ne connaissons pas la nature des différents composés dosés. Les figures 3 et 4 nous montrent l'élimination urinaire des composés indoliques chez 2 lapins intoxiqués par inhalation à l'αphénylindole (concentration moyenne  $50 \text{ mg/m}^3$ ). Nous remarquons une augmentation de l'élimination après chaque période d'intoxication. Pendant le week-end le taux de cette élimination de noyaux indoles, revient pratiquement à la même valeur que les témoins.

Les tableaux I et II regroupent les concentrations d'αphénylindole dans l'atmosphère, la durée de l'exposition, la durée du prélèvement urinaire ainsi que les valeurs de la concentration des composés indoliques urinaires.

D'après GUYTON A.C., 1947 (42) chez le Lapin le volume courant est de 21 ml et la fréquence respiratoire, 51 mouvements par minute : ce qui nous donne un volume d'échange pulmonaire moyen de 60 l/h.

Le dispositif expérimental ne permet pas de contrôler la concentration atmosphérique en αphénylindole. Nous observons des variations d'un jour à l'autre pouvant aller du simple au double.

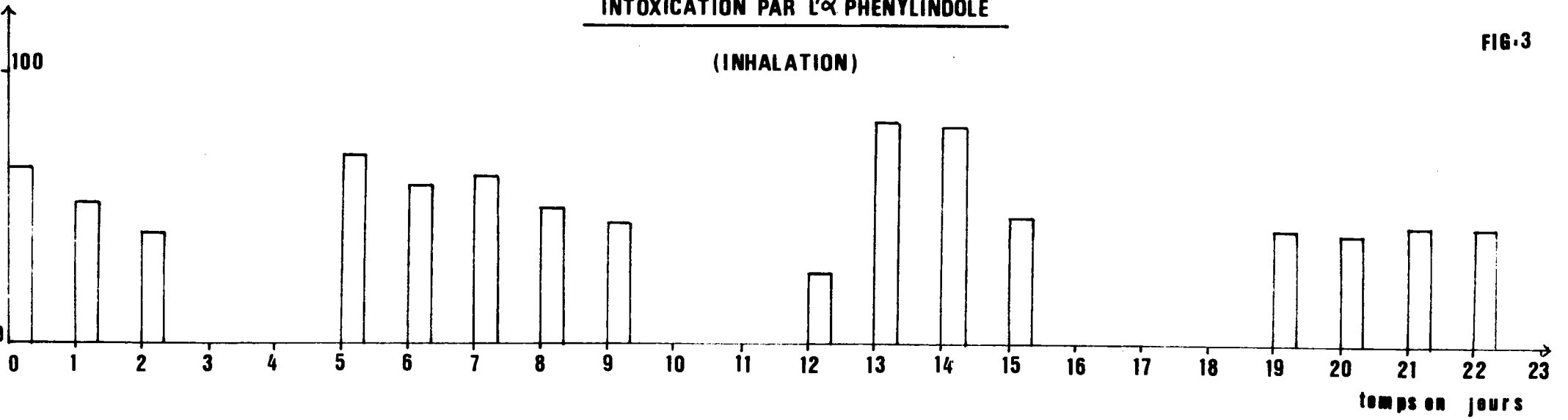


$\alpha \psi$  mg/m<sup>3</sup>

INTOXICATION PAR L' $\alpha$  PHENYLINDOLE

FIG.3

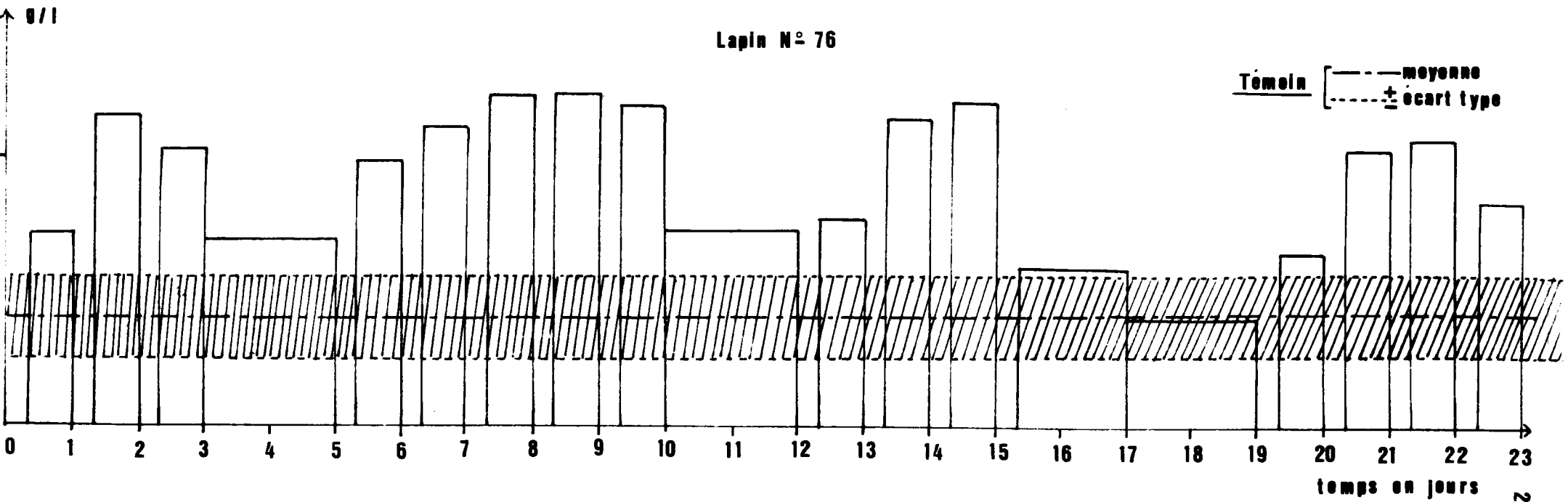
(INHALATION)



ELIMINATION URINAIRE DES NOYAUX INDOLES

Lapin N° 76

Témoin [ ——— moyenne  
          - - - - ± écart type

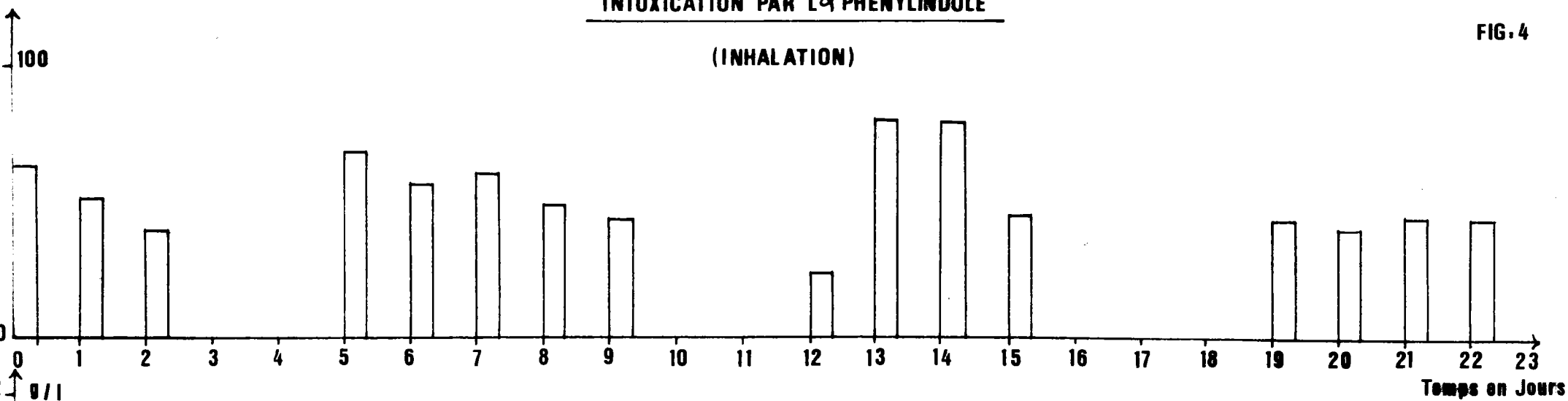


$\alpha \psi / \text{mg}/\text{m}^3$

INTOXICATION PAR L' $\alpha$  PHENYLINDOLE

FIG. 4

(INHALATION)

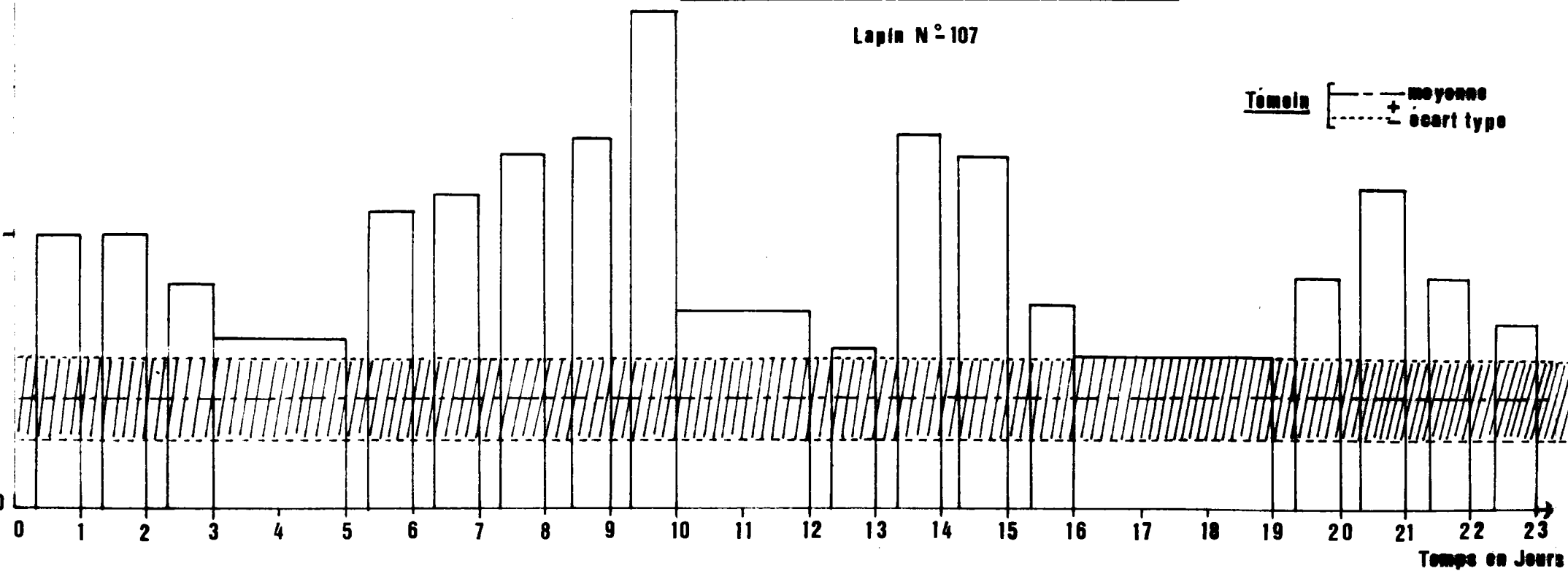


g/l

ELIMINATION URINAIRE DES NOYAUX INDOLES

Lapin N° 107

Témoin [ - - - moyenne  
+ écart type ]



**DOSAGES DES NOYAUX INDOLES**

urine de lapin

Durée de l'intoxication en heures	Concentration de l' $\alpha$ Indole en mg / m <sup>3</sup>	Durée du prélèvement d'urine en heures	Concentration des noyaux Indoles dans l'urine en G/L	
			N°76	N°107
8,15	63,2	15		
			0,71	1,00
8,45	50,9			
		15,25	1,15	1,00
8,35	39			
		15,15	1,02	0,82
		48	0,68	0,62
8,40	67,2			
		15,30	0,98	1,08
8,30	56,9			
		15,20	1,10	1,15
8,25	60,4			
		15,45	1,21	1,29
8,30	47,7			
		15,30	1,22	1,36
8,30	43,2			
		16,50	1,17	1,82
		46,40	0,72	0,72
8,35	25,8			
		15,25	0,76	0,58

Tableau I

**DOSAGES DES NOYAUX INDOLES**

urine de lapin

Durée de l'intoxication en heures	Concentration de $\alpha$ $\psi$ Indole dans l'atmosphère mg / m <sup>3</sup>	Durée du prélèvement d'urine en heures	Concentration des noyaux Indoles dans l'urine en G/L	
			N=76	N=107
8,35	78,6			
		15,25	1,13	1,36
8,35	77,9			
		16,55	1,19	1,29
8.	44,8			
		39,15	0,58	0,73
		48	0,40	0,55
8,40	40,9			
		15,20	0,64	0,83
8,35	39,4			
		15,25	1,02	1,16
8,35	42,5			
		15,25	1,06	0,83
8,50	40,9			
		15	0,83	0,67

Tableau II

Elimination urinaire de noyaux indoles  
chez les Lapins témoins et traités

	Nombre de valeurs	$m^* \pm \sigma$ g/l
2 Témoins	2 x 3	0,41 $\pm$ 0,15
Lapin N° 76	19	0,92 $\pm$ 0,25
Lapin N° 107	19	0,99 $\pm$ 0,33

\* moyenne ± écart type

La durée de l'intoxication étant en moyenne de 8 h.40 par jour. Nous obtenons un volume d'échange pulmonaire pendant l'intoxication de 520 l soit environ 0,5 m<sup>3</sup>. Ce qui représente, si tout était absorbé, une quantité moyenne d'aphénylindole de 25 mg J<sup>-1</sup>.

Pour des animaux de 2,6 kg le volume urinaire moyen est de 160 ml par 24 h. Nous utilisons ce volume moyen pour le calcul car nous ne disposons pas des urines de 24 h.

Les quantités moyennes de noyaux indoles excrétées en 24 h. sont (d'après le tableau ci-dessus) :

- 65 mg J<sup>-1</sup> pour les témoins
- 147 mg J<sup>-1</sup> pour le Lapin n° 76
- 158 mg J<sup>-1</sup> pour le Lapin n° 107.

Au vu de ces résultats, il est logique de penser que le bilan de l'excrétion journalière des composés indoliques est largement excédentaire par rapport à la quantité d'aphénylindole qui peut être absorbée.

Les composés indoliques du métabolisme normal présents dans l'urine sont principalement tous des métabolites du tryptophane.

Nous avons donc poursuivi notre étude en étudiant les métabolites urinaires du tryptophane et plus particulièrement les métabolites

de la voie des 5-hydroxyindoles. Cette voie de métabolisation conduit à la formation de substances physiologiquement active comme la 5-hydroxytryptamine. Celle-ci a une action au niveau du système nerveux central, c'est, comme d'autres amines, une substance neurotransmettrice, EARCHAS J. et USDIN E., 1973 (9). L'augmentation de l'excrétion de ces métabolites lors de l'intoxication par l'αphénylindole, expliquerait pour une part les concentrations très élevées en composés indoliques urinaires retrouvés chez les 2 Lapins traités à l'αphénylindole.

Il est possible que les 2 noyaux composant l'αphénylindole aient des actions indépendantes. Celle du noyau indole sera étudiée plus en détail dans la suite de notre travail. Parmi les actions probables du noyau phényl nous en avons retenu une : action au niveau du cycle phénylalanine-tyrosine. Pour vérifier cette hypothèse nous avons dosé l'acide hippurique urinaire.

## II.2 Expérimentation sur le Rat

Nous avons réalisé 2 types d'intoxications :

1°) une intoxication aiguë

Elle comporte une injection unique du toxique à des doses élevées, les animaux sont suivis pendant un temps très court 3 à 6 jours.

2°) une intoxication chronique par inhalation (faible dose) pendant 6 mois.

## A - INTOXICATION AIGUE

### a) Bilan biochimique sanguin

Le bilan a été réalisé sur 3 jours (voir chapitre I), paragraphes 5 et 6. Les prélèvements sanguins sont effectués par section de la carotide, le matin de 9 h. à 11 h. 30. Tous les dosages sont effectués sur le sérum. Les dosages d'enzymes et de bilirubines sont réalisés dans les 3 heures qui suivent le prélèvement. Les autres dosages sont effectués sur le sérum congelé.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n° III.

Nous remarquons que malgré quelques résultats significativement différents seule la baisse des cholinestérases nous apparaît comme suffisamment marquée pour être relevée.

Nous avons effectué les comparaisons de moyennes suivant le test de STUDENT - FISHER comme suit :

Témoins véhicules contre Témoins blancs	..
Traités contre Témoins véhicules	xx

Les valeurs significativement différentes sont marquées ainsi :

.	x	Probabilité	>	90 %
..	xx	"	>	95 %
...	xxx	"	>	99 %

voir tableau n° III

### b) Elimination urinaire des 5-hydroxyindoles et de l'acide hippurique après une injection unique d'aphénylindole

Expérimentation (chapitre I), méthodologie (paragraphe 4).

**DOSAGES SANGUINS SUR RATS FEMELLES INTOXIQUES PAR L'  $\alpha$ -PHENYLINDOLE**

DOSAGES	NORM. (témoins absolus)	T.V. 24 h	TRAITES 24 h	T.V. 48 h	TRAITES 48 h	T.V. 72 h	TRAITES 72 h
G.P.T UI/L	11,7 ± 0,9	12,27 ± 0,10	12,27 ± 0,73	12,4 ± 0,73	17,9 ± 0,73 xxx	13,9 ± 1,05	12 ± 0,8
G.O.T UI/L	99 ± 8,2	44 ± 2,5 ...	62,5 ± 3,7 xxx	139,8 ± 16,8	16,3 ± 13,3	119 ± 13,4	112 ± 0,6
Protéines Totales g/L	71,3 ± 0,75	70 ± 0,5	67,5 ± 0,8 x	67,6 ± 0,78 ..	66,3 ± 0,35	71,5 ± 0,91	65,8 ± 0,8 xxx
Cholesterol g/L	1,24 ± 0,04	1,54 ± 0,04 ...	1,13 ± 0,05 xxx	1,18 ± 0,22	1,21 ± 0,035	1,25 ± 0,06	1,54 ± 0,04 xx
Uree g/L	0,35 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,34 ± 0,008	0,36 ± 0,03	0,40 ± 0,008 ..	0,41 ± 0,64
Lipides Totaux g/L	10,3 ± 0,2	5,68 ± 0,22 ...	7,78 ± 0,44 xxx	8,24 ± 0,29 ...	9,3 ± 0,64	12,6 ± 0,71 ..	14 ± 0,22
Chlore Sérique mEq/L	99 ± 2,8	88,5 ± 2,46	95 ± 2,68	92,7 ± 2,01	93,7 ± 1,70	85,6 ± 2,1 ..	89,1 ± 1,31
Cholinestérase UI/L	2140 ± 117	2087 ± 73	1838 ± 71 x	2198 ± 97	1521 ± 42 xxx	2063 ± 78,5	1384 ± 57 xxx
Phosphatase Alcaline UI/L	23 ± 1	21,2 ± 1,19	22,2 ± 1,7	28,1 ± 1,36 ..	29,7 ± 1,65	43,6 ± 2,7 ...	51,7 ± 1,2 xxx
L.D.H Totale UI/L	1207 ± 90	767 ± 65,5 ...	1028 ± 101 xxx	2218 ± 217 ...	1996 ± 96 xxx	1859 ± 169 ...	1268 ± 103 xxx
Bilirubine Totale mg/L	1,81 ± 0,12	1,31 ± 0,16	2,34 ± 0,19 xxx	1,66 ± 0,15 ..	2,5 ± 0,14 xxx	3,07 ± 0,41	3,40 ± 0,20
Bilirubine Directe mg/L	0,43 ± 0,03	0,54 ± 0,02	1,14 ± 0,02 xxx	0,73 ± 0,08 ..	1,27 ± 0,15 xx	0,33 ± 0,04	1,20 ± 0,25 xx
Créatinine mg/L	2,1 ± 0,06	2,02 ± 0,11	2,38 ± 0,93 x	3,1 ± 0,04	2,6 ± 0,09 xx	2,28 ± 0,04	2,3 ± 0,11

xxx > 99 %  
xx > 95 %  
x > 90 %

... > 99 %  
.. > 95 %  
. > 90 %

Tableau III



Après l'intoxication les urines sont recueillies toutes les 24 heures pendant 5 jours, puis dosées suivant les techniques décrites dans le chapitre I, paragraphes 2 et 3.

Pour les 5-hydroxyindoles, l'acide hippurique et la 5-hydroxytryptamine urinaires, les résultats sont exprimés d'une part en mg par kg de poids corporel et par jour ( $\text{mg kg}^{-1}\text{j}^{-1}$ ) et, d'autre part pour les valeurs cumulées en  $\text{mg kg}^{-1}$ . Pour les jours au cours desquels un animal est mort le calcul est effectué en éliminant le poids de celui-ci.

Pour les 5-hydroxyindoles les résultats sont présentés dans les tableaux n° IV et IV bis. La valeur moyenne chez les témoins est de  $1,12 \text{ mg kg}^{-1}\text{j}^{-1}$ , l'écart type est de 0,85 pour 15 valeurs (tableau n° V). La figure n° 5 représente l'élimination urinaire de ces composés en fonction du temps.

Nous observons aucune différence significative entre les témoins blancs et les témoins véhicules. Pour les animaux intoxiqués à la dose de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , le maximum de l'élimination se situe dans les premières 24 h. D'autre part, 3 jours après l'intoxication, cette élimination est revenue à une valeur identique à celle des témoins.

Pour les animaux intoxiqués à 500 et  $1.000 \text{ mg/kg}$ , le maximum d'élimination se situe au 2ème jour. Les valeurs reviennent pratiquement identiques à celles des témoins au 4ème jour.

La figure n° 6 représente l'élimination des 5-hydroxyindoles urinaires exprimée en valeur cumulée en fonction du temps. Pour les animaux témoins (blancs et véhicules) l'élimination est linéaire en fonction du temps en prenant 24 heures comme unité de base.

ELIMINATION URINAIRE DES 5 - HYDROXYINDOLES

chez le rat après injection d' $\alpha$  phénylindole seul

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	5HO-INDOLES	
			mg/kg / j	Valeur Cumulée mg/kg
TB	1j	0,686	1,3	1,3
TV		0,686	2,5	2,5
250 mg/kg	24	0,665	10,0	10,0
500	24	0,640	6,7	6,7
1000	24	0,628	6,3	6,3
TB	2j	0,686	2,2	3,5
TV		0,686	2,3	4,8
250 mg/kg	24	0,664	7,4	17,4
500	24	0,647	9,8	16,5
1000	24	0,412*	17,2	23,5
TB	3j	0,687	2,2	5,7
TV		0,687	1,9	6,7
250 mg/kg	24	0,666	1,6	19,0
500	24	0,667	3,7	20,2
1000	24	0,414	8,4	31,9
TB	4j	0,670	1,1	6,8
TV		0,683	1,2	7,9
250 mg/kg	24	0,656	1,6	20,6
500	24	0,655	2,1	22,3
1000	24	0,416	2,3	34,2

\* mort d'un animal

Tableau IV

**ELIMINATION URINAIRE DES 5 - HYDROXYINDOLES**

chez le rat après injection d' $\alpha$  phenylindole seul

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	5 HO INDOLES	
			mg / kg / j	Valeur Cumulee mg / kg
TB                    5j	48	0,665	0,77	7,6
TV	48	0,678	0,81	8,7
250 mg/kg	48	0,651	0,76	21,4
500	48	0,641	1,0	23,3
1000	48	0,416	1,4	35,6

Tableau IV bis

**VALEURS TEMOINS CHEZ LES RATS ♀ 220G**

---

**Excretion Urinaire**

**Acide Hippurique**

<b>Nb de Valeurs</b>	<b>Unite</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart type</b>	<b>Reference</b>
	<b>mg J<sup>-1</sup></b>	<b>5,3</b>		<b>97</b>
<b>27</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup> J<sup>-1</sup></b>	<b>47,2</b>	<b>27,3</b>	
<b>28</b>	<b>mg J<sup>-1</sup></b>	<b>7,6</b>	<b>2,7</b>	<b>62</b>

**Acide 5HO Indole Acetique**

<b>15</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup> J<sup>-1</sup></b>	<b>1,12</b>	<b>0,85</b>
-----------	--	-------------	-------------

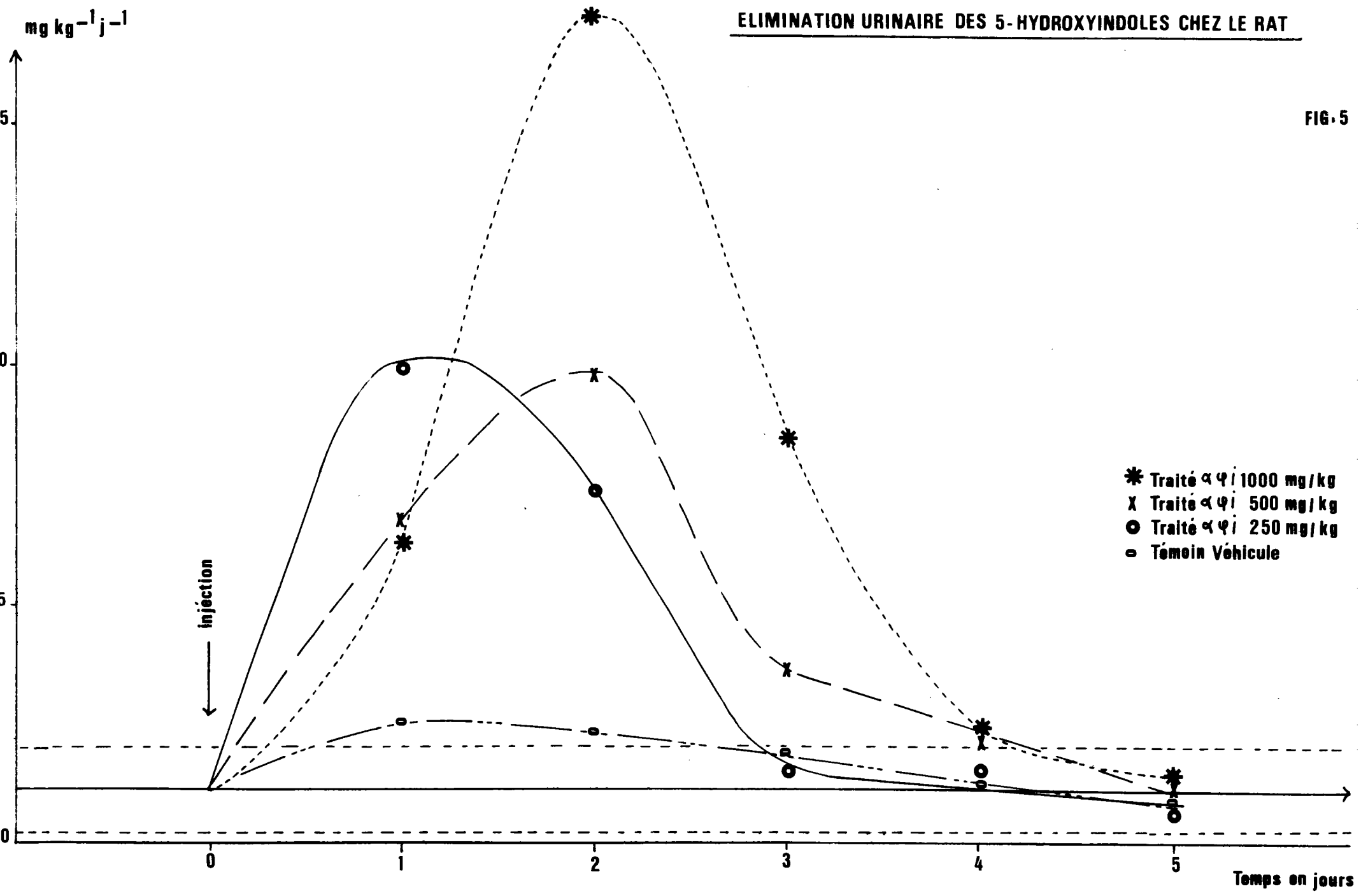
**Serotonine**

<b>3</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup> J<sup>-1</sup></b>	<b>0,096</b>
----------	--	--------------

**Tableau V**

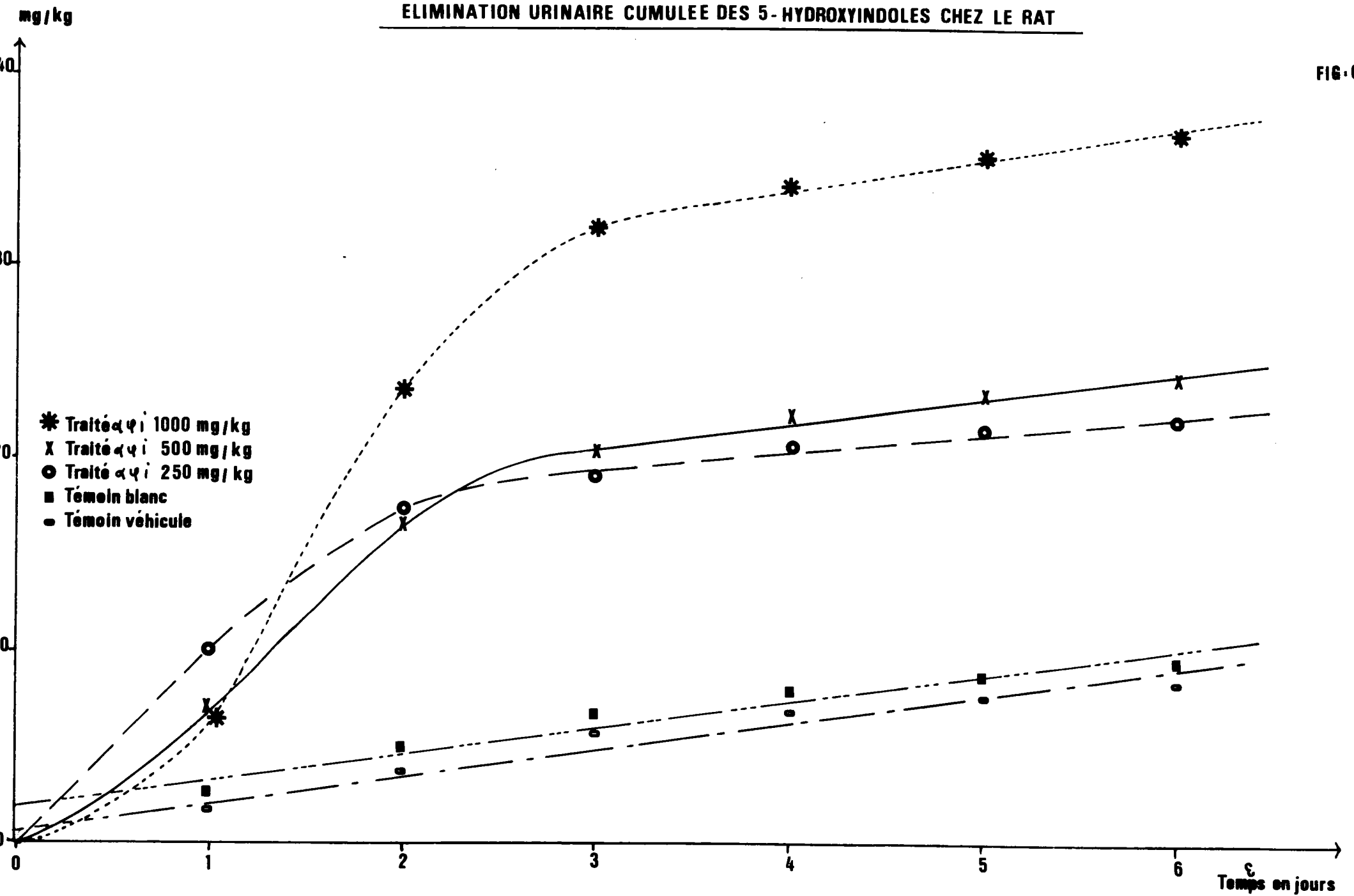
ELIMINATION URINAIRE DES 5-HYDROXYINDOLES CHEZ LE RAT

FIG. 5



# ELIMINATION URINAIRE CUMULEE DES 5-HYDROXYINDOLES CHEZ LE RAT

FIG. 6



Pour les animaux intoxiqués à 250 et 500 mg kg<sup>-1</sup>, l'élimination exprimée en valeur cumulée est relativement semblable. Celle-ci est linéaire à partir du 3ème jour. Nous observons pour la dose la plus élevée 1.000 mg kg<sup>-1</sup>, une élimination urinaire supérieure à celle des 2 autres doses.

Sur ces mêmes urines nous avons dosé la sérotonine (voir chapitre I, paragraphe 4) afin de déterminer si cette augmentation des 5-hydroxyindoles était uniquement due à l'acide 5-hydroxyindole acétique ou à plusieurs de ces composés.

Le tableau n° VI présente les résultats obtenus d'une part exprimés en mg kg<sup>-1</sup>j<sup>-1</sup> et d'autre part les valeurs cumulées en mg kg<sup>-1</sup>.

L'excrétion urinaire de sérotonine augmente après l'injection d'αphénylindole. La valeur chez les animaux témoins est en moyenne : 0,096 mg kg<sup>-1</sup>j<sup>-1</sup>. (voir tableau n° V, page 36).

La figure n° 7 représente les valeurs cumulées de l'excrétion de la sérotonine urinaire en fonction du temps. Les animaux témoins (blancs et véhicules) excrètent une faible quantité de sérotonine. Nous remarquons une très légère augmentation pour les animaux témoins véhicules au 3ème jour. Les Rats traités à la dose de 250 mg kg<sup>-1</sup> excrètent des quantités de sérotonine relativement constantes pendant les 4 premiers jours. Pour les animaux traités à 500 et 1.000 mg kg<sup>-1</sup>, l'excrétion en valeurs cumulées est linéaire du 2ème au 4ème jour. La valeur la plus élevée se situe entre le 1er et le 2ème jour.

L'excrétion de la sérotonine est en relation directe avec la dose de toxique administrée. Si nous effectuons le rapport de l'excrétion de la sérotonine urinaire exprimée en mg kg<sup>-1</sup>j<sup>-1</sup> sur les 5-hydroxyindoles urinaires exprimés avec les mêmes unités. Nous obtenons les résultats indiqués dans le tableau ci-après. Ces valeurs sont exprimées en pourcentage.

chez le rat après injection d' $\alpha$  phénylindole seul

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	SEROTONINE	
			mg / kg / j	Valeur Cumulée mg / kg
TB	1j	0,686	0,05	0,05
TV		0,686	0,07	0,07
250 mg / kg	24	0,665	0,66	0,66
500	24	0,640	1,0	1,0
1000	24	0,628	0,87	0,87
TB	2j	0,686	0,05	0,10
TV		0,686	0,05	0,12
250 mg / kg	24	0,664	0,23	0,89
500	24	0,647	1,40	2,40
1000	24	0,412*	3,02	3,89
TB	3j	0,687	0,19	0,29
TV		0,687	0,38	0,50
250 mg / kg	24	0,666	1,0	1,89
500	24	0,667	0,48	2,88
1000	24	0,414	1,0	4,89
TB	4j	0,670		
TV		0,683		
250 mg / kg	24	0,656	0,72	2,61
500	24	0,655	0,75	3,63
1000	24	0,416	1,4	6,29

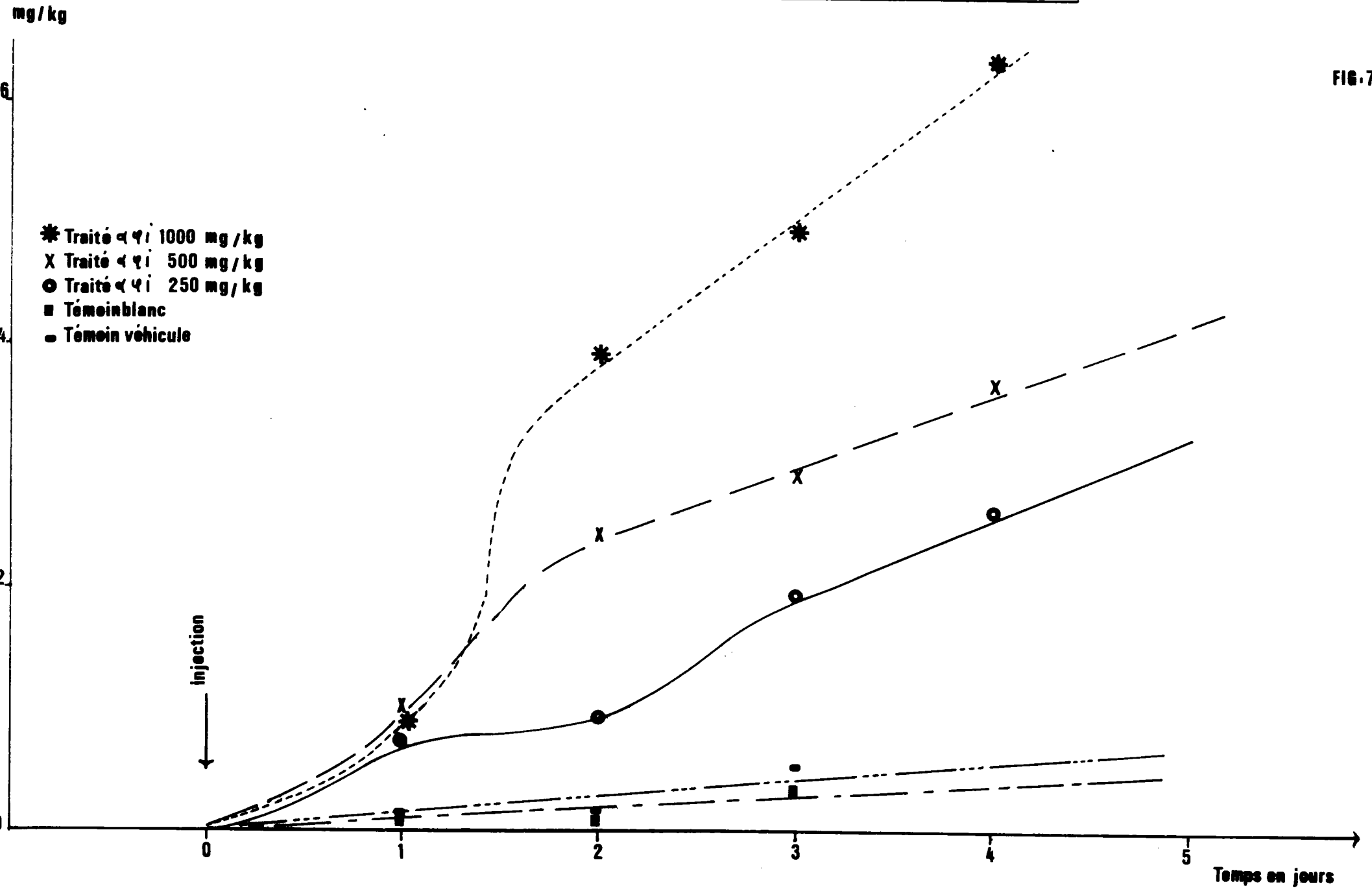
\* mort d'un animal

Tableau VI



# ELIMINATION URINAIRE CUMULEE DE LA SEROTONINE CHEZ LE RAT

FIG. 7



Temps en Jours	1	2	3	4
Dose $\alpha$ phénylindole mg/kg				
250	6,6	3,1	62,0	45,0
500	14,9	14,3	12,9	35,7
1000	13,8	17,6	11,9	60,8
Témoins blancs	8,6			
Témoins véhicules	14,8			

Pour les animaux témoins ce rapport est de 8,6 %. DREUX et col., 1973 (30) donnent un rapport moyen chez l'Homme de 2,1 % avec un minimum de 1,3 % et un maximum de 7,1 %.

Pour les animaux traités à 250 mg kg<sup>-1</sup>, ce rapport est voisin de celui des témoins durant les 2 premiers jours puis augmente brusquement au troisième jour.

Pour les doses de 500 et 1.000 mg kg<sup>-1</sup>, il est voisin de celui des témoins durant les 3 premiers jours, puis il augmente au quatrième jour.

Les valeurs faibles du rapport correspondent parfaitement avec les éliminations importantes des 5-hydroxyindoles urinaires après intoxication. Les valeurs fortes de ce rapport se situent au moment où le taux des 5-hydroxyindoles urinaires est revenu au même niveau que les témoins.

Ceci implique que l' $\alpha$ phénylindole a probablement deux actions distinctes au niveau du métabolisme du tryptophane. L'une de ces actions se traduit par l'augmentation de l'excrétion des 5-hydroxyindoles urinaires dans les premiers jours qui suivent l'intoxication aiguë. La seconde, qui est démontrée par l'augmentation du taux de sérotonine urinaire, pourrait être en relation avec une action inhibitrice de la monoamineoxydase lors de l'intoxication par l' $\alpha$ phénylindole.

La suite de notre travail sera dirigée vers l'étude de ces deux actions (élimination des 5-hydroxyindoles et de la sérotonine).

- Acide hippurique urinaire

Les quantités éliminées par les animaux témoins sont présentées dans le tableau n° V. Nous trouvons une valeur moyenne de 47,2 mg kg<sup>-1</sup>j<sup>-1</sup> pour les animaux témoins.

La figure n° 8 représente l'excrétion de l'acide hippurique urinaire en fonction du temps. Les valeurs sont indiquées dans les tableaux n° VII et VII bis. Pour les Rats qui reçoivent les doses de 250 et 500 mg kg<sup>-1</sup> les courbes d'élimination sont parfaitement semblables. Le maximum se situe à 24 h. et au troisième jour l'élimination est revenue au même taux que les témoins.

Pour la dose la plus élevée (1.000 mg kg<sup>-1</sup>), le maximum de l'élimination se situe aux environs de 48 heures et celle-ci revient à une valeur normale à partir du quatrième jour.

La figure n° 9 représente les résultats cumulés. Pour les doses d'αphénylindole de 250 et 500 mg kg<sup>-1</sup>, l'excrétion est augmentée par rapport aux témoins pendant les trois premiers jours et diminue ensuite pour arriver à une quantité totale excrétée en 6 jours identique à celle des témoins. Les animaux, qui ont reçu le véhicule seul, excrètent une quantité d'acide hippurique légèrement plus faible que les témoins blancs. Pour les Rats traités à la dose la plus forte (1.000 mg kg<sup>-1</sup>) l'excrétion est très augmentée surtout pendant les trois premiers jours.

Ces courbes de l'élimination cumulée de l'acide hippurique après injection d'αphénylindole chez le Rat nous montrent qu'il y a une régulation relativement rapide qui intervient dans les 3 jours; pour la dose la plus élevée (1.000 mg kg<sup>-1</sup>) cette régulation est moins efficace.

Cette excrétion d'acide hippurique urinaire est en bonne corrél-

**ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE HIPPURIQUE**

**chez le rat après injection d' $\alpha$ -phénylindole seul**

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	ACIDE HIPPURIQUE		
			mg/kg / j	Valeur Cumulée mg / kg	
TB	1j	24	0,686	88	88
TV		24	0,686	83	83
250 mg/kg		24	0,665	146	146
500		24	0,640	139	139
1000		24	0,628	121	121
TB	2j	24	0,686	68	156
TV		24	0,686	55	138
250 mg/kg		24	0,664	74	220
500		24	0,647	79	218
1000		24	0,412*	160	281
TB	3j	24	0,687	79	235
TV		24	0,687	57	195
250 mg/kg		24	0,666	45	265
500		24	0,667	42	260
1000		24	0,414	147	428
TB	4j	24	0,670	42	277
TV		24	0,683	42	237
250 mg/kg		24	0,656	19	284
500		24	0,655	21	281
1000		24	0,416	29	457

\* mort d'un animal

Tableau VII

**ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE HIPPURIQUE**

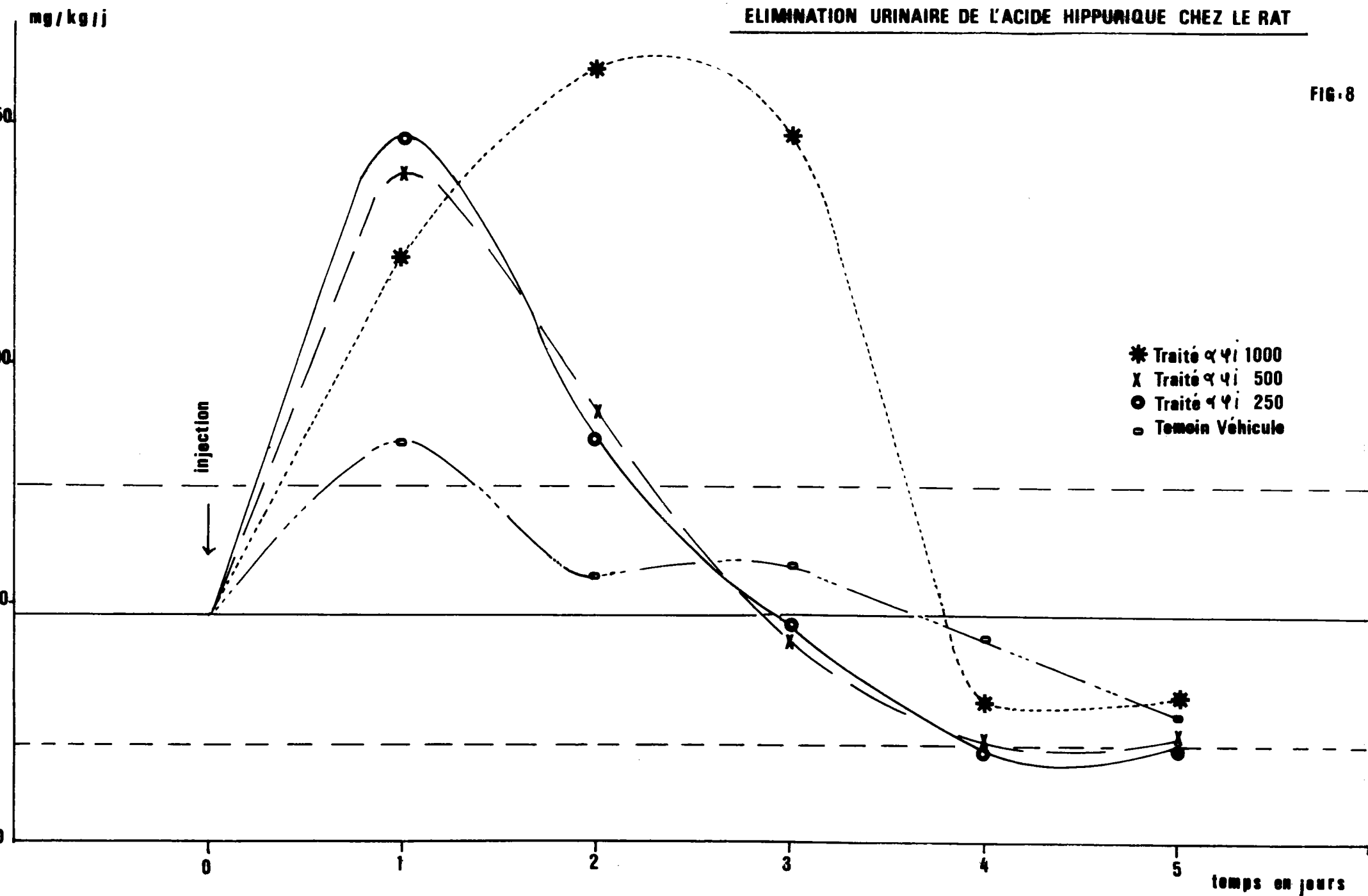
**chez le rat après injection d' $\alpha$ -phénylindole seul**

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	ACIDE HIPPURIQUE	
			mg/kg/j	Valeur Cumulée mg / kg
TB	5 j	0,665	45	322
TV		0,678	26	263
250 mg/kg		0,651	20	304
500		0,641	21	302
1000		0,416	30	487

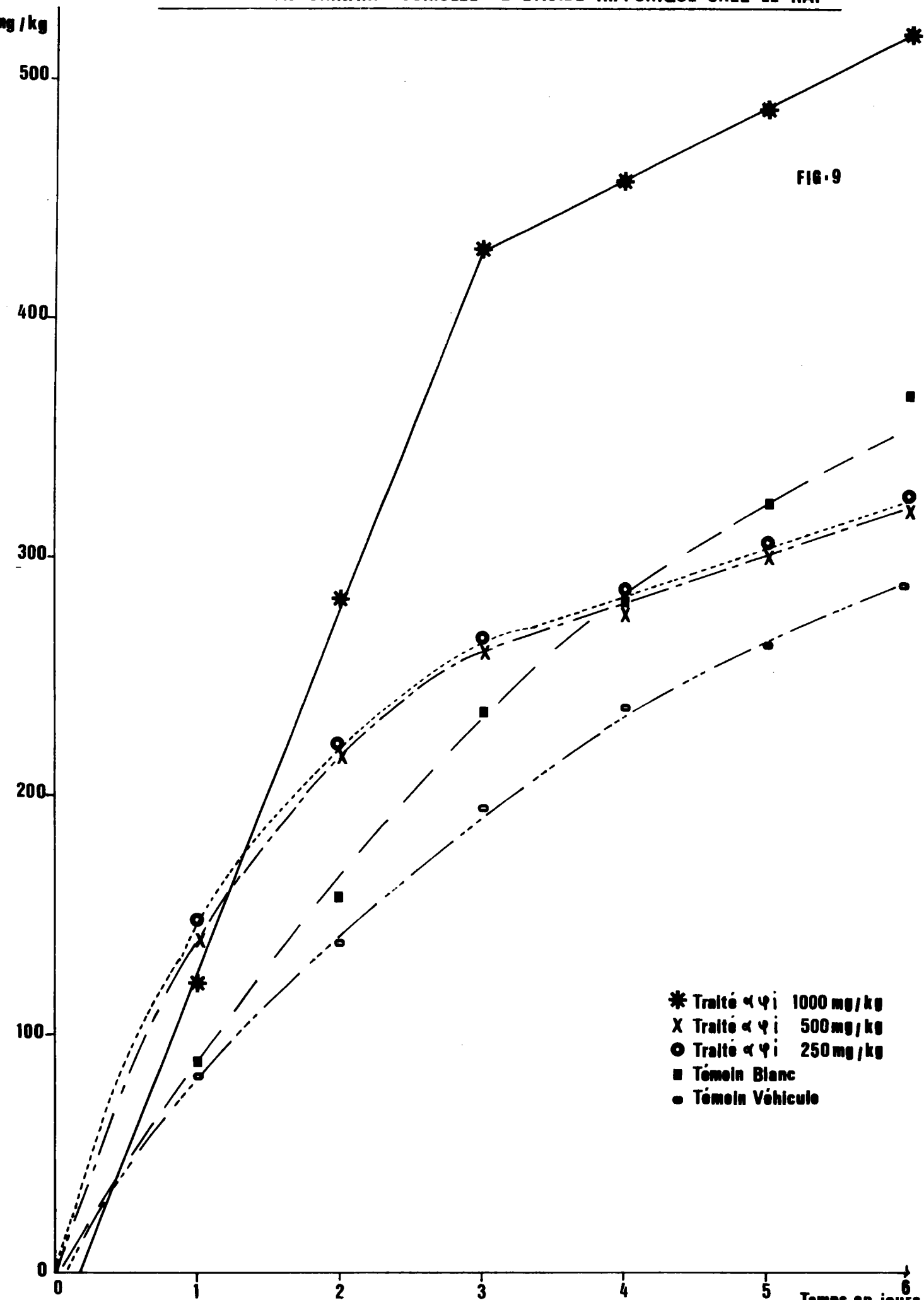
**Tableau VII bis**

ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE HIPPIRIQUE CHEZ LE RAT

FIG. 8



## ELIMINATION URINAIRE CUMULEE DE L'ACIDE HIPPIRIQUE CHEZ LE RAT



lation avec l'élimination des 5-hydroxyindoles urinaires.

Les coefficients de corrélation  $R^*$  pour les animaux traités à l'ophénylindole entre l'excrétion de l'acide hippurique et des 5-hydroxyindoles sont :

- pour les valeurs journalières ( $\text{mg kg}^{-1}\text{j}^{-1}$ )

$$R^* = 0,858 \quad \text{nombre de valeurs } N = 15$$

- pour les valeurs cumulées

$$R^* = 0,986 \quad N = 15$$

Il y a donc une relation directe entre l'excrétion de l'acide hippurique et le métabolisme du tryptophane.

Nous allons étudier l'action d'un prétraitement au tryptophane sur ces éliminations urinaires pour voir si cet acide aminé joue un rôle très important.

c) Elimination urinaire de l'acide hippurique et des 5-hydroxyindoles, chez le Rat prétraité au tryptophane

Nous avons prétraité des Rats avec une forte dose de tryptophane, puis 5 heures après ils ont reçu de l'ophénylindole. Voir chapitre I, paragraphe 6 (Expérimentation animale).

Sur ces animaux nous avons dosé les 5-hydroxyindoles, la sérotonine et l'acide hippurique urinaire.

- Acide hippurique (tableau n° X)

Les figures n° 10 et 11 laissent apparaître :

\* Une augmentation de l'excrétion de l'acide hippurique (environ X 10) dans les 5 premières heures qui suivent l'injection de



**ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE HIPPIRIQUE**

chez le rat prétraité au tryptophane

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	ACIDE HIPPIRIQUE	
			mg / kg / j	Valeur Cumulée mg / kg
TV eau + g.a. 5h	5	0,744	29	6
Tryptophane seul	5	0,669	288	60
" "	5	0,731	317	66
" "	5	1,407	235	49
TV eau + g.a. 1j	19	0,734	16	19
Tryptophane seul	19	0,745	47	97
" + labrafil	19	0,704	11	75
" + $\alpha \varphi I$	19	1,394	41,5	82
TV eau + g.a. 2j	24	0,733	15	34
Tryptophane seul	24	0,693	14	111
" + labrafil	24	0,456 *	11	86
" + $\alpha \varphi I$	24	0,911 *	130	212
TV eau + g.a. 4j	48	0,720	7	48
Tryptophane seul	48	0,699	35	181
" + labrafil	48	0,450	43	172
" + $\alpha \varphi I$	48	0,671 *	45	302
TV eau + g.a. 5j	24	0,761	34	82
Tryptophane seul	24	0,711	12	193
" + labrafil	24	0,460	85	257
" + $\alpha \varphi I$	24	0,682	92	394

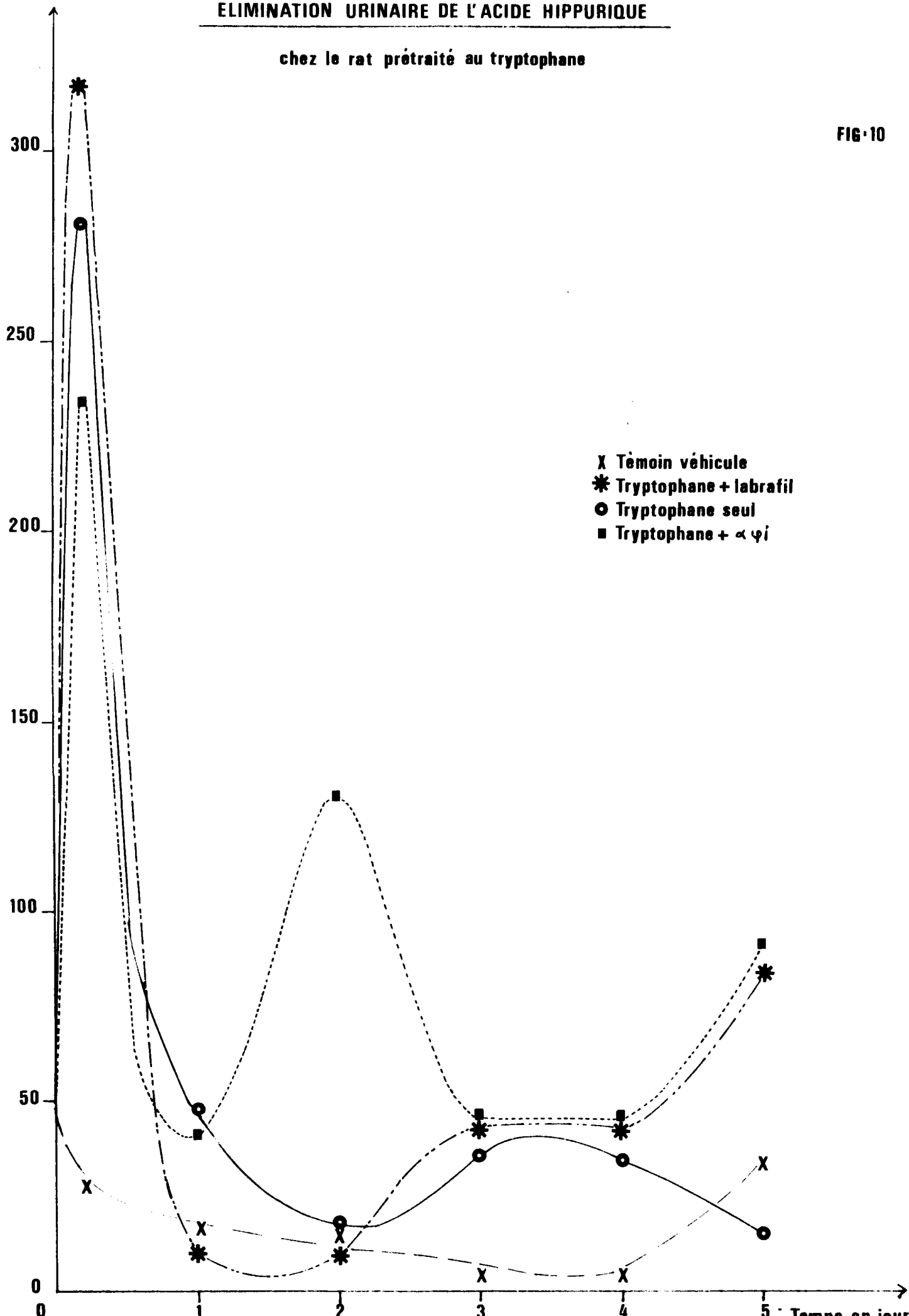
\* mort d'un animal

Tableau X

## ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE HIPPURIQUE

chez le rat prétraité au tryptophane

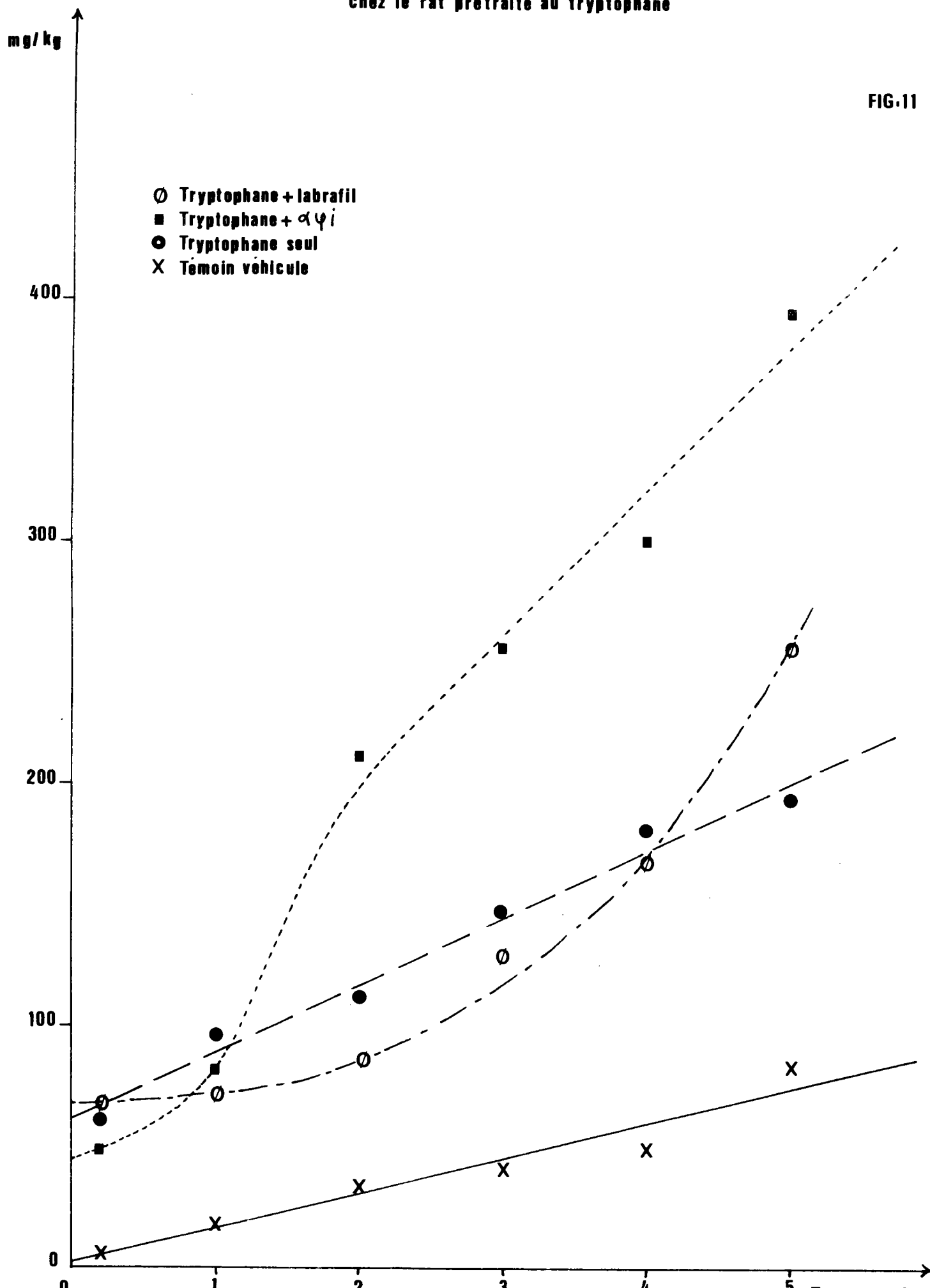
FIG. 10



## ELIMINATION URINAIRE CUMULEE DE L'ACIDE HIPPIRIQUE

chez le rat prétraité au tryptophane

FIG.11



tryptophane.

\* Une deuxième augmentation au cours du 2ème jour uniquement pour les animaux qui ont reçu, 5 heures après le tryptophane, de l'αphénylindole.

\* Une perturbation de l'excrétion due au labrafil, notamment au 5ème jour.

Les animaux prétraités au tryptophane qui reçoivent ensuite l'αphénylindole excrètent des quantités d'acide hippurique voisines de celles des animaux traités à l'αphénylindole seul, mais cette élimination est retardée de 24 h. comme celles des 5-hydroxyindoles que nous allons étudier maintenant.

- 5 hydroxyindoles (tableau n° VIII)

L'analyse de la figure n° 12 nous montre 2 faits :

\* une augmentation de l'élimination urinaire de ces substances dans les 5 premières heures qui suivent l'injection de tryptophane

\* une seconde augmentation au cours de la deuxième journée après l'administration d'αphénylindole.

La représentation des résultats en valeurs cumulées en fonction du temps figure n° 13 laisse apparaître 3 faits :

\* une élimination linéaire en fonction du temps pour les animaux témoins qui reçoivent le véhicule

\* une augmentation en 2 temps pour les animaux qui reçoivent le tryptophane (les 5 premières heures puis au cours de la 2ème journée)

\* une augmentation plus importante surtout au cours de la 2ème journée pour les animaux qui reçoivent le tryptophane, puis

ELIMINATION URINAIRE DES 5 - HYDROXYINDOLES

chez le rat prétraité au tryptophane

Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	5 HO-INDOLES	
			mg / kg / j <sup>1</sup>	Valeur cumulée mg / kg
TV eau + g.a. 5h	5	0,744	0,14	0,03
Tryptophane seul	5	0,669	3,90	0,81
" "	5	0,731	2,11	0,44
" "	5	1,407	2,52	0,52
TV eau + g.a. 1j	19	0,734	0,55	0,47
Tryptophane seul	19	0,745	0,43	1,15
" + labrafil	19	0,704	0,33	0,70
" + $\alpha \varphi I$	19	1,394	0,73	1,10
TV eau + g.a. 2j	24	0,733	0,45	0,92
Tryptophane seul	24	0,693	1,40	2,55
" + labrafil	24	0,456 *	0,74	1,44
" + $\alpha \varphi I$	24	0,911 *	4,00	5,10
TV eau + g.a. 4j	48	0,720	0,22	1,36
Tryptophane seul	48	0,699	0,71	3,97
" + labrafil	48	0,450	0,37	2,18
" + $\alpha \varphi I$	48	0,671 *	0,45	6,00
TV eau + g.a. 5j	24	0,761	0,28	1,64
Tryptophane seul	24	0,711	0,31	4,28
" + labrafil	24	0,460	0,21	2,39
" + $\alpha \varphi I$	24	0,682	0,96	6,96

\* mort d'un animal

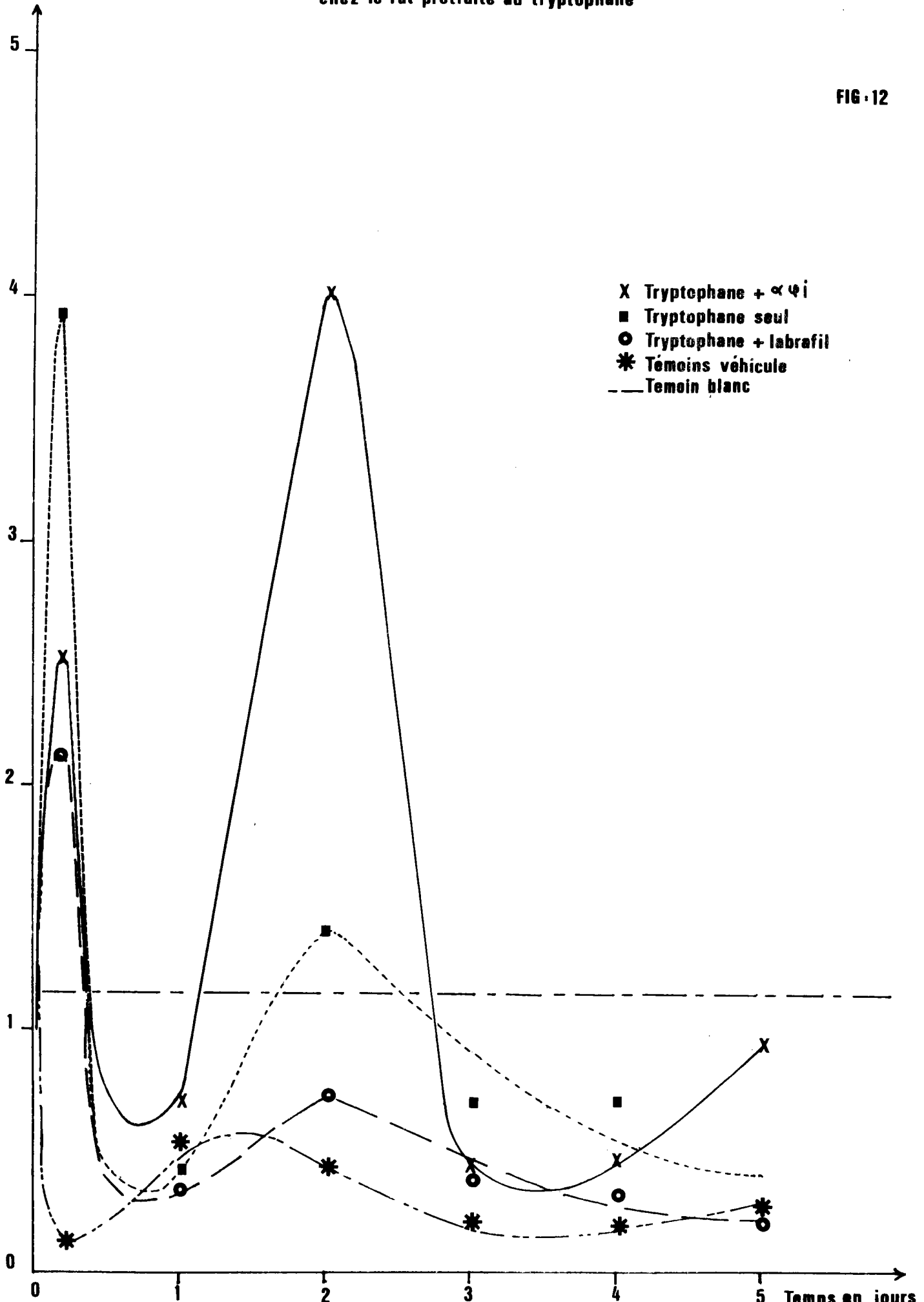
Tableau VIII

ELIMINATION URINAIRE DES 5-HYDROXYINDOLES

chez le rat prétraité au tryptophane

FIG. 12

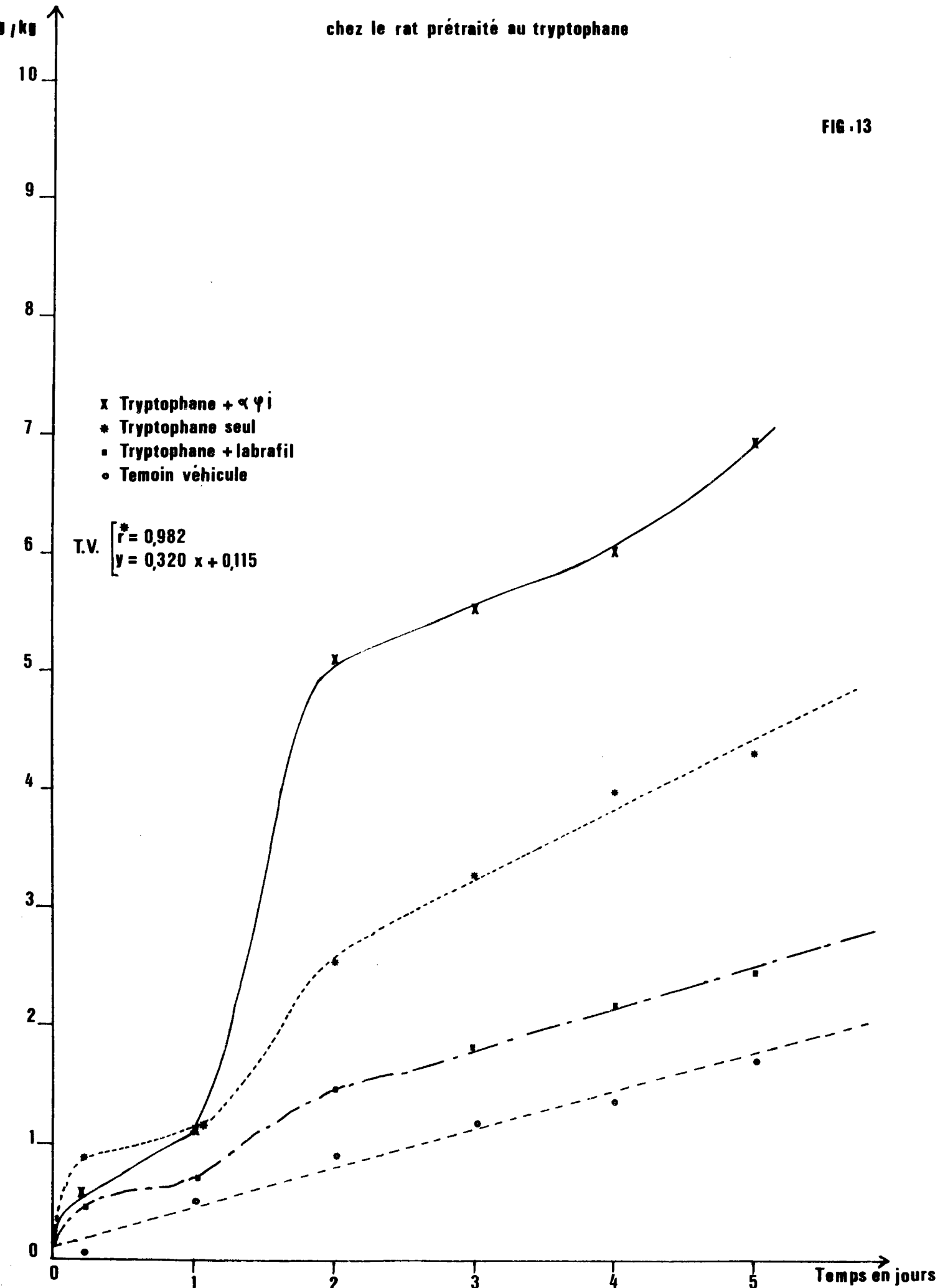
mg kg<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>



## ELIMINATION URINAIRE CUMULEE DES 5-HYDROXYINDOLES

chez le rat prétraité au tryptophane

FIG. 13







chez le rat prétraité au tryptophane

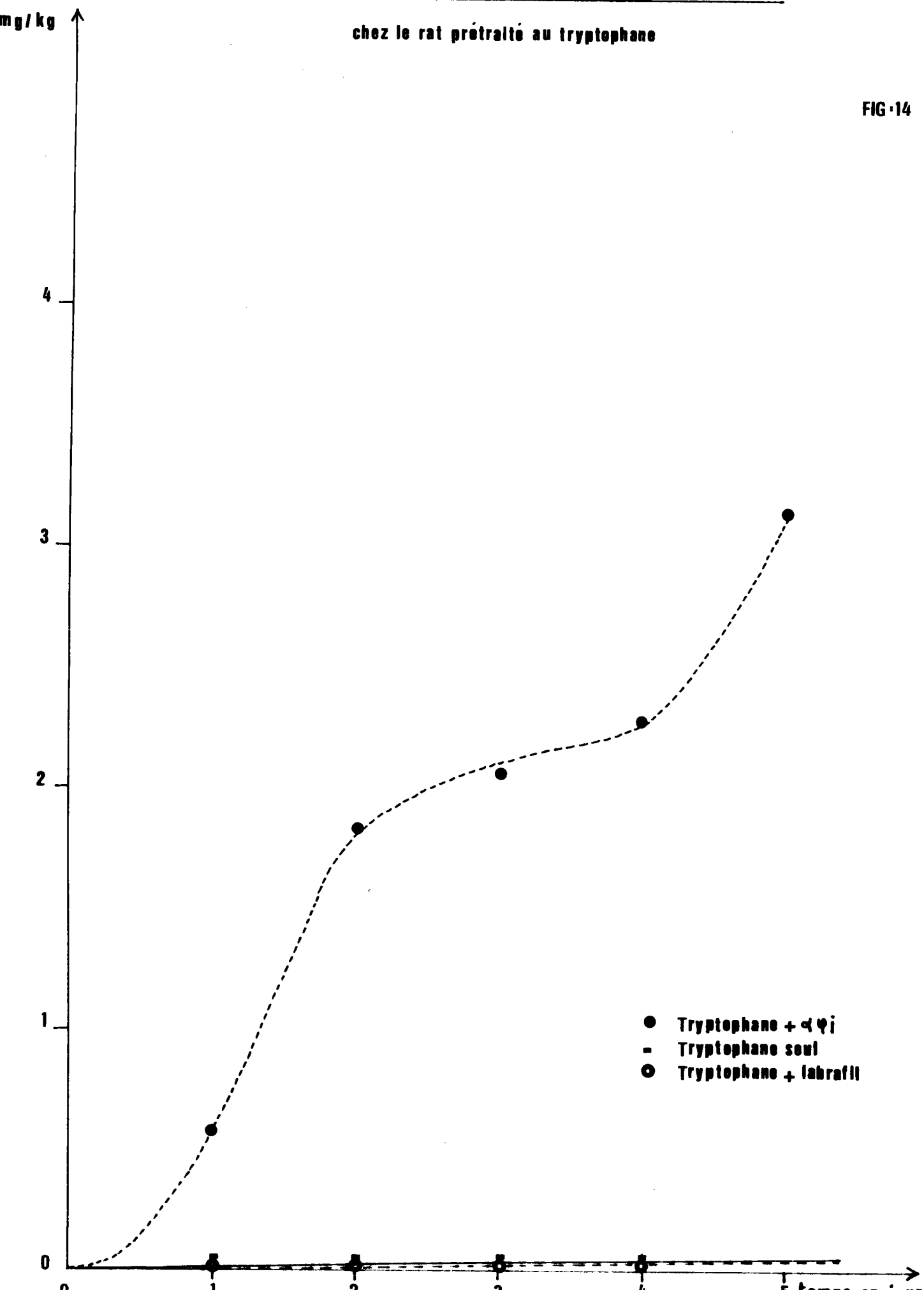
Traitement des animaux	Intervalle de temps - H	Poids des rats - kg	SEROTONINE	
			mg / kg / j	Valeur cumulée mg / kg
TV eau + g.a. 5h	5	0,744		
Tryptophane seul	5	0,669	0,043	0,009
" "	5	0,731	0,034	0,007
" "	5	1,407	0,015	0,003
TV eau + g.a. 1j	19	0,734		
Tryptophane seul	19	0,745	0,010	0,017
" + labrafil	19	0,704	0,005	0,011
" + $\alpha \varphi I$	19	1,394	0,57	0,585
TV eau + g.a. 2j	24	0,733		
Tryptophane seul	24	0,693	0	0,017
" + labrafil	24	0,456 *	0	0,011
" + $\alpha \varphi I$	24	0,911 *	1,27	1,85
TV eau + g.a. 4j	48	0,720		
Tryptophane seul	48	0,699	0,001	0,018
" + labrafil	48	0,450	0	0,011
" + $\alpha \varphi I$	48	0,671 *	0,21	2,27
TV eau + g.a. 5j	24	0,761		
Tryptophane seul	24	0,711	0,005	0,023
" + labrafil	24	0,460	0,007	0,018
" + $\alpha \varphi I$	24	0,682	0,88	3,15

\* mort d'un animal

Tableau IX

**ELIMINATION URINAIRE CUMULEE DE LA SEROTONINE****chez le rat prétraité au tryptophane**

FIG. 14



- Acide hippurique

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les Rats témoins et les Rats traités dans l'excrétion de l'acide hippurique après 3 ou 6 mois d'intoxication à faible ou forte dose.

Nous avons effectué, le test de *STUDENT* pour comparer les valeurs moyennes des excrétions urinaires de l'acide hippurique après 3 mois d'intoxication. (tableau n° XII).

Nous obtenons pour la faible dose comparée au témoin une valeur de  $t = 0,98$ .

Pour la forte dose  $t = 0,05$ .

Le nombre de degrés de liberté est de 12 dans les 2 cas. La table de *STUDENT* nous donne un "t" égal à 2,18 pour une probabilité de 95 %.

Dans les 2 cas les moyennes observées ne sont pas significativement différentes de la population témoin.

- 5-hydroxyindoles

\* Excrétion chez les animaux témoins après 3 mois (tableau n° XI)

Nous observons que cette élimination (figure n° 15) est un phénomène cyclique dont la période se situe aux environs de 24 heures. Le maximum se trouve entre 9 et 15 heures et le minimum entre 3 et 6 heures. Ce phénomène est à rapprocher de deux faits connus.

- HARDELAND R. et col., 1969 (43) chez le Rat, puis RAPOFORT J.M. et col., (83) chez la Souris démontrent le rythme circadien de la tryptophanepyrrolase.

**ELIMINATION URINAIRE DE L'ACIDE HIPPIRIQUE CHEZ LE RAT**

après 3 mois d'intoxication par inhalation

Etude sur une semaine		Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche	Lundi	Mardi	Moyenne Ecart type
Valeur Journalière en mg kg <sup>-1</sup> J <sup>-1</sup>	T B	34,5	38,9	52,9	45,8	75,2	35,5	105	55,4 ± 26,0
.. ..	Faible Dose	28,2	38,5	41,9	55	44,4	54,9	52,8	45,1 ± 9,9 *t = 0,98
.. ..	Forte Dose	25,0	50,9	40,0	79,4	36,3	46,2	105	54,7 ± 27,8 *t = 0,05
Valeur Cumulée en mg /kg	T B	34,5	73,4	126,3	172,1	247,3	282,8	378,8	
.. ..	Faible Dose	28,2	66,7	108,6	163,6	208,0	262,9	315,7	
.. ..	Forte Dose	25,0	75,9	115,9	195,3	231,6	277,8	382,8	

\*t = test de S.

**ELIMINATION URINAIRE DES 5-HYDROXYINDOLES CHEZ LE RAT**

après 3 mois d'intoxication par inhalation

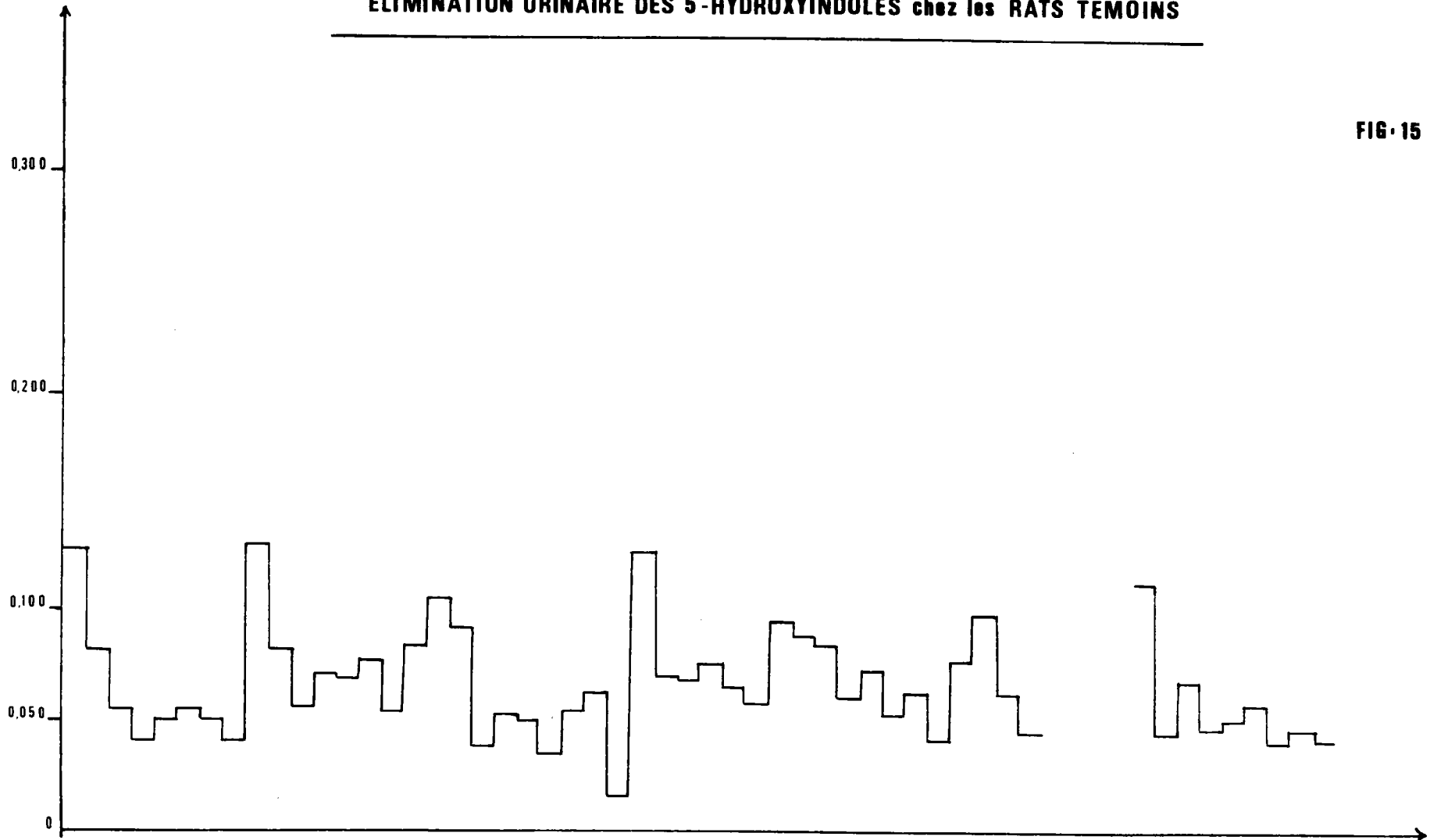
Etude sur une semaine		Mercredi	Jepdi	Vendredi	Samedi	Dimanche	Lundi	Mardi	Moyenne Ecart type
Valeur Journaliere en mg kg <sup>-1</sup> J <sup>-1</sup>	T B	0,505	0,622	0,482	0,576	0,544	0,320	0,384	0,490 ± 0,106
" "	Faible Dose	0,680	0,311	0,725	0,499	0,613	0,423	0,545	0,542 ± 0,145 *t=0,766
" "	Forte Dose	1,068	1,325	0,833	0,764	0,427	0,466	0,698	0,797 ± 0,319 *t=2,42
Valeur Cumulee en mg/kg	T B	0,505	1,127	1,609	2,185	2,729	3,049	3,433	
" "	Faible Dose	0,680	0,991	1,716	2,215	2,828	3,251	3,796	
" "	Forte Dose	1,068	2,393	3,226	3,990	4,417	4,883	5,581	

Tableau XI

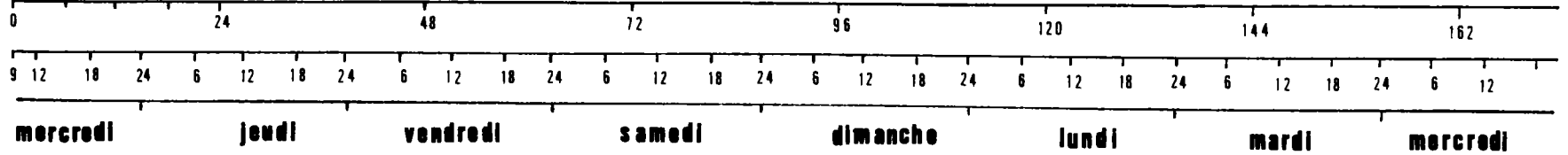
# ELIMINATION URINAIRE DES 5-HYDROXYINDOLES chez les RATS TEMOINS

FIG. 15

mg/kg de rats  
pour 3 heures



temps en heures  
heure legale



jours

mercredi

jeudi

vendredi

samedi

dimanche

lundi

mardi

mercredi

- COSTIL J. et col. en 1973 (22) montrent que l'élimination du 5-hydroxyindole acétate chez l'Enfant suit un rythme nictéméral. L'élimination est élevée entre 8 et 20 heures, puis elle diminue de moitié entre 20 et 8 heures.

Comme lors de notre étude en intoxication aiguë, chez les Rats témoins l'élimination urinaire des 5-hydroxyindoles est linéaire en fonction du temps en prenant comme base 24 heures (figure n° 16). Le coefficient de corrélation pour cette droite est de :  $R = 0,9954$ . Le calcul de la régression linéaire nous donne l'équation suivante :

$$y = 0,491 x + 0,127.$$

\* Excrétion des 5-hydroxyindoles après trois mois d'intoxication

- Dose faible (figures n° 16 et 17)

Nous observons une légère augmentation en fin de semaine, le vendredi. Le tableau n° XI nous donne la valeur moyenne de cette élimination ainsi que la valeur du test de STUDENT par rapport aux témoins  $t = 0,766$  pour 12 degrés de liberté. La table de STUDENT nous donne une valeur de "t" de 2,18 avec une probabilité de 95 %. Les 2 échantillons observés ne sont donc pas significativement différents.

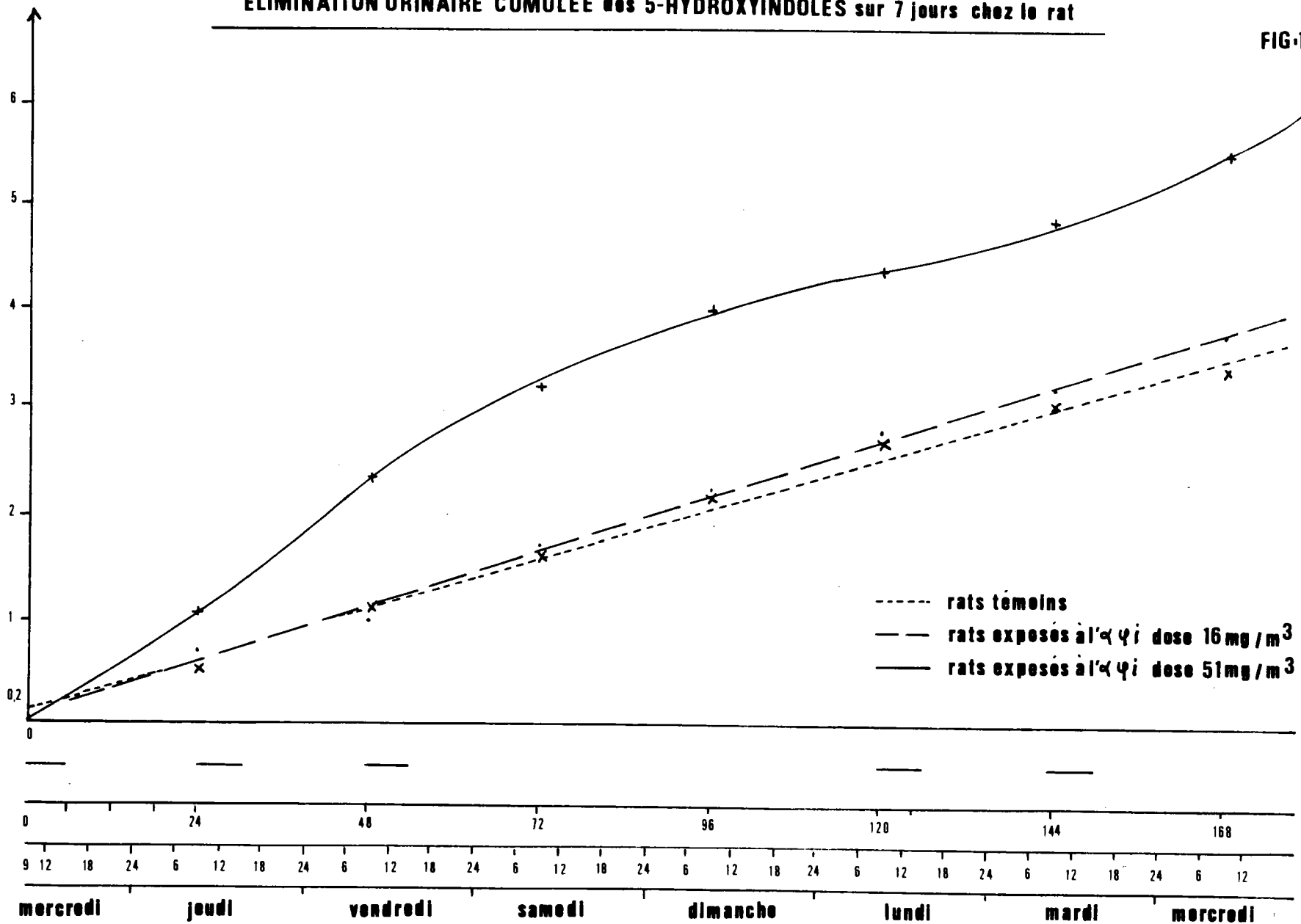
- Dose forte (figures n° 16 et 18)

Pendant le dimanche et le lundi cette élimination est identique à celle des témoins. Elle s'accroît ensuite à partir du mardi tout au long de la semaine jusqu'au vendredi. Si nous effectuons la moyenne des valeurs journalières (tableau n° XI) et que nous comparons cette valeur à celle des témoins, nous obtenons une valeur de "t" = 2,42. Les 2 échantillons observés sont cette fois significativement différents,  $2,42 > 2,18$ . L'élimination apparaît en général dès la fin de l'intoxication et avec une journée de retard.

**ELIMINATION URINAIRE CUMULEE des 5-HYDROXYINDOLES sur 7 jours chez le rat**

FIG.16

mg / kg pour 24 h



temps en heures  
heure legale

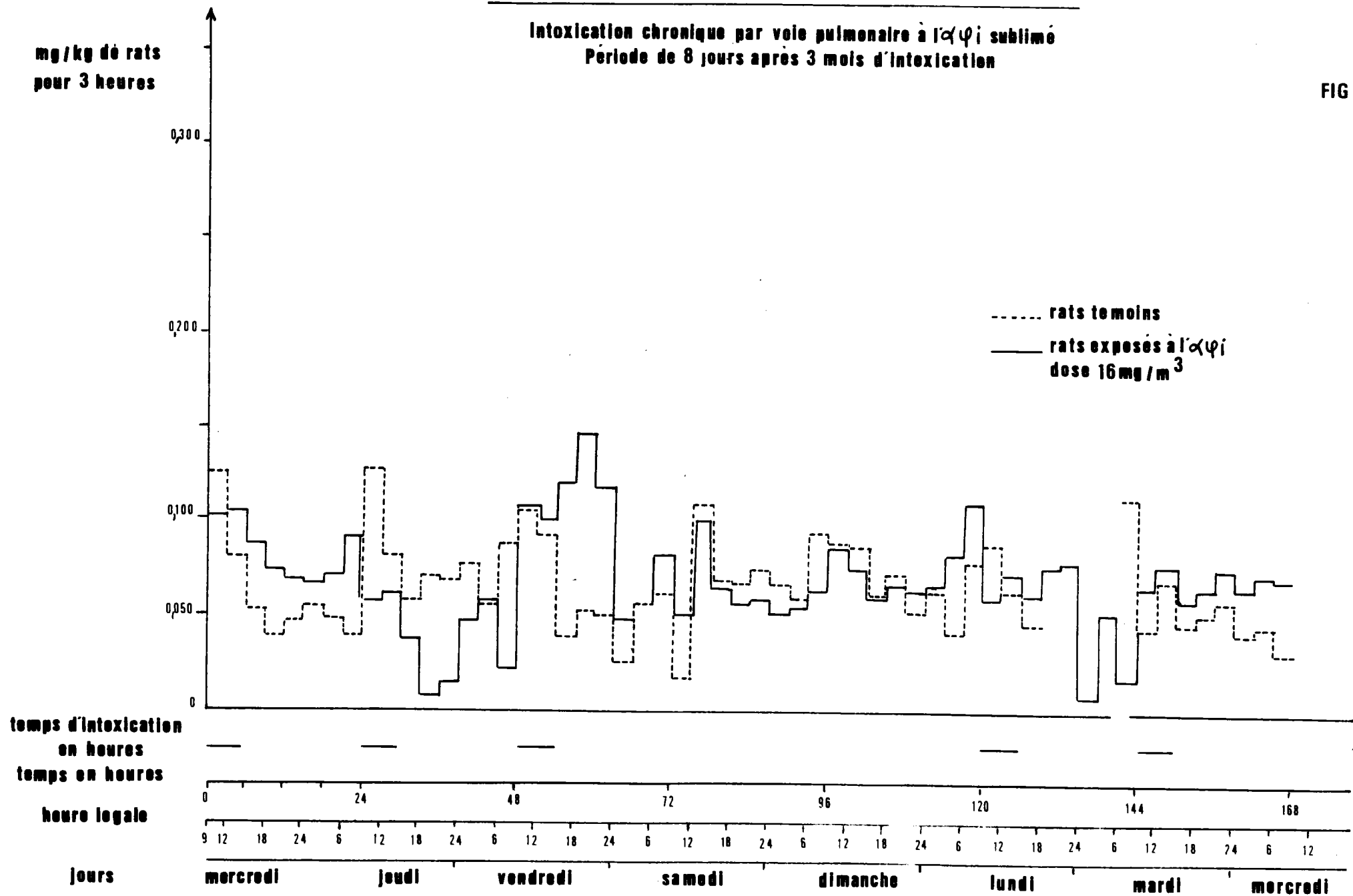
jours mercredi jeudi vendredi samedi dimanche lundi mardi mercredi



**ELIMINATION URINAIRE des 5-HYDROXYINDOLES chez le rat**

**Intoxication chronique par voie pulmonaire à  $\alpha\psi$  i sublimé  
Période de 8 jours après 3 mois d'intoxication**

**FIG 17**

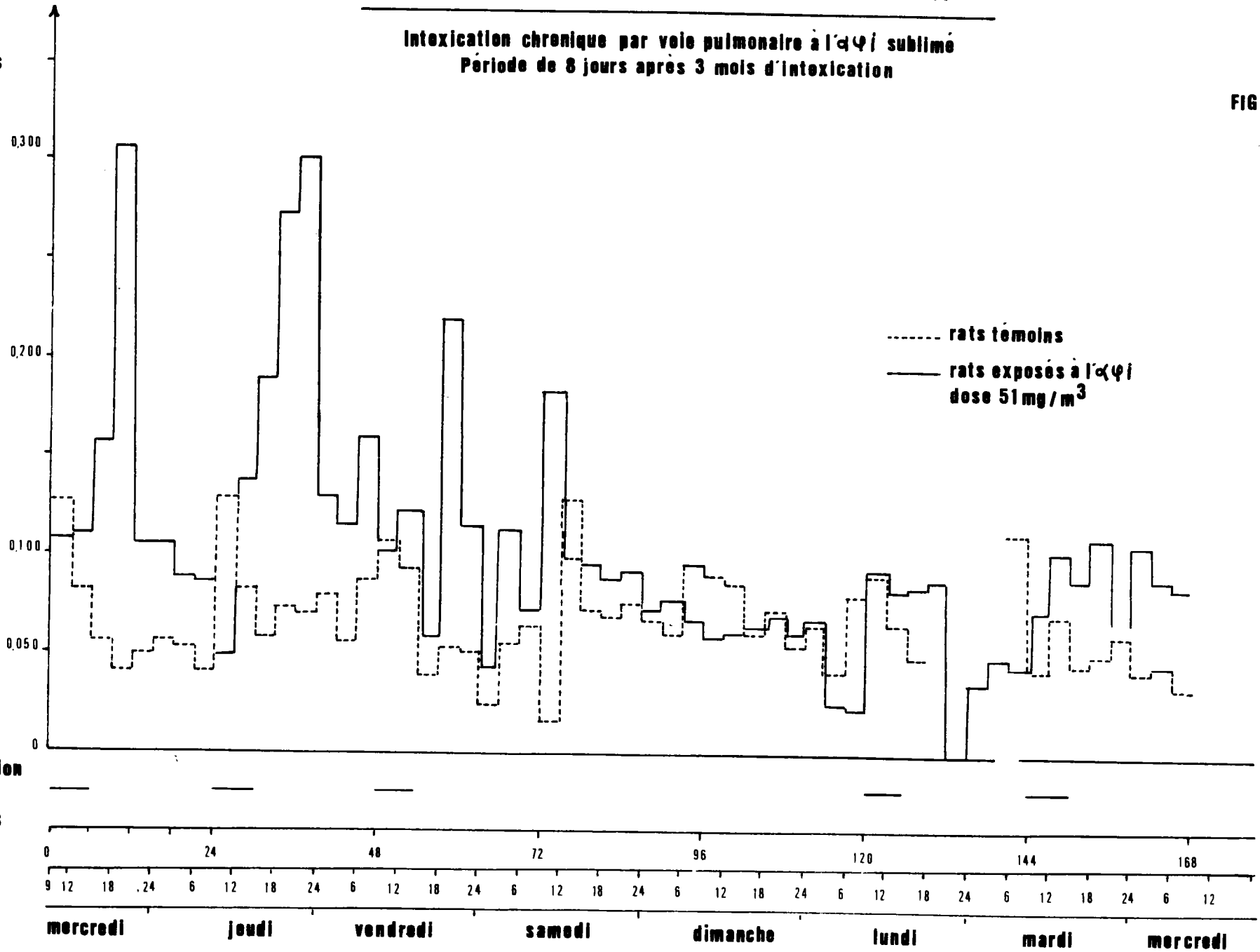


# ELIMINATION URINAIRE des 5-HYDROXYINDOLES chez le rat

Intoxication chronique par voie pulmonaire à l' $\alpha\psi$  sublimé  
Période de 8 jours après 3 mois d'intoxication

FIG-18

mg/kg de rats  
pour 3 heures



\* Excrétion des 5-hydroxyindoles après 6 mois d'intoxication

- Dose forte : nous observons une augmentation de l'élimination urinaire des 5-hydroxyindoles (figure n° 19).

L'αphénylindole en intoxication chronique par inhalation chez le Rat entraîne : une élimination urinaire accrue et cyclique des 5-hydroxyindoles à la forte concentration. Quant à l'élimination urinaire de l'acide hippurique, il est très difficile de conclure. La dispersion obtenue d'un jour à l'autre, même chez les témoins est beaucoup trop importante.

## ELIMINATION URINAIRE DES 5-HYDROXYINDOLES chez le RAT

Intoxication chronique par voie pulmonaire à  $\alpha\phi$ i sublimé

Période de 2 jours après 6 mois

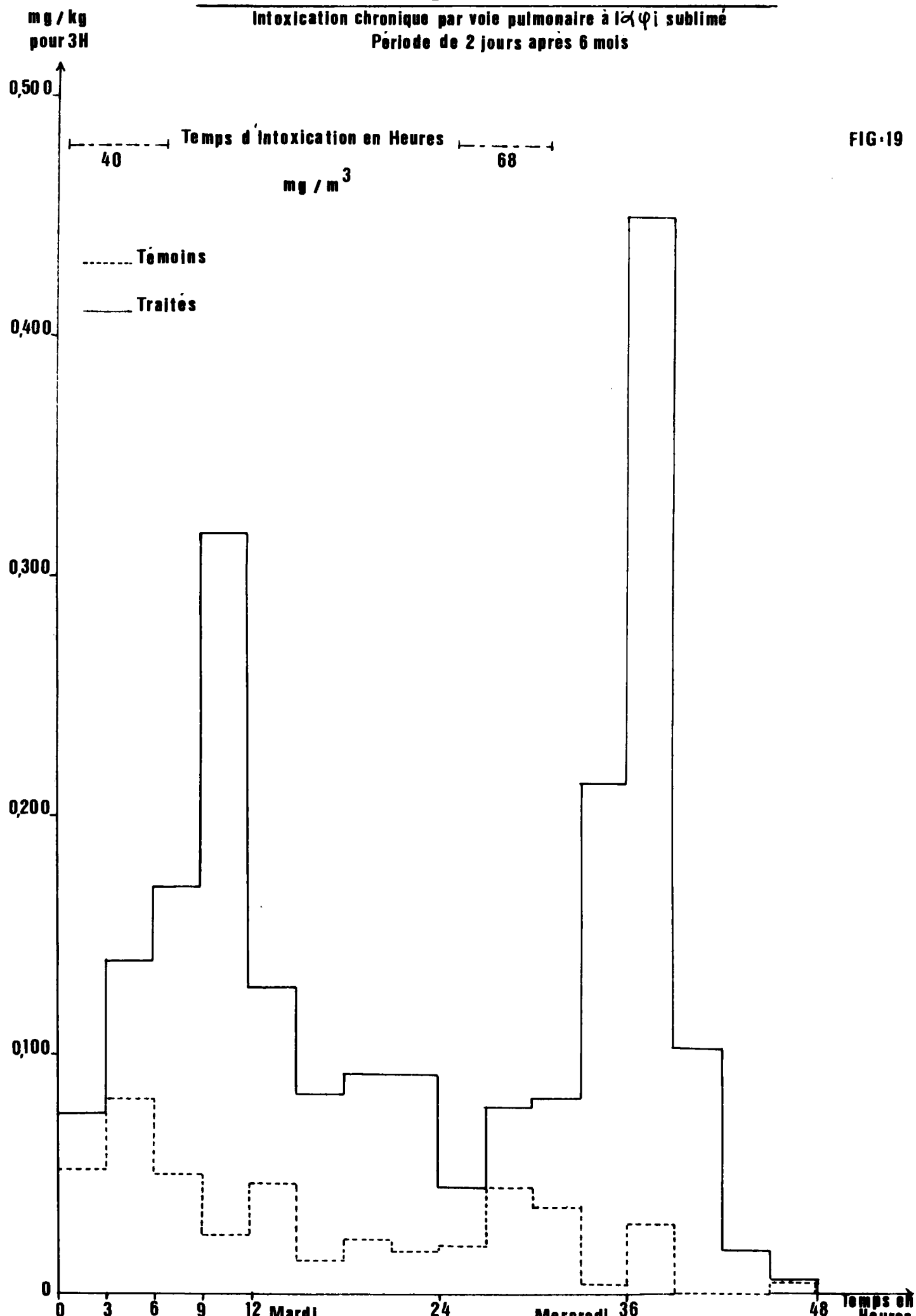


FIG.19

## **CHAPITRE III**

### **DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS**

## DISCUSSIONS et CONCLUSIONS

### - Etude sur le Lapin

L'excrétion des noyaux indoles urinaires apparaît beaucoup plus élevée que la quantité de toxique inhalé, même si une partie supplémentaire de toxique est ingérée par la voie *per os*. Ces noyaux indoles proviennent selon toute vraisemblance pour une part d'un métabolisme endogène perturbé : probablement le métabolisme du tryptophane.

### - Etude chez le Rat

#### 1°) Intoxication aiguë

*Bilan sanguin*

Seule la baisse de la cholinestérase sérique est à noter.

*Excrétions urinaires*

L'élimination urinaire de l'acide hippurique au premier jour après l'administration d'αphénylindole est multipliée par 3 environ quelle que soit la dose administrée.

L'élimination des 5-hydroxyindoles est multipliée par 9 pour les doses de 250 et 500 mg/kg et par 15 pour la dose de 1.000 mg/kg.

Nous remarquons que le taux de ces composés revient à la valeur normale après 3 ou 4 jours, il y a donc une régulation qui intervient. Ceci est probablement du au taux d'aphénylindole sanguin, qui après 3 ou 4 jours doit être très faible (voir IIIème partie - cinétique sanguine).

Pour la dose de 1.000 mg kg<sup>-1</sup>, nous observons une élimination supérieure aux 2 autres.

Remarquons qu'après une injection unique d'aphénylindole le taux de mortalité est le suivant :

- 1 mort sur 3 animaux au 1er jour à la dose de 1.000 mg/kg;
- 1 mort sur 3 animaux au 6ème jour à la dose de 500 mg/kg.

Après une injection de tryptophane (1.000 mg/kg), nous observons 3 faits dans les 5 heures qui suivent.

- Une élimination accrue de l'acide hippurique et des 5-hydroxyindoles urinaires.

- Aucune augmentation de l'élimination de la sérotonine.

5 heures après : nous injectons de l'aphénylindole (500 mg/kg). Nous observons :

- . une augmentation de l'élimination de l'acide hippurique urinaire plus brève que lors de l'injection de l'aphénylindole seul;

- . une augmentation moins importante des 5-hydroxyindoles;

- . une augmentation de l'élimination de la sérotonine urinaire, sensiblement identique à celle de l'aphénylindole seul à la même dose.

- Un taux de mortalité supérieur à l'αphénylindole seul pour la même dose.

L'injection de tryptophane (1.000 mg/kg) augmente donc la toxicité de l'αphénylindole.

Le prétraitement au tryptophane active la tryptophane pyrrolase (voir IIème partie) et augmente ainsi la métabolisation vers la voie de la cynurénine. Ce qui retarde et diminue la sortie vers la voie des 5-hydroxyindoles.

## 2°) Intoxication chronique

Le taux de tryptophane libre après intoxication à l'αphénylindole dépend d'une part de la dose de toxique inhalée et, d'autre part, de la concentration normale de tryptophane lié dans le sérum (voir tableau n° XV). Celle-ci varie beaucoup d'une espèce à l'autre.

Exemples : Rat et Souris ~ 18 µg/ml - Cobaye ~ 11,3 µg/ml - Hamster ~ 7,3 µg/ml - Chat ~ 5,8 µg/ml d'après BADAUWY A.A.B. et EVANS M., 1976 (6).

Faible dose : Légère action de l'αphénylindole sur le métabolisme du tryptophane en fin de semaine. Probablement à partir du moment où les sites libres de l'albumine sont saturés par l'αphénylindole (voir IIème partie, chapitre I).

Forte dose : Les sites libres de l'albumine sont saturés par l'αphénylindole en 24 h.. En effet l'augmentation de l'élimination urinaire des métabolites du tryptophane (5-hydroxyindoles) apparaît avec un retard de 24 h. par rapport au départ de l'intoxication.



**CONCENTRATION DE TRYPTOPHANE DANS LE SANG ET LE FOIE**

HOMME	RAT	FOIE $\mu\text{g g}^{-1}$			PLASMA ou SERUM $\mu\text{g ml}^{-1}$						REFERENCE
					Tryptophane Libre			Tryptophane Total			
		m	$\pm \sigma$	N	m	$\pm \sigma$	N	m	$\pm \sigma$	N	
	○	10,23	0,46	8	1,72	0,08	8	18,27	0,84	8	6
	○	13,1	2,2	8				22,5	2,1		25
	○							16,8			29
○					1,73	0,37	21	17,08	3,77	21	11
○					1,39	0,07	26	12,4	0,30	26	21
○								11,0	1,3		25
○					2,12	0,67	16	11,15	3,81	16	33
○					3,07	0,53	9	13	2,98	9	35

m = moyenne

$\sigma$  = écart type

N = nombre de valeurs

Tableau XV

*Nous observons :*

- 1 - une augmentation de l'élimination des 5-hydroxyindoles urinaires.*
- 2 - pas d'augmentation significative de l'acide hippurique (dispersion trop importante). Lors de l'intoxication chronique, l'action du tryptophane au niveau de la phénylalanine hydroxylase est probablement moins importante que lors d'une intoxication aiguë. (taux de tryptophane libre plus faible).*

## **II<sup>eme</sup> PARTIE**

# **ACTION DE L' $\alpha$ - PHENYLINDOLE SUR LE METABOLISME DU TRYPTOPHANE**



## **ETUDE DE L'INHIBITION DE LA MONOAMINE OXYDASE**

# **CHAPITRE I**

## **ACTION DE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE SUR LE METABOLISME DU TRYPTOPHANE**

ACTION DE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE  
SUR LE METABOLISME DU TRYPTOPHANE

Le tryptophane dont la source principale est constituée par l'alimentation, subit deux destinées principales, DREUX C. et DELAUNEUX B., 1964 (32). La plus importante normalement 90 % est constituée par la synthèse des protéines, le reste est dégradé selon 4 voies (fig. 20).

2 voies mineures : l'une vers l'indole acétate via la tryptamine, l'autre vers l'indole lactate via l'indole pyruvate. Ces composés indoliques sont produits au niveau des tissus, mais une source importante apparaît au niveau des bactéries intestinales, WEISSBACH H. et col. en 1959 (108).

2 voies principales : la plus importante conduit à la cynurénine et au-delà aux acides cynurénique, xanthurénique et nicotinique et à l'acétyl Co A (75 % de la voie catabolique).

La deuxième voie conduit à la sérotonine qui est transformée en différents composés (l'acide 5-hydroxyindole acétique, la 5-méthoxytryptamine et la N-acétylsérotonine). Nous étudierons plus précisément ces 2 voies du catabolisme du tryptophane, qui sont les plus importantes (cynurénine et sérotonine).

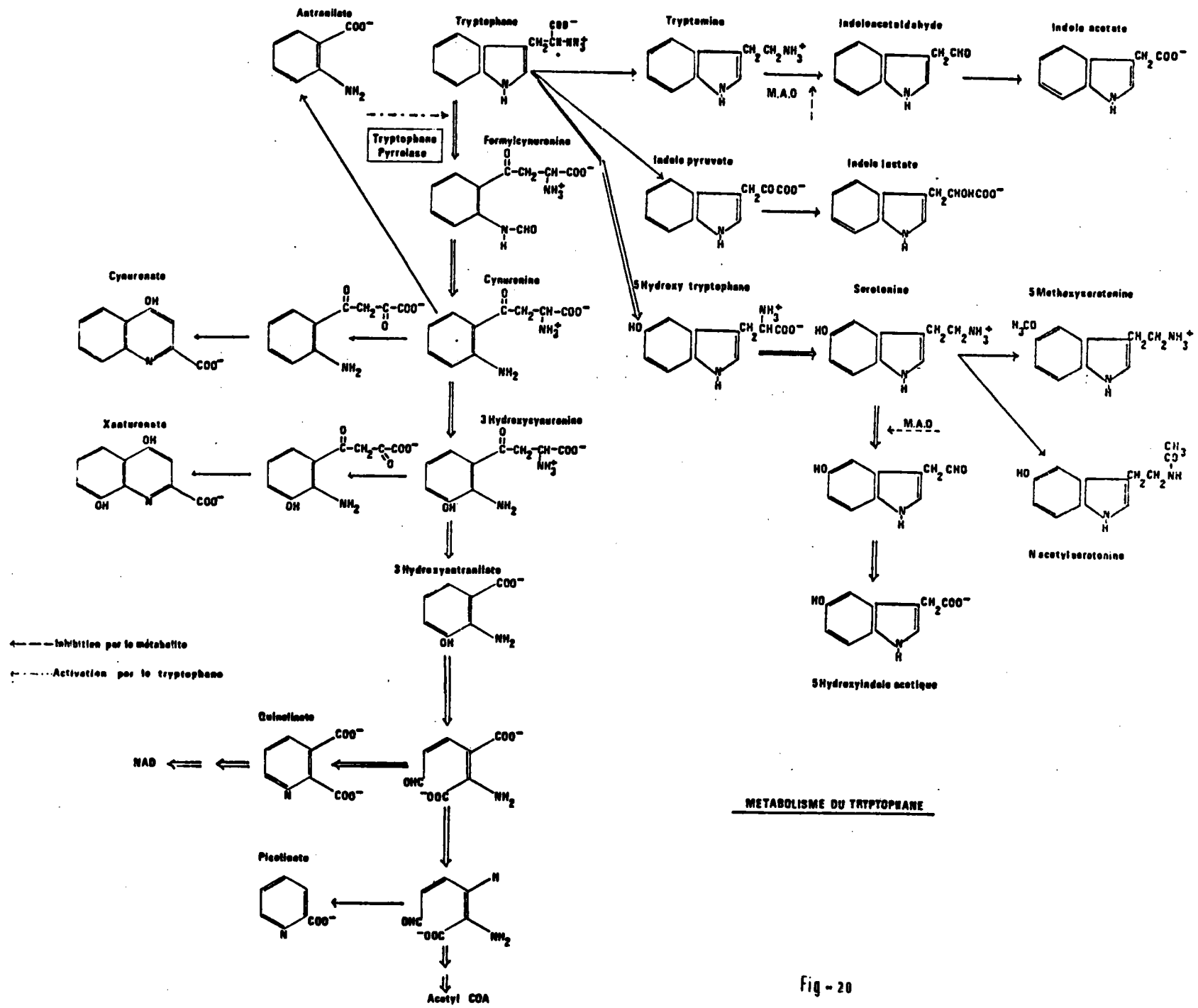


Fig - 20

## I.1 Etude du métabolisme du tryptophane

### 1°) Voie de la cynurénine

Cette voie métabolique est très importante, elle permet d'une part la détoxification du tryptophane et d'autre part la biosynthèse de N.A.D. via l'acide nicotinique, SCRIVER C.R. et ROSENBERG L.E., 1973 (94).

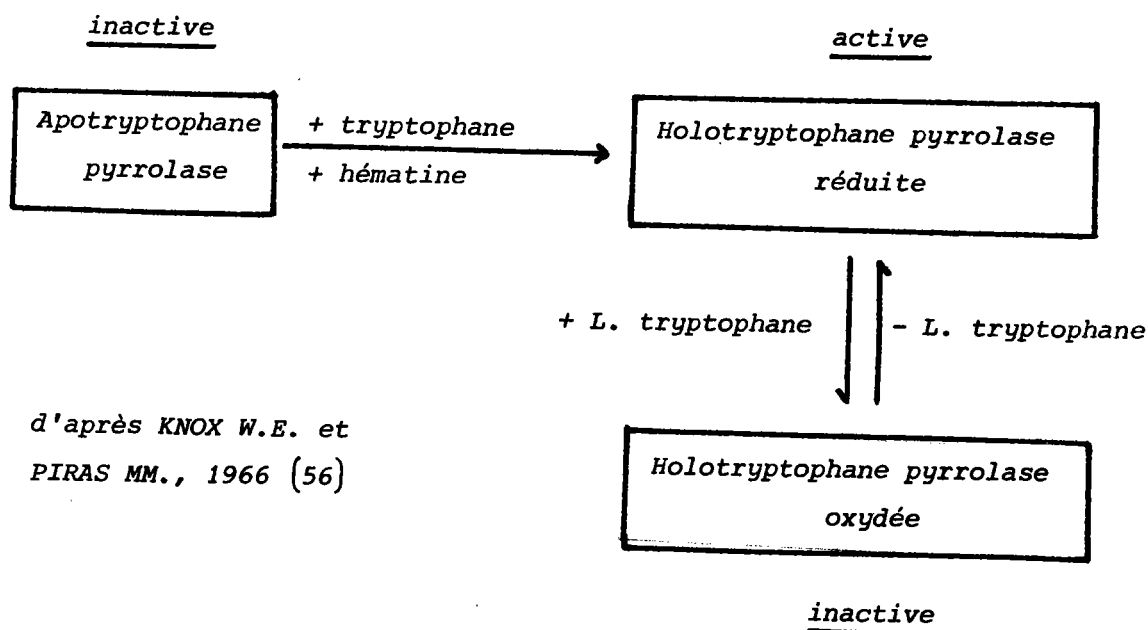
Le premier enzyme qui intervient au départ de cette voie est : la tryptophane pyrrolase (E.C. 1.1.3...){L. tryptophane oxygène 2-3 oxydo réductase}.

C'est un enzyme du cytosol hépatique dépendant de l'hème, qui catalyse la conversion du L. tryptophane en formylcynurénine. Il est très important, notamment parce qu'il agit sur la concentration libre du tryptophane sérique. Nous avons réalisé une étude bibliographique de cet enzyme, en décrivant toutes ses spécifications.

Spécificités : KNOX W.E. et MEHLER A.H., en 1950 (53) indiquent sa spécificité avec certains dérivés du tryptophane.

Avec l'acétyltryptophane aucune amine n'est formée. La tryptamine, l'acide indole 3-acétique, l'acide indole 3-propionique, l'acide indole 3-butyrique, le scatole, l'oxindole et l'isatin sont tous inactifs.

Différentes formes : la tryptophane pyrrolase existe sous trois formes.



d'après KNOX W.E. et  
PIRAS MM., 1966 (56)

Dans les essais *in vitro* pour doser l'ensemble de l'holo enzyme, KNOX W.E. et OGATA M., 1965 (55), puis KNOX W.E. et PIRAS M.M., en 1966 (56) ajoutent de l'acide ascorbique comme agent réducteur pour obtenir l'holo enzyme sous sa forme active. BADAWY A.A.B. et EVANS M., 1976 (6) recherchent les différentes formes de tryptophane pyrrolase chez différentes espèces animales. Toutes les espèces testées présentent une activité due à l'holo enzyme (Rat, Souris, Porc, Chat, Cobaye, Hamster, Mouton, Lapin, ...). Parmi ces espèces, certaines possèdent une activité due à l'apo enzyme (activité plus élevée en présence d'hématine), nous trouvons notamment le Rat, le Porc et probablement l'Homme. Par contraste BADAWY A.A.B., en 1977 (5) précise qu'il n'y a aucune activité apo-enzyme tryptophane pyrrolase chez le Cobaye, le Hamster, le Chat, le Lapin et le Mouton.

#### Localisation :

KNOX W.E. et MEHLER A.H., en 1951 (54) précisent que la tryptophane pyrrolase est localisée au niveau hépatique.



Activation :

SCHIMKE R.T. et col., en 1965 (92) décrivent deux types d'activation de la tryptophane pyrrolase :

- par les corticostéroïdes, qui augmentent la vitesse de synthèse de l'enzyme (apo enzyme);
- par le tryptophane, qui stabilise l'holo enzyme et qui diminuerait sa vitesse de dégradation.

BADAWY A.A.B., en 1977 (5) cite un autre mode d'activation chez le Rat par le cofacteur de l'enzyme, l'hème.

Les espèces, qui ne possèdent pas d'apo enzyme, sont plus sensibles à la toxicité du tryptophane, car chez elles le mécanisme d'induction hormonale de la tryptophane pyrrolase (apo enzyme) hépatique est absent (6).

De nombreux travaux ont été effectués pour étudier l'activation de la tryptophane pyrrolase surtout chez le Rat (49, 85, 50, 76, 51).

Une activation du même type que celle du tryptophane peut être obtenue par certains composés (ex.: salicylate) qui déplace le tryptophane de son site de liaison à l'albumine. BADAWY A.A.B. et EVANS M., en 1974 (7) obtiennent une activation de la tryptophane pyrrolase chez le Rat avec une dose de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de salicylate. Ils montrent également qu'une dose non activante de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de salicylate rend une dose inactive de tryptophane  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  capable d'augmenter l'activité de la tryptophane pyrrolase.

Rythme circadien :

HARDELAND R. et RENSING L., en 1969 (43) montrent, le rythme circadien de la tryptophane pyrrolase hépatique chez le Rat et les variations obtenues lors de l'induction de l'enzyme par l'hydrocortisone

ou son substrat.

RAPOPORT J.M. et col., en 1966 (83) déterminent le rythme circadien de la tryptophane pyrrolase hépatique chez la Souris.

Inhibition :

BADAWY A.A.B. et EVANS M., en 1976 (6) obtiennent une inhibition de la tryptophane pyrrolase (holo enzyme) hépatique de Rat *IN VITRO* avec le 2,2-pyridyl et le salicylate.

BADAWY A.A.B., en 1977 (5) démontre l'inhibition de l'apo enzyme hépatique de Rat.

a) *IN VITRO*

par N.A.D.P.H <sub>2</sub> et N.A.D.H <sub>2</sub>	}	inhibition réversible par	{	N.A.D.P. N.A.D.
---	---	---------------------------------	---	--------------------

b) *IN VIVO* - (administration chronique)

éthanol phénobarbitone morphine nicotine	}	augmente la concentration de N.A.D.H <sub>2</sub> et N.A.D.P.H <sub>2</sub>
---	---	--

Le même auteur (5), en 1977, étudie l'action des substrats de la glycine acyltransférase sur la tryptophane pyrrolase (apo-enzyme) hépatique de Rat.

Prétraitement :

Les animaux adrénalectomisés reçoivent le benzoate ou le p. aminobenzoate par voie orale dans l'eau bidistillée à raison de

1 g kg<sup>-1</sup> de poids corporel. Le traitement est le suivant : injecter 3 heures après par voie "intrapéritonéale" du tryptophane (500 mg kg<sup>-1</sup>) ou du salicylate (400 mg kg<sup>-1</sup>). Les animaux sont sacrifiés 1 heure après cette injection. Les résultats sont présentés dans le tableau page suivante.

Les substrats de la glycine acyltransférase diminuent l'activité de la tryptophane pyrrolase (holo-enzyme). Ceux-ci diminuent le pool de glycine libre pour la 5-aminolévulinate synthétase, qui intervient lors de la biosynthèse de l'hème. Celle-ci est nécessaire pour activer la tryptophane pyrrolase (apo-enzyme).

LABRIE F. et KORNER A., en 1968 (62), puis SATO Y. et MARUYANA M., en 1972 (89) montrent que le "turnover" de la tryptophane pyrrolase est rapide. D'une part la synthèse de la tryptophane pyrrolase (apo-enzyme) est plus rapide que celle des autres protéines. D'autre part, la vitesse de dégradation est également rapide dans les conditions de base.

#### Toxicité du tryptophane :

HORITA A. et CARINO M.A., en 1970 (45), BADAWY A.A.B. et EVANS M., en 1974 (7) et BADAWY A.A.B., en 1977 (5) étudient la toxicité du tryptophane. En absence de régulation hormonale de la tryptophane pyrrolase, l'acide aminé serait métabolisé par d'autres voies dont les produits seraient toxiques. Notamment par la voie des 5-hydroxy-indoles, un des métabolites responsables de la toxicité du tryptophane serait la sérotonine. Cette toxicité serait augmentée en traitant les animaux avec un composé inhibiteur de la monoamine oxydase. Elle diminue lorsque les animaux sont traités avec la p. chlorophénylalanine, qui est un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase.

cynurénine formée $\mu$ mol. $h^{-1}$ $g^{-1}$ de foie						
prétraitement	eau		benzoate		P. aminobenzoate	
traitement	Activité		Activité		Activité	
	holo enzyme	totale	holo enzyme	totale	holo enzyme	totale
néant	$3,0 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,4$
tryptophane	$13,5 \pm 0,7$	$16,5 \pm 0,9$	$9,6 \pm 0,6$	$18,6 \pm 0,6$	$9,1 \pm 0,4$	$17,5 \pm 1,1$
salicylate	$7,7 \pm 0,8$	$11,7 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,3$	$12,0 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,1$	$10,2 \pm 0,6$

Moyenne  $\pm$  écart type

(d'après EADAWY A.A.B. (5).)

Régulation et fonctions de la tryptophane pyrrolase hépatique chez le Rat (4)

L'enzyme est régulé par cinq mécanismes :

- hormonal : induction par les glucocorticoïdes
- activation par le substrat
- stabilisation par le substrat
- activation par le co facteur (hème)
- inhibition "feed back" par N.A.D.H<sub>2</sub> et N.A.D.P.H<sub>2</sub>

Les fonctions possibles sont :

- détoxification du tryptophane
- régulation du taux de tryptophane libre sérique
- synthèse de N.A.D.

C'est donc un enzyme très important du métabolisme du tryptophane.

## 2°) Voie de la 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

Le long de cette chaîne métabolique deux enzymes sont importants pour notre étude.

a) La tryptophane hydroxylase (E.C. 1.99.1.4.).

b) La mono-amine-oxydase (E.C. 1.4.3.4.) que nous étudierons plus en détail lors du chapitre suivant.

Tryptophane hydroxylase :

D'après LOVENBERG W. et col., 1968 (65) et GREEN A.R. et col., 1976 (39) la tryptophane hydroxylase est l'enzyme limitant la voie de métabolisation de la sérotonine.

## Propriétés de l'enzyme de Rat

	cerveau	foie
<i>pH optimum</i>	7,5	7,4
<i>Km tryptophane</i>	$3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$
<i>Km cofacteur</i>	$3 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$
<i>Ki phénylalanine</i>	$3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

d'après LOVENBERG W. et col., 1968 (65).

Le co-facteur nécessaire à la réaction enzymatique est identique à celui de la phénylalanine-hydroxylase (tétrahydrophptérine).

Localisation : d'après LOVENBERG W. et col., 1968 (65)

Activité spécifique : n moles/mg protéine et par h.

Espèces	Organes	Act. spécif.
Rat	cerveau	0,060
Rat	foie	0,008
Rat	rein	0,017
Rat	glande pinéale	0,53
Rat	muqueuse intestinale	< 0,002
Lapin	cerveau	0,058
Homme	plaquettes	0,050

Inhibition par les composés suivants :

- |                          |   |                                 |
|--------------------------|---|---------------------------------|
| - p. chlorophénylalanine | } | LOVENBERG W. et col., 1968 (65) |
| - Phénylalanine          |   |                                 |
| - Sérotonine "feed back" |   | BARCHAS J. et col. (9)          |

Nous pouvons donc penser qu'il y a une relation directe entre la tryptophane hydroxylase, le taux de tryptophane libre et de phénylalanine sérique. Pour réaliser une étude complète *in vivo* sur les différentes voies métaboliques du tryptophane, nous avons utilisé cet acide aminé marqué au  $^{14}\text{C}$  soit sur le carbone 3, soit sur le carbone 2. Le composé marqué sur le  $\text{C}_3$  est le traceur des 4 voies métaboliques, (figure n° 20) alors que le  $\text{C}_2$  est éliminé dès la première étape de la voie de la cynurénine.

## I.2 Technique de séparation des métabolites du tryptophane

Toutes les techniques de séparation des métabolites urinaires du tryptophane sont basées sur la chromatographie. MORRIS K.M. et MOON R.J., en 1973 (70) préconisent d'utiliser la chromatographie bidimensionnelle sur plaque. Nous avons préféré utiliser une technique de chromatographie sur colonne, qui possède un pouvoir de résolution supérieur pour ces composés. Ce type de séparation a été utilisé par plusieurs auteurs, qui décrivent des méthodes différentes.

MORRIS K.M. et MOON R.J. (70) utilisent du D.E.A.E. cellulose comme phase fixe, mais ils recommandent une deuxième séparation par chromatographie sur plaque pour séparer chaque fraction obtenue.

CHEN N.C. et GHOLSON R.K., en 1972 (17) préconisent d'utiliser 2 colonnes de D.E.A.E. cellulose sous différentes formes (amine et formiate).

CHILCOTE D.O. et MROCHEK J.E., en 1972 (18) décrivent une technique qui nécessite 2 colonnes connectées. La première contient une

résine anionique et la seconde une résine cationique. Les auteurs présentent la séparation de 6 métabolites.

Nous avons préféré utiliser la méthode de BAKRI M. et CARLSON J.R., en 1970 (8). C'est une séparation par chromatographie sur colonne, qui utilise comme support du séphadex Q.A.E. A 25. Avec une colonne unique de séphadex, nous obtenons une excellente séparation de 16 métabolites du tryptophane. Par rapport aux techniques précédentes, le séphadex a une double action :

- séparation par filtration
- séparation par échanges d'ions.

Le séphadex est utilisé sous la forme  $Cl^-$ . La tryptamine et la sérotonine ne sont pratiquement pas séparées. Les auteurs préconisent d'utiliser une deuxième colonne de carboxyméthylcellulose sous forme  $Na^+$  pour séparer ces 2 composés, si nécessaire. Nous utilisons uniquement la première colonne.

Technique utilisée :

- . longueur de la colonne : 50 cm.
- . Diamètre intérieur de la colonne : 10 mm.
- . Température : 4 °C.

Le séphadex Q.A.E. A 25 est lavé, puis gonflé avec du tampon Tris HCl 0,05 M pH 7,9.



## Elution

Durée en heures	Solution	Composés élués
1 h.	Tris HCl 0,05 M pH 7,9	basiques et amphotères
2 h.	Tris pH 7,9 + gradient linéaire de 0 à 0,15 M de Na Cl	Acides
2 h.	Tris pH 7,9 + gradient linéaire de 0,15 à 1,5 M de Na Cl	

- . Longueur d'onde : 280 nm.
- . Débit de l'éluat : 150 ml/h.

Injection : 250  $\mu$ l d'urine + 250  $\mu$ l du mélange des métabolites ci-dessous (50  $\mu$ g de chaque). Ceci afin de mieux les identifier lors de la mesure de l'absorption à 280 nm.

Mélange de métabolites : sérotonine, tryptamine, cyrunénine, tryptophane, 5-hydroxytryptophane et l'acide 5-hydroxyindole acétique.

La mesure de la radioactivité de chaque fraction a été réalisée par comptage en scintillation liquide. La correction de QUENCHING est effectuée à l'aide d'un standard externe.

### I.3 Expérimentation animale

Animaux : Rats E.O.P.S., origine SPRAGUE-DAWLEY, sexe : mâle, poids : 220 g.

Nous formons 4 lots de 2 animaux par "randomisation". Les 4 lots sont placés dans 4 cages à métabolisme. L'urine est collectée pendant les 5 premières heures qui suivent l'injection de tryptophane.

Tryptophane utilisé :

D.L. tryptophane marqué au  $^{14}\text{C}$  (C.E.A.)

a) marqué sur le  $\text{C}_2$ , réf.: CCM 145  
activité spécifique  $17,5 \mu \text{Cie} = 1 \text{ m Mole}$ .

b) marqué sur le  $\text{C}_3$ , réf.: CCM 305  
activité spécifique  $25 \mu \text{Cie} = 1 \text{ m Mole}$ .

DOSE :  $50 \mu \text{Cie}$  par Rat.

aphénylindole : dose  $100 \text{ mg kg}^{-1}$

véhicule : sérum physiologique (suspension)

Lot n°	1	2	3	4
1ère injection I.P. 9 h.30	sérum physiologique 1 ml/100 g	aphénylindole 100 mg/kg	sérum physiologique 1 ml/100 g	aphénylindole 100 mg/kg
2ème injection I.P. 10 h.	tryptophane $^{14}\text{C}_3$ 50 $\mu \text{Cie/rat}$	tryptophane $^{14}\text{C}_3$ 50 $\mu \text{Cie/rat}$	tryptophane $^{14}\text{C}_2$ 50 $\mu \text{Cie/rat}$	tryptophane $^{14}\text{C}_2$ 50 $\mu \text{Cie/rat}$

#### I.4 Résultats et Discussions

##### a) Etude du métabolisme du tryptophane

Sur les figures (n° 21, 22, 23 et 24) qui représentent les résultats de l'élimination urinaire des métabolites du tryptophane, le trait plein montre l'absorption à 280 nm et l'histogramme hachuré la mesure de la radioactivité de chaque fraction rapportée au volume d'urine éliminée pendant 5 heures sur la quantité injectée.

- \* figure n° 21 : animaux témoins tryptophane  $^{14}\text{C}_3$  (lot n° 1).
- \* figure n° 22 : animaux témoins tryptophane  $^{14}\text{C}_2$  (lot n° 3).
- \* figure n° 23 : animaux traités ophénylindole tryptophane  $^{14}\text{C}_3$  (lot n° 2)
- \* figure n° 24 : animaux traités ophénylindole tryptophane  $^{14}\text{C}_2$  (lot n° 4).

L'étude comparative de ces 4 figures nous montre que, dans les 5 heures qui suivent l'administration de l'ophénylindole, le métabolisme du tryptophane est augmenté.

##### - Voie de la cynurénine

Après traitement à l'ophénylindole, la quantité de métabolites urinaires de la voie de la cynurénine est multipliée par 4. (tableau n° XVII). Elle passe de 128  $\mu$  Moles chez les témoins à 488  $\mu$  Moles chez les traités. Cette forte augmentation est principalement due à trois métabolites du tryptophane (A - B - C), (figure n° 23). Ceux-ci sont déjà présents en quantité beaucoup plus faible chez les animaux témoins (figure n° 21).

**ELIMINATION URINAIRE DES METABOLITES DU TRYPTOPHANE  $^{14}C$**

pendant les 5 premières heures après l'injection

Lot N <sup>o</sup>	Tryptophane C <sub>3</sub> <sup>*</sup> Temoins 1	Tryptophane C <sub>3</sub> <sup>*</sup> Traites α ψ i 2	Tryptophane C <sub>2</sub> <sup>*</sup> Temoins 3	Tryptophane C <sub>2</sub> <sup>*</sup> Traites α ψ i 4
Injection aux 2 rats D.P.M.	222 000 000	222 000 000	170 630 000	202 625 000
Quantité de Tryptophane injecté μ Moles	4 000	4 000	4 490	5 330
Volume d'urine en ml	1,7	4,8	1,6	1,7
Activité totale de l'urine D.P.M.	13 552 400	37 920 000	4 400 000	7 391 000
Excrétion des Metabolites radioactifs en μ Moles	244	683	116	195
Excrétion des Metabolites radioactifs de la voie de la kynurénine seule en μ Moles	128	488		
<u>Activité de l'urine</u> Activité injectée %	6,1%	17,1%	2,6%	3,6%
Activité injectée sur la colonne D.P.M.	3 157 000	1 681 000	7 615 000	1 226 000
Somme des activités des éluats D.P.M.	3 146 000	1 785 000	5 690 000	1 066 000

Le métabolite A est un métabolite neutre ou amphotère, il est élué entre la sérotonine et la cynurénine. Il peut être identifié comme un dérivé de la cynurénine, (3-hydroxycynurénine, N-acétylcynurénine, cynurénine-O-sulfate).

Le métabolite B est un métabolite légèrement acide, il est élué après le 5-hydroxytryptophane et juste avant l'acide picolinique, il s'identifie peut-être comme un dérivé de l'acide nicotinique (nicotinanide).

BAKRI M. et CARLSON J.R., en 1970 (8) ne citent pas ces deux métabolites, lors de la mise au point de leur technique.

Le métabolite C est identifié comme l'acide quinolinique.

- Métabolites de la voie des 5-hydroxyindoles et des voies mineures

L'excrétion de ces métabolites est légèrement augmentée. Nous retrouvons chez les animaux traités tous les métabolites présents chez les témoins. L'élimination de ces composés marqués est de :

116  $\mu$  Moles = témoins

195  $\mu$  Moles = traités.

Ce qui nous donne un facteur de 1,5 environ (tableau n° XVII) pour les animaux traités par rapport aux témoins.

- Etude comparative des métabolites urinaires chez la Souris et chez le Rat

MORRIS K.M. et MOON R.J., en 1974 (70) étudient chez la Souris l'élimination urinaire des métabolites du D.L. tryptophane marqué au  $^{14}\text{C}$  sur le cycle benzénique. Les urines sont recueillies durant les 5 heures qui suivent l'injection. Dans une seconde expérience, les auteurs injectent également une surcharge de 20 mg de L tryptophane.

Les métabolites urinaires de la voie de la cynurénine chez la souris qui ont été identifiés sont : la cynurénine, la 3-hydroxycynurénine, l'acide cynurénique, l'acide xanthurénique, la cynurénine-O-sulfate et la N-acétylcynurénine. Ceux de la voie de la sérotonine sont : l'acide 5-hydroxytryptophol-O-glucuronide, le 5 H.I.A.A.-O-glucuronide. Une partie des métabolites urinaires ne sont pas identifiés. Le tryptophane lui-même est éliminé au niveau urinaire.

	SOURIS (70)		RAT	
	Témoin	Surcharge	Témoin	αphénylindole
métabolites totaux de la cynurénine	35,3	31,4	52,4	71,4
autres métabolites	15,4	18,6		
métabolites totaux de la sérotonine	14,0	9,5	47,5	28,5
tryptophane	27,7	36,6		

Les résultats sont exprimés en pourcentage relatifs. Nous remarquons une nette augmentation des métabolites de la voie de la cynurénine chez le Rat traité à l'αphénylindole. D'autre part chez la Souris après une surcharge de tryptophane, son élimination urinaire augmente. Chez le Rat traité à l'αphénylindole nous n'observons pas de variation significative du tryptophane urinaire.

b) Etude de la liaison de l'αphénylindole à l'albumine

L'étude de la liaison de divers ligands indoliques sur l'albumine a été effectuée notamment par KRASNER J. et col., en 1966 (60), Mc MENAMY R.H. et col., en 1968 (66), PANDE C.S. et col., en 1974 (77). Tous ces ligands possèdent le même site de liaison sur l'albumine.

- Dans une première manipulation *in vivo* chez le Rat, nous avons mesuré le taux de composés marqués liés aux protéines sériques; après une injection de 100  $\mu$  Cie d'aphénylindole par voie intrapéritonéale. Le sang est prélevé sur héparine 30 minutes après l'injection. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'activité totale dans le sang. La précipitation des protéines a été effectuée avec le sulfate d'ammonium (solution saturée).

Les pourcentages retrouvés dans les différentes fractions sont les suivants :

- . Hématie : 6,8 %
- . Solution de lavage des hématies : 11,5 %
- . Plasma total : 82 %
- . aphénylindole et métabolites liés aux protéines du plasma : 79 %.

La plus grande partie des composés radioactifs se trouve donc liée aux protéines.

- Dans une seconde manipulation, la capacité de liaison aux protéines sériques de Rat vis-à-vis du tryptophane a été mesurée *in vitro* à l'aide de la dialyse à l'équilibre et de tryptophane marqué au  $^{14}\text{C}$ .

Les conditions de la dialyse sont les suivantes :

- . ph 7,4
- . température :  $\approx$  20 °C
- . membrane : imperméable aux molécules ayant un P.M. supérieur à 5 000
- . temps d'équilibre du tryptophane : 2 h. 30
- . sérum dilué au 1/3 avec du tampon.

*Traitement des animaux : Rats*

Les animaux reçoivent l' $\alpha$ phénylindole par injection I.P. en suspension dans un mélange sérum physiologique + éthanol. L'étude a été réalisée avec 3 doses différentes (5, 50, 300 mg/kg). Les animaux sont sacrifiés à 5 minutes, 4 heures et 24 heures après l'injection. Le sérum est ensuite prélevé, dilué au 1/3 v/v avec du tampon phosphate pH 7,4. La dialyse à l'équilibre est ensuite effectuée en présence de tryptophane  $^{14}\text{C}_2$ .

*Exploitation des résultats :*

Si nous traçons la courbe (fig. 20 bis)  $y = f(x)$  d'après SCATCHARD G., 1949 (90) où

$$y = \frac{\text{Tryptophane lié}}{\text{Tryptophane libre}}$$

$$x = \text{Tryptophane lié}$$

Nous obtenons une hyperbole qui peut se décomposer en 2 droites asymptotiques. Ceci nous montre que le tryptophane possède au moins 2 types de liaisons au niveau des protéines sériques :

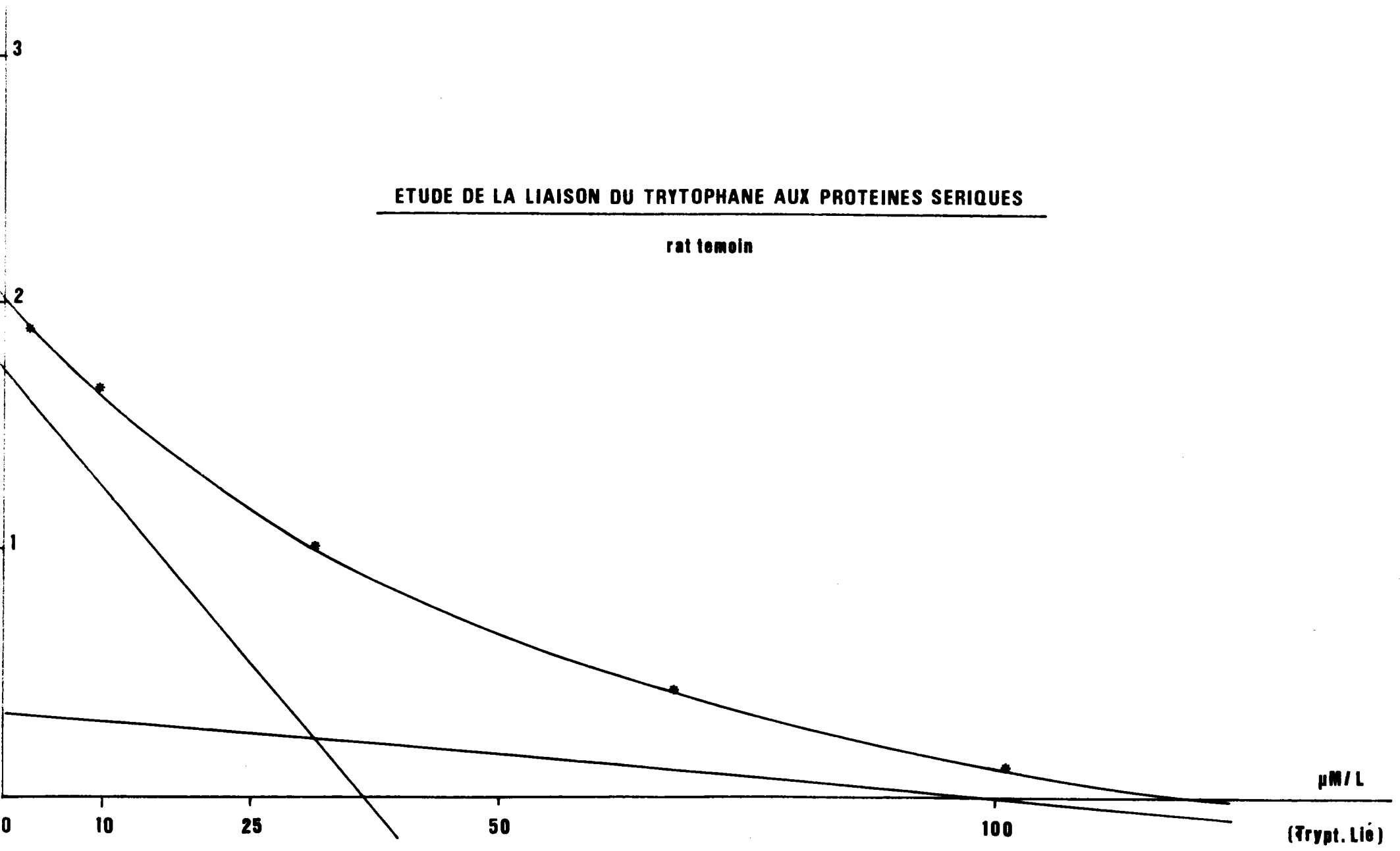
L'une avec l'albumine et l'autre avec les globulines. Ne connaissant pas la concentration exacte en protéines, nous ne pouvons pas déterminer le nombre de sites. L'intersection de chaque droite avec l'axe des x nous donne la capacité de liaison. La pente détermine la constante de liaison relative.

Les différentes valeurs obtenues sont présentées dans le tableau n° XVIII (capacité de liaison). Nous observons avec la protéine 1 (albumine) une baisse de la capacité de liaison, à 4 h. pour 5 et 50 mg/kg, à 4 h. et 24 h. pour la dose de 300 mg/kg. Nous ne remarquons aucune différence significative de capacité de liaison pour la protéine n° 2, par contre la dispersion de cette capacité est beaucoup plus importante après le traitement à l' $\alpha$ phénylindole.



(Trypt. Lié)  
(Trypt. Libre)

ETUDE DE LA LIAISON DU TRYPTOPHANE AUX PROTEINES SERIQUES  
rat témoin



**ETUDE DE LA CAPACITE DE LIAISON DU TRYPTOPHANE AUX PROTEINES SERIQUES DE RAT**

$\alpha\varphi$ In vivo dose mg kg <sup>-1</sup>		5			50			300			Constante de liaison relative
Temps après l'injection		5'	4h	24h	5'	4h	24h	5'	4h	24h	
Essais N°1	Prot N°1	41,9	*2,4	25,6	45,4	*4,35	38,2	39,0	*17,9	*15,5	k1 = 0,0429
	Prot N°2	72,7	75,7	76,0	61,3	65,6	63,8	62,3	56,9	101	k2 = 0,0019
Essais N°2	Prot N°1	49,5	39,1	36,4	57,3	*18,8		56,5	*16,7	35,0	k1 = 0,0435
	Prot N°2	122,5	109,1	120,0	88,4	99,5		79,3	116	106	k2 = 0,0031

\* Valeurs inférieures aux témoins (m - 2σ)

Valeurs Témoins	1	2	3	4		
Prot N°1	61,0	59,9	36,4	38,7	m = 49 ± 13	k1 = 0,0477
Prot N°2	70,4	84,4	90,8	79,4		k2 = 0,0036

Tableau XVIII

L'étude de la capacité de liaison de l'albumine vis-à-vis du tryptophane en présence d' $\alpha$ -phénylindole montre qu'il entre en compétition avec le tryptophane pour le site de liaison des indoles sur l'albumine.

Cette compétition se traduit par une augmentation du tryptophane libre sérique.

JACOBY J.H. et col., en 1975 (49), GREEN R.A. et col., en 1976 (39), VASQUIER M. et col., en 1976 (107) et ETIENNE F. et col., en 1976 (34) ont étudié l'action de certaines drogues tels que le dipropylacétate et le salicylate, qui ont des actions semblables sur la liaison du tryptophane à l'albumine. Les mêmes auteurs citent la relation qui existe entre le taux de tryptophane sérique libre et le passage de la barrière héméo-encéphalique de cet acide aminé.

Ce taux plus élevé de tryptophane libre sérique aurait plusieurs actions.

- Il augmenterait probablement le taux de tryptophane au niveau du système nerveux central.

- La métabolisation du tryptophane au niveau périphérique est plus importante notamment par la voie des 5-hydroxyindoles.

- Il augmente l'excrétion de l'acide hippurique urinaire. Il agit notamment au niveau du métabolisme de la phénylalanine-tyrosine, (tableau n° XIV).

D'après STEIN W.H. et col., en 1954 (100), SCHEIRER K. et col., en 1954 (93), ARMSTRONG M.D. et col., en 1955 (2) et GRÜMER H.O. et col., en 1961 (41) une partie de l'acide hippurique endogène vient du métabolisme de la phénylalanine via l'acide phénylpyruvique. Nous proposons ici une hypothèse de l'action de l' $\alpha$ -phénylindole, qui expliquerait l'augmentation de l'excrétion urinaire de l'acide hippurique. Cette action serait due au tryptophane. La phénylalanine hydroxylase (E.C. 1.99.1.2.) d'après

# METABOLISME DE LA PHENYLALANINE ET DE LA TYROSINE

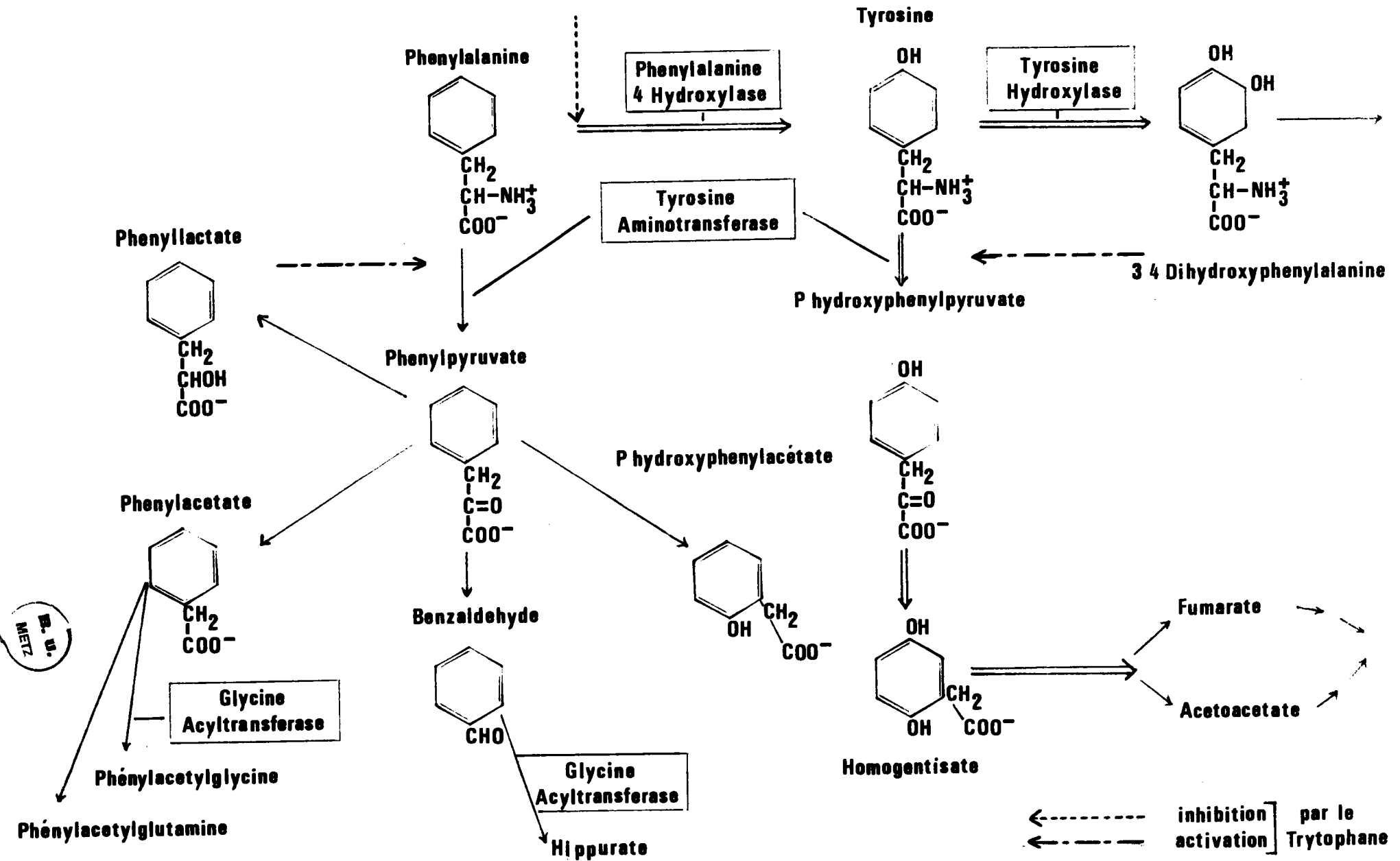


Tableau XIV

RENSON J. et col., en 1962 (89) peut hydroxyler aussi bien la phénylalanine que le tryptophane. Mais COULSON W.F. et col., en 1968 (23) précisent qu'elle posséderait 2 sites réactionnels différents, l'un pour la phénylalanine, l'autre pour le tryptophane. Elle hydroxyle la phénylalanine 30 fois plus vite que le tryptophane. LOVENBERG W. et col., (65) montrent qu'elle est inhibée en présence de tryptophane. Avec la tryptophane hydroxylase, elles utilisent le même co-facteur, la tétrahydro-pyridine, c'est-elle qui limiterait l'activité de l'enzyme. LOVENBERG W. et col., 1968 (67) décrivent qu'elle a une forte activité au niveau du foie et du rein chez le Rat. MILLER M.R. et col., en 1976 (69) chez le Rat, puis PARQUER C.E. et col., en 1977 (78) chez l'Homme, isolent 3 iso-enzymes hépatiques, qui possèdent des propriétés différentes (spécificité et inhibition). Auparavant SCRIVER C.R. et ROSENBERG L.E., en 1973 (94) avaient montré que l'enzyme hépatique chez l'Homme et le Rat avait des propriétés semblables. L'activité de l'enzyme pour la phénylalanine est donc plus faible en présence de quantité de tryptophane plus importante. D'après les mêmes auteurs, quand l'hydroxylation de la phénylalanine est altérée, la vitesse de métabolisation vers les voies mineures est augmentée. LABRIE et KORNER A., en 1968 (62) décrivent l'induction de la tyrosine transaminase (tableau n° XIV) E.C.2.6.1.5. (L tyrosine-2-oxo-glutarate-aminotransférase), qui utilise comme substrat la tyrosine et la phénylalanine, par le tryptophane ou par un mélange complet d'acides aminés chez le Rat adrénalectomisé.

Le tryptophane a donc deux actions distinctes au niveau du métabolisme de la phénylalanine :

- 1 - il inhibe la phénylalanine hydroxylase,
- 2 - il induit la tyrosine transaminase.

Ces 2 actions augmentent la biosynthèse de l'acide phényl-pyruvique et par la même voie celle de l'acide hippurique.

A l'aide de l' $\alpha$ -phénylindole marqué ( $^{14}C_2$ ), après une purification et une mesure de la radioactivité de l'acide hippurique, nous avons montré que celui-ci n'est pas un métabolite de l' $\alpha$ -phénylindole.

### I.5 Conclusions

L' $\alpha$ phénylindole *in vivo* diminue la capacité de liaison de l'albumine sérique vis-à-vis du tryptophane. Il entre en compétition avec lui pour les sites de liaison indolique de l'albumine.

L'action de l' $\alpha$ phénylindole au niveau du métabolisme du tryptophane et de la phénylalanine (figure n° 25) chez le Rat peut se décomposer ainsi :

- Augmentation de la concentration du tryptophane libre dans le sang par compétition de l' $\alpha$ phénylindole avec le tryptophane lié à l'albumine.

Cette augmentation agit à 2 niveaux.

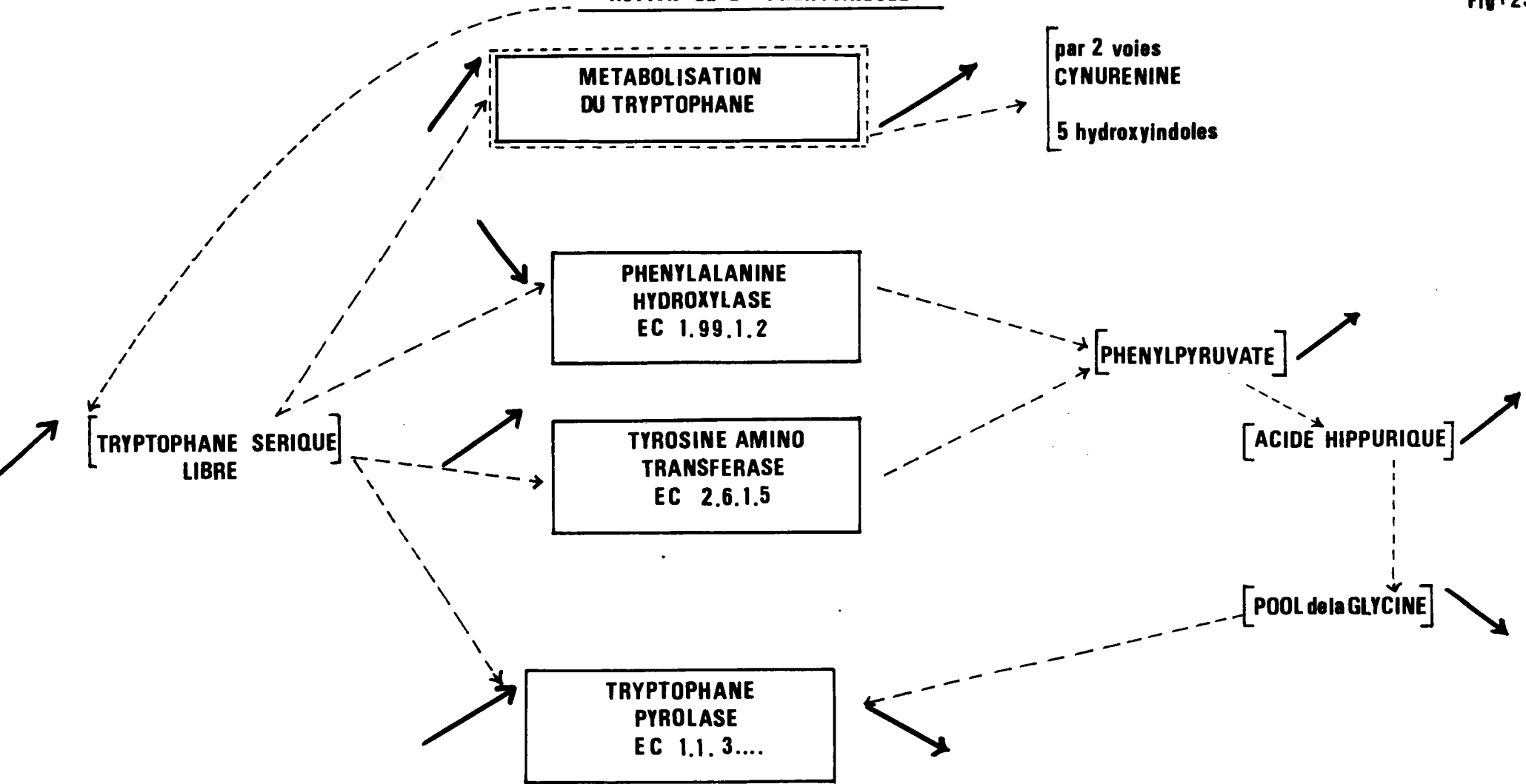
1°) Action au niveau du métabolisme de la phénylalanine qui a pour conséquence une élévation de la quantité d'acide hippurique excrété dans l'urine.

2°) Action au niveau du métabolisme du tryptophane. Nous observons dans un premier temps pendant les 5 premières heures une métabolisation plus rapide, principalement par la voie de la cynurénine (figure n° 20). Celle-ci se traduit au niveau urinaire par la sortie de 3 métabolites, (un dérivé de la cynurénine, l'acide quinolinique et un dérivé de l'acide nicotinique), ceux-ci sont tous des intermédiaires dans la voie de synthèse de N.A.D. On retrouverait donc probablement une synthèse de N.A.D. plus importante. Celui-ci après réduction pourrait alors inhiber la tryptophane pyrrolase par "feed back" (9).

La biosynthèse de l'acide hippurique diminue la quantité d'hème formée (chapitre I.1 inhibition). Celle-ci est nécessaire pour activer la tryptophane pyrrolase (apo enzyme).

ACTION DE L' $\alpha$  PHENYLINDOLE

Fig. 25



-----> Action  
 —————> Conséquence

→ Augmentation ou Activation  
 ↘ Baisse ou Inhibition

Pour ces 2 raisons, l'activation de la tryptophane pyrrolase serait ensuite diminuée. Le tryptophane serait alors métabolisé par les autres voies et notamment par celle des 5-hydroxyindoles.

La toxicité du tryptophane est due pour une part importante à la sérotonine (7), (5). Cette toxicité est augmentée en présence d'un inhibiteur de la mono-amine-oxydase (45).

Lors d'une intoxication chronique chez l'animal, le taux de tryptophane sérique lié joue un rôle très important. L'α-phénylindole en intoxication chronique déplace le tryptophane de son site de liaison à l'albumine à partir du moment où tous les sites libres de l'albumine sont saturés par l'α-phénylindole. Nous avons regroupé dans le tableau n° XV, page 72, les différentes concentrations du tryptophane, dans le foie, le sérum chez l'Homme et le Rat, citées dans la littérature. Ces valeurs sont voisines. Mais chez certaines espèces, ce taux de tryptophane lié est plus faible, environ 10 mg/l (exemple : "le Cobaye") (6). Par contre, elles sont plus sensibles à la toxicité de cet acide aminé (5).



## **CHAPITRE II**

### **ETUDE DE L'INHIBITION DE LA MONOAMINE OXYDASE**

ETUDE DE L'INHIBITION DE LA MONO AMINE OXYDASE

La mono-amine-oxydase (M.A.O. E.C. 1.4.3.4) catalyse la désamination oxydative d'un grand nombre de mono-amines physiologiques, en aldéhydes correspondants, suivant la réaction :



Parmi ces amines se trouvent les catécholamines, la tryptamine et la sérotonine. Le pH optimum de cet enzyme est de 7,3.

II.1 Description de l'enzyme :

La constitution complète de l'enzyme est encore inconnue. Il contient notamment un groupe flavinique ainsi que plusieurs groupes SH libre. GORKIN V.Z., 1973 (38).

- Localisation

Il est largement distribué dans l'organisme BLASCHKO H, 1952 (13). Des concentrations particulièrement élevées sont observées dans le foie (cellules parenchymateuses), le tractus digestif (épithélium muqueux de l'intestin) et le cerveau. Le taux d'enzymes serait plus faible dans le rein.

ROBINSON D.S. et col., en 1968 (86) montrent une activité M.A.O. du plasma et des plaquettes chez l'Homme.

Dans la cellule l'enzyme est situé pour une large part (70 %), dans les mitochondries d'après HAWKINS J., 1952 (44). OUGAL B.S., 1977 (32) montre qu'il est probablement localisé aux niveaux des membranes intra et extra mitochondriales. On le retrouve aussi dans la fraction microsomale.

- Différentes formes de la mono-amine-oxydase

Depuis 1966, GORKIN V.Z. (37) on sait que cet enzyme peut se présenter sous plusieurs formes. De nombreux travaux sont publiés sur ce sujet. Les différentes formes sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrilamide. Suivant les auteurs et les techniques utilisées le nombre de bandes obtenues varient de 1 à 5 pour un organe identique d'une même espèce.

Etude du nombre d'iso-enzymes de la mono-amine-oxydase

organes	mitochondrie	HOMME		RAT		BOEUF	
		Nbre de bandes	REF	Nbre de bandes	REF	Nbre de bandes	REF
foie		3	(47)				
	*	5	(111)	5	(111)		
cerveau		2	(48)				
	*	1	(111)	2	(111)		
	*	5	(20)	4	(112)		
				2	(76)		
rein	*					1	(32)
placenta	*	2	(111)				

Tous ces iso enzymes présentent des propriétés spécifiques en matière de substrat, de pH optimum, de température d'inactivation et d'inhibiteurs.

- Rôle physiologique

La désamination oxydative par la mono amine oxydase intervient à plusieurs stades du métabolisme des amines biogènes catéchiques et indoliques. Elle participe à la détoxification de ces amines, formées dans le tractus gastro intestinal et synthétisées au niveau du système nerveux central ou dans d'autres organes (38).

- Inhibition

De nombreux travaux ont été publiés concernant l'étude de l'inhibition de la M.A.O. par divers produits. Nous citerons ici quelques inhibiteurs des M.A.O. parmi les plus connus : les propargylamines, les amphétamines, les phénylpipéridines, le sulfate de tranlycypromine, le phosphate d'iproniaside et l'isoniaside. Ces inhibiteurs ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* notamment par : ROBINSON D.S., en 1968 (26), WILLIAMS C.H. et col., en 1974 (110) et par WILLIAMS C.H., 1974 (109).

SHAWKY A.A. et KNOWLES C.O., en 1973 (96) étudient l'action de plusieurs inhibiteurs de la mono amine oxydase de foie de Rat *in vitro*. Ils utilisent comme substrat la cynurénine et déterminent les doses qui inhibent 50 % de l'activité enzymatique. Ces doses sont de  $6,3 \cdot 10^{-6}$  M/l pour l'isoproniaside et de  $5,8 \cdot 10^{-7}$  M/l pour la tranlycypromide.

D'après PATEK D.R. et col., en 1974 (79), puis ROTH J. A. et col., 1974 (87) le site d'inhibition pour des inhibiteurs tel que la phénylhydrazine, est le groupement flavinique de l'enzyme.

Toutes les préparations sont inhibées par les agents chélatants, ce qui suggère qu'un métal peut être invoqué dans l'activité de l'enzyme. Le cuivre paraît jouer un rôle important bien que mal précisé.

D'après NOTER D., 1978 (74), SCHLOOT W., 1969 (92) certains inhibiteurs de la M.A.O. inhibent aussi la N-acétyltransférase.

## II.2 Méthode de mesure de l'activité mono-amine-oxydase

Ces méthodes sont de 4 types :

- . consommation d'O<sub>2</sub>
- . taux de NH<sub>3</sub> dégagé
- . quantité de substrat restant
- . quantité de produit formé.

Le dosage de la mono-amine-oxydase se pratique soit: sur l'homogénat total, sur l'homogénat après une légère centrifugation, sur la fraction mitochondriale. Il y a une très grande différence de sensibilité entre la fraction mitochondriale et l'homogénat total. Il est évident que pour réaliser une étude courante d'activité enzymatique, l'homogénat est le mieux adapté.

### a) Dosage de l'ammoniac dégagé

Le dosage peut être effectué selon deux méthodes :

- . dans une enceinte à diffusion de CONWAY
- . par colorimétrie (hypochlorite de sodium).

Cette méthode n'est pas utilisée.

b) Mesure de la consommation d'oxygène

Cette mesure est effectuée à l'aide d'une électrode de CLARCK. WILLIAMS C.H., en 1974 (109) a utilisé différents substrats. Cette technique est relativement peu sensible et sa spécificité est discutable.

c) Les 2 dernières méthodes sont les plus utilisées.

Le choix de la méthode dépend en grande partie du choix du substrat.

Les substrats utilisés sont :

- des amines physiologiques : tyramine, tryptamine, 5-hydroxy-tryptamine, adrénaline, noradrénaline, dopamine, ... etc;
- des amines synthétiques : cynuramine, benzylamine, butylamine, ... etc.

- Les techniques radio-métriques utilisent des substrats marqués au  $^{14}\text{C}$ , on mesure la quantité de produit formé. Elles font partie du quatrième groupe de méthode. Les amines sont absorbées fortement sur des résines cationiques. Plusieurs types de résines peuvent être utilisées, citons l'amberlite CG 50, la Biorex 70, la Dowex 50 W H C R et la Dowex X 8. Les auteurs qui ont décrit de telles méthodes sont : ROBINSON D.S. et col., 1968 (68), JAIN M., 1973 (50), ROTH J.A. et col., 1974 (87) et DEMISCH L. et col., en 1976 (24).

Pour celles-ci les substrats utilisés sont :

- . l'hydrobromure de tyramine  $^{14}\text{C}_1$
- . le bisuccinate de tryptamine  $^{14}\text{C}_2$
- . la 5 hydroxytryptamine  $^{14}\text{C}_2$  hydrogène oxalate
- . la norépinéphrine  $^{14}\text{C}$
- . l'hydrochlorure d'  $\alpha$ benzylamine  $^{14}\text{C}$
- . la dopamine  $^{14}\text{C}$
- . et la  $\beta$ phényléthylamine  $^{14}\text{C}_1$ .

Ce sont des analyses relativement longues à effectuer.

- Le dernier groupe de techniques utilisées est basé sur la mesure de l'absorption ou de la fluorescence de l'amine ou du produit formé suivant le cas. Un des substrats les plus utilisés est la benzylamine ou ses dérivés. Le tableau n° XX nous présente les différentes méthodes ainsi que leurs auteurs.

Nous avons utilisé la technique décrite par WESSBACH H. et col., en 1960 (108) qui permet de suivre directement la réaction enzymatique à 37 °C par la disparition du substrat à 360 nm.

PAYENDA R., en 1969 (80) préconise d'utiliser la mesure de la formation de 4-hydroxyquinoline par la différence d'absorption de celle-ci entre 329 et 340 nm. Cette mesure serait plus satisfaisante, mais il est nécessaire de précipiter les protéines auparavant.

METHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITE MONO-AMINE-OXYDASE

ABSORPTION OU FLUORESCENCE

nom du substrat	méthode de dosage	produit dosé	AUTEURS
benzylamine	fluorescence	benzaldéhyde	ZAITSU K. et col., en 1977 (113)
4 hydroxy 3 méthoxy benzylamine	extraction au toluène absorption à 345 nm	aldéhyde = vanilline	CHRISE W. et col., 1973 (19)
benzylamine	extraction cyclohexane absorption à 242 nm	benzaldéhyde	BIDARD J.N. et col., 1972 (12) TABOR et col., 1952 (102)
P. benzylamino azoβnaptol	extraction cyclohexane absorption à 500 nm	aldéhyde	M.A.O. test. dans le sérum coffret BIOLYON
cynuramine	fluorescence	aldéhyde	KRAJL M., en 1965 (59)
cynuramine	absorption directe à 360 nm	substrat	WESSBACH H. et col., en 1960 (109)

Tableau n° XX



d) Technique de mesure de l'activité de la mono-amine-  
oxydase

d'après WEISSBACK et col., en 1960 (109).

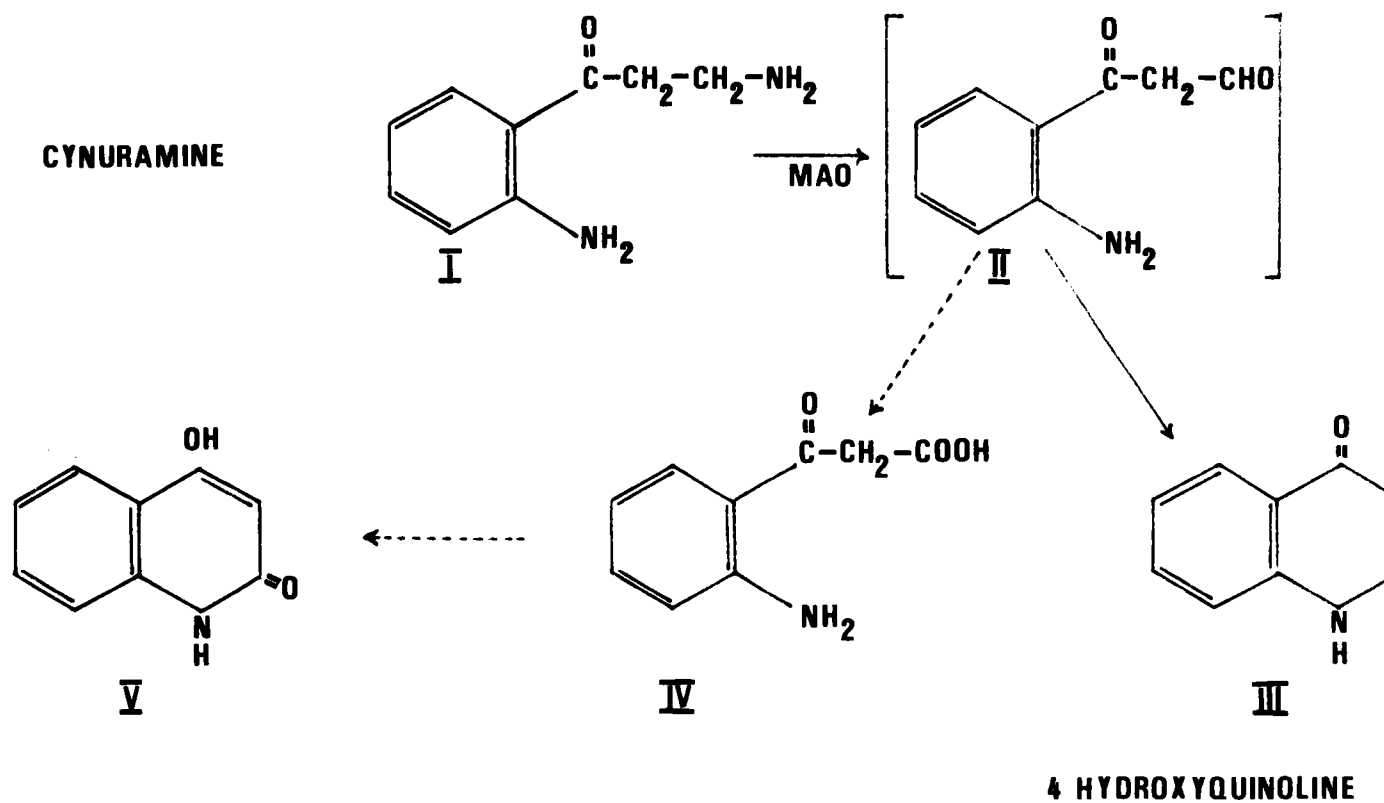
- Solutions

- . Solution de RINGER
- . Tampon phosphate 0,05 pH 7,4.
- . Substrat = dihydrobromure de cynuramine 3  $\mu$ M dans 1 ml H<sub>2</sub>O - P M = 326,1.
- . Inhibiteur iproniazide P M = 277,2 concentration finale dans la cuve  $6,3 \cdot 10^{-6}$  M/l.

- Méthodologie

Les animaux sont sacrifiés par décapitation sans anesthésie préalable. Nous prélevons les organes (foie, rein, cortex) très rapidement. Ils sont ensuite lavés dans une solution de RINGER à 4 °C, puis homogénéisés à l'aide d'un appareil de POTTER, dans l'eau bidistillée à 4 °C. Pour 1 g de tissus ajouter 4 ml d'eau. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 4 °C, 15 minutes à 4 000 g. Ceci afin d'éliminer les débris cellulaires et les grosses particules qui pourraient ensuite perturber la mesure. La disparition du substrat (la cynuramine) est suivie au spectrophotomètre à 360 nm et à 37 °C. La désamination oxydative de la cynuramine (I) produit un aldéhyde II, qui peut théoriquement soit se condenser pour donner la 4-hydroxyquinoline III, soit subir une oxydation ultérieure en un acide IV ou une lactame V . (figure 26).

La 4-hydroxyquinoline n'absorbe pas à la longueur d'onde de 360 nm. Ses maximums d'absorptions se situent à 315 et 329 nm. Elle n'interfère pas sur la mesure. Le coefficient d'extinction moléculaire de la cynuramine à 360 nm est de  $\epsilon = 4,5 \cdot 10^3 \text{ ML}^{-1}$ . Il nous permet de calculer l'activité enzymatique en unité internationale. ( $\mu$  moles de cynuramine transformée par gramme de tissus et par heure).



**TRANSFORMATION DE LA CYNURAMINE SOUS L'INFLUENCE DE LA MONOAMINE OXYDASE**

Mesure de la M.A.O. *in vivo*

FOIE	Volume de substrat ml	Volume de tampon ml	Volume d'homogénat ml
Témoin	0	2,8	0,2
Essai	0,1 = 0,3 $\mu$ M	2,7	0,2

REIN et CORTEX	Volume de substrat ml	Volume de tampon ml	Volume d'homogénat ml
Témoin	0	2,50	0,5
Essai	0,050=0,15 $\mu$ M	2,45	0,5

Mesure de la M.A.O. *in vitro*

FOIE	Volume de substrat ml	Volume de tampon ml	Volume d'homogénat ml	Volume d'inhibiteur ml
Témoin	0	2,8	0,2	
Essai	0,1	2,7	0,2	Extrait témoin
Test de l'inhibition	0,1	2,6 2,2	0,2	0,1 > < 0,5

Le taux de M.A.O. est plus faible dans le rein et le cerveau. Pour compenser cette faible activité, nous avons ajouté un volume d'homogénat plus important (0,5 ml) lors de la mesure de l'activité M.A.O. Parallèlement un volume plus faible de substrat est ajouté dans ces 2 cas.

### II.3 Expérimentation

#### a) Technique d'extraction d'un métabolite hépatique de l'aphénylindole

Les animaux (RATS) reçoivent une dose de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  d'aphénylindole par voie I.P. . Le véhicule utilisé est l'H.P.M.C.

Les animaux sont sacrifiés 3 heures après l'injection. L'homogénéat de foie à 20 % s'effectue dans l'eau bidistillée à  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Après une centrifugation de 10 minutes à  $4\ 000 \text{ g}$ , à 2 ml de surnageant nous ajoutons 5 ml d'éthanol absolu pour précipiter les protéines. Une seconde centrifugation de 10 minutes à  $1\ 400 \text{ g}$  est effectuée, puis le surnageant est concentré sous vide à  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . L'extrait est ensuite chromatographié sur une plaque de gel de silice MERCK à l'échelle préparative avec le solvant suivant : n butanol, acide acétique, eau (12, 3, 5 v/v). Une tache fluorescente en relation avec l'injection de toxique est observée à  $254 \text{ nm}$ , le R.F. de celle-ci est de 0,66. Le foie d'un Rat témoin ayant reçu le véhicule seul est traité en parallèle afin de réaliser un extrait témoin.

Le pouvoir inhibiteur de ce métabolite hépatique est testé *in vitro*.

#### b) Expérimentation animale

Animaux : Rats E.O.P.S., origine SPRAGUE-DAWLEY

Sexe : mâle

Poids : 250 à 280 g

Les rats ne reçoivent pas de nourriture pendant les 12 heures qui précèdent le sacrifice.

- *Activité M.A.O. in vivo*

Véhicule : H.P.M.C.

Voie : I.P.

Dose ophénylindole : 400 mg/kg

Sacrifice : 3 heures après l'injection.

Les animaux témoins reçoivent le véhicule seul sous le même volume. L'injection du produit ou du véhicule est toujours effectuée entre 9 h.30 et 10 h.30.

- *Activité M.A.O. in vitro*

Toutes les mesures sont effectuées sur la M.A.O. du foie de Rat non traité.

#### II.4 Résultats

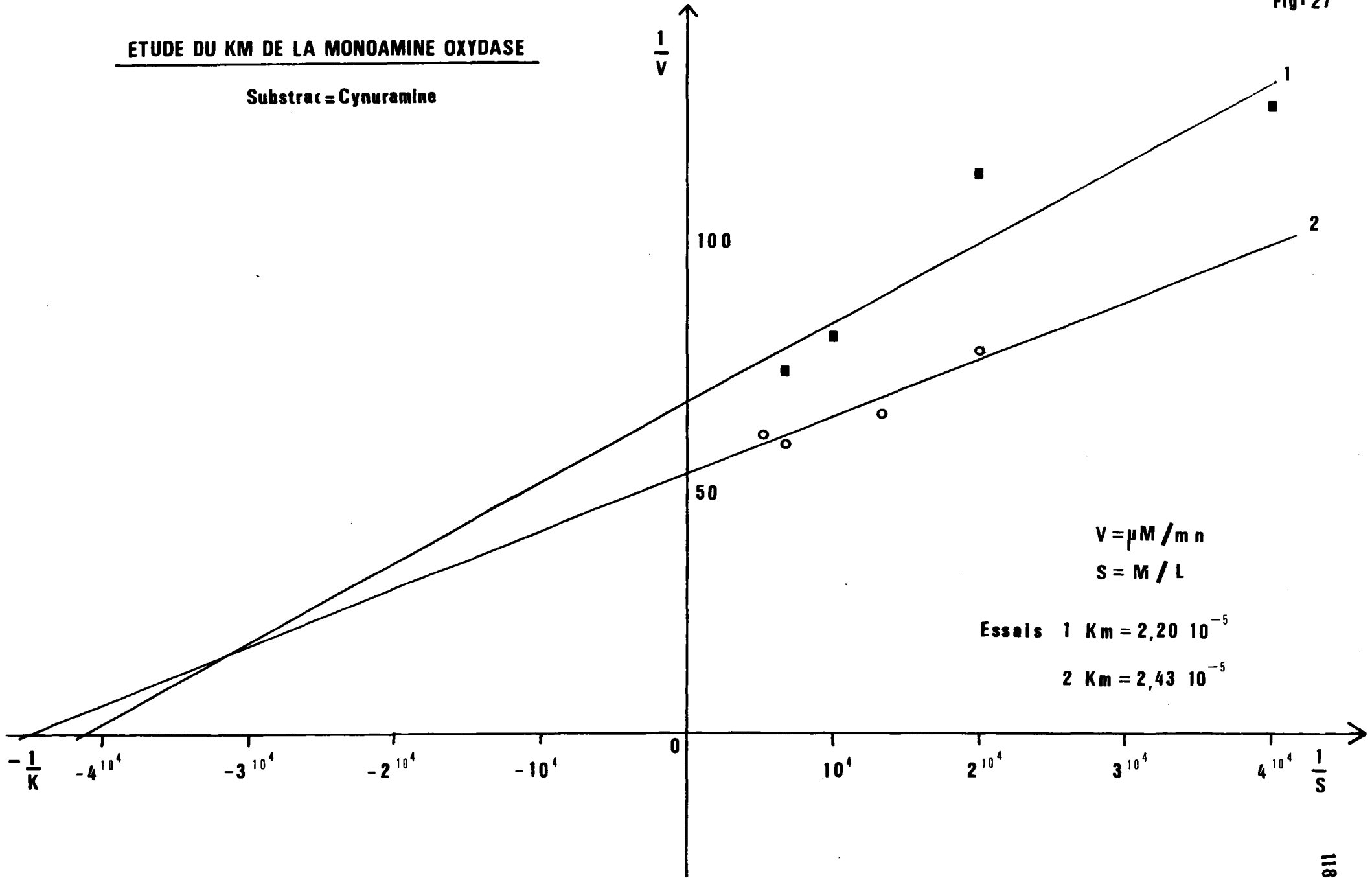
a) Etude du k.m. de la cynuramine

Dans nos conditions expérimentales pour la M.A.O. de foie de Rat, nous obtenons un k.m. moyen de  $2,32 \cdot 10^{-5}$  M. La figure 27 représente 2 droites de LINEWEAVER-BURK pour 2 homogénats différents. ROBINSON D.S., en 1968 (86) a étudié les k.m. d'autres substrats pour la mono amine oxydase des mitochondries de foie de Rat, il obtient les résultats suivants :

Fig. 27

ETUDE DU KM DE LA MONOAMINE OXYDASE

Substrac = Cynuramine



Substrats	k.m.
Benzylamine	$4,5 \cdot 10^{-4}$ M
Tryptamine	$4,5 \cdot 10^{-4}$ M
Tyramine	$6,3 \cdot 10^{-5}$ M
Sérotonine	$4,0 \cdot 10^{-5}$ M

b) Action de l'αphénylindole (in vivo) sur la monoamine-oxydase de différents organes chez le Rat.

Le tableau n° XXI présente les différentes valeurs de l'activité de la M.A.O. chez les animaux traités et témoins. Cette activité est mesurée sur le foie, le rein et le cerveau (cortex). Nous observons une inhibition de 25 % pour le rein, 32 % le cerveau, 36 % le foie. Nous avons comparé les moyennes entre témoins et traités dans les trois cas.

Le test de STUDENT FISHER nous donne les valeurs de "t" ci-après avec la probabilité P. d'être significativement différentes.

Etude de l'activité de la M.A.O. chez le Rat *in vivo*

	TEMOINS	TRAITES	Inhibition %
REIN	Nombre de mesures 6	6	25 %
	moyenne 1,00 U.I. écart type 0,14	0,767 U.I. 0,080	
FOIE	Nombre de mesures 9	6	36 %
	moyenne 24,0 U.I. écart type 10,0	13,3 U.I. 4,6	
	Valeurs de la littérature moyenne 16,4 U.I. (82) moyenne 22 U.I. (12)		
CERVEAU	Nombre de mesures 6	6	32 %
	moyenne 2,26 U.I. écart type 0,72	1,54 U.I. 0,29	
	Valeurs de la littérature moyenne 2,8 U.I. (82) moyenne 5,2 U.I. (12)		
	1 U.I. = 1 $\mu$ M h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>		

Tableau n° XXI



Organe	Valeur de t	Nombre de D.L.	Probabilité
Rein	3,54	10	99 % >
Foie	1,98	13	90 % >
Cortex	2,27	10	95 % >

L' $\alpha$ phénylindole *in vivo* a donc une action inhibitrice sur la mono-amine-oxydase de ces 3 organes étudiés. Chez les animaux "témoins" véhicules", nous avons obtenu pour le foie et le cerveau, des valeurs sensiblement égales à celles de la littérature (12), (80). (tableau n° XXI).

c) Etude de l'inhibition de la mono-amine-oxydase de foie de Rat *in vitro*

- Action de l'iproniazide (figure n° 28)

La concentration finale de l'inhibiteur est de  $6,3 \cdot 10^{-6}$  M/l. Dans nos conditions expérimentales, le pourcentage d'inhibition obtenue est de 21 %. A la même concentration et avec le même substrat SHAWKY A.A. et col., en 1973 (96) obtiennent une inhibition de 50 %.

- Action de l' $\alpha$ phénylindole (figure n° 28)

La concentration finale de l' $\alpha$ phénylindole est de  $1,73 \cdot 10^{-5}$  M/l. Aucune inhibition n'est observée *in vitro* en sa présence.

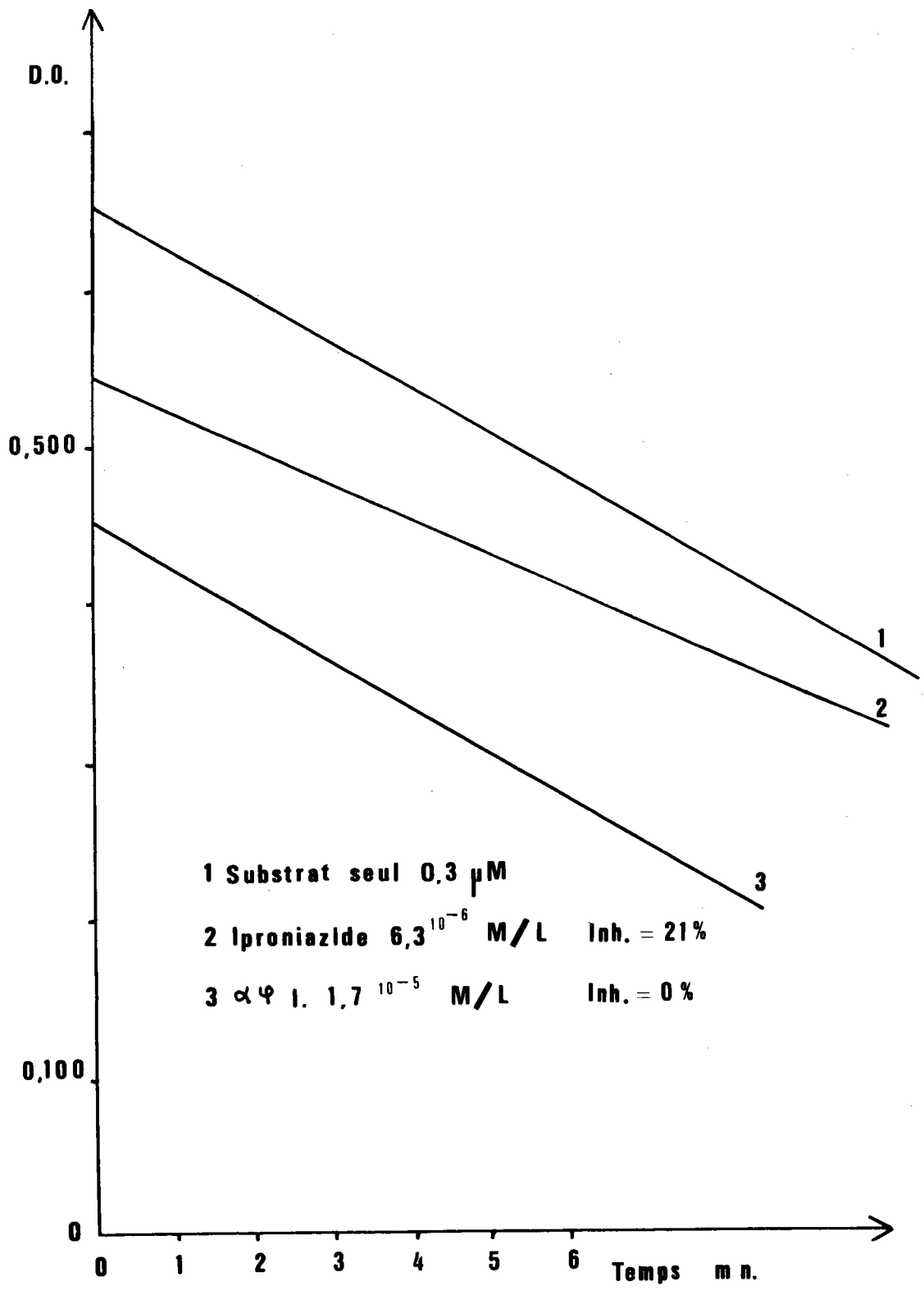
- Action d'un métabolite hépatique de l' $\alpha$ phénylindole

Technique d'extraction (voir chapitre II.3 d)).

ETUDE DE L'INHIBITION DE LA M.A.O DE FOIE DE RAT IN VITRO

par l' $\alpha\psi$ i et l'iproniazide

Fig. 28



Dans tous les cas nous obtenons une inhibition, le taux de celle-ci varie d'une expérience à l'autre, en fonction de la quantité de métabolites présente dans l'extrait. Le pourcentage d'inhibition obtenu est de 44 % environ. Ces expériences ont été réalisées plusieurs fois avec plusieurs extraits du même métabolite.

- Action du même métabolite extrait de l'urine de Rat

L'extraction de ce métabolite est décrite dans la IIIe partie (chapitre I.5). La concentration du métabolite est inconnue. La figure n° 29 représente la mesure de l'activité sans inhibiteur (courbes 1 et 4) avec le métabolite (courbes 2, 3 et 5). Le tableau ci-dessous présente les différents résultats obtenus.

Quantité de substrat	Volume d'inhibiteur	% d'inhibition
0,6 $\mu$ M	0,100 ml	15 %
	0,200 ml	24 %
0,3 $\mu$ M	0,200 ml	36 %

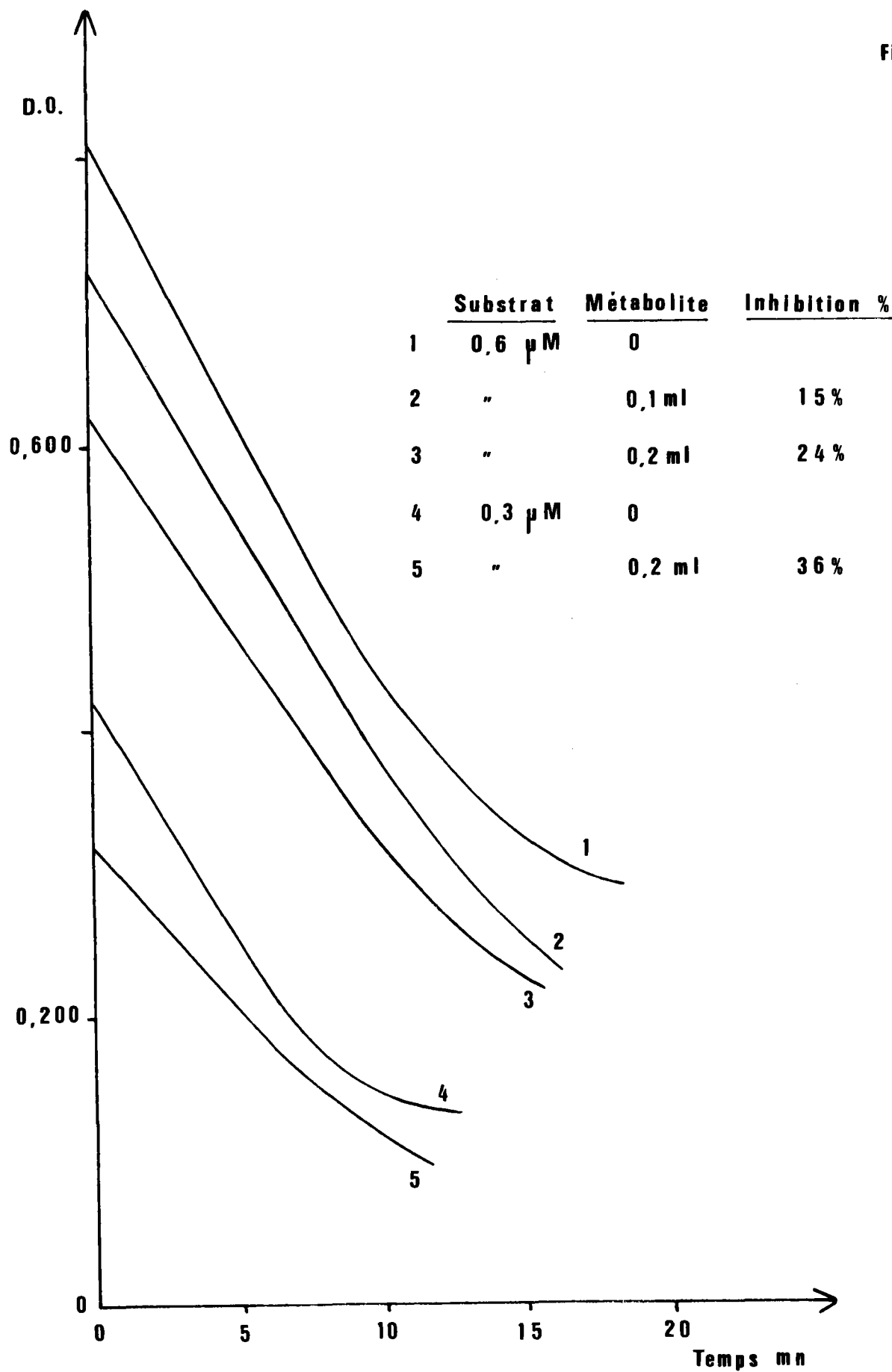
### II.5 Conclusions

L'action inhibitrice sur la mono amine oxydase du foie, du rein et du cerveau de Rat, observée *in vivo* n'est pas due à l'aphénylindole lui-même. En effet il n'a aucune action sur la M.A.O. du foie de rat *in vitro*. Alors que sur le même homogénat l'iproniazide, à la concentration finale de  $6,3 \cdot 10^{-6}$  M/l provoque une inhibition de 21 %. Par contre le métabolite le plus important de l'aphénylindole, extrait à partir du foie ou de l'urine de Rat traité, montre une action inhibitrice très nette sur la M.A.O. *in vitro*.

**ETUDE DE L'INHIBITION DE LA M.A.O DE FOIE DE RAT IN VITRO**

par un métabolite de l' $\alpha$  phénylindole

Fig. 29



*Dans la IIIe partie de notre travail, nous étudierons plus particulièrement le métabolisme de l'aphénylindole chez le Rat et le métabolite qui possède un pouvoir anti mono-amine-oxydase sera identifié.*

## **III<sup>ème</sup> PARTIE**

**ETUDE DU METABOLISME DE**

**L' $\alpha$ -PHENYLINDOLE**

ETUDE DU METABOLISMEDE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE

*L'étude des cinétiques et du métabolisme nécessite de nombreuses mesures dans les différents milieux biologiques. L'usage des radio-éléments facilite grandement ces mesures et permet de pousser les investigations avec finesse et diversité. C'est pourquoi une synthèse de la molécule d' $\alpha$ phénylindole dont le carbone 2 est un atome de carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) a été étudiée et réalisée au sein du service des molécules marquées du C.E.N. SACLAY (C.E.A.).*

# **CHAPITRE I**

## **TECHNIQUES UTILISEES**



## I - TECHNIQUES

### I.1 Cathétérisme permanent chez le Rat vigile

L'étude de la cinétique d'une substance sur animal nous place devant une alternative quant au choix de l'espèce. En effet l'animal doit être de taille suffisante pour permettre un échantillonnage sanguin important en volume, fréquence et durée, mais le prix de revient de la molécule marquée limite fortement cette taille. Le choix s'est porté sur le Rat qui réalise un bon compromis entre ces deux exigences.

La technique utilisée est décrite par BONNET P. et col., en 1978 (14). La canulation de la carotide et de la vessie est effectuée chez le Rat au cours d'une brève intervention chirurgicale. L'implantation de tels cathéters permet ensuite des prélèvements de sang et d'urine chez le Rat vigile, non contraint. De cette façon nous pouvons procéder à un nombre important de prélèvements sanguins voisin de 15 en 24 heures. Le prélèvement urinaire correspond à un lavage de la vessie par du sérum physiologique (2 ml) introduit par le cathéter vésical. Il est ainsi possible d'effectuer les cinétiques sanguines et urinaires des toxiques.

La chronologie des prélèvements sanguins et urinaires peut être modifiée suivant les conditions expérimentales.

### I.2 Mesure de la radioactivité totale des échantillons biologiques

Le carbone 14 est transformé par combustion (oxymat IN 4101) en CO<sub>2</sub>, qui est piégé dans un mélange scintillant spécial contenant de la phényléthylamine. La mesure de l'activité de l'échantillon est ensuite effectuée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (type

Intertechnique S L 30). La correction de *QUENCHING* est effectuée par la méthode du standard externe.

### I.3 Technique d'autoradiographie sur le Rat

Les animaux reçoivent le produit par différentes voies. Ils sont endormis puis congelés immédiatement dans l'azote liquide. Après un séjour d'au moins 48 heures dans un congélateur à - 30 ou - 35 °C, ils sont découpés au microtome à congélation en coupes longitudinales de 20 à 30  $\mu$  d'épaisseur, recueillis sur ruban adhésif. Les coupes ainsi obtenues sont aussitôt placées dans un congélateur à - 30 - 35 °C où une sublimation avec dépôt de glace sur les parois froides de l'appareil les déshydrate en 10 à 15 jours. Les coupes débarrassées de l'eau peuvent alors être ramenées à la température ambiante.

Dans une chambre noire, ces coupes sont collées grâce au ruban adhésif sur un film radiographique type KODAK. L'ensemble est laissé en contact pendant 4 jours, puis les films sont développés selon le procédé classique.

On obtient ainsi une coupe deshydratée qui aide à la localisation de l'image radiographique où le taux de radioactivité se traduit par toutes les teintes allant du noir à la couleur du fond du film développé. Les autoradiographies sont ensuite analysées.

### I.4 Techniques de séparation des métabolites de l'aphénylindole des milieux biologiques

#### a) Recherche et séparation des métabolites libres.

Pour le foie, nous réalisons un homogénat avec 5 g de tissu et 20 ml d'eau bidistillée à 4 °C. L'homogénat est ensuite centrifugé 15 minutes à 2 000 g.

- *Technique de précipitation à l'éthanol.*

Nous avons appliqué cette méthode sur différents milieux biologiques et sur le foie.

	<i>Volume utilisé ml</i>	<i>Ethanol ml</i>
<i>Homogénat de foie surnageant</i>	2	5
<i>Bile</i>	0,2	1
<i>Perfusat</i>	0,4	1

Les différents mélanges sont agités, puis centrifugés 10 minutes à 1 300 g. Chaque surnageant est concentré sous vide à 30 °C, puis chromatographié sur une plaque de gel de silice (MERCK) avec le solvant (1) : chloroforme, méthanol (6, 4, v/v).

- *Technique de précipitation au tungstate*

Nous avons appliqué cette méthode pour la bile, le perfusat, l'urine et le foie.

	Volume utilisé ml	H <sub>2</sub> O. ml	Tungstâte de Na 10 % ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,66 N ml
Homogénat de foie surnageant	2	0,5	1	1
Bile	0,2	2	1	1
Perfusat	0,4	2	1	1
Urine	1	1,5	1	1

Après agitation, chaque mélange est centrifugé 20 minutes à 1 300 g pour éliminer les protéines. Le surnageant est ensuite récupéré et extrait avec 4 ml d'éther éthylique, celui-ci est séparé puis évaporé. L'extrait sec est repris avec 100 µl d'un mélange d'isopropanol eau (v/v). Ce mélange est chromatographié sur plaque.

absorbant : gel de silice MERCK.

solution de migration (2) : Isopropanol, ammoniacque,  
eau (8, 1, 1 v/v).

La plaque de chromatographie est activée au préalable par chauffage, 30 minutes à 100 °C.

- Après séchage des plaques chromatographiques la mesure de l'activité le long du chromatogramme est effectuée avec un compteur à circulation de gaz (méthane) BERTHOLD.

b) Recherche et séparation des métabolites conjugués

Nous appliquons cette méthode pour le foie, la bile, le perfusat et l'urine.

La technique utilisée est identique à celle décrite ci-dessus (précipitation au tungstate et extraction). Mais nous pratiquons une hydrolyse acide (0,2 ml d'acide perchlorique 60 %, 10 minutes à 100 °C) avant l'extraction à l'éther éthylique.

#### I.5 Technique de séparation et de purification du métabolite principal de l'urine de Rat

- Le protocole est décrit dans le tableau n° XXII.

L'utilisation du porapack Q (résine de polystyrène neutre) permet d'extraire les composés indoliques des solutions aqueuses d'après NIEDERWIESER A. et col., en 1971 (71).

Une autre technique décrite par ASATOR A. et DALGLIESH C.E., en 1956 (3), qui préconisent d'utiliser du charbon partiellement désactivé avec différents composés. Cette méthode nous est apparue moins sélective et plus complexe à utiliser. Nous ne l'avons donc pas retenue.

TECHNIQUE DE PURIFICATION DU METABOLITEPRINCIPAL URINAIRE DE L' $\alpha$ PHENYLINDOLE

ACTIONS	CONDITIONS	REFERENCE
Recueillir	150 à 200 ml d'urine sur acide acétique (5 ml)	
Ajouter	10 mg d'acide ascorbique	
Ajuster à pH2	avec HCl concentré	
Centrifuger	10 minutes à 1 700 g	
Ajouter	5 g de Porapak Q	(71)
Agiter	15 minutes	
Filtrer	sur verre fritté	
Laver	avec au moins 200 ml d'eau jeter le filtrat	
Désorber lentement	avec 400 ml éthanol/eau v/v	
Evaporer	l'éthanol sous vide à 30 °C	
Verser la phase aqueuse	sur une colonne de résine IR 120 H <sup>+</sup> (5 g)	
Laver la colonne	avec 50 ml d'eau bidistillée	
Saturer	la fraction aqueuse avec Na Cl	
Extraction	au 1 butanol v/v	
Concentrer	le 1 butanol sous vide à 35 °C	
Chromatographie sur plaque	gel de silice (préparative) solvant (chloroforme- $\alpha$ -éthanol 6,4)	
Gratter la bande fluorescente	éluer avec de l'éthanol - analyser)	

Tableau n° XXII

## I.6 Méthodes d'analyse du métabolite principal

### - Spectre infrarouge

Ils sont réalisés sur les composés de synthèse. Le métabolite extrait de l'urine de Rat nous donne un spectre difficilement exploitable.

### - Spectre de masse sur le métabolite et les composés de synthèse

Les différents produits sont étudiés par introduction directe.

### - Chromatographie en phase gazeuse

Colonne : QF<sub>1</sub>                      gaz vecteur N<sub>2</sub>, 2 bars  
Température . injecteur et détecteur : 200 °C  
                  . colonne : 160 °C  
                  . détection par ionisation de flamme.

### - Chromatographie sur plaque gel de silice

Solvant : chloroforme méthanol (6,4 v/v)  
Révélation : réactif de PILET (1ère partie).

## I.7 Technique de séparation de l' $\alpha$ phénylindole et de son métabolite principal

### a) séparation à partir des tissus

Nous avons utilisé la technique décrite dans le chapitre précédent (extraction à l'éthanol). Elle est appliquée pour le foie et le rein, dans le cas du cerveau nous avons ajouté de la soude N pour saponifier les lipides dans le milieu éthanol.

Dans tous les cas, nous avons réalisé une extraction à l'aide du 1 butanol avant d'effectuer le dépôt sur la plaque chromatographique.

### b) Séparation à partir du sang (cinétique du métabolite et de l' $\alpha$ phénylindole)

Le volume de sang prélevé est de 500  $\mu$ l, il est centrifugé 3 minutes à 1 400 g, puis le plasma est récupéré. Sur une aliquote, nous effectuons une mesure de l'activité totale. Un volume de 200  $\mu$ l de plasma est prélevé auquel nous ajoutons 800  $\mu$ l d'eau bidistillée et 2 ml de 1 butanol, afin d'extraire dans la phase organique l' $\alpha$ phénylindole et son métabolite principal. Après agitation et centrifugation 15 minutes à 1 400 g, le surnageant est déposé quantitativement sur une plaque de chromatographie.

Support : gel de silice (MERCK)

Solution de migration (1) : chloroforme, méthanol (6,4).

L'activité le long des chromatogrammes est mesurée à l'aide d'un compteur à circulation de gaz (méthane) BERTHOLD.



### I.8 Technique du foie isolé et perfusé de Rat

La technique utilisée est celle décrite par CATAU G. en 1975 (16). Le milieu de perfusion est constitué par du sang de Rat dilué. La solution de dilution contient : différents sels minéraux, de l'albumine et du glucose. La dilution du sang est la suivante : 65 ml de soluté + 25 ml de sang hépariné.

## **CHAPITRE II**

### **EXPERIMENTATION ANIMALE**

## EXPERIMENTATIONS ANIMALES

Pour toutes les recherches du métabolisme nous avons utilisé les animaux suivants :

Rats E.O.P.S. albinos souche O.F.A.

Origine SPRAGUE DAWLEY

Sexe : mâle

Seul leurs poids varient d'une expérience à l'autre.

### II.1 Cinétiques globales

Poids des animaux 350 g

Rats instrumentés (chapitre I.1)

Dose de toxique  $^{14}\text{C}$  : 100  $\mu$  Cie

Véhicule : éthanol 100  $\mu$ l

Voies : orale, intrapéritonéale (I.P.), injection directe dans la circulation I.C. (carotide).

Les prélèvements de sang et d'urine sont effectués d'après le protocole suivant :

- . pour les voies I.P. et per os, toutes les 30 minutes pendant 2 heures, puis toutes les heures pendant 6 heures;
- . pour la voie I.C., toutes les 15 minutes pendant 2 heures, puis toutes les 30 minutes pendant 2 heures également et enfin toutes les heures pendant 3 heures;

- . A partir du 2ème jour les prélèvements sont effectués tous les jours ouvrables.

## II.2 Autoradiographie

Poids des animaux : 110 g

Voies : per os et I.P.

Dose :  $\alpha$ phénylindole  $^{14}\text{C}_2$  100  $\mu$  Cie par Rat

Véhicule : éthanol.

- . Voies per os : les animaux sont sacrifiés à 5 minutes et 3 heures après l'administration du produit.
- . Voie I.P. : les animaux sont sacrifiés 5 minutes, 1 heure et 2 heures après l'injection.

## II.3 Etude des métabolites urinaires

- Recherche du nombre de métabolites urinaires

Poids des animaux : 350 g

Doses :  $\alpha$ phénylindole marqué  $^{14}\text{C}_2$  100  $\mu$  Cie/Rat

$\alpha$ phénylindole non marqué 200 mg/kg

Voie : I.P.

Véhicule : éthanol + sérum physiologique.

Le rat est placé dans une cage à métabolisme afin de recueillir l'urine de 24 heures.

- Séparation et identification du métabolite principal urinaire

Poids des animaux : 300 g

Nombre : 6 Rats

- . 1 Rat traité avec de l'aphénylindole  $^{14}\text{C}$  100  $\mu$  Cie + 200 mg/kg d'aphénylindole non marqué;
- . 5 Rats traités avec de l'aphénylindole non marqué 200 mg/kg

Véhicules : éthanol + sérum physiologique

Voie : I.P.

Les urines de 24 heures sont recueillies.

#### II.4 Cinétique sanguine de l'aphénylindole et de son métabolite principal

Animaux : Rat instrumenté d'un poids de 300 g

Dose : aphénylindole  $^{14}\text{C}$  100  $\mu$  Cie/Rat

Voie : I.P.

Véhicule : éthanol

Le protocole des prélèvements sanguins est le suivant : prélèvements à 5, 15, 30, 45 et 60 minutes, puis toutes les heures pendant 5 heures.

#### II.5 Cinétiques du foie isolé et perfusé

L'aphénylindole  $^{14}\text{C}$  (25  $\mu$  Cie) est mélangé au perfusat au temps "t=0". Des prélèvements de bile et de perfusat sont réalisés pendant la durée des expériences et, à la fin de celles-ci, le foie est prélevé.

- 1°) La mesure de l'activité totale est effectuée sur les différents échantillons biologiques.
- 2°) Lors d'une autre expérience, nous séparons les métabolites du perfusât, de la bile et du foie, de façon à déterminer leurs cinétiques notamment au niveau biliaire.

#### II.6 Répartition de l'aphénylindole et de son métabolite principal dans différents tissus

Poids des animaux : 300 g

Dose : aphénylindole  $^{14}\text{C}$  100  $\mu\text{Ci}/\text{Rat}$  + aphénylindole non marqué 200 mg/kg

Voie : I.P.

Véhicule : éthanol + sérum physiologique.

Les animaux sont sacrifiés 3 heures après l'injection. Les organes sont prélevés très rapidement.

## **CHAPITRE III**

### **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## RESULTATS et DISCUSSIONS

### III.1 Etude sur le Rat instrumenté - cinétique globale -

Nous avons réalisé plusieurs cinétiques par différentes voies (I.P. - per os - I.C.) et avec différents véhicules (éthanol, H.P.M.C., D.M.F. 50 %, suspension dans du sérum physiologique).

- Quelle que soit la voie ou le véhicule, nous retrouvons du  $^{14}\text{C}$  dans le sang, les urines et les fèces. Nous présentons ici les cinétiques obtenues avec l'éthanol comme véhicule.

La figure n° 30 représente l'activité mesurée dans le sang en fonction du temps. Nous remarquons que la concentration en  $^{14}\text{C}$  dans le sang est maximale rapidement après l'injection, l'utilisation de l'H.P.M.C. comme véhicule provoque un retard de ce maximum (30 à 45 minutes). Avec la voie orale (figure n° 30), nous remarquons 2 maximums l'un à 40 minutes et l'autre à 6 heures. Le premier traduit le passage de l'αphénylindole au niveau sanguin, le deuxième serait probablement due à l'action de métabolisation de l'αphénylindole par la flore intestinale, puis passage des métabolites au niveau sanguin. Dans les 2 autres cas, la décroissance suivant le maximum est d'allure exponentielle.

La figure n° 31 représente le débit de la radioactivité urinaire exprimé en D.P.M. par heure. Dans tous les cas, nous observons un



Fig. 30

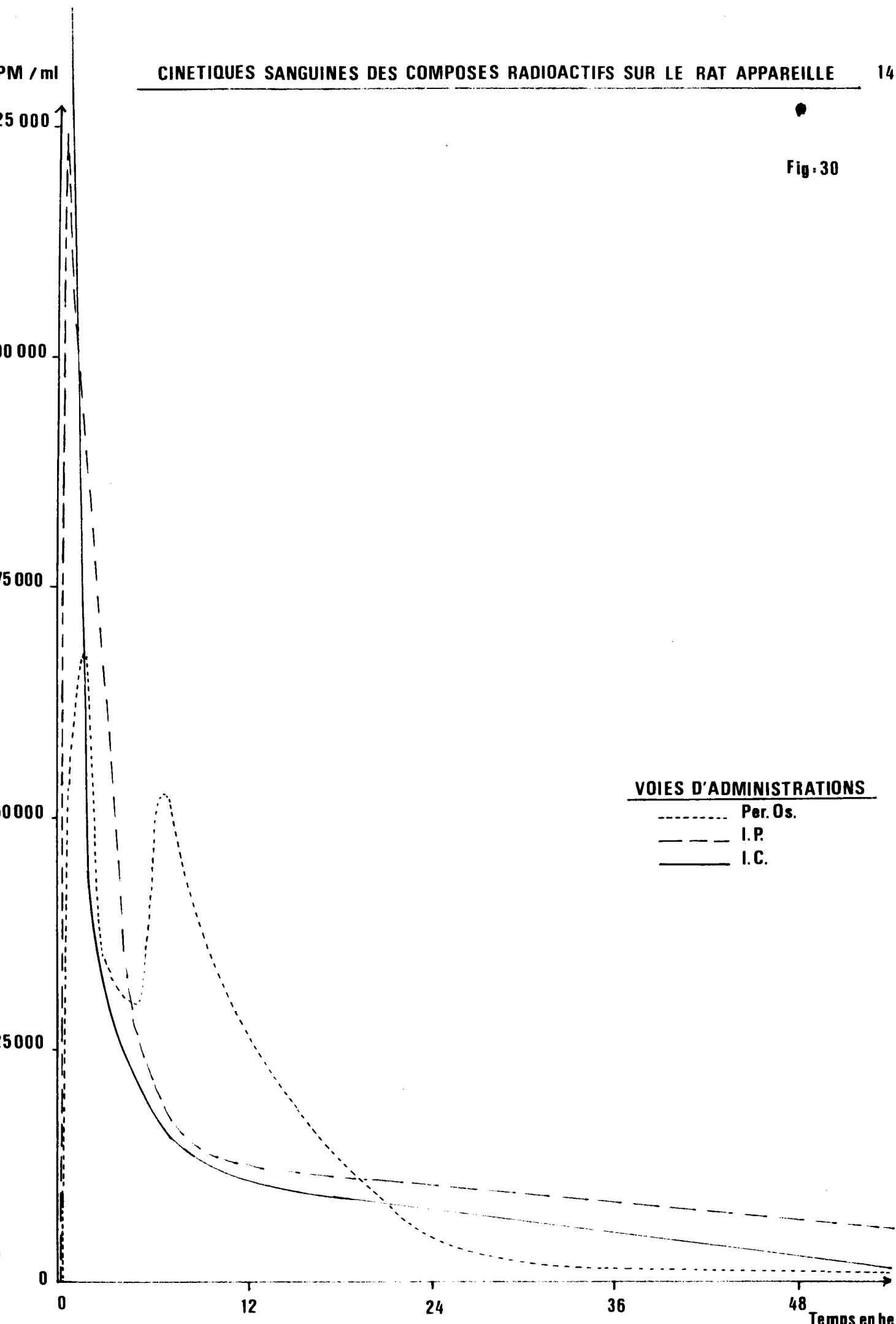
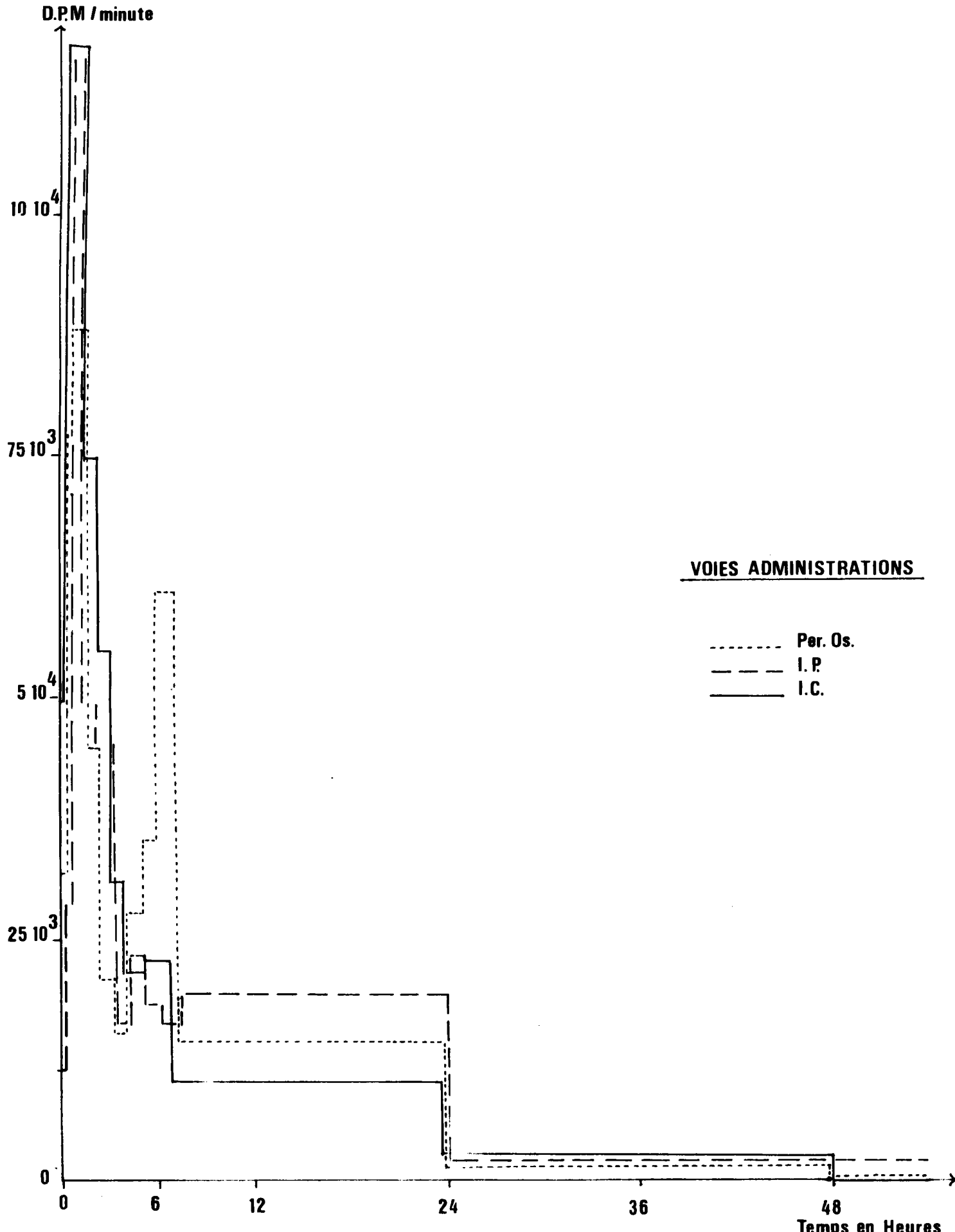


Fig. 31



parallélisme entre la courbe de concentration en  $^{14}\text{C}$  dans le sang et la sortie urinaire. 24 heures après l'administration du toxique la concentration sanguine est très faible, elle n'est plus mesurable à partir du quatrième jour. L'élimination urinaire, elle aussi, est très importante dans les premières 24 heures suivant l'administration. Mais elle continue très longtemps, à un niveau beaucoup plus faible jusqu'à au moins 1 mois et demi (mesurée dans le cas I.P. éthanol). Les cinétiques sanguines et urinaires sont semblables pour les voies I.P. et I.C.. L'élimination urinaire après 48 heures est identique pour les trois voies.

Dans tous les cas, nous observons aussi une sortie de  $^{14}\text{C}$  dans les fèces, ce qui montre l'élimination de métabolites par la voie biliaire. Cette excrétion est d'ailleurs probablement aussi importante quantitativement que l'excrétion urinaire.

Nous n'avons pas pu quantifier exactement l'importance de la sortie fécale car l'extraction des fèces est difficile à effectuer avec un rendement constant.

Le bilan actif des cinétiques n'étant pas complet, nous avons été amenés à mesurer la radioactivité du  $\text{CO}_2$  expiré, celui-ci est actif, dès le premier prélèvement, 30 minutes après l'injection (voie I.P.).

### III.2 Etude autoradiographique de l'aphénylindole

Cette étude a été réalisée avec de l'aphénylindole marqué sur le  $\text{C}^2$ . Les autoradiographies présentent donc la répartition dans l'animal de ce Carbone<sup>2</sup>.

#### III.2.1 Voie per os

Les animaux ont été sacrifiés 5 minutes et 3 heures après l'administration.

\* Après 5 minutes

Le produit se trouve dans le tube digestif, portion antérieure (cavité buccale, oesophage, estomac et duodénum). Le foie renferme une quantité non négligeable de radioactivité. Les cortex rénal et surrénalien, le myocarde, le poumon et le tégument (épiderme, derme et peaucier) commencent à être marqués.

\* Après 3 heures (figure n° 32)

Tout l'organisme présente une radioactivité plus ou moins importante selon les organes et tissus, mais on peut définir un fond d'intensité modérée (muscles, système nerveux central, encéphale et moelle épinière, moelle osseuse, testicules) et des zones de concentration plus grandes. Ce sont dans l'ordre croissant :

- . le tégument, les glandes salivaires et lacrymales, les sinus nasaux, le sang, le poumon, la graisse brune et le tissu adipeux crural et para épidiidymaire.
- . une partie du cortex rénal
- . le foie et certaines zones du cortex rénal (le rein a un aspect "piqueté")
- . le contenu du tube digestif antérieur ...

Il faut signaler :

- . la surrénale n'a pas été retrouvée sur les coupes
- . les parois osseuses et le thymus ne sont pas marqués

- La moelle osseuse et le système nerveux sont marqués mais comme le fond.

L'analyse de ces images montre :

- .. qu'il y a une absorption du  $^{14}\text{C}$  en provenance de l'aphényl-indole
- .. qu'on le retrouve dans le sang, qui le distribue rapidement dans presque tout l'organisme avec des répartitions différentes (tissus glandulaires, tissus adipeux, tégument, ...)
- .. en l'occurrence une substance radioactive traverse la barrière hémato-méningée
- .. il existe des concentrations rénales de la radioactivité (voie d'élimination?).

AUTORADIOGRAPHIE (P.O. - 3 h.)

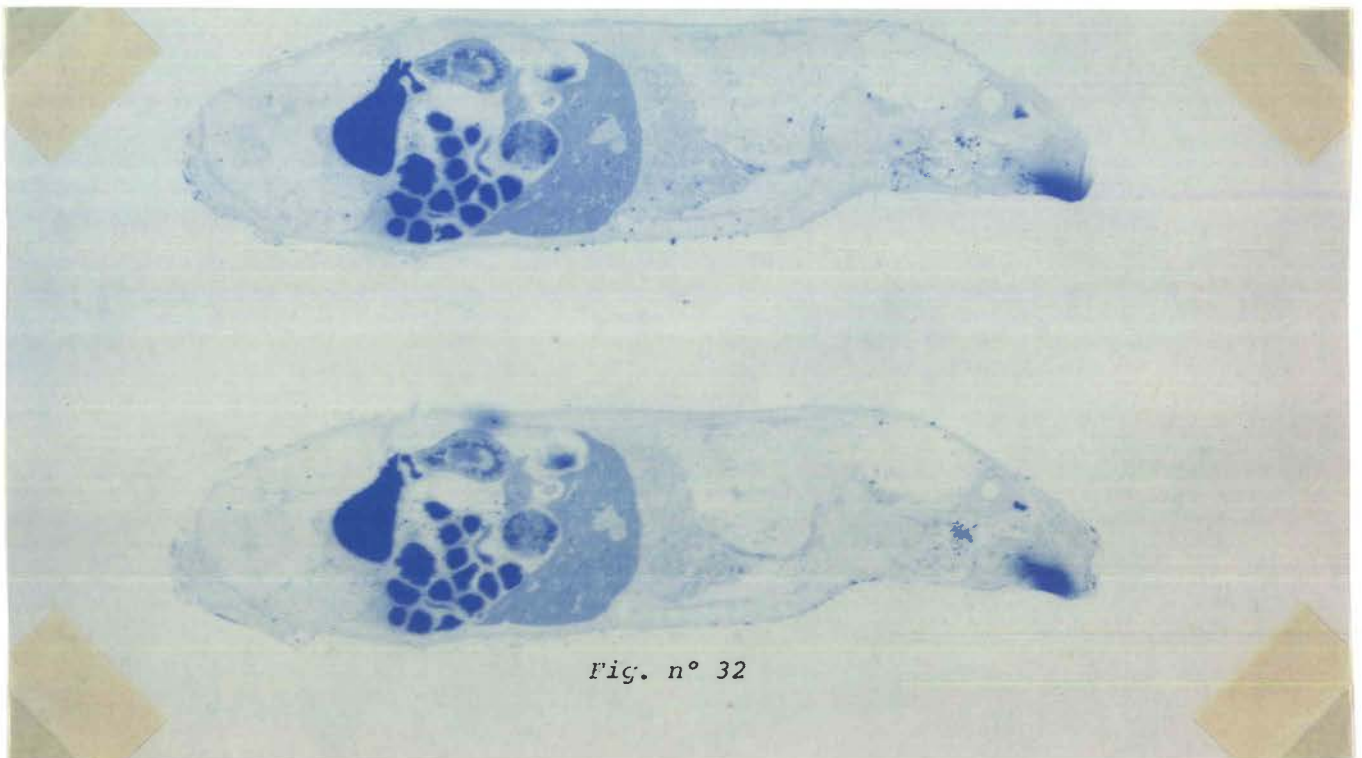


Fig. n° 32

### III.2.2. Voie intrapéritonéale

Les animaux ont été sacrifiés 5 minutes, 1 heure et 2 heures après l'injection.

#### \* Après 5 minutes

Le produit se distribue dans tout l'organisme plus rapidement qu'après administration orale, si bien que dans les images autoradiographiques, il est possible de définir un fond (muscle, moelle osseuse et médullosurrénale) et des zones où la radioactivité est plus intense. Dans l'ordre croissant, ce sont :

- . les glandes salivaires et lacrymales, le système nerveux central (encéphale et moelle épinière), le sang, le tégument, le tissu adipeux crural et para épiddymaire.
  
- . le myocarde
  
- . la graisse brune et le cortex rénal
  
- . le foie et la corticosurrénale
  
- . le système biliaire intra et extrahépatique et le contenu du duodénum.

La zone interviscérale est fortement marquée en raison de la voie d'administration.

\* Après 1 heure

On retrouve une disposition analogue à celle du paragraphe précédent : seules les variations sont mentionnées ci-après :

- . le rein est généralement plus marqué et présente des concentrations focales aussi sombres que le système biliaire
- . par contre le myocarde, le système nerveux central (encéphale et moelle épinière) et la médulla du rein sont moins marqués
- . la zone interviscérale est moins marquée.

\* Après 3 heures

On remarque une diminution de la radioactivité dans certains foyers modifiant la répartition précédemment établie. On reconnaît toujours un fond (muscle, moelle osseuse, système nerveux central) et les concentrations croissantes suivantes :

- . glandes lacrymales, tégument, graisse brune, tissu adipeux crural et paraépididymaire, portion du cortex rénal et corticosurrénale
- . foie
- . système biliaire intra et extrahépatique, contenu du tube digestif antéromédian (duodénum, jéjunum).

L'analyse de ces images montre comme précédemment :

- .. une absorption du  $^{14}\text{C}$  que l'on trouve dans le sang et qui se distribue rapidement dans tout l'organisme
- .. un passage de la barrière hémato-méningée
- .. une voie d'élimination rénale est possible
- .. en outre, une seconde voie d'élimination : la bile. Nous avons localisé un composé radioactif dans le canal cholédoque et au niveau intestinal lors de l'injection de l'αphénylindole par voie I.P.

### III.3 Mesure de l'activité dans différents tissus après l'injection d'αphénylindole ( $^{14}\text{C}_2$ )

La mesure de l'activité dans les différents organes montre la présence de  $^{14}\text{C}$  principalement dans le foie. (voir tableau n° XXIII). Ces résultats confirment l'étude autoradiographique.

Le rôle du foie est confirmé ici. L'activité dans cet organe est la plus importante à 5 minutes après l'injection. Elle décroît ensuite en fonction du temps, mais reste toujours la plus importante par rapport aux autres organes. La répartition de la radioactivité est différente suivant les lobes. Il est probable que tous les lobes du foie n'aient pas la même fonction.

Nous pouvons classer les différents organes en 4 groupes d'après leurs cinétiques dans le temps.

- groupe 1 : cervelet, poumon, rate, testicule.

Dans ce groupe la radioactivité décroît de 5 minutes à 3 heures.

- groupe 2 : surrénales, foie.

La radioactivité diminue rapidement de 5 minutes à 1 heure puis, plus lentement entre 1 et 3 heures.



- groupe 3 : coeur, cerveau, bulbe.

*La radioactivité est stable de 5 minutes à 1 heure, puis elle décroît de 1 heure à 3 heures.*

- groupe 4 : rein.

*La radioactivité augmente de 5 minutes à 1 heure, puis diminue ensuite.*

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE DANS DIFFERENTS TISSUS

Organe \ Temps	Temps		
	5 minutes	1 heure	3 heures
Sang	35.200 D.P.M/ml	105.500 D.P.M/ml	24.200 D.P.M/ml
Cerveau	356.890 D.P.M 0,2 %	372.700 D.P.M 0,2 %	54.480 D.P.M 0,03 %
Cervelet	72.600 D.P.M 0,04 %	48.313 D.P.M 0,02 %	13.600 D.P.M 0,007 %
Bulbe	61.320 D.P.M 0,03 %	82.460 D.P.M 0,04 %	4.400 D.P.M 0,002 %
Poumon	1.017.910 D.P.M 0,5 %	535.840 D.P.M 0,3 %	330.880 D.P.M 0,2 %
Coeur	366.730 D.P.M 0,2 %	348.840 D.P.M 0,2 %	82.800 D.P.M 0,04 %
Foie	25.647.840 D.P.M 13,4 %	14.931.470 D.P.M 7,4 %	11.035.430 D.P.M 6,25 %
Rein	1.434.780 D.P.M 0,7 %	2.263.030 D.P.M 1,1 %	1.395.890 D.P.M 0,8 %
Surrénales	265.540 D.P.M 0,1 %	73.730 D.P.M 0,04 %	55.890 D.P.M 0,03 %
Rate	1.537.050 D.P.M 0,8 %	205.850 D.P.M 0,1 %	85.040 D.P.M 0,2 %
Testicules	2.818.570 D.P.M 1,5 %	645.070 D.P.M 0,31 %	361.210 D.P.M 0,05 %

% = pourcentage d'activité dans l'organe par rapport à l'activité injectée.

D.P.M. = activité totale par organe.

Tableau n° XXIII

### III.4 Etude des métabolites urinaires de l'αphénylindole chez le Rat

#### A) Recherche du nombre de métabolites urinaires

L'urine de 24 h. d'un Rat ayant reçu de l'αphénylindole  $^{14}\text{C}_2$  + αphénylindole non radioactif est traité suivant le protocole décrit dans le chapitre II.3.

La figure n° 33 représente la mesure de l'activité le long de 2 chromatogrammes, l'un pour les métabolites libres, l'autre pour les métabolites conjugués. Au fur et à mesure de leur mise en évidence les divers métabolites ont été repérés par une lettre (A, B, C, D, E, F). L'αphénylindole est représenté par la lettre I. Nous retrouvons dans l'urine 6 métabolites (A, B, C, D, E, F).

#### METABOLITES URINAIRES (RAT)

Solvant 2 R.F.	libres I	% I + II	conjugués II	Solvant 1 R.F.
0,63	A trace		A	0,36
			B	0,55
	C trace	26 %	C	0,65
	D	50 %	D } trace de conjugué	0,76
			E trace	0,28
			F trace	0,46

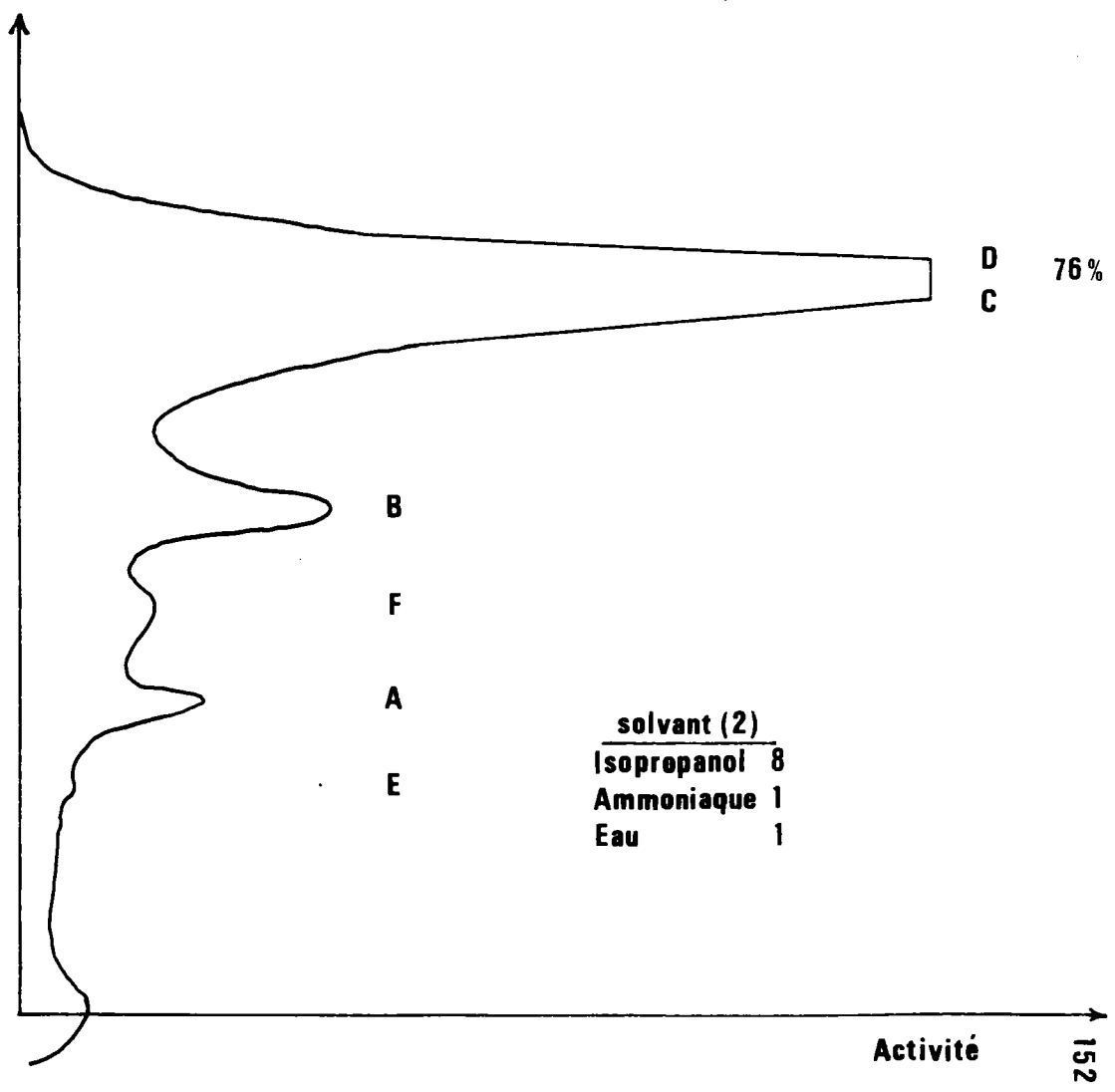
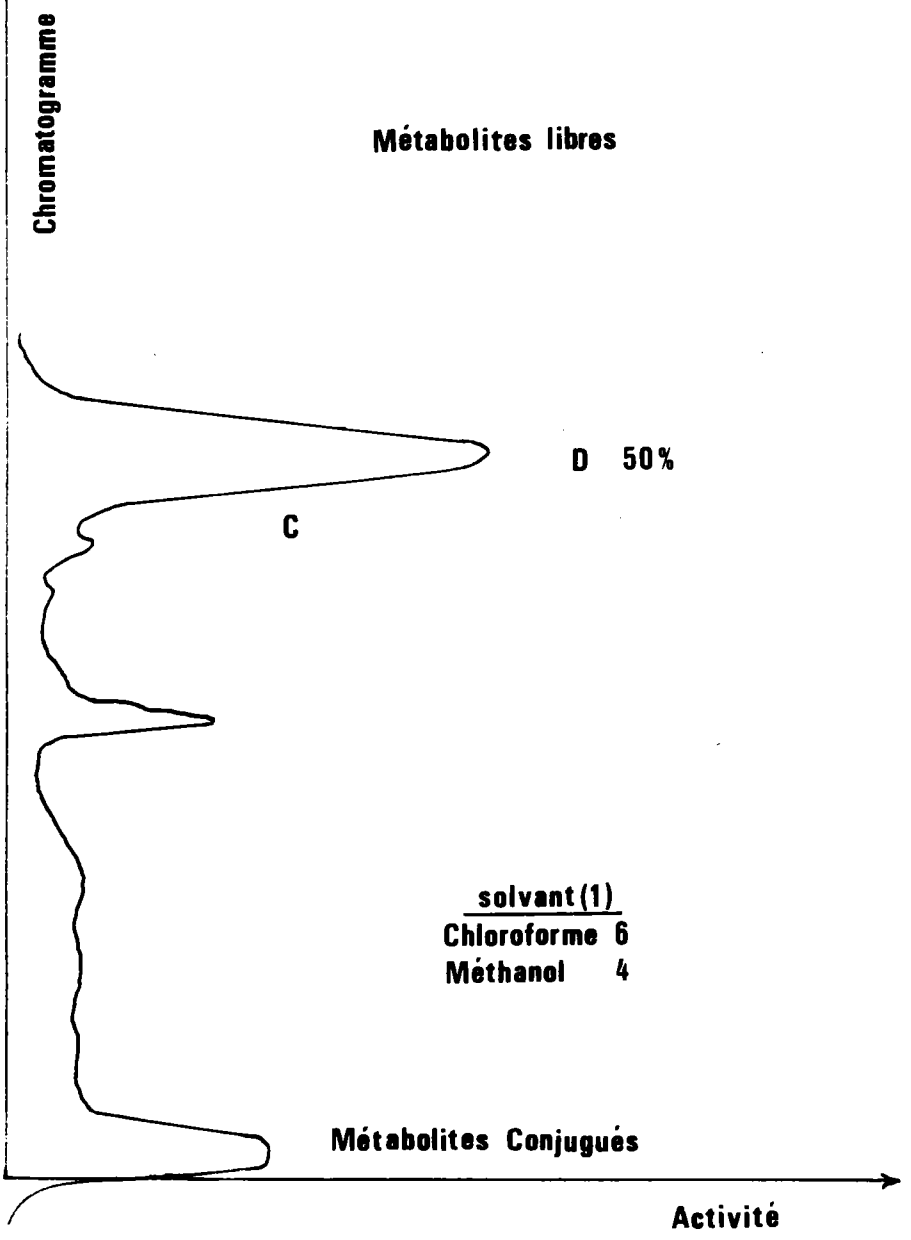
Solvant n° 1 : isopropanol, ammoniaque, eau (8, 1, 1 v/v).

Solvant n° 2 : chloroforme, méthanol (6,4 v/v).

ETUDE DES METABOLITES URINAIRES DE L' $\alpha$  PHENYLINDOLE CHEZ LE RAT

Support : gel de silice

Fig : 33



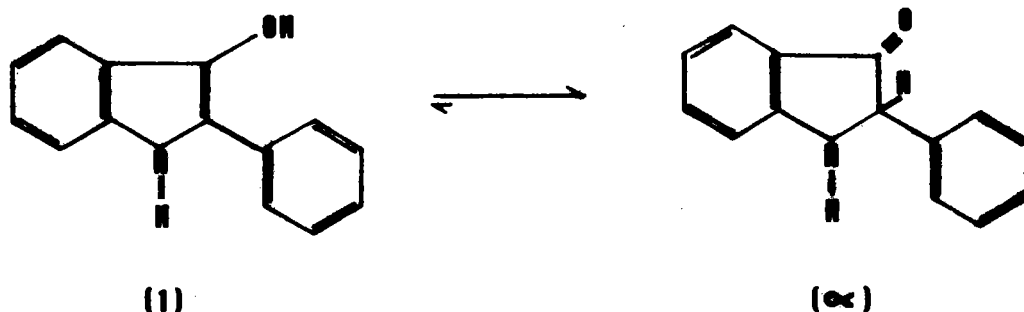
Le métabolite D, se trouve principalement à l'état libre. Le composé C est éliminé pour une large part sous forme conjuguée. Les métabolites A, B, E, F sont quantitativement moins importants et sont tous excrétés principalement sous forme conjuguée. Le métabolite D est le métabolite urinaire le plus important (environ 50 % de l'activité).

Nous n'avons jamais retrouvé d'αphénylindole non métabolisé dans les urines.

B) Identification du métabolite urinaire principal (D)

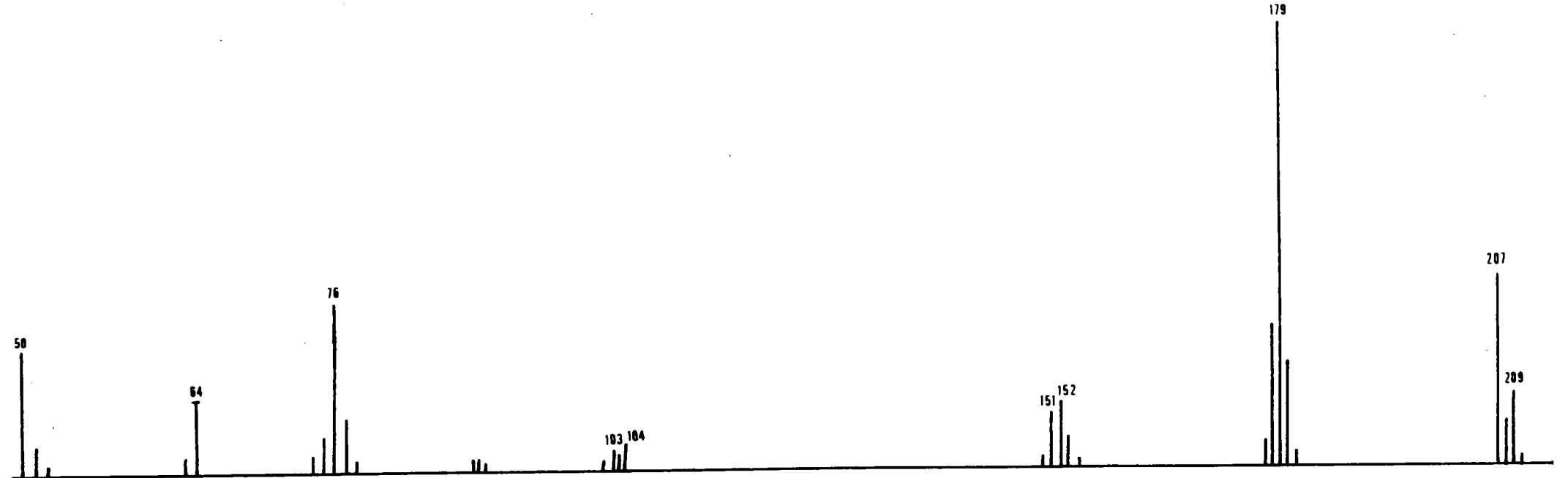
Le spectre infrarouge du métabolite (D) extrait de l'urine de Rat n'est pas exploitable. Le spectre de masse de ce même composé (figure n° 34) nous indique un poids moléculaire de 209. (αphénylindole 193). Ce qui nous donne une différence de 16 qui correspond à l'addition d'un atome d'oxygène. Le métabolite est donc probablement un hydroxy phénylindole. Il reste maintenant à déterminer la position exacte de cette fonction hydroxyle. Plusieurs composés hydroxylés ont été synthétisés : nous citerons notamment le 5-hydroxy-2-phénylindole, le 6-hydroxy-2-phénylindole et les hydroxy-2-phénylindoles pour lesquels la fonction OH se trouve en Ortho ou Para sur le phényl.

Les spectres de masse des composés hydroxylés sur le phényl sont très différents comparés à celui du métabolite. Les spectres de masse des dérivés hydroxylés en 5 ou en 6 sont relativement proches du spectre de masse du métabolite, mais ils ne sont pas parfaitement identiques. La synthèse du composé 3-hydroxy-2-phénylindole fut alors réalisée. La forme énol (1) de ce composé n'est pas stable (voir figure ci-dessous).



SPECTRE DE MASSE DU METABOLITE

(extrait d'urine de rat)



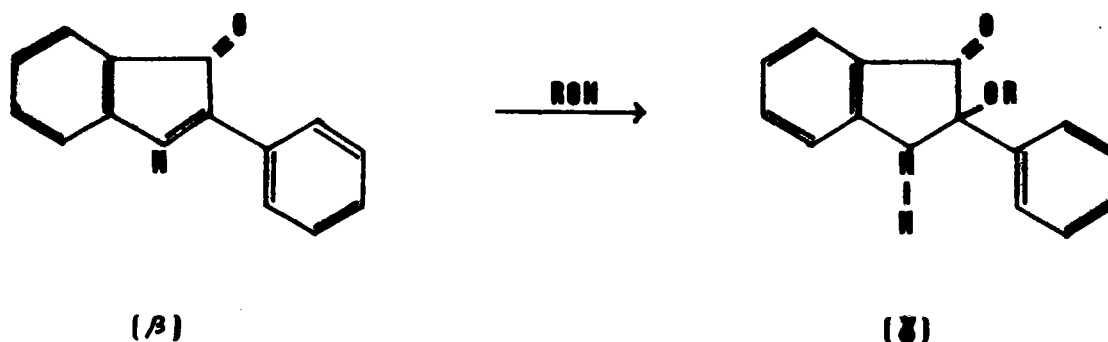
Nous obtenons donc l'oxo-3 phényl-2 indole sous la forme cétonique (composé  $\alpha$ ). Ses spectres de masse et infrarouge sont représentés respectivement par les figures n° 35 et n° 36. Le spectre de masse du composé ( $\alpha$ ) est parfaitement semblable à celui du métabolite; excepté un pic à 64 qui est présent uniquement avec le métabolite urinaire.

Par oxydation de ce composé  $\alpha$  nous obtenons un produit  $\beta$  (oxo 3-phényl-2-indole forme oxydée). Les spectres de masse et infrarouge de celui-ci sont représentés par les figures n° 35 et n° 37. Les spectres de masse des composés  $\alpha$  et  $\beta$  sont parfaitement identiques, excepté l'ion moléculaire.

ION MOLECULAIRE

Produit $\alpha$	209	avec un 207 important
Produit $\beta$	207	avec un 209 presque inexistant

D'après RICHMAN R.J. et HASSNER A., en 1968 (85) le composé  $\beta$  en solution réagit avec le solvant pour donner le produit  $\gamma$  suivant la réaction ci-dessous.



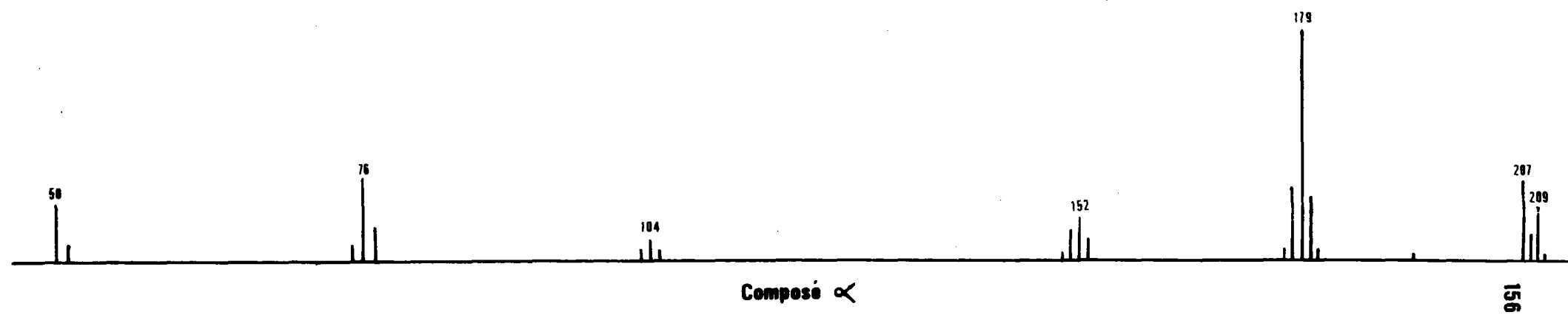
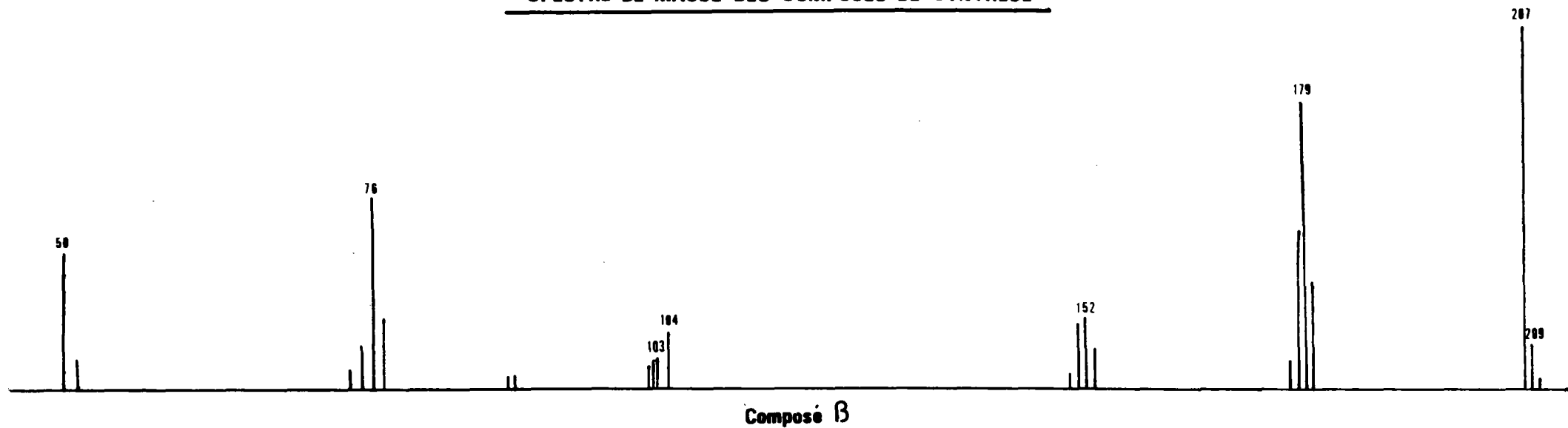
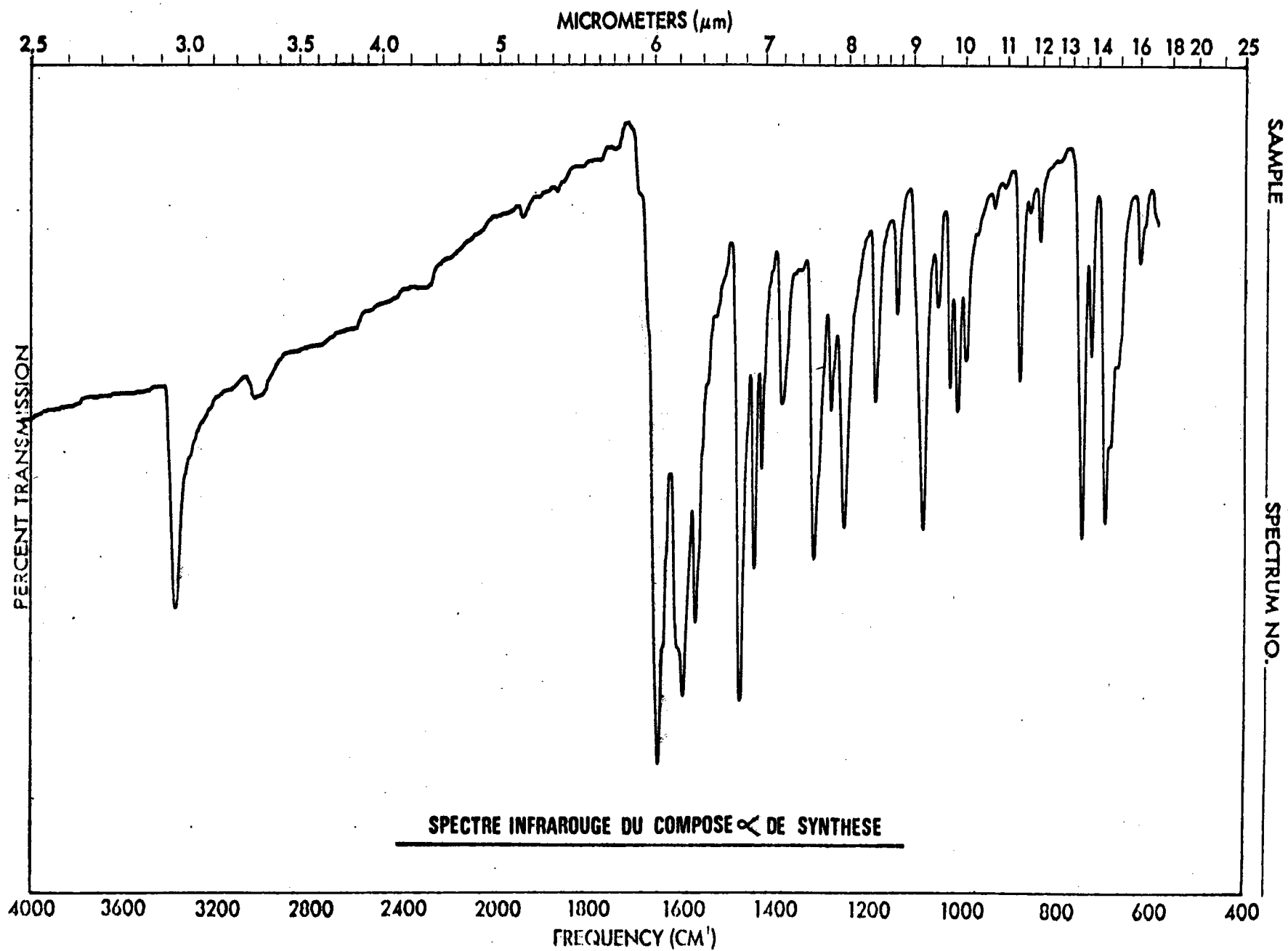
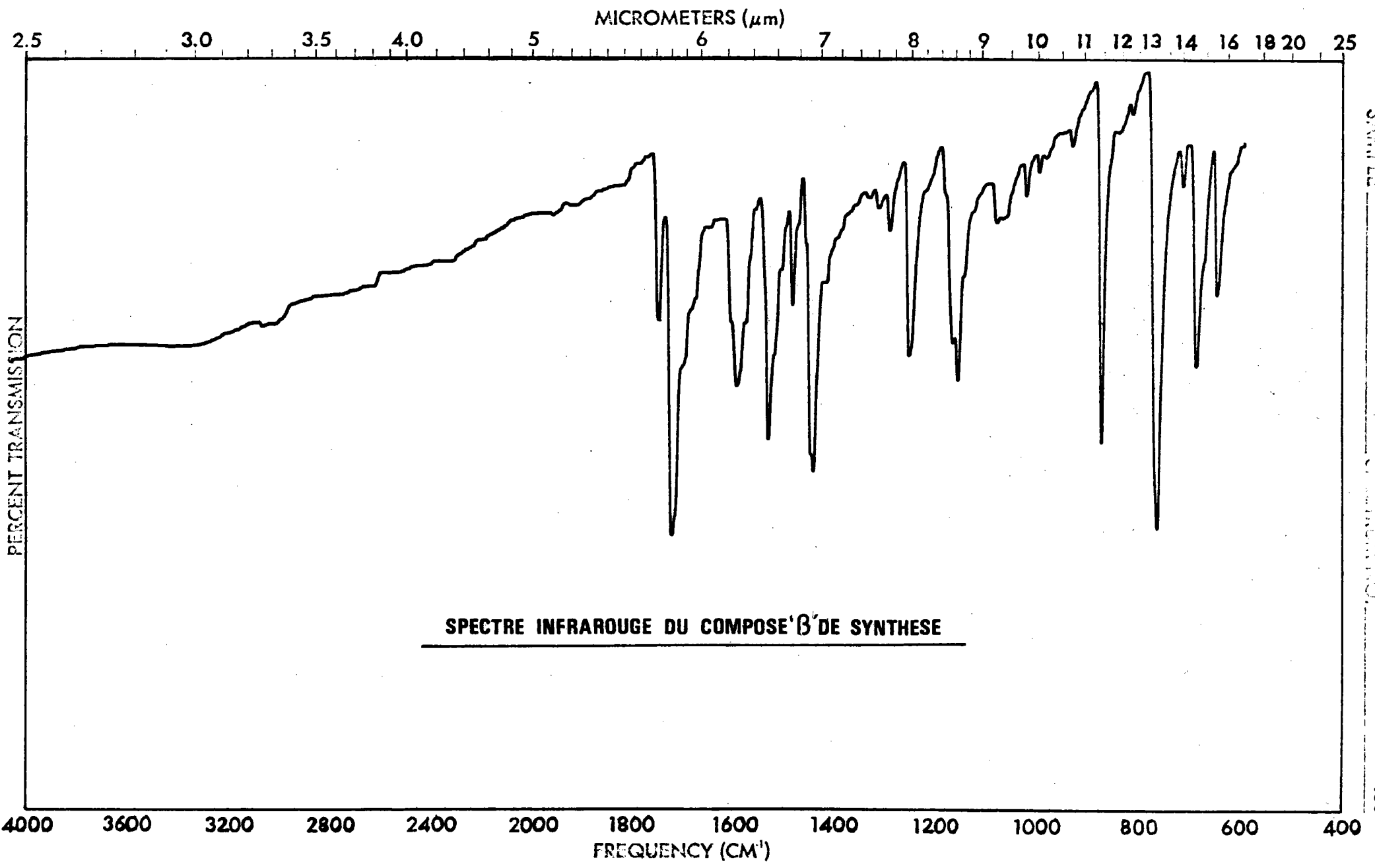
SPECTRE DE MASSE DES COMPOSES DE SYNTHESE



Fig. 36





SPECTRE INFRAROUGE DU COMPOSE 'B' DE SYNTHESE

SAMPLE  
158

Si nous utilisons la solution de migration suivante : chloroforme, méthanol (8, 2 v/v), pour effectuer une chromatographie sur plaque des 2 composés  $\alpha$  et  $\beta$  obtenus par synthèse; quel que soit le solvant utilisé (eau, méthanol, éthanol), chaque composé nous donne 2 taches bien séparées et probablement identiques. En solution il est donc probable que nous ayons les 2 ou même les 3 formes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) en équilibre.

Si nous pratiquons la même chromatographie sur le métabolite extrait de l'urine de Rat, nous obtenons 2 taches semblables (même R.F. et couleur identique au réactif de PILET, "orange").

- Etude par chromatographie en phase gazeuse

L'étude du temps de rétention par chromatographie en phase gazeuse nous donne les résultats ci-dessous. Les conditions de cette chromatographie sont décrites dans le chapitre I, paragraphe 6.

	Temps de rétention en secondes	Nombre de pics
composé $\alpha$	490	1
composé $\beta$	481	1
métabolite urinaire	488	1
métabolite + surcharge composé $\beta$	487	1

Les 2 composés de synthèse sortent avec le même temps de rétention que le métabolite.

Le métabolite D est donc l'oxo-3 phényl-2 indole mais nous ne pouvons pas préciser sous quelle forme exacte il se trouve *in vivo*. Il est probable qu'il soit sous forme  $\alpha$  et  $\beta$ .

Si nous comparons les valeurs des R.F. dans 2 solvants différents. Le métabolite C pourrait s'identifier comme le 5-hydroxy-2-phénylindole.

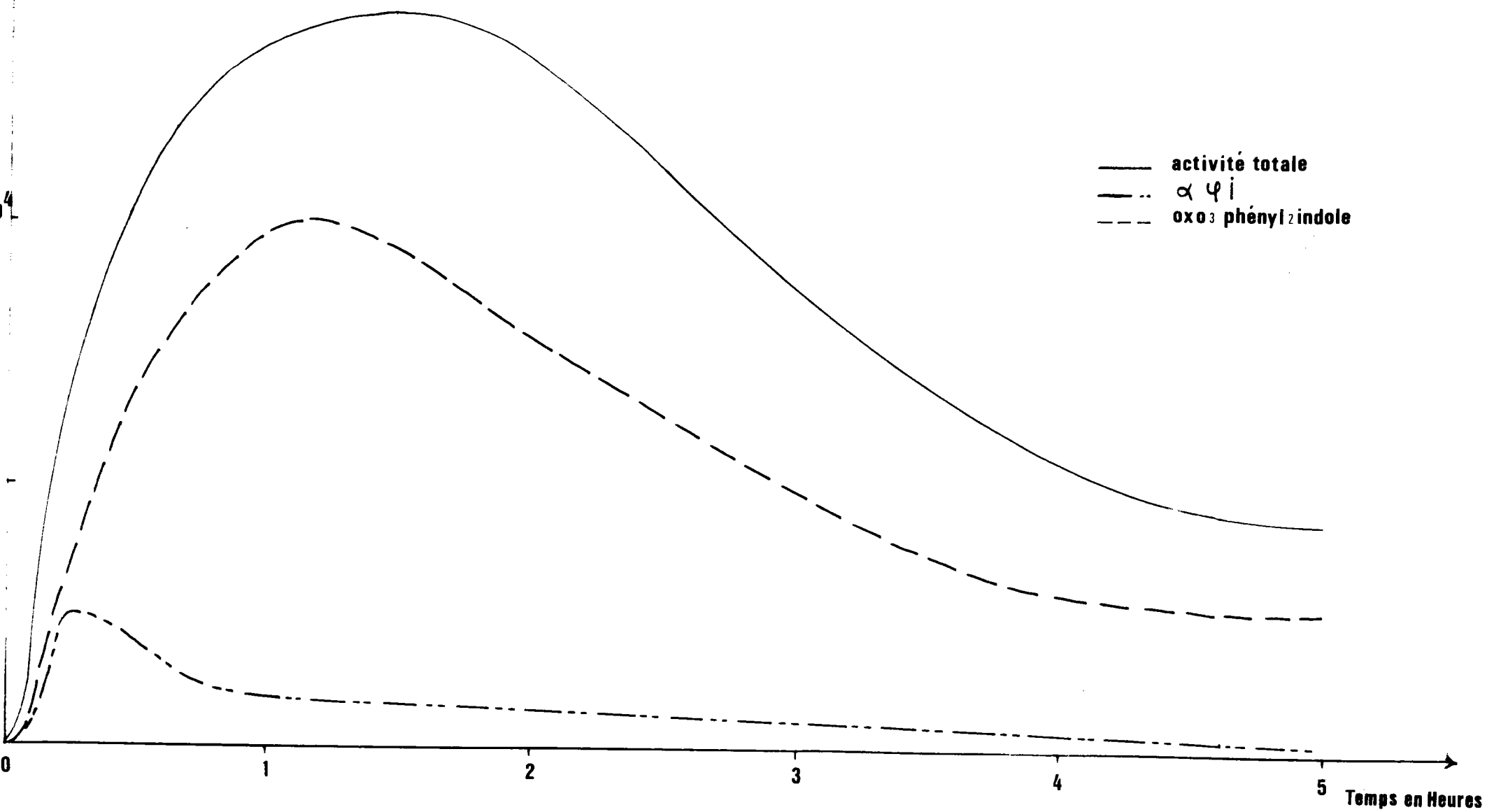
Une étude des métabolites urinaires en fonction de la voie d'administration nous montre que le rapport des métabolites  $\frac{D}{C}$  est inversé lorsque l'on passe de la voie I.P. à *per os*. Nous avons remarqué également une différence entre ces 2 voies au niveau des cinétiques. La voie *per os* montre 2 maximas au niveau sanguin et urinaire qui correspondent. Parmi plusieurs hypothèses nous retenons celle-ci : le deuxième maxima dans le sang pourrait être le passage du 5-hydroxy-2-phénylindole métabolisé par la flore intestinale.

### III.5 Cinétiques de l'αphénylindole et des métabolites

#### A) Dans le sang (*in vivo*)

La technique utilisée est décrite dans le chapitre 1.7 et l'expérimentation animale dans le chapitre II.4.

La figure n° 38 représente la radioactivité totale dans le sérum, la radioactivité de l'αphénylindole seul et enfin la radioactivité de l'oxo-3-phényl-2-indole. Le maximum de la radioactivité αphénylindole seul se situe à 15 minutes environ. A ce moment précis, il représente la moitié de la radioactivité totale du sérum. L'autre moitié est constituée par le métabolite. Le maximum de la radioactivité totale correspond au maximum de la radioactivité de l'oxo-3-phényl-2-indole. Il se situe environ à 1 h., ce qui est en accord avec les cinétiques totales du chapitre III.1. Lors de l'étude précédente, la quantité de sang prélevée pour chaque mesure était beaucoup plus faible. Dans la cinétique ci-dessus, l'animal est plus perturbé, ce qui peut expliquer la légère différence du maximum d'activité. D'autre part, ce maximum est établi sur le sérum alors que lors de l'étude des cinétiques totales, les mesures sont effectuées sur le sang total.

CINETIQUE SANGUINE DE L' $\alpha$  PHENYLINDOLE ET DE SON METABOLITEDPM  
pour 50  $\mu$ l (sérum)

La différence observée entre la somme de la radioactivité du métabolite et de l'αphénylindole et la radioactivité totale du sérum est due aux autres métabolites sanguins que nous allons étudier plus précisément avec le foie isolé et perfusé.

B) In vitro à l'aide du foie isolé et perfusé de rat

1) Mesure de la radioactivité totale

- cinétique totale dans le perfusat

Après 15 minutes l'activité tombe à 30 % de sa valeur initiale, puis augmente lentement jusqu'à 2 h. pour rediminuer ensuite (figure n° 39).

Pendant les 15 premières minutes, la baisse observée peut se traduire par la fixation rapide dans le foie. La légère augmentation qui suit est probablement le relargage des métabolites dans le perfusat. La baisse observée entre 2 h. et 5 h. s'explique par la perte de CO<sub>2</sub>, qui n'est pas piégé lors de la perfusion.

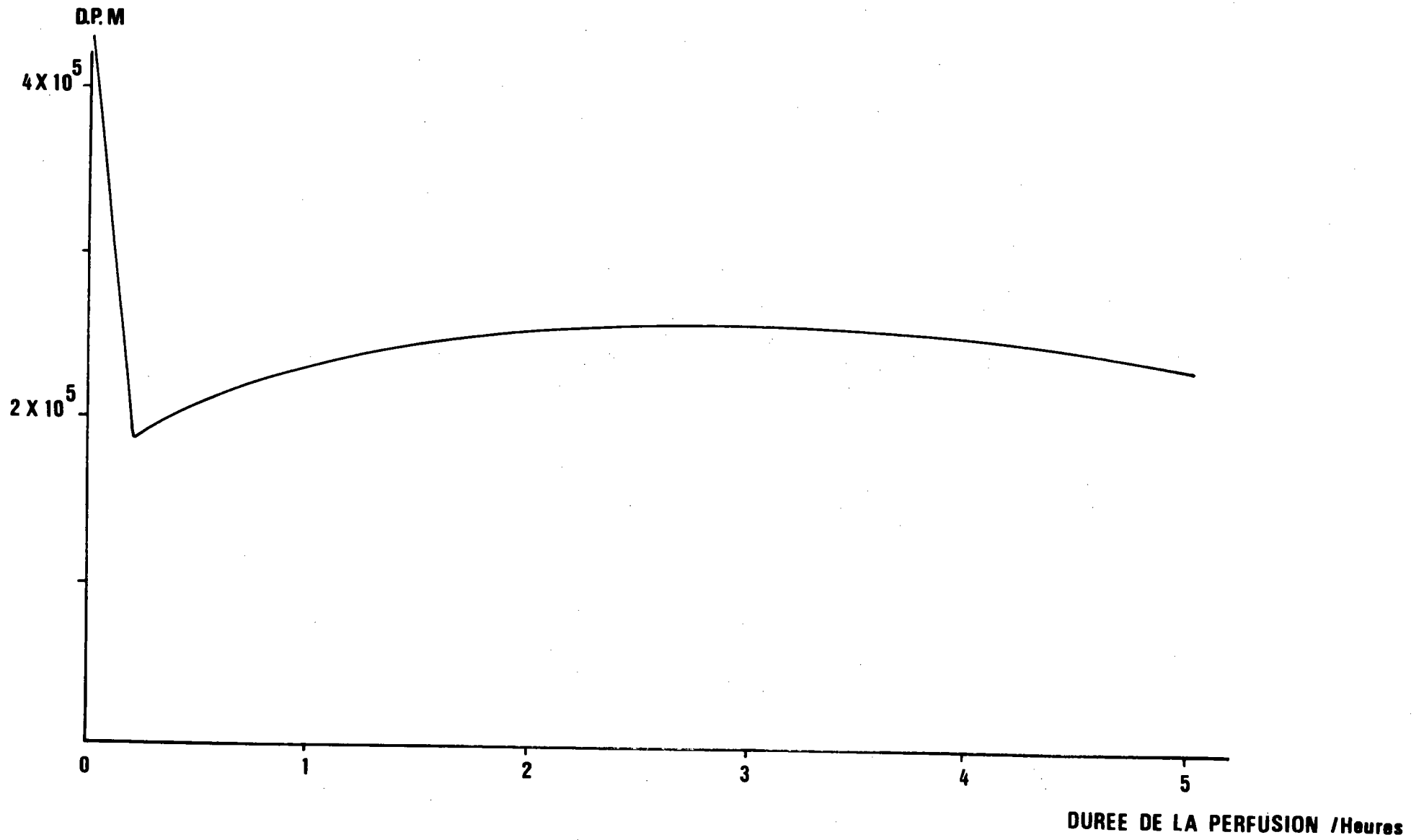
- cinétique biliaire totale

L'élimination de composé radioactif dans la bile est très rapide, en effet nous décelons de l'activité 5 minutes après l'injection de l'αphénylindole <sup>14</sup>C<sub>2</sub>. Cette élimination rapide par la voie biliaire a déjà été mise en évidence lors de l'analyse des autoradiographies (chapitre III.2).

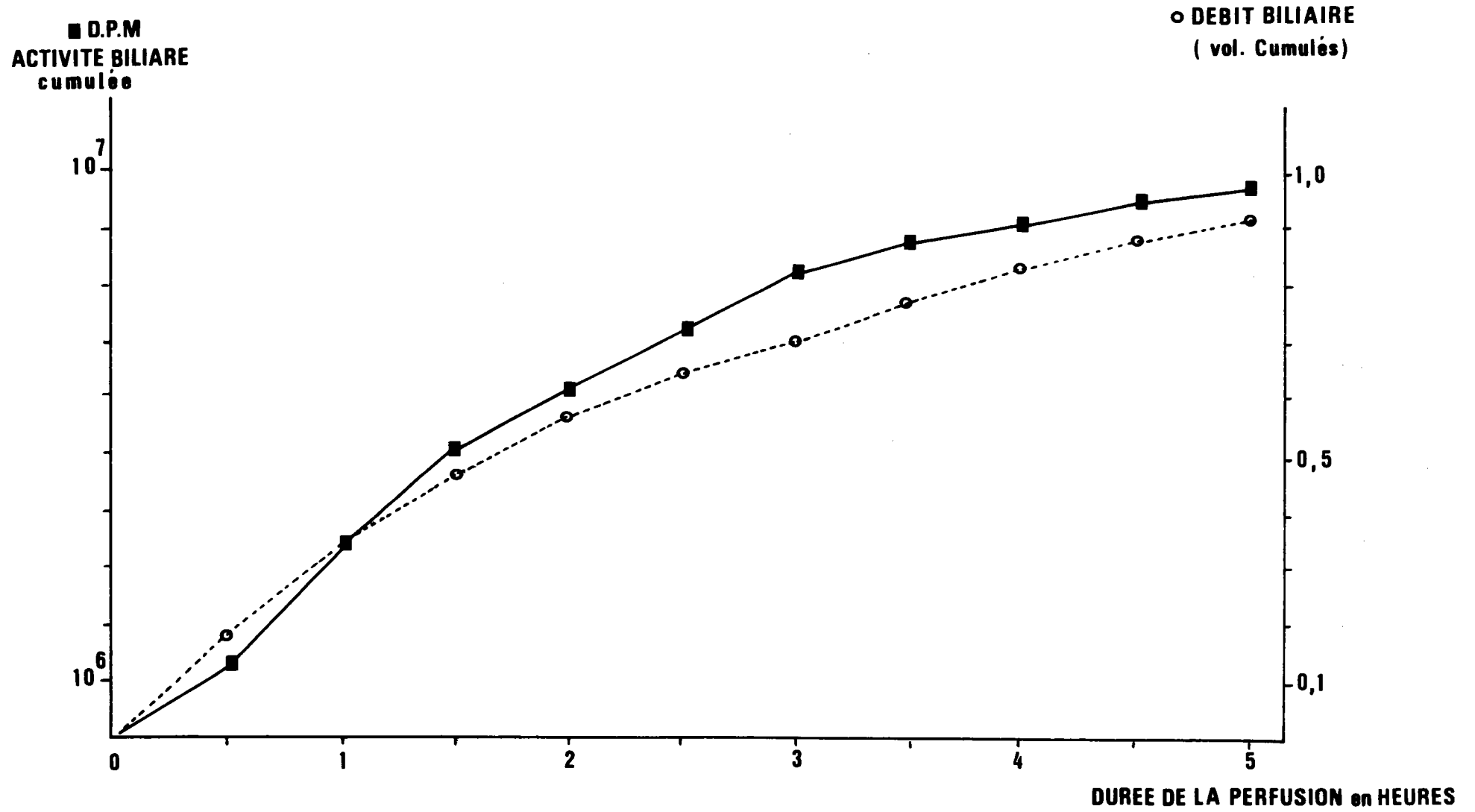
L'ensemble des résultats conduit à une courbe d'activité cumulée, qui suit de très près le débit biliaire en volume cumulé (figure n° 40).

CINETIQUE TOTALE DANS LE PERFUSAT

Fig.39



CINETIQUE DES METABOLITES MARQUES





A la fin de la perfusion (5 h.), nous retrouvons de 17 à 35 % de l'activité injectée dans la bile.

- bilan complet de la radioactivité

Activité injectée  $56 \cdot 10^6$  D.P.M., soit 25  $\mu$  Cie.

Radioactivité totale du perfusat à 5 h.	37 %	$20.751 \cdot 10^3$	D.P.M.
Radioactivité totale dans la bile	35 %	$20.020 \cdot 10^3$	D.P.M.
Radioactivité totale dans le foie à 5 h.	11 %	$7.282 \cdot 10^3$	D.P.M.
Activité de la solution de lavage du foie		$266 \cdot 10^3$	D.P.M.
Somme	86 %	$48.319 \cdot 10^3$	D.P.M.

Le bilan de l'activité en fin d'expérience n'est jamais complet. Le déficit se situe entre 14 et 20 %. Cette disparition d'activité peut s'expliquer par la formation de  $^{14}\text{CO}_2$  qui n'est pas récupéré dans le dispositif expérimental.

Cette hypothèse est confrontée par l'élimination de  $^{14}\text{CO}_2$  lors des cinétiques totales.

En fin d'expérience la radioactivité mesurée dans les différents lobes se situent entre 13 et 28 % de l'activité initiale. Ce qui nous fait penser que tous les lobes n'ont peut être pas les mêmes fonctions, nous avons déjà fait cette même remarque lors des autoradiographies. Nous retrouvons également ici comme lors de l'étude des cinétiques totales (féces) une élimination biliaire aussi importante que la concentration des métabolites du perfusat (élimination urinaire).

2) Recherche des métabolites biliaires, hépatiques et sanguins (perfusat)

Les techniques utilisées lors de cette étude sont décrites dans le chapitre II, paragraphe 4.

Nous utilisons les mêmes lettres pour repérer les mêmes métabolites que lors de l'étude urinaire (chapitre IV).

Le tableau n° XXIV présente les résultats des différentes chromatographies. L'aphénylindole correspond au produit repéré par la lettre I et l'oxo-3-phényl-2-indole par la lettre D.

Nous séparons 6 métabolites par chromatographie (A, B, C, D, E, F).

Les métabolites B et F sont typiquement biliaires. Nous retrouvons les métabolites suivant dans les différents milieux biologiques :

- 6 dans la bile
- 3 dans le foie en fin d'expérience (B, C, D)
- 4 dans le perfusat (A, C, D, E).

Les métabolites A, B, E sont conjugués; C, D, F sont principalement sous forme libre. Le métabolite D est partiellement détruit au cours de l'hydrolyse, alors que le composé C résiste bien.

Dans la bile les plus abondants sont : A, B, C, D. Dans le perfusat le métabolite D est le composé principal. L'aphénylindole I est totalement métabolisé par le foie perfusé en moins de 5 heures.

Nous retrouvons ici les mêmes métabolites que nous avons séparés à partir de l'urine (A, B, C, D, E, F).

(foie perfusé)

SOLVANT 2 R.F.		LIBRES	CONJUGUES	SOLVANT 1 R.F.
	%	BILE		
0,63	7%	C D  F Trace	A B C D Trace E Trace	0,36 0,55 0,65 0,76 0,28 0,50
		FOIE		
0,63		C D	B	0,52 0,65 0,73
		PERFUSAT 1mn		
0,86	66%	I	A C } Trace D } E	0,65 0,76
		1H		
0,63 0,84	79% 5%	{ C D  I	A C D Trace E	0,38 0,66 0,76 0,27
		5H		
0,62	71%	{ C D	A C D Trace E	0,38 0,64 0,72 0,27

Bile A + B + C + E + F = 83%

Tableau : XXIV

Perfusat 1 minute A + E = 26%  
 1 heure // = 11%  
 5 heures // = 26%

Les métabolites B et F de l'urine sont absents du perfusat. Ils sont excrétés dans la bile, puis absorbés au niveau de l'intestin.

Nous retrouvons, dans cette étude du foie perfusé, tous les métabolites isolés *in vivo*. Tous ces composés sont donc métabolisés au niveau du foie. (tableau n° XXIV).

### 3) Cinétiques de 4 métabolites biliaires

Nous avons réalisé l'étude comparative de la cinétique d'apparition des métabolites biliaires. Les résultats obtenus lors de cette étude ne sont pas absolument quantitatifs. Les différents rendements sont difficiles à évaluer. Le but de celle-ci est de connaître la cinétique d'élimination biliaire des 4 métabolites les plus importants (A, B, C, D). La cinétique d'apparition de ces 4 composés est-elle identique ?

La figure n° 41 représente le débit d'activité (D.P.M. par minute) en fonction du temps. La courbe que nous avons tracée est plus représentative qu'un histogramme.

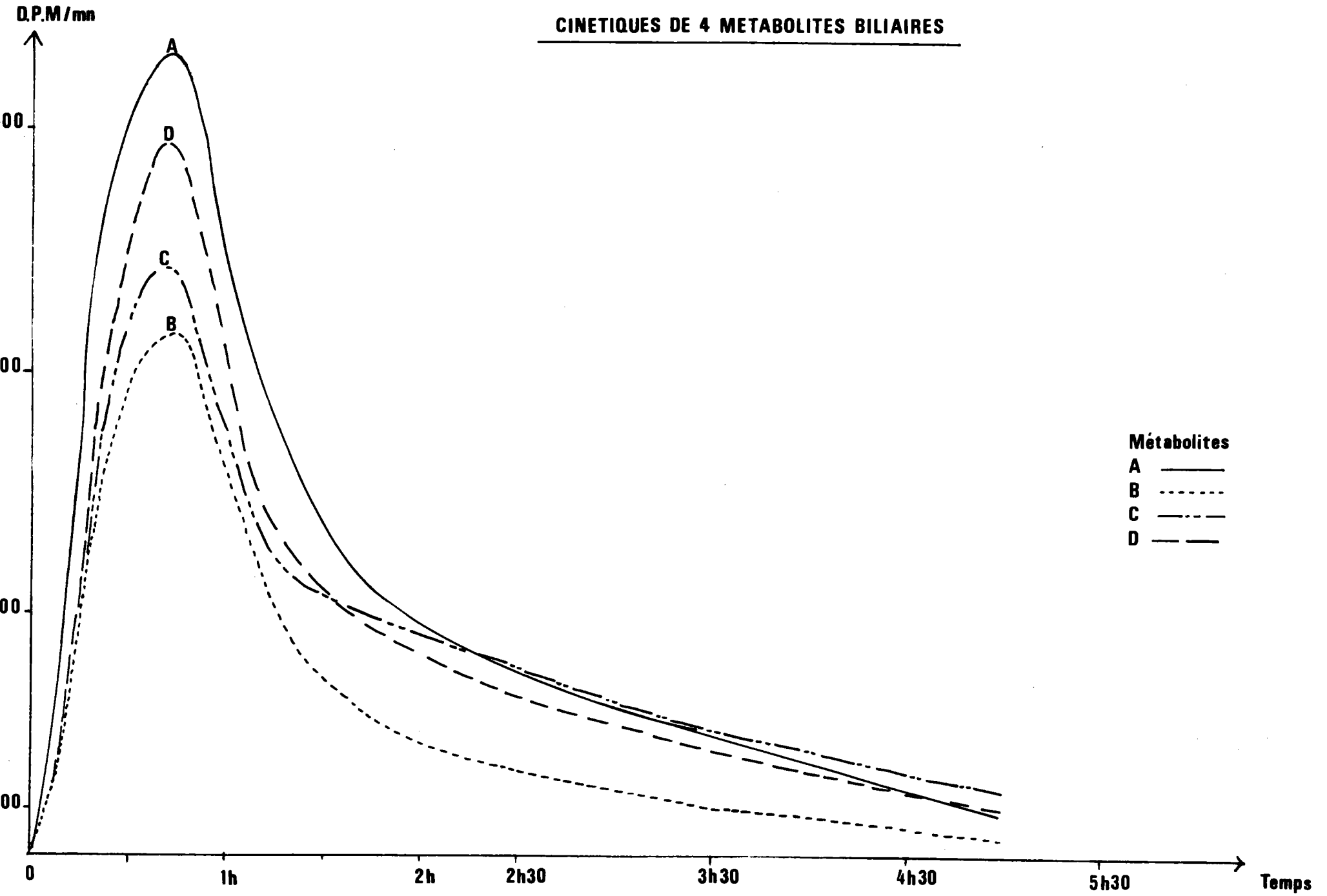
L'élimination maximum se situe pour les 4 métabolites entre 30 et 60 minutes. La représentation en valeur cumulée (figure n° 42) laisse apparaître des cinétiques d'élimination parallèles pour les métabolites (A, C) d'une part et (B, D) d'autre part. Le composé A est le plus important au niveau de l'élimination biliaire.

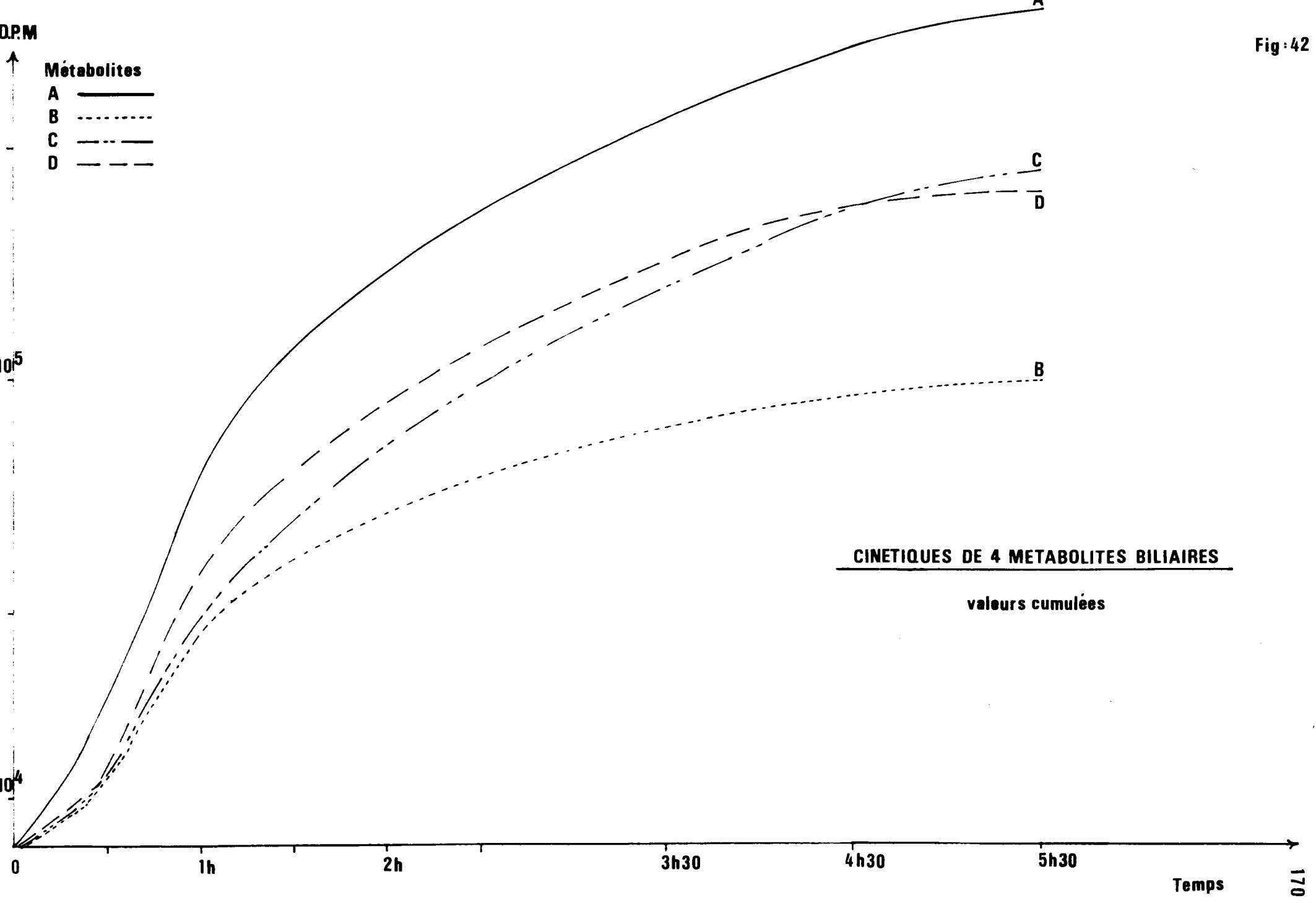
L'excrétion biliaire lors de cette étude est représentée par la figure n° 43.

### 4) Conclusions

La méthode de perfusion du foie *in vitro* a permis de montrer avec précision l'importance de l'élimination fécale des métabolites de

CINETIQUES DE 4 METABOLITES BILIAIRES

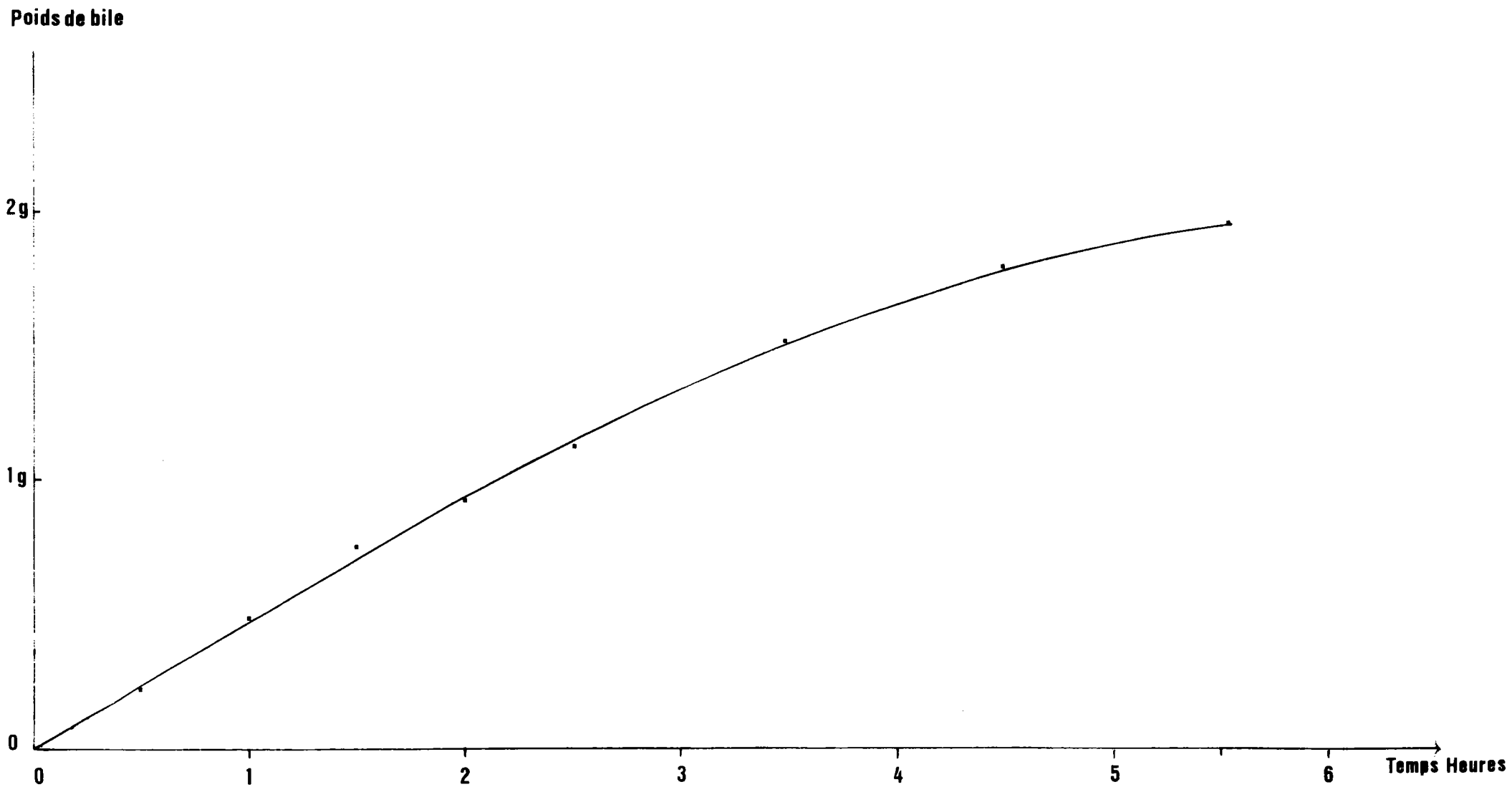




EXCRETION BILIAIRE

(valeur cumulée)

Fig:43



l'aphénylindole et de les dénombrer. Le foie isolé et perfusé réalise ici les meilleures conditions pour étudier la totalité des métabolites hépatiques de l'aphénylindole. Cette technique permet également de montrer la réabsorption au niveau intestinal de certains métabolites biliaires (B, F) que l'on retrouve au niveau urinaire lors des expériences réalisées *in vivo*. Elle concentre au niveau du perfusat les métabolites qui normalement sur l'animal entier peuvent être éliminés par la voie urinaire (tableau n° XXV).

### III.6 Répartition de l'aphénylindole et de son métabolite principal dans quelques organes

Le métabolite principal (oxo-3 phényl-2 indole), possède un pouvoir inhibiteur sur la mono amine oxydase. Il était important de rechercher la nature de la molécule radioactive qui a été localisée et mesurée sur les différents tissus, lors des études d'autoradiographie.

Nous avons étudié les organes suivants : le foie, le rein, le cerveau. Ceux-ci ont montré (partie II) une baisse d'activité de la mono-amine-oxydase *in vivo* après traitement à l'aphénylindole. Le métabolite D (oxo-3 phényl-2 indole) représente une partie très importante de l'activité dans le foie et le rein, respectivement 85 et 60 % (figure n° 41). La quantité de produit non métabolisé est très faible dans les 2 cas.

Dans le cerveau (figure n° 44), nous observons un rapport inverse; le métabolite D est en faible concentration, alors que l'aphénylindole représente la plus grande partie de l'activité.

Etant donné que nous avons trouvé une baisse d'activité de la mono-amine-oxydase au niveau cérébral, ce résultat nous indique que les mono-amine-oxydases du système nerveux central seraient plus sensibles à l'inhibiteur que celles des organes périphériques. (foie, rein). Ceci est en accord avec les travaux de ROTH J.A. et GILLIS C.N., en 1974 (87) sur l'inhibition des mono-amines-oxydases du foie et du cerveau.



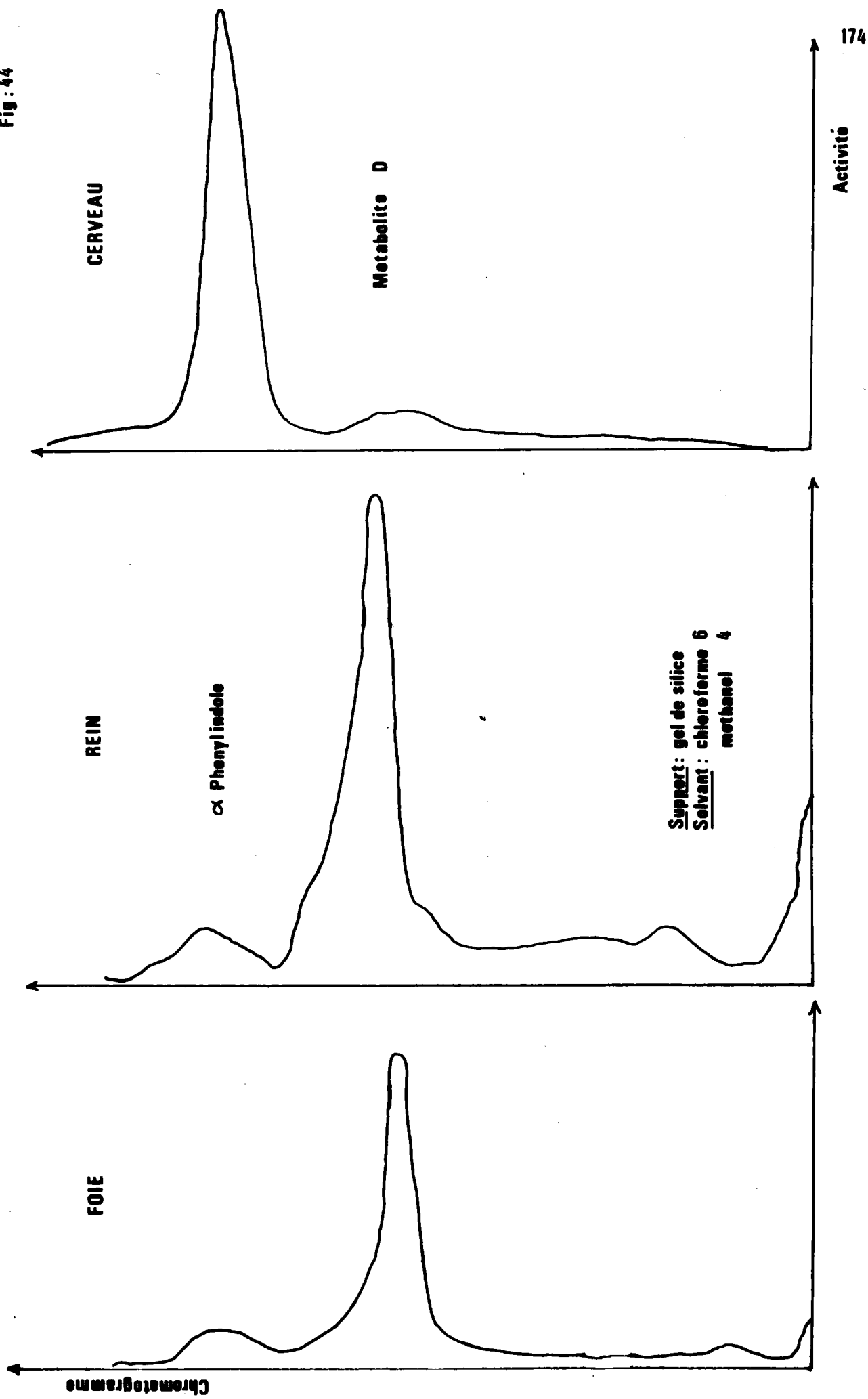
ETUDE DES DIFFERENTS METABOLITES DE L'α PHENYLINDOLE

FOIE PERFUSE				ETUDE IN VIVO 3 heures après l'injection			
	α PHENYLINDOLE	METABOLITES LIBRES	METABOLITES CONJUGUES		α PHENYLINDOLE	METABOLITES LIBRES	METABOLITES CONJUGUES
PERFUSAT 0mn	Δ I			REIN	Δ I	□ ▲ C D 60%	TRACE
PERFUSAT 1mn	Δ I		□ ▲ C D	URINE		□ ▲ C D	□ ▲ ○ ■ ● ■ C D A E B F
PERFUSAT 1h	Δ I	□ ▲ C D	□ ▲ ○ ■ C D A E	HEMATIE	Δ I	TRACE ▲ D	
PERFUSAT 5h		□ ▲ C D	□ ▲ ○ ■ C D A E	SERUM	Δ I	□ ▲ C D	TRACE
BILE		□ ▲ C D	Trace □ ▲ ○ ■ ● F C D A E B	CERVEAU	Δ I	▲ D 7%	
FOIE		□ ▲ C D	● B	FOIE	Δ I	▲ D 85%	173

Tableau : XXV

ETUDE DE LA REPARTITION DU METABOLITE

Fig : 44



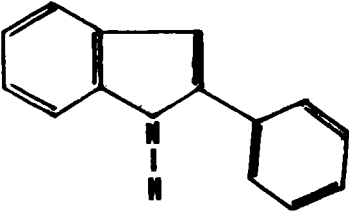
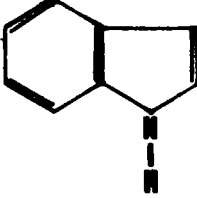
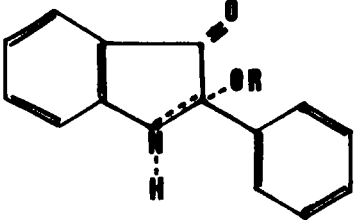
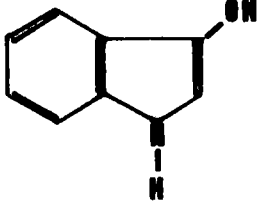
### III.7 Comparaison du métabolisme de l' $\alpha$ phénylindole et de l'indole

Le métabolisme de l'indole  $^{14}\text{C}_2$  a été étudié par KING J.L. et col., en 1966 (52).

Le métabolite principal de l'indole est l'hydroxy-3-indole appelé couramment indoxyle.

Il représente 72 % des métabolites urinaires chez le Rat.

#### Comparaison des 2 métabolismes

	$\alpha$ phénylindole	indole
Formule		
urine	24 h. 14 %	75 %
	48 h. 16 %	80 %
fèces 48 h.	Valeur approximativement identique à l'urine 15 %	10 %
$^{14}\text{CO}_2$ air expiré	présence de $^{14}\text{CO}_2$	2 %
bile	foie perfusé en 5 h. 35 %	5 %
métabolite principal	oxo-3 phényl-2 indole 	indoxyle 

Nous observons 2 différences fondamentales entre ces 2 métabolismes.

1°) L'élimination urinaire à partir de l'indole est très rapide 75 % de la dose injectée en 24 heures.

L'αphénylindole s'élimine beaucoup plus lentement par cette même voie 14 % en 24 heures, il est donc retenu dans l'organisme.

2°) L'élimination par la voie biliaire est faible avec l'indole 5 %. Pour l'αphénylindole, elle est du même ordre que l'excrétion urinaire (~ 15 %).

Les 2 métabolites les plus importants sont oxydés sur la position 3. Il est donc possible que ce soit le même enzyme qui métabolise ces 2 toxiques. D'après le même auteur (52) cette oxydation n'est pas effectuée au niveau microsomal. En effet, il a réalisé des essais de métabolisation de l'indole *in vitro* avec une fraction microsomale hépatique. Lors de cette recherche, il retrouve les métabolites de l'indole sauf l'indoxyle.

### III.8 Toxicité de l'oxo-3-phényl-2-indole

Nous avons étudié la toxicité chez le Rat de l'oxo-3-phényl-2-indole obtenu par synthèse. Les quelques essais réalisés à faible dose (10 et 30 mg/Rat) par voie I.P. nous ont permis de relever les conclusions suivantes :

- Le premier symptôme qui apparaît très rapidement après l'injection est un désordre de l'équilibre, avec quelques instants plus tard une paralysie des pattes arrière.

- Très rapidement après ces premiers effets (quelques minutes), l'animal passe par un état comateux, qui évolue ensuite vers la mort.

*Faute de produit nous n'avons pu déterminer sa D.L.50.*

*Cette brève étude nous montre que comparativement à l' $\alpha$ phényl-indole son métabolite (l'oxo-3-phényl-2-indole) est beaucoup plus toxique.*

---

## **CONCLUSIONS**

### CONCLUSIONS GENERALES

Tous ces résultats expérimentaux obtenus chez l'animal, après diverses expositions à court et long terme nous permettent de présenter les conclusions suivantes :

- Au point de vue biochimique seule la baisse de la cholinestérase sérique obtenue en intoxication aiguë par l'aphénylindole chez le Rat nous paraît suffisamment marquée pour être relevée. D'autres paramètres sériques biochimiques nous donnent des résultats significativement différents aux tests de STUDENT, mais ces variations aléatoires ne nous paraissent pas représenter la réalité.

- Lors de l'étude du métabolisme de l'aphénylindole chez le Rat nous avons remarqué, qu'un composé radioactif se répartit très rapidement dans tout l'organisme quelle que soit la voie d'administration. Citons quelques zones de concentrations particulières (foie, rein, sang).

Le métabolite urinaire le plus important après administration du produit par voie I.P. chez le Rat, est l'oxo-3-phényl-2-indole. C'est une pseudoquinone, qui est beaucoup plus toxique que l'aphénylindole lui-même.

Comparativement au métabolisme de l'indole l'excrétion urinaire dans les premières 24 h. des 6 métabolites de l'αphénylindole est beaucoup plus lente, respectivement 75 et 15 % de quantité injectée. Par contre l'élimination dans les fèces est identique à l'excrétion urinaire uniquement dans le cas de l'αphénylindole.

- Au point de vue de l'action pharmacologique nous avons noté l'action inhibitrice d'un métabolite (l'oxo-3-phényl-2-indole) sur les monoamines-oxydases aux niveaux central et périphérique.

Une partie de l'action de l'αphénylindole est due à la toxicité du tryptophane libéré au niveau sérique. Cette toxicité est augmentée par la présence d'un inhibiteur des mono-amines-oxydases.

- Test d'exposition

Lors de l'exposition de rats à des atmosphères contenant de l'αphénylindole, l'action toxique du tryptophane se traduit par une élimination urinaire accrue des 5-hydroxyindoles et notamment de la sérotonine. Cette toxicité peut-être évaluée par un dosage urinaire de ces métabolites du tryptophane.

Cette exposition peut donc être évaluée en recherchant dans les urines un des métabolites et plus particulièrement l'oxo-3-phényl-2-indole qui est un bon signe d'imprégnation.



## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - ANGERER J.  
Exposition professionnelle chronique aux solvants. IV - Séparation par chromatographie en couche mince et dosage densitométrique de l'acide hippurique dans l'urine.  
J. Int. Arch. Occup. Environm. Health, 1976, 36, 4, 287-297.
- 2 - ARMSTRONG M.D., CHLO F.C., PARKER V.J., WALL P.E.  
Endogenous formation of hippuric acid.  
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 1955, 90, 675.
- 3 - ASATOOR A., DALCLIESH C.E.  
Séparation des métabolites de l'indole sur du charbon partiellement désactivé.  
J. Chem. Soc., 1956, 445, 2291-2299.
- 4 - BADAWY A.A.E.  
Functions and regulation of tryptophane pyrolase.  
Life Sciences, 1977, 21, 755-768.
- 5 - BADAWY A.A.B.  
The effects of acetate, metal cations, phenobarbitone porphrogens and substrates of glycine acyltransferase on the utilisation of haert by rat liver apotryptophan pyrolase.  
Biochem. J., 1977, 164, 431-438.
- 6 - BADAWY A.A.B., EVANS M.  
Animal liver tryptophan pyrolases.  
Biochem. J., 1976, 158, 79-88.
- 7 - BADAWY A.A.B., EVANS M.  
La tryptophane pyrolase du foie de Cobaye.  
Biochem. J., 1974, 138, 445-451.
- 8 - BAKRI M., CARLSON J.R.  
Chromatographic separation of tryptophan metabolites.  
Anal. Biochem., 1970, 34, 46-65.
- 9 - BARCHAS J., USDIN E.  
Serotonin and behavior.  
Academic Press, 1973.
- 10 - BECK O, PALMSKOG G., HULTMAN E.  
Quantitative determination of 5-hydroxyindole 3-acetic acid in body fluids by high performance liquid chromatography.  
Clin. Chim. Acta, 1977, 79, 149-154.

- 11 - BENDER D.A., BAMJI A.N.  
Serum tryptophan binding in chlorpromazine treated chronic schizophrenics.  
*J. Neurochem.*, 1974, 22, 805.
- 12 - BIDARD J.N., CRONENBERGER I.  
Monoamine oxidase dans les homogénats d'organes.  
*Biochimie*, 1972, 34, 155-159.
- 13 - BLASCKO H.  
Amine oxidase and amine metabolism.  
*Pharmacol. Rev.*, 1952, 4, 415-458.
- 14 - BONNET P., FABRY J.P., GRADISKI D.  
Cathétérisme permanent chez le rat vigile pour l'étude des cinétiques sanguines et urinaires.  
*Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1978, 3, 3, 177-182.
- 15 - BUCHET J.P., LAUWERYS R.R.  
Measurement of urinary hippuric acid and m. methyl hippuric acids by gas chromatography.  
*Brit. J. Indust. Med.*, 1973, 30, 125-128.
- 16 - CATAU G.  
Etude du métabolisme de diverses substances à l'aide de la technique du foie isolé et perfusé de rat.  
Thèse d'état (Pharm.), Nancy, 1975.
- 17 - CHEN N.C., GHOLSON R.K.  
An improved column chromatographic method for isolation of tryptophan metabolites.  
*Anal. Biochem.*, 1972, 47, 139-145.
- 18 - CHILCOTE D.D., MROCHEK J.E.  
Chromatographic analysis of naturally fluorescing compounds.  
I - Rapid analysis of nanogram amounts of indoles in physiologic fluids.  
*Clin. Chem.*, 1972, 18, 8, 778-782.
- 19 - CHRISE W., RAKOW D., FENANDES M., MCGOUR S.  
A simple and sensitive method spectrophotometric determination of monoamine oxidase activity.  
*Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 1973, 11, 9, 367-370.

- 20 - COLLINS G.G.S., SANDLER N., WILLIAMS E.D., YODIM M.B.H.  
Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase.  
*Nature*, 1970, 225, 817-820.
- 21 - COPPEN A., ECCLESTON E.C., PEET M.  
Total and free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients.  
*Lancet*, 1972, 1, 1415.
- 22 - COSTIL J., GALLI J., RICHARDET J.M., BRISSAUD H.E.  
Elimination urinaire de l'acide 5-hydroxyindole acétique chez l'enfant normal.  
*La Nouvelle Presse Médicale*, 1973, 2, 32, 2115-2122.
- 23 - COULSON W.F., WARDLE E., SEPSON J.B.  
Phenylalanine hydroxylase activity towards TWO substrates. Simultaneously enhancement or inhibition by Phenylalanine, Tryptophan and their derivatives.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 167, 99.
- 24 - DEMISCH L., BOCHNIK H.J., SEILER N.  
A routine assay procedure for monoamine oxidase and its application to human blood platelets.  
*Clin. Chim. Acta*, 1976, 70, 31, 357-369.
- 25 - DENCKLA W.D., DEWEY H.K.  
The determination of tryptophan in plasma, liver and urine.  
*J. of Lab. and Clin. Med.*, 1967, 69, 160-169.
- 26 - DENIGES G.  
Sur un dosage de l'acide hippurique par colorimétrie.  
*Bull. Trav. Soc. Pharm.*, 1940, 78, 57.
- 27 - DEYSSON G., ALLIOT M.  
Dosage de l'acide hippurique urinaire dans l'épreuve de l'hippuricurie provoquée.  
*Ann. Soc. Chim. Biol.*, 1947, 29, 423-426.
- 28 - DREUX C.  
Dosage spectrofluorométrique de l'hydroxy-5-tryptamine (sérotonine) urinaire.  
*Ann. Biol. Clin.*, 1968, 3, 4, 357-363.
- 29 - DREUX C., BOUSQUET B., ESCANDE C.  
Tryptophane libre et sérotonine cérébrale : modifications sous l'influence des médicaments.  
*Ann. R. Acad. Farm.*, 1975, 41, 468.

- 30 - DREUX C., BOUSQUET B., HALTER D.  
*L'exploration biochimique des tumeurs carcinoides.*  
*Ann. Biol. Clin.*, 1973, 31, 283-294.
- 31 - DREUX C., DELAUNEUX B.  
*Etude critique des méthodes biochimiques d'exploration du métabolisme de la sérotonine. Techniques de dosage de l'acide 5-hydroxy-indole acétique.*  
*Presse Médicale*, 1964, 72, 2925-2930.
- 32 - DUCAL B.S.  
*Localization, purification and substrate specificity of monoamine oxidase.*  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 480, 1, 56-69.
- 33 - ESCANDE C., BOUSQUET B, DREUX C.  
*Dosage fluorométrique du tryptophane libre et total dans le plasma sanguin.*  
*Am. Biol. Clin.*, 1977, 35, 387-395.
- 34 - ETIENNE P., YOUNG S.N., SOURKES T.L.  
*Inhibition by albumin of tryptophan uptake by rat brain.*  
*Nature*, 1976, 262, 144-145.
- 35 - FLENTGE F., VENEMA K., KORF J.  
*Automated assay of tryptophan at the nanogram level : determination of tryptophan in cerebrospinal fluid and of total and non protein bound tryptophan in serum.*  
*Biochem. Med.*, 1974, 11, 234.
- 36 - GAFFNEY C.W., SCHREIER K., DIFERRANTE N., ALTMAN K.A.  
*The quantitative determination of hippuric acid.*  
*J. Biol. Chem.*, 1954, 206, 2, 695-698.
- 37 - GORKIN V.Z.  
*Monoamine oxidases.*  
*Pharmacol. Rev.*, 1966, 18, 1, 115-120.
- 38 - GORKIN V.Z.  
*Monoamine oxidases versatility of catalytic properties and possible biological functions.*  
*Adv. Pharmacol. Chemotherapy*, 1973, 11, 1-50.

- 39 - GREEN A.R., GRAHANE-SMITH D.G.  
Effects of drugs on the processes regulating the functional activity of brain 5-hydroxytryptamine.  
*Nature*, 1976, 260, 487-491.
- 40 - GRISLER R.  
La determinazione dell'acido ippurico nell'urina.  
*Med. Lavoro*, 1978, suppl. all., 3, 441-448.
- 41 - GRÜMER H.D.  
Formation of hippuric acid from phenylalanine labelled with carbon 14 in phenylketonuric subjects.  
*Nature*, 1961, 189, 4758, 63-64.
- 42 - GUYTON A.C.  
Measurement of the respiratory volumes of laboratory animals.  
*Amer. J. Physiol.*, 1947, 150, 70-77.
- 43 - HARDELAND R., RENSING L.  
Circadian oscillation in rat liver tryptophanpyrolase and its analysis by substrate and hormone induction.  
*Nature*, 1969, 219, 619-621.
- 44 - HAWKINS J.  
The localisation of amine oxidase in the liver cell.  
*Biochem. J.*, 1952, 50, 577-521.
- 45 - HORITA A., CARINO M.A.  
Modification of the toxic actions of L Tryptophan by pargyline and P Chlorophenylalanine.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1970, 19, 1521-1524.
- 46 - HOSKINS A.J., POLLITT R.J.  
Quantitative aspects of urinary indole-3-acetic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid excretion.  
*J. Chromato.*, 1975, 109, 436-438.
- 47 - HOUSLAY M.D., GARRETT N.J., TIPTON K.F.  
Mixed substrate experiments with human brain monoamine oxidase.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 14, 1937-1944.
- 48 - HOUSLAY M.D., TIPTON K.F.  
The nature of the electrophoretically separable multiple forms of rat liver monoamine oxidase.  
*Biochem. J.*, 1973, 135, 173-186.

- 49 - JACOBY J.H., SHABSHELOWITZ H., FERNSTROM J.D., WURTMAN R.J.  
The mechanisms by which methiothepin, a putative serotonin receptor antagonist, increases brain 5-hydroxyindole levels.  
*J. Pharm. Exp. Ther.*, 1975, 195, 2, 257-264.
- 50 - JAIN M.  
A rapid, sensitive, radiometric procedure for the determination of human blood platelet monoamine oxidase activity.  
*Clin. Chim. Acta*, 1975, 47, 1, 107-109.
- 51 - KANEKO I., MIURA T., HIRAO T., IKEDA M.  
Automated colorimetric determination of hippuric acid in human urine.  
*Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1975, 35, 165-172.
- 52 - KING L.J., PARKE O.Y., WILLIAMS R.T.  
The metabolism of 2 <sup>14</sup>C indole in the rat.  
*Biochem. J.*, 1966, 98, 266-277.
- 53 - KNOX W.E., MEHLER A.H.  
La transformation du tryptophane en L-kynurénine dans le foie.  
*J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 419-430.
- 54 - KNOX W.E., MEHLER A.H.  
Localisation de la tryptophane pyrrolase uniquement hépatique.  
*Science*, 1951, 113, 237.
- 55 - KNOX W.E., OGATA H.  
Effects of peroxyde, catalase and hematin in the assay of liver tryptophan pyrrolase.  
*J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 5, 2216-2221.
- 56 - KNOX W.E., PIRAS M.M.  
A reinterpretation of the stabilisation of tryptophan pyrrolase by its substrate.  
*J. Biochem. Chem.*, 1966, 241, 3, 764-767.
- 57 - KNOX W.E., PIRAS M.M.  
III - Tryptophan pyrrolase of liver. Conjugation in vivo during cofactor induction.  
*J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 12, 2959-2965.
- 58 - KORN O., WOGGON H.  
Dosage de l'aphénylindole in extracts.  
*Nahrung*, 1965, 9, 1, 43-46.

- 59 - KRAJL M.  
*A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase.*  
*Biochem. Pharmacol.*, 1965, 14, 9, 1684-1686.
- 60 - KRASNER J., Mac MENAMY R.H.  
*The binding of indole compounds to bovine plasma albumin.*  
*J. Biol. Chem.*, 1966, 211, 18, 4186-4196.
- 61 - KUPCKE I.  
*Photometrische mikrobestimmung von chloride ur tierischen Geweben.*  
*Z. Klin. Chemic.*, 1969, 7, 599.
- 62 - LABRIE F., KORNER A.  
*Actinomycine sensitive induction of tyrosine transaminase and tryptophan pyrolase by amino acids and tryptophan.*  
*J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 6, 1116-1119.
- 63 - LE FAUX R.  
*Les matières plastiques dans l'industrie alimentaire.*  
Compagnie Française d'Édition, 1972.
- 64 - LOREZ H.P., DA PRADA M.  
*Fluorescence microscopical study of 5-hydroxytryptamine storage organelles in mepacrine incubated blood platelets of beige mice.*  
*Experimentia*, 1978, 34, 5, 663-664.
- 65 - LOVENBERG W., JEGUIER E., SJOERDSMA A.  
*Tryptophan hydroxylation in mammalian system.*  
*Adv. Pharmacol.*, 1968, 6, 21-36.
- 66 - MAC MENAMY R.H., WATSON F.  
*Indole albumin association : a comparative study.*  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 1968, 26, 329-335.
- 67 - MATSUI H., KASAD M., IMAMURA S.  
*High performance liquid chromatographic determination of hippuric acid in human urine.*  
*J. Chromato*, 1978, 145, 231-236.
- 68 - MIKULSKI P., WIGLUSZ B.  
*A simple micromethod of determination of hippuric acid in the urine.*  
*Bull. Inst. Mar. Med., Gdansk*, 1970, 21, 314, 129-138.



- 69 - MILLER M.R., MAC CLURE D., SHIMAN R.  
Mechanism of inactivation of phenylalanine hydroxylase by p. chloro-phenylalanine in hepatoma cells in culture. Two possible models.  
J. Biol. Chem., 1976, 251, 3677-3685.
- 70 - NORRIS K.M., MOON R.J.  
Microanalysis of tryptophan metabolites in mice.  
Anal. Biochem., 1974, 61, 313-327.
- 71 - NIEDERWIESER A., GILIBERTI P.  
Simple extraction of indole derivatives from aqueous solution by absorption on neutral polystyrene resin.  
J. Chromat., 1971, 61, 95-99.
- 72 - NISHINO M., NOGUCHI T., KIDO R.  
Ion-exchange column chromatographic method for simultaneous and determination of 5-hydroxyindoles.  
Anal. Biochem., 1972, 45, 1, 314-316.
- 73 - NOTHDURFT H., MOHR H.J.  
Zur Verträglichkeit von 2-phenylindole auf grund landgustiger Fütterungs Versuche an Ratten.  
Arch. für Toxik., 1964, 20, 220-225.
- 74 - NOTTER D.  
Place des N acetyltransférases dans le métabolisme de médicaments et de la sérotonine. Influence de la phénelzine.  
Thèse d'Etat (Pharm.), NANCY, 1978.
- 75 - OGATA M., TOMOKUNI K., TAKATSUKA Y.  
Quantitative determination in urine of hippuric acid and m-or p. methylhippuric acid, metabolites of toluene and m-or p; xylene.  
Brit. J. Indust. Med., 1969, 26, 230-234.
- 76 - OWEN F., BOURNE R.C.  
The heterogeneity of monoamine oxidase in distinct populations of rat brain mitochondria.  
Biochem. Pharmacol., 1977, 26, 4, 289-292.
- 77 - PANDE C.S., MAC MENAMY R.H.  
Binding of indole compounds with modified albumins : characterization of the indole binding site.  
Biochim. Biophys. Acta., 1974, 342, 1, 60-68.

- 78 - PARKER C.E., BARRANGER J., NEW HOUSE A., BESSMAN S.  
Studies of the isoenzymes of phenylalanine hydroxylase in humans.  
*Biochem. Med.*, 1977, 17, 8-12.
- 79 - PATEK D.R., HELLERMAN L.  
Mitochondrial monoamine oxidase mechanism of inhibition by phenylhydrazine and by aralkylhydrazines role of enzymatic oxidation.  
*J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 8, 2373-2380.
- 80 - PAYENDAH R.  
Contribution à l'étude de l'incidence biochimique des médicaments antidépresseurs centraux de la classe des inhibiteurs de la monoamine oxydase.  
Thèse d'Université (Pharm.), Nancy, 1969.
- 81 - PILET P.E.  
Les phytohormones de croissance  
Editeurs Masson et Cie, 1961.
- 82 - PIRAS M.M., KNOX W.E.  
II - Tryptophan pyrrolase of liver. The activation reactions in crude preparations from rat liver.  
*J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 12, 2952-2958.
- 83 - RAPOPORT J.M., FEIGIN R.D., BRUTON J., BEISEL R.W.  
Circadian rhythm for tryptophan pyrrolase activity and its circulating substrate.  
*Science*, 1966, 153, 1642-1644.
- 84 - RENSON J., WEISSBACH H., UDENFRIEND S.  
Hydroxylation of tryptophan by phenylalanine hydroxylase.  
*J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2261.
- 85 - RICHMAN R.J., HASSNER A.  
The chemistry of 3-oxo 2-phenylindolenine.  
*J. Organic. Chem.*, 1968, 13, 6, 2548-2551.
- 86 - ROBINSON D.S., LOVENBERG W., KEISER H., SJOERDSMA A.  
Effects of drugs on human blood platelet and plasma amine oxidase activity in vitro and in vivo.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1968, 17, 109-119.

- 87 - ROTH J.A., GILLIS C.N.  
*Inhibition of lung, liver and brain monoamine oxidase by imipramine and desipramine.*  
*Biochem.Pharmacol.*, 1974, 23, 6, 1138-1140.
- 88 - SAAVEDRA J.H., BROWNSTEIN M., AXELROD J.  
*A specific and sensitive enzymatic isotopic microassay for serotonin in tissues.*  
*J. Pharmacol. Experim. Ther.*, 1973, 186, 3, 508-515.
- 89 - SATO Y., MARUYANA M.  
*The inhibition of tryptophan pyrolase synthesis in rat lines by CCl<sub>4</sub>.*  
*J. Biochem.*, 1972, 75, 5, 1129-1137.
- 90 - SCATCHARD G.  
*The attractions of proteins for small molecules and ions.*  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, 51, 660-672.
- 91 - SCHIMKE R.T., SWEENEY E.W., BERLIN C.M.  
*The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrolase.*  
*J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 1, 322-331.
- 92 - SCHLOOT W., TIGGES F.J., BLAESNER H., GOEDDE W.H.  
*N-acetyltransferase and serotonin metabolism on man and other species.*  
*Z. physiol. Chem.*, 1969, 350, 1353-1361.
- 93 - SCHREIRER K., ALTMAN K.I., HEMPELMANN L.H.  
*Proceedings of the society for experimental biology and medicine.*  
*Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 1954, 87, 61.
- 94 - SCRIVER C.R., ROSENBERG L.E.  
*Amino acid metabolism and its disorders.*  
W.B. Saunders Company, 1973.
- 95 - SENTENAC-ROUMANOU H., LE CALL J.Y., MARBLE G., MARC J.C.  
*Etude du dosage de 5 hydroxytryptamine urinaire par spectrofluorimétrie.*  
*Ann. Biol. Clini.*, 1967, 25, 825-834.
- 96 - SHAWKY A.A., KNOWLES C.O.  
*Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds.*  
*Nature*, 1973, 242, 6, 417-418.

- 97 - SCHIRARDIN H., METAIS P.  
Détermination of 5 hydroxyindolacetic acid, metabolite of serotonin,  
by Hauson's method.  
Ann. Biol. Clin., 1960, 18, 677-681.
- 98 - SINHA S.N., GABRIELI E.R.  
A simple method for simultaneous determination of benzoic and  
hippuric acids in biological fluids.  
Clin. Chim. Acta., 1968, 19, 313-317.
- 99 - SOLLENBERG J., BALDENSTEIN A.  
Isotachopheretic analysis of mandelic acid, phenylglyoxylic acid,  
hippuric acid and methylhippuric in urine after occupational  
exposure to styrene, toluene and/or xylene.  
J. Chromato., 1977, 132, 469-476.
- 100 - STEIN W.H., PALADINI A.C., HIRS C.H.W., MOORE S.  
Phenylacetylglutamine as a constituent of normal human urine.  
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 2848.
- 101 - STOWE B.B., THIMANN K.V.  
The paper chromatography of indole compounds and some indole con-  
taining auxins of plant tissues.  
Arch. of Biochem. Biophys., 1954, 51, 499-516.
- 102 - TABOR C.W., TABOR H., ROSENTHAL S.M.  
Purification of amine oxidase from beef plasma.  
J. Biol. Chem., 1954, 208, 645.
- 103 - TEUCHY H., VAN SUMERE C.F.  
Quantitative thin layer chromatographic determination of hippuric  
acid in rat urine.  
Clin. Chim. Acta, 1969, 25, 79-86.
- 104 - TOMOKUNI K., OGATA M.  
Direct colorimetric determination of hippuric acid in urine.  
Clinica Chem., 1972, 18, 349-351.
- 105 - UDENFRIEND S., WEISSBACH H., BRODIE B.B.  
Assay of serotonin and related metabolites, enzymes and drugs.  
Meth. Biochem. Anal., 1958, 5, 95-130.

- 106 - UMBERGER C.J., FIORESE F.F.  
Colorimetric method for hippuric acid.  
*Clin. Chem.*, 1963, 9, 91-96.
- 107 - VASQUIER M., MARTILONI J.L., MORELIS P.  
Effet d'un médicament anticonvulsant le n-dipropylacétate sur la  
pénétration cérébrale du tryptophane chez la souris.  
*C.R. Acad. Sciences*, 1976, 282, 779-781.
- 108 - WEISSBACH H., SMITH T.E., OZLY J.M., WITKOR B., UDENFRIEND S.  
A rapid spectrometric assay of monoamine based on the rate of  
disappearance of cynuramine.  
*J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 1160-1165.
- 109 - WILLIAMS C.H.  
Monoamine oxidase. I - Specificity of some substrates and inhibitors.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 615-628.
- 110 - WILLIAMS C.H., LAWSON J.  
Monoamine oxidase. II - Time dependent inhibition by propargylamines.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 629-636.
- 111 - YODIM M.B.H., COLLINS G.G.S., SANDLER M.  
Isoenzymes of soluble mitochondrial monoamine oxidase.  
*FEBS Symposium*, 1970, 18, 281-289.
- 112 - YODIM M.B.H., COLLINS G.G.S., SANDLER M.  
Multiple forms of rat brain monoamine oxidase.  
*Nature*, 1969, 223, 626-628.
- 113 - ZAITSU K., NAGAI H., KOHASHI K., OHKURA Y.  
A new fluorometric assay for human serum monoamine oxidase.  
*Chem. Pharm. Bull.*, 1977, 25, 5, 918-921.