

ETUDE DU METABOLISME DE L'HYDROXY₃ HYDROXY METHYL₅ METHYL₂ ISONICOTIN- ALDOXIME, DE L'HYDROXY₂ METHOXY₃ BENZAL- DOXIME ET DE LA DIOXIME HYDROXY₄ METHOXY₅ ISOPHTALIQUE

PHAM-HUU-CHANH, SOM CHANVATTEY et J. PATTE

Centre de Recherches sur les Toxicités (C.N.R.S.), 205 Route de Narbonne, 31-Toulouse, France

(Received 11 October 1969; accepted 12 November 1969)

Abstract—3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylisonicotinaldoxime (pyridoxal oxime), 2-hydroxy-3-methoxybenzaloxime (orthovanillin oxime) and 4-hydroxy-5-methoxyisophthalic dioxime (vanillic dialdehyde dioxime), injected intraperitoneally in equitoxic (sublethal) doses, are excreted primarily by the urinary pathway. The substances are largely unchanged, though traces of the corresponding acids are found. Vanillic dialdehyde dioxime alone is transformed into the aldehyde (vanillic dialdehyde), which can be detected in the blood of experimental animals 3 hr after administering the dioxime.

None of the oximes investigated, nor any of their metabolites (the corresponding acids) could be detected in the brain, heart, liver, spleen, kidneys or blood.

L'ÉTUDE des propriétés pharmacodynamiques de l'hydroxy₃ hydroxy méthyl₅ méthyl₂ isonicotinaldoxime (oxime du pyridoxal), de l'hydroxy₂ méthoxy₃ benzaldoxime (oxime de l'orthovanilline) et de la dioxime hydroxy₄ méthoxy₅ isophtalique (dioxime du dialdéhyde vanillique) a montré que l'oximation de la molécule peut orienter, modifier, voire inverser l'activité pharmacologique de celle-ci.^{1, 2} Dans l'état actuel de nos recherches, le rôle de la fonction oxime n'a pas encore été élucidé, mais d'ores et déjà on peut affirmer que l'influence du reste de la molécule est indéniable.

Il importe donc de savoir comment se comporte une molécule à fonction oxime dans l'organisme animal.

MATERIEL ET METHODES

Nos expériences ont été réalisées sur des rats mâles (*Rattus norvegicus* Berkenhout, var. albinos, de souche Wistar A.G.) de 220 ± 20 g.

On leur administre par voie intrapéritonéale la dose infaléale (dose maximale jamais mortelle, dix animaux par dose et par produit) de chacun des produits. (Tableau 1).

Les animaux ainsi traités ont été mis immédiatement dans des cages à métabolisme.

On recueille l'urine toutes les 3 hr après l'administration des produits. Ainsi, nous avons des échantillons d'urine de 0 à 3, 3 à 6, 6 à 9 hr et puis de 9 à 24 hr après l'injection des produits.

Parallèlement, sur des lots d'animaux différents, nous avons effectué des prises de sang par ponction cardiaque chez l'animal non anesthésié, et des prélèvements d'organes

TABLEAU 1

Produits étudiés	mM/kg	mg/kg
Oxime du pyridoxal	1.54	0.28
Pyridoxal	2.11	0.43
Oxime de l'orthovanilline	0.60	0.10
Orthovanilline	1.00	0.15
Dioxime du dialdéhyde vanillique	0.76	0.16
Dialdéhyde vanillique	0.44	0.08

(cerveau, coeur, rate, reins, foie) pour l'étude de la fixation des produits et de leurs métabolites. Les organes ainsi prélevés ont été broyés au Potter.

Extraction des produits

Nous avons adopté les techniques de Armstrong et coll.³ pour extraire les produits étudiés et leurs métabolites de l'urine et des broyats d'organes: nous avons utilisé l'acétate d'éthyle soit en milieu franchement acide (pH 2-3), soit en milieu faiblement acide, proche de la neutralité (pH 6-6.5).

On acidifie à pH 2-3 l'urine ou les dilutions de broyats d'organes avec l'acide sulfurique à 10 p. 100.

On sature ensuite la phase aqueuse par un excès de bromure de potassium.⁴

On extrait 3 fois avec 10 ml d'acétate d'éthyle chaque fois en ayant soin de bien agiter puis de centrifuger.

On réunit les 3 surnageants recueillis chaque fois après centrifugation et on les évapore sous vide à 40° au "Rotavapor".

Le résidu est repris par 1 ml d'alcool éthylique ou méthylique.

L'extraction en milieu faiblement acide a été réalisée suivant le même procédé que précédemment mais sans acidification par l'acide sulfurique.

Identification des oximes et de leurs métabolites

Nous avons utilisé principalement la chromatographie en couche mince (CCM) de Stahl⁵ pour identifier les oximes et leurs métabolites: le support de chromatographie est une couche de 250 μ de gel de silice sans indicateur de fluorescence.

La séparation des divers composants a été effectuée suivant la technique de Randerath;⁶ le solvant utilisé est du butanol saturé de NH_4OH 5N.

Comme révélateurs nous avons utilisé soit la lumière u.v. à 360 μ , soit le dibromo 2,6 quinone chloroimide (0.4 g pour 100 ml de méthanol), soit le 2,4 dinitrophénylhydrazine, réactif spécifique des aldéhydes.

Nous avons eu recours aussi à la spectrophotométrie infrarouge et ultraviolette et à la spectrofluorescence pour identifier certains composés.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Hydroxy₃ hydroxy méthyl₅ isonicotinaldoxime (oxime du pyridoxal)

Chez les animaux traités à l'oxime du pyridoxal à la dose infralethale, nous avons décelé par CCM la présence de cette oxime (R_f 0.62, fluorescence bleutée sous u.v.) en quantité assez importante dans l'urine de 3 hr et de 6 hr. L'urine de 9 hr n'en contient qu'une trace infime. Quant à l'urine recueillie entre 9 hr et 24 hr après l'injection du produit, elle en est complètement dépourvue.

En outre, la CCM de l'urine des animaux traités a mis en évidence une tache dont le R_f est de 0.31 visible aux u.v. La spectrofluorescence du grattis de cette tache l'a identifiée à de l'acide pyridoxique.

Aucune présence de l'oxime du pyridoxal ni de ses métabolites n'a été décelée dans le sang ou dans les broyats d'organes (cerveau, coeur, rate, reins, foie) prélevés à 3, 6, 9 et 24 hr après l'administration intrapéritonéale de l'oxime du pyridoxal à la dose infraléthale.

En résumé, dans les conditions expérimentales adoptées, l'oxime du pyridoxal administrée par voie intrapéritonéale à la dose infraléthale (0.28 mg/kg, soit 1.54 mM/kg, i.p.) disparaît rapidement du sang circulant et ne se fixe pas dans les organes (cerveau, coeur, rate, reins, foie). Elle s'élimine en nature dans l'urine pendant les 6 premières heures qui suivent l'administration du produit. Seule une partie infime de l'oxime du pyridoxal s'est décomposée en acide pyridoxique décelé à l'état de trace dans l'urine.

Pyridoxal

On a identifié de faibles quantités de pyridoxal (R_f 0.38 colorée en bleu intense par le dibromo 2, 6 quinone chloroimide) dans l'urine de 3 hr des rats mâles traités par voie intrapéritonéale d'une dose léthale de pyridoxal (0.43 mg/kg, soit 2.11 mM/kg, i.p.). Par contre, on trouve des quantités plus importantes d'acide pyridoxique.

L'acide pyridoxique a été décelé en quantité importante dans le foie et en quantité plus faible dans le coeur, la rate et le cerveau.

Ainsi, le pyridoxal administré par voie intrapéritonéale à la dose infraléthale chez le rat mâle, d'une part se fixe principalement dans le foie et en petite quantité dans le cerveau, le coeur, la rate, et d'autre part s'élimine par l'urine. Seule, une petite quantité de pyridoxal a été retrouvée dans l'urine accompagnant l'acide pyridoxique.

Oxime de l'orthovanilline

Administrée par voie intrapéritonéale à la dose infraléthale (0.10 mg/kg, soit 0.60 mM/kg, i.p.), l'oxime de l'orthovanilline (R_f 0.67 colorée en bleu turquoise à reflet verdâtre par le dibromo 2,6 quinone chloroimide) s'élimine telle quelle dans l'urine. On décèle toutefois de petites quantités d'acide orthovanillique.

Aucune trace d'oxime de l'orthovanilline ni d'acide orthovanillique n'a été trouvée dans le sang et dans les broyats d'organes (cerveau, coeur, rate, reins, foie).

Orthovanilline

On trouve dans l'urine de rats mâles traités par une dose infraléthale d'orthovanilline (0.15 mg/kg, soit 1 mM/kg, i.p.) de petites quantités d'orthovanilline (R_f 0.51 colorée en vert entourée d'une couronne bleutée par le dibromo 2,6 quinone chloroimide) et d'acide orthovanillique (R_f 0.33, colorée en bleu intense à reflet verdâtre par le dibromo 2,6 quinone chloroimide).

La présence de ces composés a été décelée dans toutes les fractions d'urine: la quantité d'orthovanilline dans l'urine diminue avec le temps alors que l'acide orthovanillique a été retrouvé en quantité encore importante dans l'urine recueillie entre 9 et 24 hr après l'administration de l'orthovanilline.

Seul l'acide orthovanillique a été identifié dans le broyat des reins des animaux: la présence de l'acide orthovanillique est plus importante dans les reins des animaux sacrifiés 6 hr après l'injection du produit que chez ceux sacrifiés 3 hr après l'injection du produit.

Ni l'orthovanilline, ni l'acide orthovanillique n'ont été retrouvés dans aucun autre organe.

L'orthovanilline, administrée à des rats, s'élimine donc essentiellement sous forme d'acide orthovanillique et en petite quantité en nature. L'acide orthovanillique a été retrouvé aussi dans les broyats de reins.

Dioxime du dialdéhyde vanillique

La CCM de l'urine des rats traités par la dioxime du dialdéhyde vanillique (R_f 0.49, colorée en jaune par la 2,4 dinitrophénylhydrazine, fluorescente sous u.v.) révèle la présence de celle-ci en quantité importante dans toutes les fractions d'urine. On y trouve en quantité moindre du diacide vanillique.

On n'a trouvé ni de dioxime du dialdéhyde vanillique, ni du diacide vanillique dans les broyats d'organes (cerveau, coeur, rate reins, foie).

Par contre, on a révélé la présence du dialdéhyde vanillique dans le sang prélevé 3 hr après l'administration de dioxime du dialdéhyde vanillique.

Il apparaît donc que la dioxime du dialdéhyde vanillique administrée par voie intrapéritonéale à la dose léthale chez les rats mâles se transforme en dialdéhyde puis en diacide vanillique. On a trouvé seulement le dialdéhyde vanillique dans le sang 3 hr après l'administration de dioxime du dialdéhyde vanillique. La dioxime du dialdéhyde vanillique est excrétée telle quelle dans l'urine ou en petite quantité transformée en diacide vanillique.

Ni la dioxime, ni le dialdéhyde, ni le diacide vanillique ne se fixent sur les organes.

Dialdéhyde vanillique

On retrouve le dialdéhyde vanillique (R_f 0.36, colorée en jaune orangé foncé par la 2,4 dinitrophénylhydrazine) dans toutes les fractions d'urine et aussi dans le sang prélevé 3 hr après l'administration de dialdéhyde vanillique par voie intrapéritonéale à la dose infraléthale (0.08 mg/kg, soit 0.44 mM/kg, i.p.).

Sa présence dans les différents organes n'a pas été mise en évidence.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales adoptées, les expériences réalisées ont permis de mettre en évidence les points suivants:

(1) Les oximes du pyridoxal, de l'orthovanilline et du dialdéhyde vanillique s'éliminent par l'urine, en grande partie telles quelles, et à l'état de trace sous forme d'acide correspondant (acide pyridoxique, acide orthovanillique et diacide vanillique). Seul avec l'oxime du dialdéhyde vanillique on retrouve le dialdéhyde vanillique dans le sang des animaux 3 hr après le traitement à la dioxime du dialdéhyde vanillique. Ceci démontre la stabilité de la fonction oxime et sa responsabilité directe des propriétés pharmacodynamiques de la molécule.

(2) Le pyridoxal, l'orthovanilline, ont été excrétés en grande partie sous forme d'acides (acide pyridoxique, acide orthovanillique) et en faible quantité à l'état d'aldéhyde. Le dialdéhyde vanillique par contre est éliminé exclusivement à l'état d'aldéhyde, on n'a pas trouvé de trace de diacide vanillique dans les urines des animaux traités.

(3) Aucune des oximes étudiées ni leurs métabolites (acides correspondants) n'ont été décelés dans les broyats d'organes (cerveau, coeur, rate, reins, foie) ni dans le sang. Or, après l'administration de pyridoxal ou d'orthovanilline, on retrouve l'acide pyridoxique dans le coeur, la rate et le cerveau, et en grande partie dans le foie, et l'acide

orthovanillique dans les reins des animaux traités. Il apparaît donc que l'oximation de la fonction aldéhyde empêche cette fixation.

Nos résultats rappellent ceux de Enander et coll.⁷ selon lesquels l'iodure de *N*-méthylpyridinium 2 aldoxime (PAM) est excrété non modifié dans l'urine des rats. Néanmoins, les auteurs ont décelé par chromatographie un nombre de métabolites parmi lesquels le *N*-méthyl-pyridinium 2 nitrile, l'acide *N*-méthylpyridinium 2 carboxylique (homarine) et le *N*-méthyl₂pyridone. Par contre, Loomis,⁸ en expérimentant sur le PAM, a trouvé que celui-ci pénètre faiblement dans le foie et le rein des souris et dans presque tous les tissus mous du chien. Mais seules des traces ont été retrouvées dans le cerveau de chien.

D'après Erdman,⁹ le dichlorure bis-(4 hydroxy iminométhyl (1) pyridine-méthyl)-éther (Toxogonin, LüH₆), contrairement au PAM, peut franchir la barrière hémoméningée.

Résumé—L'hydroxy₃ hydroxy méthyl₅ méthyl₂ isonicotinaldoxime (oxime du pyridoxal), l'hydroxy₃ méthoxy₃ benzaldoxime (oxime de l'orthovanilline) et la dioxime hydroxy₄ méthoxy₆ isophthalique (dioxime du dialdéhyde vanillique) injectées par voie intrapéritonéale aux doses équitoxiques (dose infraléthale) s'éliminent essentiellement par l'urine, en grande partie non modifiées et à l'état de trace sous forme d'acide correspondant. Seule, la dioxime du dialdéhyde vanillique se transforme en aldéhyde (dialdéhyde vanillique) décelé dans le sang des animaux trois heures après l'administration de la dioxime du dialdéhyde vanillique.

Aucune des oximes étudiées ni aucun de leurs métabolites (acides correspondants) n'ont été décelés dans le cerveau, le cœur, la rate, les reins, le foie, ni dans le sang.

REFERENCES

1. PHAM-HUU-CHANH, SOM CHANVATTEY, M. C. AZUM-GELADE et P. DUCH KAN, (sous presse) (1969).
2. PHAM-HUU-CHANH, SOM CHANVATTEY, M. C. AZUM-GELADE et G. SILVE MAMY, (sous presse) (1969).
3. M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW et P. E. WALL, *J. biol. Chem.* **218**, 293 (1956).
4. H. SELIGSON, B. KRAMER, D. SELIGSON et H. BALTRUSH, *Anal. Biochem.* **6**, 362 (1963).
5. E. STAHL, H. R. BOLLINGER, M. BRENNER, H. GANSHIRT, H. K. MANGOLD, H. SEILE et D. WALDI, *Thin layer Chromatography, a Laboratory Handbook*. Academic Press, New York (1965).
6. K. RANDEATH, *Chromatographie sur couches minces*. Gauthier Villars, Paris (1964).
7. I. ENANDER, A. SUNDWALL et B. SORBO, *Biochem. Pharmac.* **11**, 377 (1962).
8. T. A. LOOMIS, *Toxic. Appl. Pharmac.* **5**, 489 (1963).
9. W. D. ERDMAN, *Arzneim. Forsch.* **15**, 135 (1965).
10. F. BERGLUND, C. E. ELWIN et A. SUNDWALL, *Biochem. Pharmac.* **11**, 383 (1962).