

15. OKITA, G.T. and SPRATT, J.L. — Determination of Radiotracer Stability of Tritium-Labeled Compounds in Biological Studies, in "Tritium in the Physical and Biological Sciences", Vol. 2, p. 85, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1962.
16. OBER, R.E., FUSARI, S.A., COFFEY, G.L., GWYNN, G.W. and GLAZKO, A.J. — Preparation of Tritium Labeled Paromomycin (Humatin) by Fermentation in a Medium Containing Tritiated Water, *Nature*, **193** : 1289-1290 (1962).
17. KATZ, J.J. and FEDER H. M. — Chemical and Biological Studies with Deuterium, Thirty-Ninth Annual Priestley Lectures, Part I (1965).
18. BOWEN, H.J.M. — Biological Fractionation of Isotopes, *Intern. J., Appl. Radiation Isotopes*, **7** : 261-272 (1960).
19. WOOD, B.J.B. and INGRAHAM, L.L. — The ^3H Rate Effect in Tyrosinase-Catalysed Hydroxylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **98** : 479-484 (1962).
20. THOMPSON, J.F. and KLIPFEL, F.J. — Studies on the Enzymatic Dehydrogenation of Deuterated Succinate, *Biochim. Biophys. Acta*, **44** : 72-77 (1960).
21. LYNN, K.R. and YANKWICK, P.E. — ^{13}C Kinetic Isotope Effects in the Urease-Catalysed Hydrolysis of Urea, *Biochim. Biophys. Acta*, **81** : 533-547 (1964).
22. ROSENBLUM, C. — Non-metabolite Residues in Radioactive Tracer Studies, in ROTH, L.J., *op. cit.*, p. 353.
23. McMAHON, R.E., CULP, H.W. and MARSHALL, F.J. — The Metabolism of α -d1-Acetyl-methanol in the Rat : The Identification of the Probable Active Metabolite, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **149** : 436-445 (1965).
24. BERENBOM, M. — Studies on the Utilization of the Carbon of *p*-Dimethylaminoazobenzene for Rat Liver Nucleic Acid Synthesis, *Cancer Res.*, **22** : 1343-1348 (1962).

L'Étude métabolique des médicaments marqués: description d'un plan expérimental

B. GLASSON et A. BENAKIS

Laboratoire du Métabolisme des Médicaments
Université de Genève, Suisse

Reçu le 10 mai 1966

INTRODUCTION

Le métabolisme des médicaments est actuellement une discipline qui s'intègre dans la science pharmacologique. Plusieurs articles ont déjà exposé l'importance, l'ampleur et les informations que ces études peuvent apporter dans l'étude des nouveaux produits pharmaceutiques ^(1, 2). Cette extension est d'ailleurs prouvée par la littérature scientifique qui s'accroît de jour en jour.

Ces travaux émanent surtout de l'Université, mais les sociétés industrielles s'intéressent d'une manière très précise à ce type d'études. Si l'équipement nécessaire est complexe et coûteux et si le marquage des produits à étudier pose de réelles difficultés, non seulement sur le plan scientifique, mais également sur le plan des délais et des prix de revient, il n'en est pas moins certain que l'on assistera à une introduction des résultats obtenus par ces techniques dans le dossier de chacun des nouveaux produits pharmaceutiques ⁽³⁾. Cependant, nous devons insister sur le fait que l'on ne saurait tirer des conclusions de telles recherches qu'avec une grande prudence, car la statistique ne peut les étayer, étant donné le nombre limité d'expériences *.

Cette étude est consacrée d'une part à cette connaissance technique nécessaire à l'étude métabolique d'un médicament marqué, d'autre part aux avertissements de circonspection dans leur interprétation dont tout chercheur désireux de les poursuivre doit s'inspirer. Elle n'est nullement exhaustive; elle a pour but d'exposer la suite des opérations nécessaires, tout en soulignant l'importance de chacune d'elles, comme aussi les techniques et l'appareillage utilisé.

Nous devons encore remarquer que les progrès continus en matière d'appareils et de techniques nous obligent à une constante révision de notre point de vue.

LES CONDITIONS DE SYNTHÈSE

Celui qui entreprend l'étude d'une substance exogène donnée doit tout d'abord prévoir théoriquement, à la lumière des réactions métaboliques classiques, ses transformations possibles dans l'organisme. La molécule peut-elle s'éliminer comme telle ou subira-t-elle in vivo des oxydations et des conjugaisons? Où se situeront ces transformations de structure? Cette étude préalable le conduira à prévoir *la position la plus utile de l'élément* marqué. Il adaptera sa synthèse à cet effet. Il se peut qu'une seule position du traceur radioactif ne suffise pas à découvrir l'identification ultérieure des catabolites. Une seconde étude sera dès lors nécessaire quant à une position différente de l'atome marqué dans sa structure moléculaire ⁽⁴⁾.

Toute synthèse marquée doit obéir à un premier impératif : posséder une *activité spécifique la plus élevée* possible, sans que cet impératif ait des répercussions par des phénomènes d'autoradiolyse ⁽⁵⁾. Les faibles doses administrées à l'animal et la forte dilution qui s'opère dans l'organisme vivant justifient l'utilisation de substances d'activité spécifique élevée. De plus, l'activité spécifique élevée facilite la détection sur chromatogrammes de quantités très faibles, qui doivent posséder encore assez d'activité pour rendre aisée une détermination non seulement qualitative, mais quantitative.

* Cf. également les Recommandations du Comité de l'Association européenne pour l'Étude de la Toxicité des Médicaments, 1964.

Le choix de la voie de synthèse doit tenir compte également de l'impératif de *pureté radiochimique*, qui est elle-même en relation avec la position de l'atome marqué. Une erreur d'appréciation du nombre des catabolites s'explique par la confusion entre les produits issus du métabolisme et les éventuelles impuretés — pouvant elles-mêmes se métaboliser. On peut citer l'exemple du marquage en position 2 du cycle hydantoïnique de la diphénylhydantoïne, qui s'effectue par condensation de l'urée — ^{14}C avec le benzyl. Cette synthèse peut conduire à la formation d'une diphényl-acétylène-diurée, aux propriétés proches de celles de la diphényl-hydantoïne, une purification étant extrêmement difficile. Si, par contre, on fait réagir du cyanure de sodium- ^{14}C sur la benzophénone, en présence d'acétamide, on obtient une diphénylhydantoïne marquée en position 4 du cycle dont le processus de purification est plus simple et plus total ⁽⁶⁾.

Ces trois conditions impératives de synthèse nécessitent une liaison intime entre les synthéticiens et les utilisateurs. Il appartient au pharmacologue de préciser la partie de molécule ou le radical auquel il porte intérêt. Le chimiste décidera si cette synthèse est réalisable et étudiera son rendement en radioactivité. Leur dialogue posera des problèmes d'ordre scientifique (le rendement de la synthèse, la pureté obtenue) et économique (le prix de la molécule marquée, en relation avec la durée de la synthèse). Ces problèmes ne peuvent être résolus que sur la base d'une information réciproque, qu'il est très difficile d'obtenir jusqu'ici ⁽⁷⁾. Un office permanent de liaison et de documentation, actuellement en gestation, tend à combler cette lacune en Europe ⁽⁸⁾.

LES CONDITIONS DE L'EXPÉRIMENTATION

L'animal de choix, pour ce type d'expérience, est le rat de souche pure, à un âge où l'on observe une relative stabilisation de son poids. Ces animaux, d'environ 100 à 150 g, présentent l'avantage d'utiliser des quantités relativement faibles, de l'ordre du milligramme du produit administré. Exceptionnellement, le chat, et plus rarement le chien, sont utilisés, parce que plus difficiles à traiter; ils demandent une canulation pour l'observation de l'élimination urinaire à des temps réguliers. La pureté de la souche, l'âge de l'animal et son poids sont des problèmes annexes. La voie parentérale nous paraît préférable pour l'injection chez le rat. La voie i.v. pose quelquefois des problèmes délicats lorsqu'il s'agit de l'administration quantitative du produit, dans le cas où un bilan est nécessaire. Cette nécessité d'une injection quantitative nous oblige à prendre des dispositions tout à fait strictes quant à la quantité administrée. Il faut tenir compte des quantités restantes dans le dispositif d'injection. Le schéma d'élimination ne présente pas de différence notable dans le cas d'une administration intraveineuse ou i.p. La quantité injectée varie selon la nature du produit et le but poursuivi par l'expérience. Elle sera la dose thérapeutique pour toute analyse globale; elle sera inférieure ou répétée dans le cas d'étude chronique, ou pour l'observation des phénomènes d'accoutumance. Elle peut être élevée et unique

lorsqu'il s'agit d'obtenir des quantités importantes en vue de l'identification des métabolites. Si l'on dispose d'une substance d'une activité spécifique élevée, la dilution permet d'administrer la dose thérapeutique tout en épargnant le produit marqué. Après administration, l'animal est maintenu dans une cage métabolique en atmosphère contrôlée.

L'étude sur l'urine « globale » ne peut servir qu'à établir un bilan de l'excrétion du produit. Il nous paraît essentiel, en plus, de suivre l'élimination urinaire en fonction du temps, si l'on tient à observer la durée d'action du produit inchangé, c'est-à-dire à suivre le rythme de son oxydation ou de sa conjugaison — le plus souvent processus d'inactivation. L'animal demeure jusqu'à 48 à 60 heures dans sa cage métabolique. Les urines sont recueillies par un collecteur de fractions ⁽⁹⁾.

De même, un autre type d'expérience consiste à mesurer en continu le CO₂, par un dispositif infra-rouge dans l'air exhalé, et également le ¹⁴CO₂, par la technique des chambres d'ionisation. On établit en continu le rapport ¹⁴CO₂/CO₂. Le même appareillage nous permet de mesurer le taux d'oxygène. En effectuant ces expériences, on place l'animal dans une cage métabolique, enceinte dans laquelle les différents paramètres, tels la pression, l'humidité, la température et l'alimentation, sont contrôlés.

Tout prélèvement d'organes nécessitera l'interruption de l'expérience après 6 à 12 heures. Dans la plupart des cas, la répartition de la radioactivité dans les organes ne fait que confirmer le foie comme l'organe majeur de transformations biochimiques. Cependant, s'il peut être intéressant de connaître la quantité de radioactivité dans un organe particulier (le cerveau, par exemple), c'est pour savoir s'il s'agit du produit inchangé ou d'un de ses catabolites. L'autohisto-radiographie est alors indiquée, mais ne répond que fragmentairement à la question. En définitive, seule l'analyse quantitative, et surtout qualitative, permet de séparer les catabolites et de les identifier. Ces différentes étapes sont illustrées dans le schéma à la page 214.

LE PROBLÈME ANALYTIQUE

La mesure de la radioactivité est, dans ce type d'expérience, une technique de routine. Différents compteurs sont utilisés : du GM au compteur à courant gazeux sans fenêtre, du compteur proportionnel à la scintillation liquide ⁽¹⁰⁾.

Les activités spécifiques de plus en plus élevées des médicaments utilisés ont facilité le problème de comptage. Cependant, il se pose encore quelques questions concernant les mesures par scintillation des produits du catabolisme ⁽¹¹⁾.

La première mesure est celle de la radioactivité globale des fractions urinaires éliminées. Cette information peut nous renseigner sur la cadence d'élimination; mais les problèmes les plus importants à résoudre sont ceux de la transformation du produit injecté chez l'animal.

Schéma d'une Étude métabolique

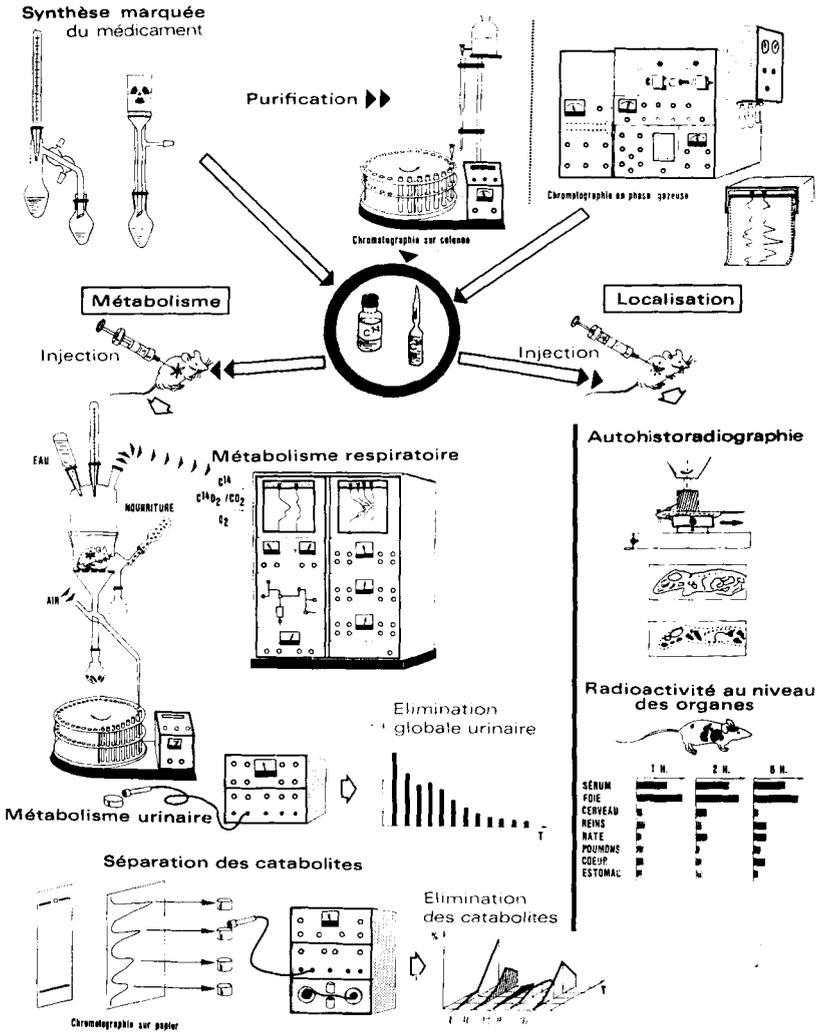


FIG. 1

Après l'administration du médicament marqué, les liquides biologiques sont récoltés. Chaque fraction urinaire est étudiée par chromatographie sur papier. Plus de dix systèmes chromatographiques sont utilisés afin de choisir le système avec lequel on obtient la meilleure séparation. Chaque substance radioactive est localisée par enregistrement de sa radioactivité à l'aide d'un compteur sans fenêtre à courant gazeux. On repère ainsi couramment des quantités de

l'ordre du microgramme. Chaque secteur actif est élué du papier. Une nouvelle chromatographie est nécessaire pour déterminer si cette radioactivité est due à un ou plusieurs catabolites. En effet, il est rare qu'une séparation complète de tous les catabolites soit possible par un seul système chromatographique. Pratiquement deux, voire trois systèmes sont suffisants pour une séparation complète. Les séparations ne sont bonnes et les R_f constants qu'à condition de travailler dans des enceintes climatisées. Une fois la technique de chromatographie sur papier mise au point — ce qui est d'ailleurs assez laborieux et réserve parfois des surprises — on obtient, après élution, des valeurs quantitatives pour chacun des secteurs actifs correspondant à un des catabolites. La méthode planimétrique, ainsi que celle d'intégration par disque, n'ont pas donné, dans notre domaine, des résultats suffisamment reproductibles pour l'utilisation de routine. C'est pour cette raison que nous sommes obligés d'éluier et de mesurer la radioactivité des catabolites.

L'autoradiographie est également utilisée plutôt pour l'observation de la régularité de la chromatographie que comme méthode de routine.

Le nombre des catabolites et la vitesse de leur élimination déterminés, il reste à établir leur structure chimique, ce qui, dans ces études, constitue la plus grande difficulté. D'une part, il est, à priori, difficile de formuler une hypothèse de transformation du produit administré, et les transformations biochimiques ne suivent pas nécessairement les voies des dégradations de la chimie organique. D'autre part, les méthodes de la chimie organique pour la recherche des fonctions ne peuvent pas être appliquées, à cause des très faibles quantités de catabolites dont nous disposons. Il faut donc recourir aux méthodes physico-chimiques de la spectrométrie dans l'ultraviolet et l'infrarouge. Ces méthodes physico-chimiques, même si l'on applique des techniques « micro », nécessitent des quantités de l'ordre d'une micro-mole pour l'infrarouge, et des quantités bien supérieures pour l'ultraviolet. Ces nécessités nous obligent à mettre en œuvre la chromatographie sur couches minces. Cette chromatographie a l'avantage d'être rapide, mais les séparations sont de moins bonne qualité que celles sur papier. Des quantités dix fois supérieures peuvent être chromatographiées. Le liquide biologique est appliqué non plus en spots circulaires, mais sur une ligne de quelques centimètres. Par auto-radiographie, nous avons constaté des séparations bien meilleures que dans le cas des plaques à spots circulaires. Il n'est pas question, par chromatographie sur couches, d'obtenir, après élution, des produits purs. En réalité, la plaque est séparée en trois ou quatre secteurs et, après élution, une nouvelle chromatographie est nécessaire.

Une première tentative de détermination d'une constante physique, — en l'occurrence le point de fusion, — est appliquée, dans le cas où nous disposons d'une quantité de l'ordre de cinquante microgrammes. Après élution de plusieurs secteurs, une technique de microsublimation a été mise au point. Sous vide poussé, la substance est chauffée et on condense les sublimables sur une lamelle de microscope refroidie, à la température de l'azote liquide. On observe le point de fusion sous microscope à platine chauffante. Cette technique est utilisée pour

confirmer un résultat; elle est aléatoire dans le cas d'un catabolite de nature inconnue, et ceci pour bien des raisons.

La chromatographie en phase gazeuse est évidemment la méthode de choix pour la purification et la préparation des produits issus du catabolisme des médicaments. Les médicaments que nous utilisons, barbituriques, hydantoïne, glyoxaline, etc., donnent des temps de rétention bien reproductibles, qui permettent leur séparation. Ceci est encore valable pour certains de leurs catabolites. Il est intéressant de signaler que le glucuro conjugué — pratiquement toujours présent dans le processus du métabolisme des médicaments — supporte assez bien la chromatographie en phase gazeuse, sans décomposition appréciable. Avec des colonnes d'environ six pieds, d'un huitième de pouce, des quantités de l'ordre d'une dizaine de microgrammes de ces produits sont repérables en utilisant des détecteurs à ionisation de flammes. La nécessité de travailler à des températures relativement élevées peut être cependant néfaste à certains catabolites. Pour être sûr que de tels phénomènes n'interviennent pas, une chromatographie de chacun de ces catabolites doit être faite au préalable. C'est seulement dans ces cas là qu'on peut passer à l'échelle préparative. La chromatographie sur couches nous procure le matériel pour ces essais.

Le cliché suivant (Fig. 2) résume schématiquement la procédure utilisée dans ces types de recherche.

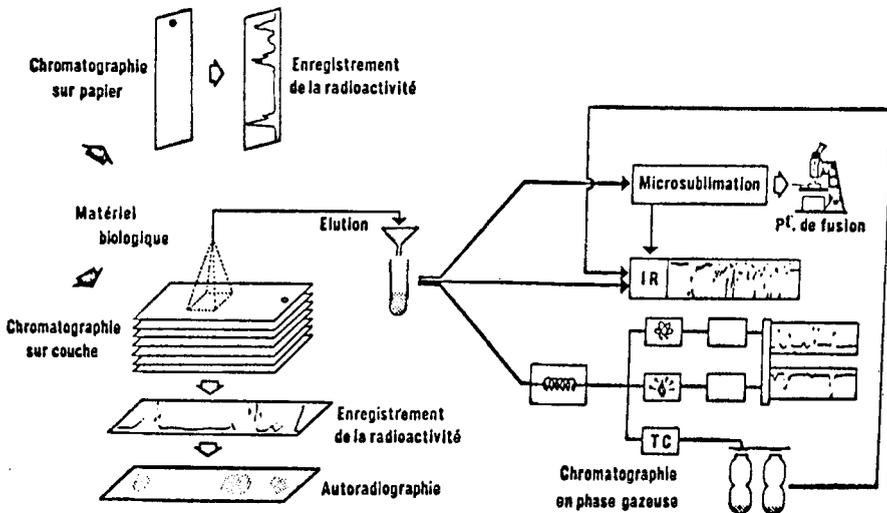


FIG. 2

Un autre avantage que présente la chromatographie en phase gazeuse est la possibilité de l'associer à la spectrométrie infrarouge.

Plusieurs dispositifs sont déjà décrits et des accessoires — livrables par des sociétés spécialisées — permettent d'effectuer un spectre infrarouge, en recueil-

lant le produit directement à la sortie de la colonne. Avec une certaine expérience, des quantités de l'ordre d'un demi-microlitre sont suffisantes pour obtenir un tel spectre (12, 13, 14, 15, 16).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET PERSPECTIVES

a) Un personnel qualifié et entraîné dans les techniques de la micro-analyse peut poursuivre ces études, qui demandent une grande régularité dans le temps. Grâce à cet entraînement et à une organisation rationnelle, l'analyse métabolique à l'aide de traceurs demande quelques semaines, voire quelques mois, ce qui constitue une nécessité impérieuse lorsque ces études doivent se faire systématiquement sur plusieurs séries chimiques.

b) L'équipement d'un tel laboratoire doit être aussi moderne que possible. Il est essentiel d'automatiser au maximum les opérations qui doivent s'y effectuer. Le renouvellement et l'acquisition des appareils les plus perfectionnés conditionnent la rapidité de l'exécution et la sûreté de l'expérimentation.

Nous avons souligné l'importance de la notion du temps dans ces études métaboliques. Toute généralisation nous semble dangereuse, tant qu'elle est basée sur un faible nombre de résultats. En outre, on peut facilement « ignorer » des catabolites, si la radioactivité du produit injecté est trop faible. Il est facile de confondre, de plus, une impureté avec un métabolite. Ces causes d'erreur, ajoutées aux variations générales et individuelles inévitables du sujet utilisé, exigent la répétition des expériences et de la prudence dans les conclusions.

Une fois ces difficultés surmontées, il n'en demeure pas moins que l'emploi des radioisotopes en pharmacologie a permis de découvrir toute une série de nouvelles voies métaboliques. La caractérisation du comportement individuel en fonction de l'espèce, du sexe, etc., a été démontrée. La recherche fondamentale en vue de la compréhension du mécanisme d'action des médicaments se poursuit actuellement grâce à leur utilisation. Ces recherches, faites *in vitro* et *in vivo*, peuvent contribuer à expliquer — sur le plan biochimique — des phénomènes encore peu connus en médecine, tels que l'accoutumance, le terrain pathologique, les phénomènes de tératogénèse, de l'allergie, etc., et à préciser nos connaissances enzymologiques, liées aux réactions cataboliques.

L'industrie pharmaceutique en est consciente. Les nombreux travaux scientifiques, paraissant actuellement, nous prouvent que chaque nouvelle synthèse doit être désormais envisagée sous l'angle métabolique aussi bien que toxicologique. L'époque n'est pas éloignée où les visas nécessaires à la diffusion de tout médicament exigeront une étude métabolique, parallèlement à la définition de ses propriétés pharmacodynamiques.

Les recherches isotopiques appliquées aux substances médicamenteuses ne seront plus alors réservées à quelques laboratoires privilégiés.

BIBLIOGRAPHIE

1. COHEN, Y. — Problèmes de pharmacodynamie abordés à l'aide de radio-éléments, *Actualités pharmacologiques*, 15^e série, pp. 261-262, Masson & C^{ie} (1963).
2. PAOLETTI, R. et POGGI, M. — Applicazioni delle molecole marcate nella ricerca farmacologica, Conférence sur les méthodes de préparation et de conservation des molécules marquées, EUR 1625.e, Euratom, May 1964, pp. 431-451.
3. BOISSIER, J.R. — Quelle doit être la place des études métaboliques au cours de l'expérimentation des médicaments et quelles en sont les limites?, *Thérapie*, **20** : 241-245 (1965).
4. GLASSON, B. — Servitudes et perspectives de la recherche métabolique de quelques substances exogènes douées d'activité pharmacologique, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47** : n° 5, (1965).
5. PICHAT, L. — Quelques aspects de la synthèse chimique des molécules marquées, Conférence sur les méthodes de préparation et de conservation des molécules marquées, EUR 1625.e, Euratom, Bruxelles 1963, 23-54.
6. GLASSON, B., BENAKIS, A. et ERNST, C. — Métabolisme et excrétion comparée de quelques médicaments anticonvulsivants, *Thérapie*, **18** : 1483-1491 (1963).
7. BENAKIS, A. — Discussion Session IV, Preparation and biomedical application of labeled molecules, EUR 220.e, Euratom, Venise, août 1964, 261-262.
8. Compte rendu de la Table ronde des synthéticiens et utilisateurs de molécules marquées en pharmacologie, Genève (octobre 1965), non publié.
9. GLASSON, B. et BENAKIS, A., *Helvetica Physiol. Acta*, **19** : 320-334, (1961).
10. GLASSON, B. — Acquisitions récentes concernant le métabolisme des uréides, *Actualités pharmacologiques*, 15^e série, Masson & C^{ie} éd., 100-137 (1963).
11. CARLOS, G., BELL, J.R. et NEWTON Hayes, F. — Éd., Liquid scintillation counting, Pergamon Press (1958).
12. BURCHFIELD, H.P. et STORRS Eleanor E., *Biochemical Applications of Gas Chromatography*, Academic Press, New York, London (1962).
13. BRAM, E. G. Jr. — The Marriage of infrared and NMR gas chromatography, Du Pont de Nemours. U.S.A.
14. F & M. Scientific Corporation Technical Paper 32, Avodale, Pennsylvania, U.S.A.
15. Wilks Scientific Corporation, South Norwalk, Connecticut, U.S.A.
16. BAUDET, P. et coll. — Techniques nouvelles de microspectrophotométrie IR, *Geln. Chem. Acta*, **47** : 2341 (1964).