

Le métabolisme des xénobiotiques : effets bénéfiques, effets néfastes

Daniel Mansuy

Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, UMR 8601, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

Auteur correspondant : Daniel Mansuy, daniel.mansuy@parisdescartes.fr

Reçu le 17 janvier 2013

Résumé – Les systèmes mis au point par les êtres vivants pour métaboliser les xénobiotiques jouent un rôle clé dans l'adaptation du vivant à son environnement chimique. Les résultats récents concernant les structures des cytochromes P450 de mammifères ont permis de mieux comprendre les bases moléculaires de l'adaptabilité de ces enzymes à des xénobiotiques de structures extrêmement variées. L'action de ces enzymes sur les xénobiotiques a d'autres effets bénéfiques comme la bioactivation de certains médicaments, mais aussi des effets néfastes avec la formation de métabolites agressifs pour le milieu cellulaire, qui sont à la base de nombreuses toxicités.

Mots clés : Cytochromes P450 / adaptation / toxicité / médicaments / bioactivation

Abstract – Metabolism of xenobiotics: beneficial and adverse effects.

The systems developed by living organisms for the metabolism of xenobiotics play a key role in the adaptation of living species to their chemical environment. Recent data about mammalian cytochrome P450 structures have led to a better understanding of the molecular basis for the adaptability of these enzymes to xenobiotics exhibiting highly variable structures. The action of these enzymes on xenobiotics leads to other beneficial effects such as the bioactivation of some drugs, but also to adverse effects with the formation of aggressive metabolites for the cell that are responsible for the appearance of many toxicities.

Key words: Cytochromes P450 / adaptation / toxicity / drugs / bioactivation

Les organismes vivants absorbent journallement un grand nombre de xénobiotiques présents dans leur environnement, comme des médicaments, des insecticides ou des pesticides, des solvants ou des hydrocarbures dérivés du pétrole. Pour s'adapter au « stress chimique » auquel ils sont soumis, ils se sont dotés de systèmes efficaces de métabolisme et d'élimination des xénobiotiques. Il est d'ailleurs frappant de constater que le schéma général de ce métabolisme est globalement le même dans la plupart des espèces vivantes, de l'Homme jusqu'aux plantes. Il fait toujours intervenir deux étapes : une fonctionnalisation du xénobiotique, le plus souvent catalysée par des mono-oxygénases, suivie d'une conjugaison de la



Fig. 1. Les deux étapes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques par les organismes vivants.

fonction chimique introduite dans la première étape (en général une fonction OH) à divers motifs polaires qui rendent les métabolites finaux beaucoup plus hydrosolubles que le xénobiotique de départ et facilement éliminables (par exemple par le rein chez l'Homme) (figure 1) (Testa & Kramer, 2006). Les mono-oxygénases

les plus fréquemment impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques font intervenir des hémoprotéines ubiquitaires chez les êtres vivants, les cytochromes P450 (P450s). Dans le génome humain, 57 gènes codent pour des P450s. Une vingtaine d'entre eux sont en charge du métabolisme des xénobiotiques (Guengerich, 2005). Quand on analyse l'ensemble des données publiées sur le métabolisme des médicaments, on s'aperçoit que trois P450s, les P450s 3A4, 2C9 et 2D6, catalysent l'oxydation de plus de 80 % des médicaments, et que le P450 3A4 (le P450 majeur du foie humain) est impliqué dans l'oxydation de 40 % des médicaments. Toutefois, en dépit de leur très faible spécificité de substrats, ces P450s sont efficaces au plan de leurs activités catalytiques et relativement régio-sélectifs dans l'hydroxylation de leurs substrats.

Ces propriétés paradoxales qui sont à la base de l'adaptation des êtres vivants à leur environnement chimique sont longtemps restées sans explication au niveau moléculaire. Des éléments d'explication de l'adaptabilité de ces enzymes à des composés de structure chimique extrêmement variable ont été apportés récemment grâce à la résolution de toute une série de structures de P450s de mammifères par diffraction aux rayons X. La première structure d'un P450 de mammifère, le P450 2C5 de foie de lapin, n'a été publiée qu'en 2000 (Williams *et al.*, 2000); les premières pour un P450 de mammifère ayant fixé un substrat n'ont été publiées qu'en 2003 (Wester *et al.*, 2003a, 2003b). Ces résultats ont ouvert la voie à la détermination des structures de nombreux autres P450s de mammifères, en particulier à celles des principaux P450s humains responsables du métabolisme des xénobiotiques (Poulos & Johnson, 2005). Ces structures mettent en évidence deux domaines distincts de la protéine :

- un domaine relativement rigide, constitué majoritairement d'hélices α , fortement conservé dans l'ensemble de la famille des P450s, et porteur des éléments majeurs de l'activité catalytique,
- un domaine beaucoup plus flexible et mobile au plan conformationnel, dont la séquence varie le plus d'un P450 à l'autre, et qui contient les principaux éléments de reconnaissance et de fixation des substrats.

Une comparaison des structures du site de fixation des substrats du P450 2C5 sans substrat ou ayant fixé soit un dérivé du sulfaphénazole, soit un médicament, le diclofenac, a mis clairement en évidence un changement très important de la conformation de ce site après fixation d'un substrat (Wester *et al.*, 2003a, 2003b). Ce changement conformationnel se traduit par une compaction du site autour du substrat et conduit à la fermeture du canal d'accès des substrats et du canal d'accès de l'eau ; il prépare le complexe protéine-substrat pour une catalyse d'oxydation efficace. Cette

adaptation du site actif de l'enzyme à la forme et à la structure du substrat est aussi à la base de la régio-sélectivité de son oxydation. L'ensemble des structures de P450s humains responsables du métabolisme des xénobiotiques publiées par la suite a confirmé la grande adaptabilité de leur site de fixation des substrats à des composés de structures très variées. De plus, la taille et la forme de ce site varient beaucoup d'un P450 à l'autre.

Ainsi, quand un xénobiotique pénètre dans un organe comme le foie, il a le choix entre une vingtaine de P450s lui présentant des tailles et des formes de site actif et des séquences d'acides aminés très variées. Il va choisir celui (ou ceux) qui est (sont) le(s) plus adapté(s) à sa structure, et sa fixation dans son (leur) site actif va conduire à un changement de la conformation de ce (ces) site(s) pour favoriser au maximum son oxydation (Mansuy, 2008, 2011) (figure 2).

Le métabolisme des xénobiotiques a donc un effet bénéfique majeur, faciliter l'élimination des substances dont l'accumulation dans l'organisme conduirait à des problèmes de toxicité. Cet effet est à la base de l'adaptation des êtres vivants à leur environnement chimique. Dans le cas de certains médicaments, l'action des P450s peut conduire à un autre type d'effets bénéfiques, leur bioactivation avec formation de métabolites pharmacologiquement actifs. C'est ce qui se passe dans le cas des anti-thrombotiques thiéno-pyridiniques, ticlopidine (Ticlid) et clopidogrel (Plavix), qui ne deviennent actifs sur le plan thérapeutique qu'après transformation métabolique *in vivo* en thiols, résultant d'une ouverture oxydante de leur noyau thiophène (Maffrand, 2012) (figure 3). Cette activation métabolique se fait en deux étapes catalysées par des P450s. La première est une hydroxylation classique du noyau thiophène conduisant à un métabolite primaire de type thiolactone. La seconde aboutit à une ouverture du cycle thiolactone avec formation d'un thiol qui va se fixer de façon covalente à une cystéine du récepteur P2Y12 des plaquettes et conduire à l'inhibition de leur agrégation et à l'effet anti-thrombotique attendu. Curieusement, cette seconde étape, dont le produit final n'est que le composé résultant d'une hydrolyse de la fonction thioester du métabolite thiolactone, nécessite une oxydation avec consommation d'O₂ et de NADPH et l'intervention des P450s. Le mécanisme de cette seconde étape n'a été établi que récemment (Dansette *et al.*, 2009, 2012) (figure 3). Il fait intervenir une S-oxydation, catalysée par les P450s, du métabolite thiolactone et une réaction du carbone de la fonction CO-SO de l'intermédiaire thiolactone sulfoxyde avec H₂O. Ceci conduit à une ouverture du cycle thiolactone avec formation d'un métabolite réactif, l'acide sulfénique du thiol qui est proposé comme responsable de l'effet thérapeutique de la ticlopidine et

Domaine hypervariable
(boucles B-C et F-G par exemple...) en termes
de **séquence et de conformation**

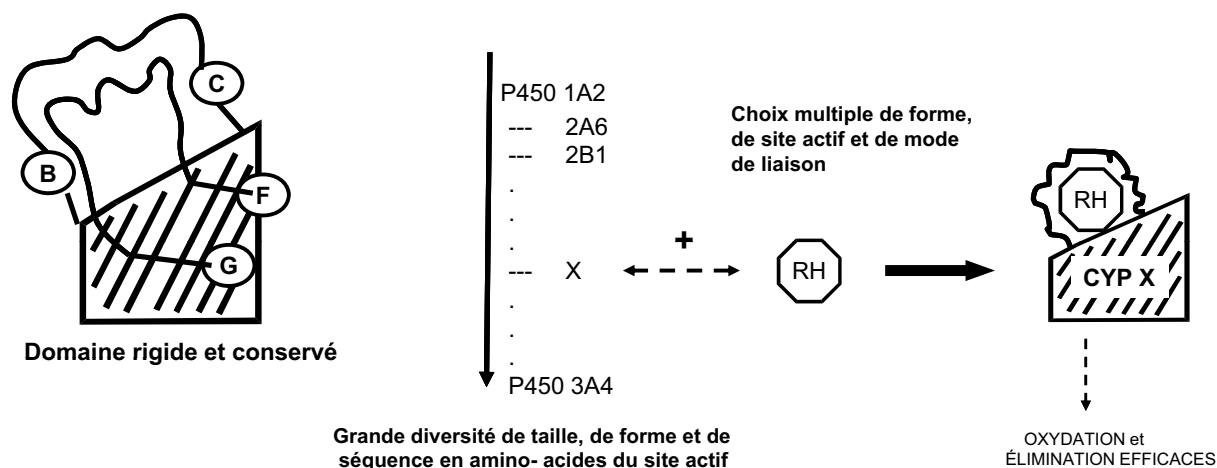


Fig. 2. Schéma illustrant l'adaptabilité du système des P450s pour l'oxydation et l'élimination de xénobiotiques (RH) de structures très variées. Les P450s sont représentés de façon très schématique pour montrer l'existence de 2 domaines et pour illustrer la flexibilité de leur interaction avec ces xénobiotiques.

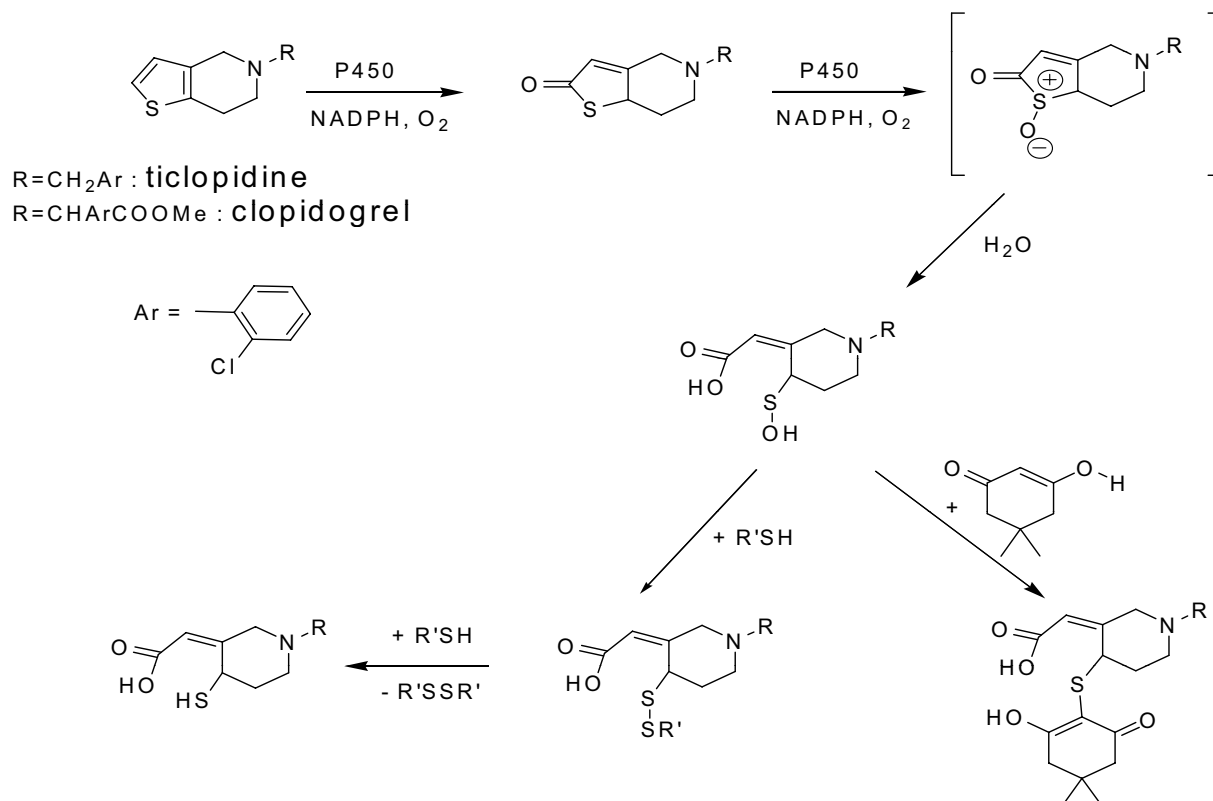


Fig. 3. Bioactivation de la ticlopidine et du clopidogrel impliquant la formation d'un métabolite intermédiaire de type acide sulfénique et du métabolite final de type thiol considéré comme responsable de leur activité thérapeutique. R'SH = glutathion. Ar, qui fait partie de R, est le substituant ortho-chlorophényle indiqué dans la figure.

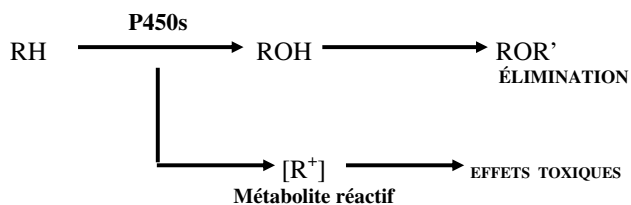


Fig. 4. Rôle bénéfique et rôle néfaste des P450s lors du métabolisme des xénobiotiques.

du clopidogrel. La formation de cet acide sulfénique a été établie par piégeage par un réactif classique des acides sulféniques, le dimédon, et identification de l'adduit obtenu par RMN et spectrométrie de masse. Ce métabolite actif réagit avec les fonctions thiols de la cystéine ou du glutathion avec formation d'un dithioéther. En présence d'un excès de glutathion, ce dithioéther est réduit en thiol correspondant, le métabolite final précédemment décrit et présentant un effet direct sur le récepteur P2Y12 des plaquettes. Compte tenu du mécanisme détaillé de la bioactivation de la ticlopidine et du clopidogrel établi récemment et décrit ci-dessus (figure 3) (Dansette *et al.*, 2009, 2012), on peut aussi envisager que le métabolite responsable de l'effet thérapeutique de ces médicaments soit l'acide sulfénique ou le dithioéther qui en dérive par réaction avec le glutathion (Dansette *et al.*, 2012). Ces deux composés sont en effet des espèces électrophiles capables d'établir une liaison covalente avec une cystéine du récepteur P2Y12 des plaquettes.

Le métabolisme des xénobiotiques n'a toutefois pas que des effets bénéfiques. L'oxydation de certains d'entre eux, en particulier par les P450s, conduit à des métabolites électrophiles capables de réagir de façon covalente avec les sites nucléophiles des protéines et des acides nucléiques. Ceci peut être à l'origine d'effets toxiques variés allant de l'hépatotoxicité à la cancérogénèse (Guengerich, 2008) (figure 4). Par exemple, l'acide tienilique, un médicament diurétique, a été retiré du marché après la survenue d'un certain nombre d'hépatites de type immuno-allergique. Ces effets toxiques ont été reliés à la formation d'un métabolite très électrophile, lors de son oxydation par le P450 2C9 du foie humain, un sulfoxyde de thiophène qui se fixe de façon covalente à une sérine du site actif de ce P450 (Melet *et al.*, 2003). Cette fixation conduit à une inactivation du P450 2C9 (Lopez-Garcia *et al.*, 1994), et est à la base de l'apparition d'anticorps anti-P450 2C9 chez les patients atteints d'une hépatite à l'acide tienilique (Beaune *et al.*, 1987).

En conclusion, il est clair que les systèmes mis au point par les êtres vivants pour métaboliser et faciliter l'élimination des xénobiotiques ont un effet bénéfique essentiel dans l'adaptation du vivant

à son environnement chimique. Les P450s jouent un rôle majeur dans ces réactions de détoxification, grâce à leur adaptabilité à des composés de structures extrêmement diverses. Dans des cas plus rares, ils ont un autre type d'effets bénéfiques, pour la bioactivation de certains médicaments qui sont en fait des « *pro-drugs* ». Le revers de la médaille de l'action bénéfique détoxifiante des P450s qui est basée sur leur capacité à oxyder n'importe quel xénobiotique, c'est de produire, lorsque la structure du xénobiotique s'y prête, des métabolites réactifs électrophiles agressifs pour le milieu cellulaire qui peuvent être à la base de l'apparition d'effets toxiques néfastes. Ces effets néfastes sont indissolublement liés aux caractéristiques des P450s qui sont nécessaires au bon exercice des effets bénéfiques de ces enzymes (figure 4).

Références

- Beaune P., Dansette P.M., Mansuy D., Kiffel L., Finck M., Amar C., Leroux J.P., Homberg J.C., Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P450 that hydroxylates the drug. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1987, 84, 551–555.
- Dansette P.M., Libraire J., Bertho G., Mansuy D., Metabolic activation of thioesters: evidence for the formation of sulfenic acid intermediates in the bioactivation of the antithrombotic prodrugs ticlopidine and clopidogrel. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22, 369–373.
- Dansette P.M., Rosi J., Bertho G., Mansuy D., Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25, 348–356.
- Guengerich F.P., Human cytochrome P450 enzymes. In Ortiz de Montellano (Ed.) *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, pp. 377–463.
- Guengerich F.P., Peter F., Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 70–83.
- Lopez-Garcia M.P., Dansette P., Mansuy D., Thiophene derivatives as new mechanism-based inhibitors of cytochromes P450: inactivation of yeast-expressed human liver P450 2C9 by tienilic acid. *Biochemistry*, 1994, 33, 166–175.
- Maffrand J.P., The story of clopidogrel and its predecessor, ticlopidine: could these major anti-platelet and anti-thrombotic drugs be discovered and developed today? *CR Chimie*, 2012, 15, 737–743.
- Mansuy D., Biocatalysis and substrate chemodiversity: adaptation of living organisms to their chemical environment. *Catalysis Today*, 2008, 138, 2–8.
- Mansuy D., Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: adaptation of aerobic organisms

- to their chemical environment and new mechanisms of prodrug bioactivation. *Ann Pharm Fr*, 2011, 69, 62–69.
- Melet A., Jean P., Lopez-Garcia M.P., Marques-Soares C., Jaouen M., Dansette P.M., Sari M.A., Mansuy D., Substrate specificity of human P450 2C9: importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac, sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409, 80–91.
- Poulos T.L., Johnson E.F., Structure of cytochrome P450 enzymes. In Ortiz de Montellano (Ed.) *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, pp. 87–111.
- Testa B., Kramer S.D., The biochemistry of drug metabolism, an introduction. Part 1: principles and overview. *Chem Biodiv*, 2006, 3, 1053–1101.
- Wester M.R., Johnson E.F., Marques-Soares C., Dansette P.M., Mansuy D., Stout C.D., The structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry*, 2003a, 42, 6370–6379.
- Wester M.R., Johnson E.F., Marques-Soares C., Dansette P.M., Mansuy D., Stout C.D., Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 angström resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding. *Biochemistry*, 2003b, 42, 9335–9345.
- Williams P.A., Cosme J., Sridhar V., Johnson E.F., McRee D.E., The crystallographic structure of a mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptation for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*, 2000, 5, 121–132.