

Réduction radiolytique du nifurtimox par les radicaux libres $\text{CO}_2^{\cdot-}$

A Filali-Mouhim¹, B Champion¹, D Jore¹, B Hickel², C Ferradini¹

¹Laboratoire de Chimie physique, CNRS URA 400, Université René-Descartes,
45, rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, ²CEA-Centre d'Études Nucléaires/Saclay,
DSM-DRECAM-SCM, CNRS URA 331, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

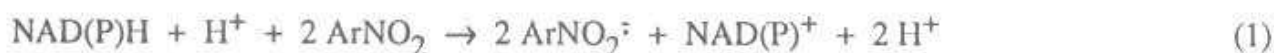
(Reçu le 25 janvier 1991; accepté le 15 avril 1991)

RÉSUMÉ - Le Nifurtimox est un médicament antiparasitaire couramment utilisé dans le traitement de la maladie de Chagas. Son action thérapeutique semble mettre en jeu sa réduction monoélectronique conduisant à un radical réduit susceptible de réagir avec l'oxygène pour générer l'ion superoxyde cytotoxique. Les mécanismes d'oxydo-réduction impliqués dans cette action ont été étudiés par les méthodes de la radiolyse continue et pulsée. Ce travail est consacré aux échanges monoélectroniques observés en l'absence d'air, les radicaux réducteurs choisis étant les ions $\text{CO}_2^{\cdot-}$.

ABSTRACT - Nifurtimox is an antiparasitic drug often used in the treatment of the Chagas disease. Its therapeutic action seems to involve its monoelectronic reduction leading to a reduced radical capable of providing superoxide anion by reaction with oxygen. The oxidation reduction mechanisms involved in this action have been studied by steady state and pulse radiolysis methods. This study is devoted to the monoelectronic exchanges observed in the absence of air, the reducing radicals being the $\text{CO}_2^{\cdot-}$ anions.

INTRODUCTION

Le Nifurtimox [4-(5 nitrofurfurylidène amino)-3 méthylmorpholine-1,1 dioxyde], ArNO_2 (voir Fig. 1), est le médicament le plus utilisé dans le traitement de la maladie de Chagas [1]. Il semble que son action soit liée à la formation du radical anion $\text{ArNO}_2^{\cdot-}$ [2-5] selon la réaction globale (1):



En l'absence d'oxygène, $\text{ArNO}_2^{\cdot-}$ pourrait conduire à la formation de l'hydroxylamine correspondante ArNHOH qui serait susceptible de présenter des propriétés cytotoxiques [6]. En présence d'oxygène, la réaction (2) conduirait à la formation d'ions superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui seraient alors responsables de l'action de ce médicament [4,7-10].



L'étude des mécanismes d'échange monoélectronique du Nifurtimox a été effectuée par les

méthodes de la radiolyse continue et de la radiolyse pulsée. Dans un premier temps, cette étude a été menée en l'absence d'air, afin de caractériser quantitativement la formation et le devenir du radical réduit ArNO_2^- dans ces conditions.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le Nifurtimox nous a été fourni par les Laboratoires Bayer. NaH_2PO_4 et HCOONa sont respectivement des produits Prolabo et Merck de qualité "pour analyse". L'eau utilisée est ultrapurifiée par un système Millipore; sa pureté est contrôlée par mesure de résistivité ($1/\rho = 0,054$ Siemens). Toute la verrerie utilisée pour les irradiations est chauffée à 400°C pendant 4 heures après lavage.

Les irradiations γ ont été effectuées avec une source de ^{60}Co . La dosimétrie est déterminée par la méthode de Fricke [radiooxydation d'une solution aérée de sulfate ferreux, $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, en présence d'acide sulfurique, $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$, avec $\lambda_{\text{max}}(\text{Fe}^{3+}) = 304 \text{ nm}$, $\epsilon_{304} = 2204 \text{ mol}^{-1}.\text{l.cm}^{-1}$, $G(\text{Fe}^{3+}) = 15,6 \text{ molec}/100 \text{ eV}$]. Les doses sont délivrées avec une intensité égale à $1,2 \times 10^{18} \text{ eV.cm}^{-3}$.

Les expériences de radiolyse pulsée ont été effectuées avec le Febetron 707 (1,7 MeV) du CEN Saclay [11], qui délivre des impulsions d'électrons d'une durée de 16 ns à mi-hauteur. La dose moyenne par impulsion est de 23 Gy. La valeur des doses délivrées est mesurée par dosimétrie au thiocyanate [oxydation des ions SCN^- par les radicaux $\text{OH}^\cdot$ en solution aqueuse à $\text{pH} = 7$ et saturée de N_2O , avec $\lambda_{\text{max}}(\text{SCN})_2^- = 472 \text{ nm}$, $\epsilon_{472} = 7,6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}.\text{l.cm}^{-1}$, $G(\text{SCN})_2^- = 5,5 \text{ molec}/100 \text{ eV}$]. Le trajet optique est de 2,5 cm.

Les dosages des solutions de ArNO_2 sont effectués avec un spectrophotomètre Cary 210, avec un trajet optique de 1 cm. Nous avons vérifié que la loi de Beer est suivie jusqu'à une concentration $[\text{ArNO}_2]_0$ égale à $8,5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$: $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$, $\epsilon_{400} = 1,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{l.cm}^{-1}$ (figure 1). La détermination de structure du produit final a été rendue possible en utilisant un spectromètre Bruker WD 250 pour l'analyse RMN du proton, un appareil Nermag R 10-10 C pour la spectrométrie de masse et un spectromètre Perkin-Elmer 783 pour l'analyse infra-rouge.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Radiolyse pulsée

Afin de caractériser quantitativement la formation et le devenir de l'espèce transitoire obtenue par réduction du Nifurtimox par les radicaux libres $\text{CO}_2^\cdot$, en absence d'oxygène, des solutions de ArNO_2 ont été irradiées à $\text{pH} = 7$ sous atmosphère de N_2O avec une dose de 23 Gy ($[\text{ArNO}_2] = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, $[\text{HCOONa}] = 8 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$, [tampon phosphate] = $6 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$). La figure 2 montre le spectre d'absorption différentiel obtenu 40 μs après l'impulsion (spectre A). Ce spectre présente un maximum à $\lambda = 440 \text{ nm}$. L'encart de cette figure montre la densité optique différentielle portée en fonction du temps pour $\lambda = 405 \text{ nm}$ (courbe a) et $\lambda = 440 \text{ nm}$ (courbe b); ces courbes représentent la formation de l'espèce réduite ArNO_2^- . La figure 3 montre l'évolution de

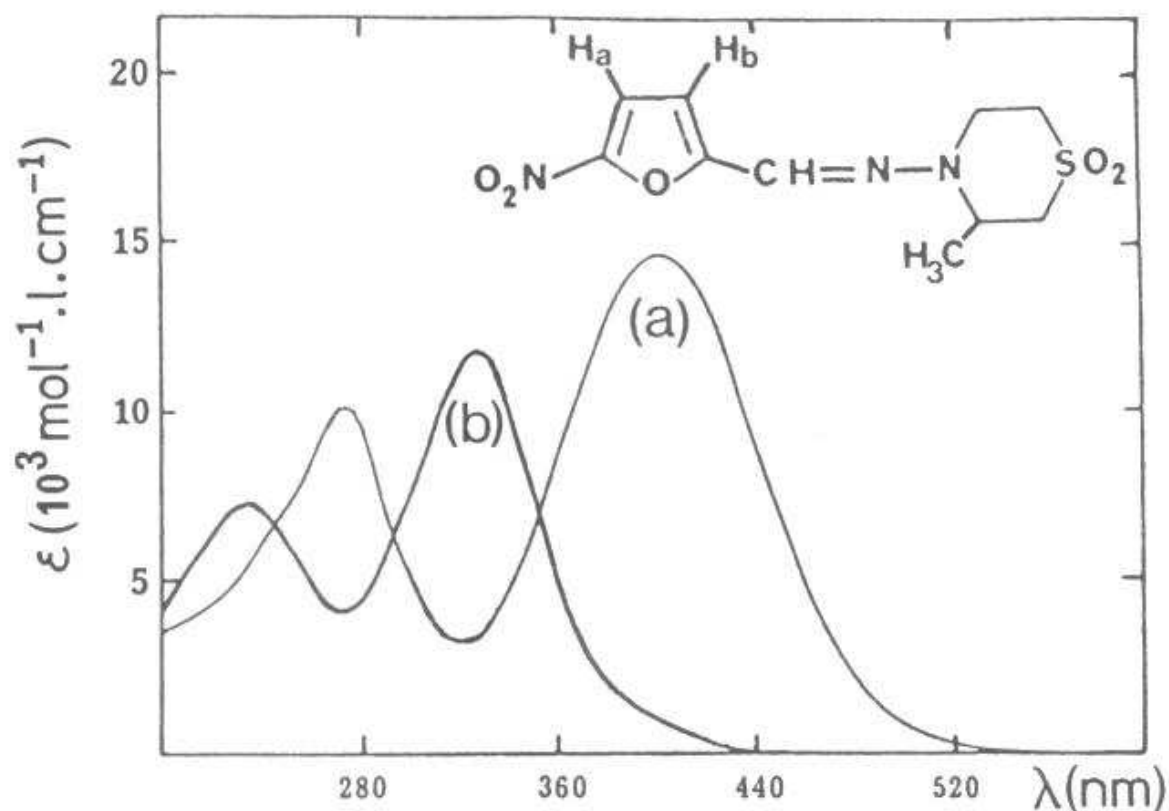


Figure 1 - Structure de ArNO₂ et spectres d'absorption de ArNO₂ (a) et de P (b)

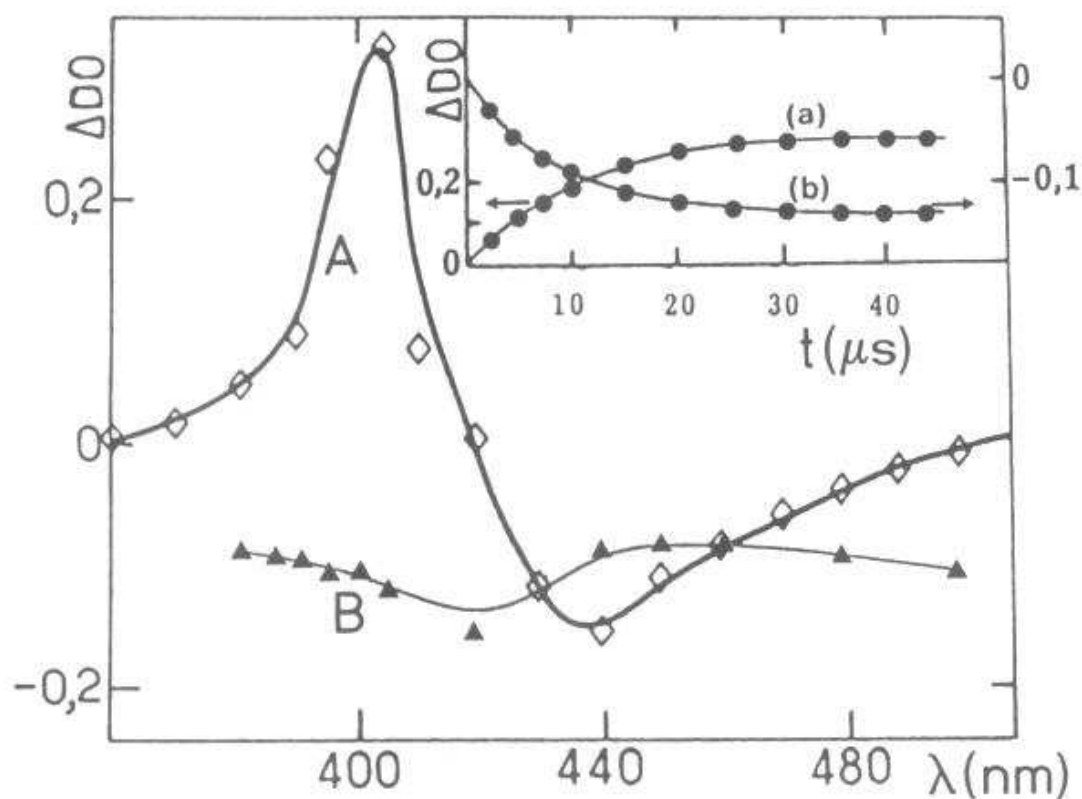


Figure 2 - Radiolyse pulsée, spectres d'absorption différentiels obtenus à $t = 40 \mu\text{s}$ (A) et $t = 50 \text{ s}$ (B) (dose = 23 Gy)
Encart: ΔDO portée en fonction de t pour $\lambda = 405$ (a) et 440 nm (b), points expérimentaux et courbes calculées

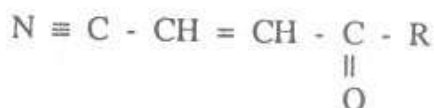
cette espèce à 3 longueurs d'onde différentes: $\lambda = 380, 390$ et 400 nm. On peut observer que cette évolution, qui est terminée en 50 s, suit une loi cinétique de second ordre. Le spectre d'absorption différentiel du produit final obtenu à $t = 50$ s est présenté figure 2, spectre B.

Radiolyse continue

Des solutions aqueuses de Nifurtimox de concentration initiale comprise entre 7×10^{-6} et $8,6 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ont été irradiées en présence de N_2O à $\text{pH} = 7$ ($[\text{HCOONa}] = 8 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$, [tampon phosphate] = $6 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$). La figure 4 montre à titre d'exemple l'évolution des spectres d'absorption différentiels obtenus lors de l'irradiation de solutions de concentration initiale $[\text{ArNO}_2]_0 = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ avec des doses variant de $0,09$ à $0,47 \times 10^{18} \text{ eV.cm}^{-3}$. On peut observer que l'absorption à $\lambda = 406$ nm décroît en fonction de la dose au profit d'une absorption nouvelle à $\lambda = 330$ nm. Les points isobestiques indiquent que ArNO_2 est transformé en un produit unique P. Des résultats analogues ont été obtenus pour toutes les concentrations choisies dans la gamme ci-dessus. L'encart de la figure 4 indique que la densité optique différentielle ΔDO_{406} varie linéairement en fonction de la dose. La pente de cette droite permet le calcul du produit $G(-\text{ArNO}_2) \times \Delta\epsilon_{406}$ qui est constant et égal à $2,1 \times 10^{-3}$.

Détermination de la structure de P

Le produit P a pu être isolé et caractérisé après séparation par CLHP (colonne semi-préparative ODS C 18, phase greffée, éluant: méthanol/eau avec 50 à 100% de méthanol en volume; temps de rétention de P: 11 minutes) d'une solution de ArNO_2 de concentration $[\text{ArNO}_2] = 7 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ irradiée avec une dose de $1,86 \times 10^{18} \text{ eV.cm}^{-3}$. Le spectre de masse de P (impact électronique) indique que ce dernier possède une masse molaire de 255. Son spectre infra-rouge présente deux signaux à 2250 et 1660 cm^{-1} qui indiquent respectivement la présence d'une fonction $\text{C} \equiv \text{N}$ et d'une cétone $\alpha - \beta$ éthylénique. Les spectres RMN (^1H) de ArNO_2 et de P montrent que les déplacements chimiques des protons éthyléniques H_a et H_b de ArNO_2 ($\delta = 7,35$ et $6,75$ ppm) deviennent pour P: $7,57$ et $6,82$ ppm (les signaux correspondant aux protons du groupement R sont inchangés). La constante de couplage $J_{\text{H}_a-\text{H}_b}$ égale à 11 Hz est caractéristique de deux protons éthyléniques en position *cis*. L'ensemble de ces résultats suggère pour P la structure suivante:



($M = 255$ peut en effet traduire la perte d'une molécule d'eau de l'hydroxylamine ArNHOH).

Le spectre d'absorption de P présente deux maxima à 245 et 330 nm. Le coefficient d'extinction molaire ϵ_{330} a pu être déterminé; il est égal à $1,2 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{l.cm}^{-1}$ (figure 1).

DISCUSSION

Il est bien connu que la radiolyse de solutions aqueuses contenant du formiate de sodium et saturées de N_2O conduit à la formation de radicaux libres $\text{CO}_2^{\cdot-}$ avec un rendement égal à

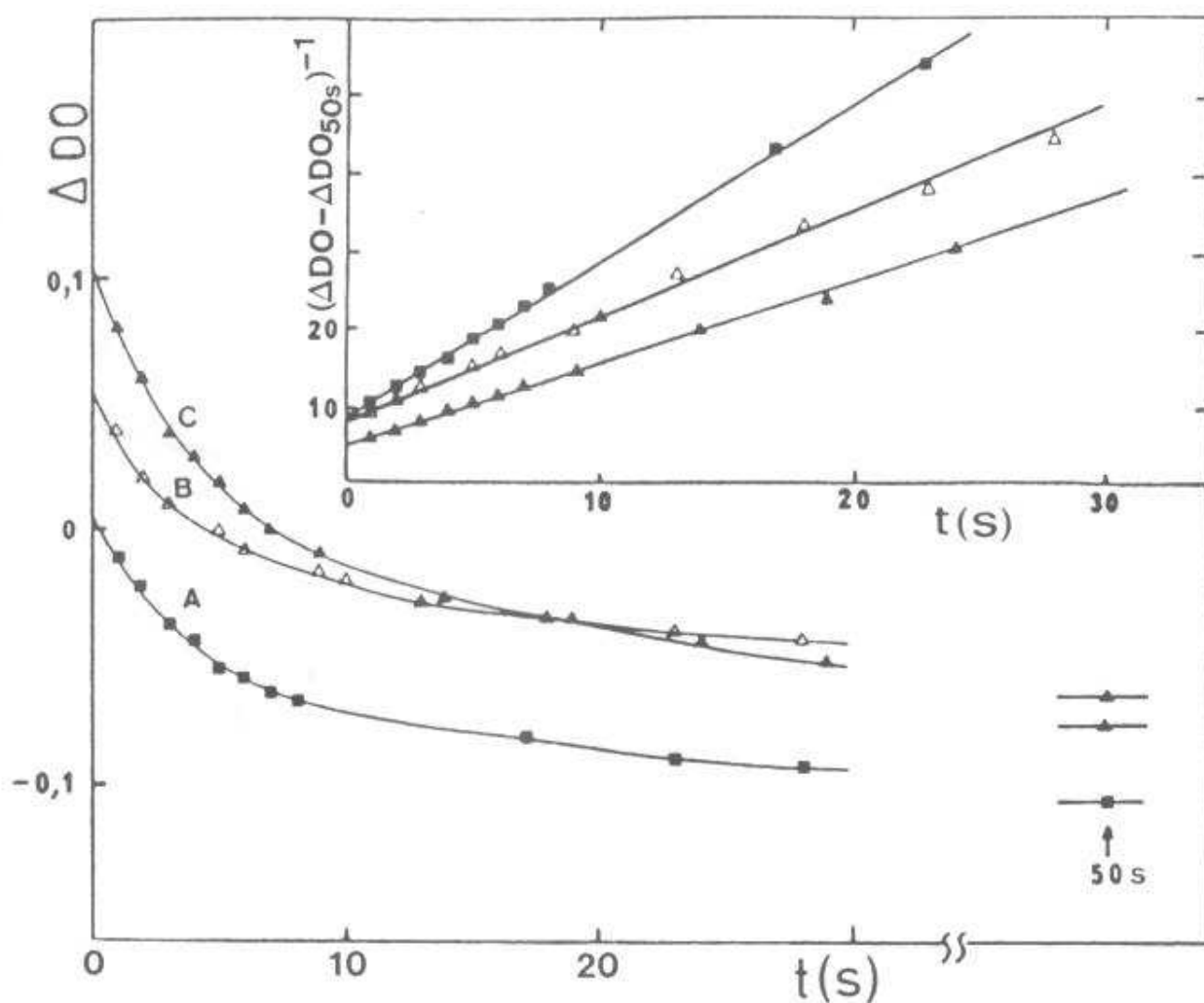
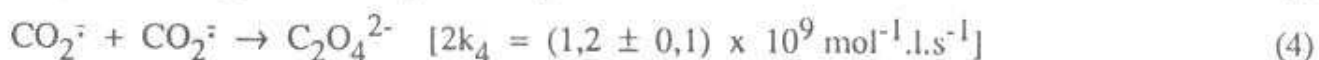


Figure 3 - Évolution de $\text{ArNO}_2^\cdot$ observée à $\lambda = 380$ (A), 390 (B) et 400 nm (C) (doses = 33 , 17 et 18 Gy respectivement).
Encart: $(\Delta\text{DO} - \Delta\text{DO}_{50\text{ s}})^{-1}$ porté en fonction du temps.

6 molec/100 eV.

Les résultats de radiolyse pulsée montrent que les radicaux $\text{CO}_2^\cdot$ réduisent ArNO_2 en un radical $\text{ArNO}_2^\cdot$ dont le spectre d'absorption présente un maximum à 405 nm. Les conditions expérimentales choisies ($[\text{ArNO}_2] = 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, dose = 23 Gy, ce qui conduit à une concentration initiale en radicaux $\text{CO}_2^\cdot$ égale à $4,4 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$), ne correspondent pas à des conditions de pseudo premier ordre. De ce fait, la constante de vitesse de formation de $\text{ArNO}_2^\cdot$ a été calculée en tenant compte des deux réactions concurrentes suivantes:



La valeur $k_3 = (2,7 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ mol}^{-1}.\text{l.s}^{-1}$ a donné le meilleur accord avec les résultats expérimentaux (voir figure 2).

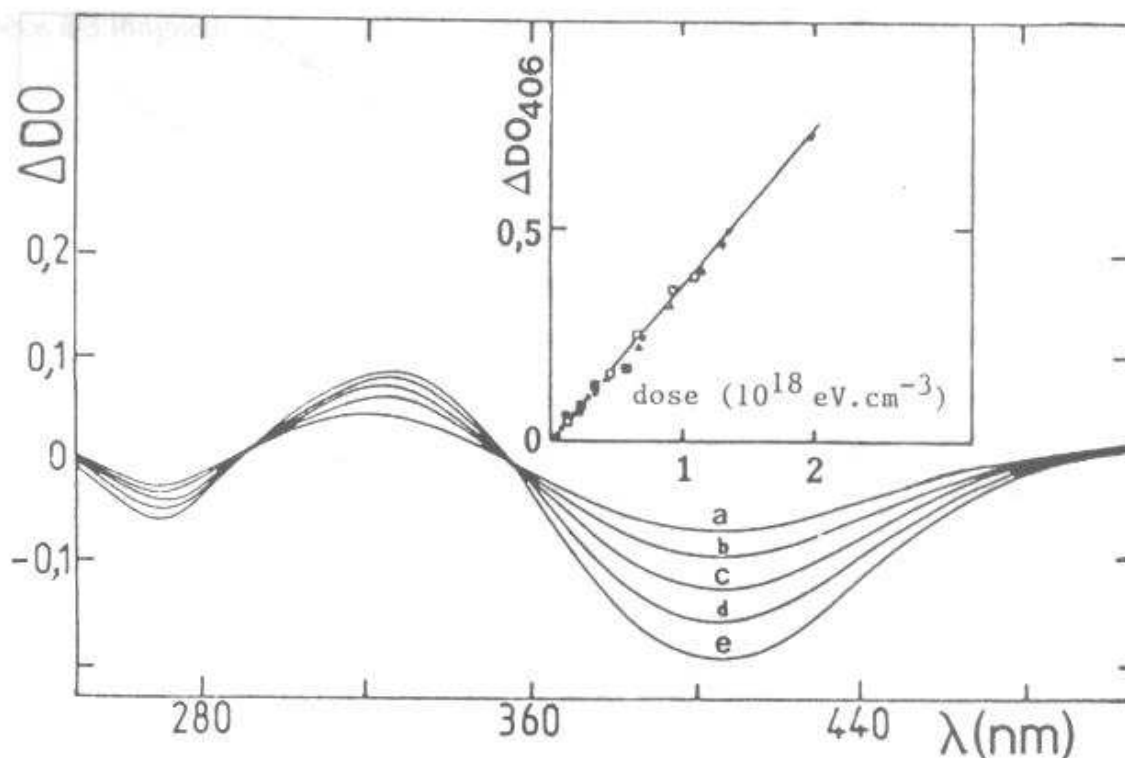
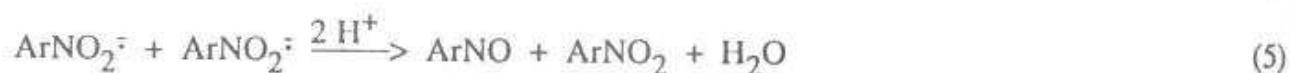
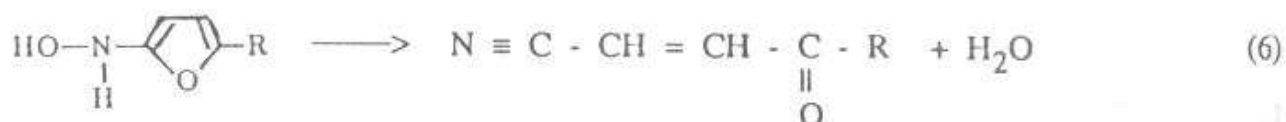


Figure 4 - Radiolyse continue, spectres d'absorption différentiels de solutions de ArNO_2 irradiées avec des doses égales à: 0,9 (a), 2 (b), 3 (c), 4,1 (d) et 4,7 $\times 10^{17} \text{ eV.cm}^{-3}$ (e).
Encart: ΔDO_{406} portée en fonction de la dose pour toutes les concentrations testées.

Le radical anion ArNO_2^- disparaît selon une cinétique de deuxième ordre (voir figure 3). La pente des droites $(\Delta\text{DO} - \Delta\text{DO}_{50\text{ s}})^{-1}$ en fonction du temps permet le calcul de la constante de vitesse de la réaction (5): $k_5 = 3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{l.s}^{-1}$.



Les résultats obtenus par radiolyse γ indiquent que les irradiations de ArNO_2 conduisent à la formation d'un produit P correspondant à une réduction à 4 électrons de ArNO_2 . Il semble donc que, dans les conditions de la radiolyse γ , le composé ArNO subisse aisément une réduction par deux équivalents d'électrons conduisant à l'hydroxylamine ArNHOH correspondante. P pourrait alors être obtenu par ouverture du cycle furannique de ArNHOH selon la réaction (6).



En conclusion, ce travail montre qu'en l'absence d'oxygène le Nifurtimox est réduit par les radicaux $\text{CO}_2^{\cdot -}$ et conduit à la formation de $\text{ArNO}_2^{\cdot -}$ [$k = (2,7 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$]. Ce dernier évolue selon une cinétique de deuxième ordre pour générer le composé ArNO correspondant ($k = 3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$). ArNO , observé par radiolyse pulsée, est réduit dans les conditions de la radiolyse γ en un dérivé de l'hydroxylamine ArNHOH , espèce réduite suggérée en tant qu'agent cytotoxique en l'absence d'oxygène.

RÉFÉRENCES

- [1] - H. Van den Bossche - *Nature*, 1978, 273, 626.
- [2] - R.Docampo, R.P.Mason, C.Mottley et R.P.A.Muniz - *J.Biol.Chem.*, 1981, 256, 10930.
- [3] - S.N.J.Moreno, R.P.Mason et R.Docampo - *J.Biol.Chem.*, 1984, 259, 6298.
- [4] - R.Docampo et A.O.M.Stoppani - *Arch.Biochem.Biophys.*, 1979, 197, 317.
- [5] - R.Docampo, S.N.J.Moreno, A.O.M.Stoppani, W.Leon, F.S.Cruz, F.Villalta et R.F.A.Muniz - *Biochem.Pharmacol.*, 1981, 30, 1947.
- [6] - G.F.Whitmore et A.J.Varghese - *Biochem.Pharmacol.*, 1986 35, 97.
- [7] - R.Docampo, S.N.J.Moreno et A.O.M.Stoppani - *Arch.Biochem.Biophys.*, 1981, 207, 316.
- [8] - R.P.Mason et J.L.Holtzman - *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1975, 67, 1267.
- [9] - P.Wardman et E.D.Clarke - *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1976, 69, 942.
- [10] - P.Wardman - *Environ. Health Persp.*, 1985, 64, 309.
- [11] - B.Lesigne et R.Sauneuf - *Rev.Sci.Instrum.*, 1976, 47, 1063.