

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1997



106 027648 1

THESE N°

327

ETUDE DE L'EFFET COMPLEXANT DU TAMOXIFENE.
INFLUENCE SUR L'HORMONOGENESE THYROIDIENNE.

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 1 octobre 1997

PAR

Jacques NADAUD

Né le 2 avril 1972 à La Rochefoucauld (Charente)



EXAMINATEURS DE LA THESE

M. LAGORCE Jean François.....- Président

Melle CLEDAT Dominique.....- Juge

Melle BEYSSEN Marie Laure.....- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

<u>DOYEN DE LA FACULTE :</u>	Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
<u>ASSESEURS :</u>	Monsieur le Professeur HABRIOUX Gerard Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences
<u>PROFESSEURS :</u>	
BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BERNARD Michel	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE et MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE et CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A mes parents,

Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de
mes études.

Que ce travail soit pour eux le témoignage et la conclusion
de tous leurs efforts.

A mon frère, Roland.

A mon neveu, Romaric.

A la mémoire de mes grands-parents.

A tous mes amis.

A notre maître de thèse,

Monsieur Jean-François Lagorce

Maître de conférences, service de Chimie Organique, habilité à diriger des recherches.

Vous m'avez confié la réalisation de cette recherche et accepté la présidence de cette thèse.

Vos conseils et vos connaissances ont été pour moi, le guide de mon travail.

Vos qualités humaines et votre sympathie resteront un exemple.

Nous vous exprimons nos sincères remerciements et toute notre gratitude.

A nos juges,

Mademoiselle Dominique CLEDAT

Maître de conférences, service de Chimie Analytique.

Votre passion et vos connaissances ont été pour la réalisation de cette thèse une aide incontournable.

Votre accueil et votre disponibilité nous ont beaucoup touché.

Vous avez accepté de juger ce travail.

Soyez en remerciée.

Mademoiselle Marie-Laure BEYSSEN

Docteur en Pharmacie.

Ton soutien et tes encouragements tout au long de ce travail m'ont été précieux.

Avec toute mon amitié et ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

A Mademoiselle Frédérique Martin,
pour ses encouragements et sa gentillesse.

A Madame Frédérique Claude,
pour votre accueil et vos judicieux conseils.

INDEX

I. GENERALITES

II. TAMOXIFENE

II.1. Historique

II.2. Synthèse de la molécule

II.3. Pharmacologie

II.4. Effets secondaires

III. LA THYROIDE

III.1. Physiologie

III.1.1. Follicule thyroïdien

III.1.2. Synthèse des hormones thyroïdiennes

III.1.3. Mécanisme de synthèse des T3 et T4

III.2. Pathologies thyroïdiennes

III.2.1. Hyperthyroïdies

III.2.2. Hypothyroïdies

IV. PRESENTATION DES MOLECULES ETUDIEES

IV.1. Présentation

IV.2. Synthèse du diméthylphénylaminoéthanol

IV.2.1 Mode opératoire

IV.2.2 Contrôle du produit synthétisé

IV.2.2.1 Spectrométrie par
résonance magnétique

IV.2.2.2 Spectrométrie infrarouge

IV.2.2.3 Conclusion

V. MODELISATION MOLECULAIRE :

V.1 Principe de la modélisation moléculaire

V.2 Modélisation des complexes par transfert de charge

V.2.1 Théorie de la formation des complexes par transfert de charge

V.2.2 Méthodes

V.2.3 Résultats

V.2.4 Conclusion

VI. ETUDE IN VITRO

VI.1. Présentation

VI.2. Spectrophotométrie

VI.2.1 Préparation des solutions

VI.2.2. Spectroscopie visible

VI.2.3. Spectroscopie UV

VI.2.4. Résultats

VI.2.4.1. Tamoxifène

VI.2.4.2. Diméthyléthanolamine

VI.2.4.3. Diméthylphényléthanolamine

VI.2.4.4. Méthimazole

VI.2.5. Conclusion

VI.3. Peroxydase

VI.3.1. Principe

VI.3.2. Solutions

VI.3.3. Résultats

VI.3.4. Conclusion

VII. ETUDE IN VIVO

VII.1. Présentation

VII.2. Résultats

VII.2.1. Evolution pondérale

VII.2.2. Evolution pondérale de la thyroïde

VII.2.3. Dosage des T3 et T4

VII.2.4. Etude histologique de la glande

VII.3. Conclusion de l'étude in vivo

VIII CONCLUSION GENERALE

IX. BIBLIOGRAPHIE

I. GENERALITES

Le tamoxifène est une molécule traditionnellement utilisée dans le traitement des cancers du seins hormonaux dépendants. Le cancer du sein représente actuellement un véritable problème de santé publique ; c'est de loin la localisation cancéreuse la plus fréquente chez les femmes dans les pays industrialisés. En 1995, le nombre de nouveaux cas était estimé à 21500.

Le tamoxifène de part sa formule chimique, nous est apparu comme une molécule capable de complexer l'iode par transfert de charge. Cette propriété pourrait être à l'origine de troubles de la fonction thyroïdienne chez la femme.

Cette étude a pour but de vérifier une éventuelle corrélation entre l'utilisation de cette molécule et des troubles thyroïdiens.

Nous avons recherché si le tamoxifène avait la capacité de complexer l'iode moléculaire in vitro puis son influence in vivo. Nous avons également essayé de mettre en évidence le site complexant de la molécule.

Cette recherche a été basée sur trois points :

- une étude conformationnelle de la structure de la molécule et une recherche théorique par modélisation moléculaire de sites pouvant complexer l'iode.
- une étude in vitro mettant en évidence les résultats obtenus par modélisation.
- une étude in vivo chez le rat.

II. LE TAMOXIFENE

II. LE TAMOXIFENE :

II.1 Historique :

La découverte de l'activité du stilbéne et du triphényléthylène comme agents antioestrogéniques chez la souris ainsi que la relation structure - activité ont permis de développer des recherches sur des molécules avec un plus fort potentiel antioestrogénique. Ceci a permis d'aboutir à la découverte du diéthylstilbestrol mais également de nombreuses autres molécules.

Ces recherches à partir de 1958 , ont permis de mettre à jour des molécules pouvant intervenir dans le traitement de la stérilité, en particulier avec la découverte du clomifène. Cette molécule fut une des premières d'une série de composés incluant le tamoxifène qui fut donc dans un premier temps synthétisé et testé comme médicament traitant les stérilités.

Les antioestrogènes non stéroïdiens ont connu un déclin d'intérêt dans les traitements contraceptifs par voie orale , mais ont été étudiés dans le traitement du cancer du sein chez la femme.

Le rôle ovarien dans ce cancer fut mis en évidence par Beatson en 1896 après avoir observé une rémission de certains cancers du sein après ovariectomie. A partir de cette étude, pendant les années soixante de nouvelles recherches ont permis d'établir une relation entre ce type de cancer et une hormone : l'oestrogène. En 1962 ;

Jensen et Jacobson mettent en évidence des récepteurs oestrogéniques sur les cellules cancéreuses. L'ablation chirurgicale des ovaires présente des risques non négligeables et une morbidité élevée ce qui a conduit à l'utilisation de drogues médicales ayant des propriétés antagonistes spécifiques vis à vis de l'oestrogène. De nombreuses molécules furent testées en phase I et II mais une seule présentait un intérêt : le tamoxifène (Novaldex®). Cette étude fut réalisée en 1976 par Legha et Carter.

II.2 Synthèse de la molécule :

Tamoxifène, ICI 46,474 est le (Z)-2-[4-(1,2-diphénylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-diméthyléthanamine. On trouve cette molécule sous forme de sels de citrate dans les spécialités commercialisées.

Caractéristiques physico-chimiques :

Le tamoxifène possède un poids moléculaire de 563.6g/mol. Le sel de citrate se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche fine et sans odeur, assez soluble dans l'eau ; soluble dans l'éthanol, le méthanol et l'acétone. La poudre est stable pendant cinq ans si elle est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité. C'est un produit très hygroscopique, il est instable si il est exposé aux rayons UV en particulier quand il est en solution.

Synthèse(1) :

La synthèse du tamoxifène s'effectue à partir de l'anisole et de l'acide (4-bromophényl)-acétique grâce à une réaction d'acylation de Friedel-Crafts ; ceci aboutit à la

formation d'une cétone. On réalise sur cette molécule l'addition d'une molécule de diméthylphénylaminoéthanol grâce à un organomagnésien. On effectue ensuite à partir du composé obtenu des substitutions afin d'obtenir le tamoxifène.

Cette synthèse aboutit à l'obtention de racémiques. Il faudra ensuite séparer ces deux isomères par des méthodes physiques ; en effet la forme E ou cis ne possède pas d'activité antioestrogénique connue.

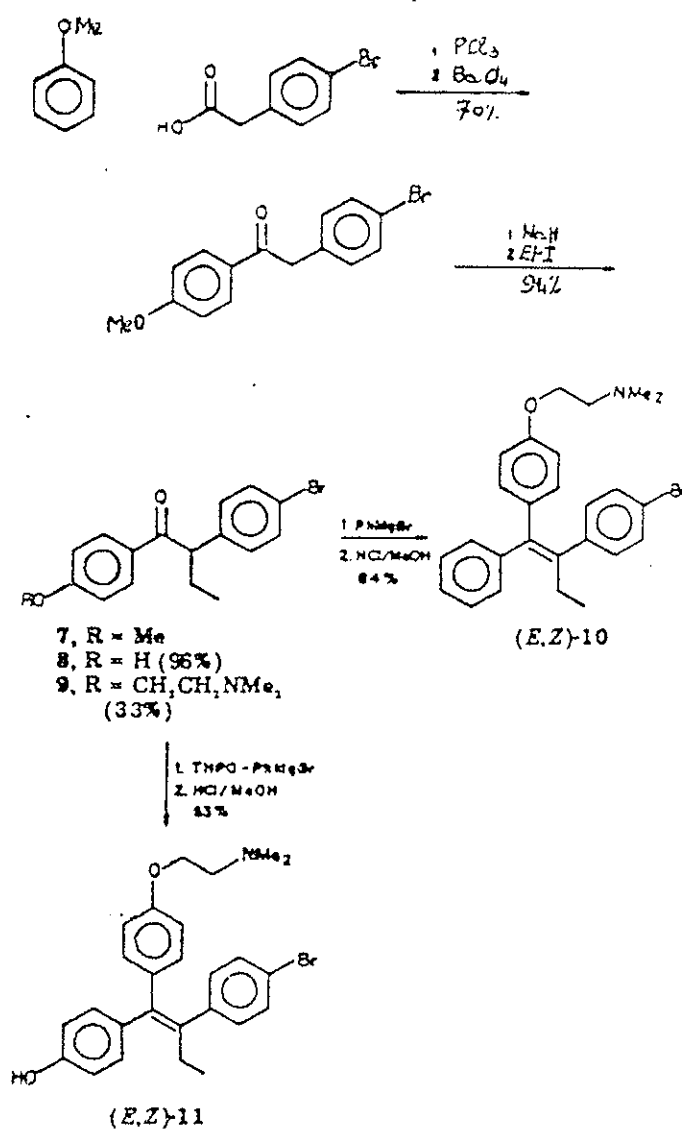


Schéma de synthèse de tamoxifène

II.3 Pharmacologie(2) :

Le tamoxifène (Nolvadex©, Tamofène©, Kessar©, Oncotam©) est une drogue présentée sous la forme de comprimés à deux dosages (10 et 20 mg), utilisé par voie orale, qui interfère avec l'activité de l'oestrogène. Il est utilisé pour le traitement des cancers du sein précoces ou avancés. Il est largement utilisé depuis le début des années 70.

Cet antioestrogène non stéroïdien de synthèse dérivé du diéthylstilbestrol possède une action antagoniste partielle. Il va agir sur tous les tissus dotés de récepteurs oestrogéniques et en particulier les organes génitaux. L'utilisation de ce médicament a montré une efficacité avec une diminution significative des rechutes locales et contralatérales notamment chez les femmes traitées pendant une période au moins égale à un an. La survie des patientes sous tamoxifène est supérieure à celle des femmes non traitées.

Certaines études ont mis en évidence que le tamoxifène avait les mêmes effets bénéfiques qu'une thérapie hormonale substitutive en post ménopause ; il évite l'élévation du cholestérol et diminue les risques de décalcification.

La durée du traitement par tamoxifène chez la femme ayant développé un cancer du sein sera variable selon la réponse au traitement ; en général la prescription est de 2 à 5 ans avec une prise quotidienne ; les effets de cette molécule pour une durée supérieure à 5 ans n'a pas permis d'obtenir d'autres effets bénéfiques.

Chez la femme le pic maximal de la concentration en principe actif est obtenu 4 à 7 heures après une prise unique. Le produit possède une demi-vie de 7 jours(3).

On retrouve 3 métabolites majoritaires :

- métabolite A ;ICI 46.929 : rupture de la double liaison entre les deux carbones centraux avec hydroxylation du carbone portant les deux cycles benzéniques.
- métabolite D ;ICI 79.280 : forme hydroxylée du tamoxifène : 4-hydroxytamoxifène.
- métabolite E ;ICI 77.949 : correspondant à la disparition de la chaîne latérale azotée.

Les métabolites A et D ont été retrouvés dans le fèces chez le chien et le singe.

Le métabolite E a été mis en évidence dans la bile du chien.

Le métabolite D présente des propriétés antioestrogéniques supérieurs à celles du tamoxifène avec une affinité aux récepteurs de l'estradiol 100 fois plus grande.

Une récente étude a permis de mettre en évidence qu'un métabolite ICI 55.548 ou B possède une très forte activité antioestrogénique, il s'agit du desméthyl tamoxifène.

La concentration steady state obtenue avec des doses thérapeutiques en tamoxifène de l'ordre de 10 mg par jour est comprise entre 100 et 200 ng/ml.

Effets du tamoxifène(4),(5),(6) :

- Endomètre : possède une action antioestrogénique source d'effets secondaires importants.
- Autres effets :
 - Hypothalamus : des concentrations élevées en estradiol inhibent la sécrétion de la LH-RH. Il y a une diminution plasmatique de FSH (Follicle-stimulating hormone) et de LH (luteinizing hormone). Les effets du tamoxifène vont dépendre du sexe, du stade physiologique et de l'équilibre hormonal de la personne traitée.
 - Femme avec infertilité anovulatoire :
Le tamoxifène augmente les concentrations de TSH et de LH , ce qui provoque un développement folliculaire et une anovulation.
 - Femme pré ménopausée :
Les effets sont très variables selon la dose utilisée.
Avec une dose de 20 mg par jour, on a noté une élé-

vation significative de la sécrétion hypophysaire. Par contre avec 10 mg par jour, les résultats ne montrent pas de modification de cette sécrétion.

- Femme ménopausée :

Chez la femme en post ménopause, le taux en oestrogène est bas et il n'y a plus de blocage de l'hypothalamus : la sécrétion en LH et FSH est maximale ; les concentrations de ces hormones sont à des taux plasmatiques très élevés.

Les femmes recevant 100 µg d'estradiol par jour en post ménopause ont une chute plasmatique des hormones gonadotrophines.

Les femmes souffrant d'un cancer du sein, traitées par une dose de 20 mg par jour présentent une diminution significative, moins importante qu'avec l'estradiol, des hormones gonadotrophines(7).

Le tamoxifène au niveau de l'hypophyse, a un effet antagoniste vis à vis des oestrogènes ; ce qui provoque une baisse de sensibilité aux grandes concentrations de LH-RH. On observe donc une diminution de la concentration plasmatique des hormones gonadotrophines.

Chez l'homme les oestrogènes provoquent une chute des hormones gonadotrophines induisant une atrophie testiculaire. Par contre ; le tamoxifène provoque une augmentation de FSH et de LH chez les hommes présentant une oligospermie.

Action sur la sécrétion de prolactine :

Les oestrogène augmentent la sécrétion de prolactine chez la femme comme chez l'homme. Le tamoxifène n'a pas d'effet dans les cas d'une sécrétion normale mais peut provoquer une diminution en cas d'hyperprolactiménié.

Action au niveau de la lactation :

Le tamoxifène présente une effet négatif sur la lactation. Cet effet peut être expliqué par son action sur l'hypothalamus ou par son mécanisme en bloquant l'action de la prolactine au niveau du sein.

Gynécomastie :

Le tamoxifène n'induit pas de gynécomastie chez les hommes atteint par une oligospermie. Il diminue ces gynécomasties chez les hommes souffrant d'un cancer du poumon hormonodépendant.

II.4 Effets secondaires :

Le tamoxifène ayant nous l'avons vu un passage systémique, les effets qu'il va induire découleront de son action antagoniste sur tous les organes porteurs de récepteurs oestrogéniques ; en particulier au niveau des organes génitaux.

Le traitement par cette molécule révèle une bonne tolérance chez les femmes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant, avec 3 à 4% de cas d'effets secondaires. Ce pourcentage s'avère beaucoup plus élevé ; de l'ordre de 30% quand il est

utilisé dans le traitement des troubles fonctionnels hormonaux chez la femme non ménopausée.

L'effet secondaire le plus souvent rencontré sont les bouffées de chaleur (10 à 20%). Nausées et vomissements sont apparus chez 10% des malades, ainsi que des troubles digestifs telle que la constipation. Les diarrhées ne sont que des cas isolés.

Il a été également rapporté quelques cas de thromboses artérielles et veineuses bien qu'aucune relation n'ait été clairement établie avec l'utilisation du tamoxifène.

Avec des doses élevées de ce principe actif (plus de 180 mg par jour et sur une durée au moins égale à un an) une toxicité oculaire ainsi que des rétinopathies ont été notées chez certaines femmes. L'utilisation à des doses usuelles sur une durée supérieure à quatre ans n'a pas permis de retrouver cet effet secondaire.

Le tamoxifène fut l'objet qu'une grande campagne de presse pour son effet secondaire majeur dans sa gravité. De par son action « oestrogène - like », il est à l'origine de l'apparition de cancer de l'utérus. Cet effet secondaire connu depuis les années 80 ; a été mis en valeur par une directive de l'OMS (organisation mondiale de la santé) classant le tamoxifène parmi les produits cancérigènes. L'annonce de cette information fut largement reprise dans la presse française et internationale pendant le mois de février 1996. Ceci fut bien sur à l'origine de l'inquiétude des femmes poursuivant ce traitement.

Les quotidiens nationaux ont ensuite publié des articles beaucoup plus rassurant comme nous avons pu le lire dans le journal « Libération© »(8) qui rappelle que le rapport bénéfice/risque de ce traitement jouait en faveur du tamoxifène et souligne qu'aucun décès par cancer de l'utérus n'avait été constaté au jour de la publication ; dans ce même article, le journal affirme que l'agence du médicament ne remettait pas en cause l'utilisation de ce médicament constituant un traitement majeur qui permet de diminuer considérablement la mortalité et le taux de rechute des femmes traitées ainsi que de réduire le risque d'un cancer sur l'autre sein.

Au mois de juin 1996, un magazine à visée médicale destiné au grand public « Top Santé© »(9) a consacré également un article sur le cancer du sein et le traitement par tamoxifène. Le rédacteur rappelle que l'utilisation de ce médicament présentait un bénéfice bien supérieur au risque qu'il faisait courir aux femmes atteintes d'un cancer et que ce rapport ne s'avérait inquiétant que dans le cas d'une utilisation du tamoxifène dans la prévention du cancer du sein chez les femmes ayant de grands facteurs de risque ; ce type d'utilisation n'étant pas encore développé en France.

III. LA THYROÏDE

III.1. Physiologie :

La thyroïde est une glande endocrine, située en avant des anneaux de la trachée et contre les parties latérales du larynx en avant des gros vaisseaux du cou. Les lobes latéraux mesurent 6 centimètres de haut ; 3 de large et 2 de profondeur. Ces deux lobes verticaux sont réunis par un isthme horizontal prolongé par la pyramide de Lalouette. Le lobe droit est souvent plus volumineux que le gauche.

Elle possède un poids normal moyen chez l'adulte d'environ 15 à 30 grammes.

La stimulation de la thyroïde est sous la dépendance de la TSH (thyroïdostimuline) sécrétée par l'hypophyse. La libération des hormones thyroïdiennes est dépendante de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La glande possède également une innervation adrénergique et cholinergique.

III.1.1. Follicule thyroïdien :

La thyroïde regroupe au sein d'une structure morphofonctionnelle unique nommée follicule, deux types de cellules.

- cellules folliculaires, vésiculaires ou thyrocytes. Elles sont responsables de la production des hormones thyroïdiennes.
- cellules C ou cellules à calcitonine également appelées cellules parafolliculaires, cellules interstitielles ou cellules claires.

Cette unité fonctionnelle de la glande , de forme sphérique, est formée d'un épithélium unistratifié limitant une cavité contenant une substance protéique claire : la colloïde.

La taille et la morphologie de ces follicules varient en fonction de l'activité de la glande.

Au repos, les follicules sont volumineux , épithélium aplati, colloïde abondante. Les cellules de l'épithélium possèdent une forme cubique ; le noyau étant de forme plus ou moins arrondie, central ou parabasal.

La colloïde est une substance de nature protéique essentiellement composée de thyroglobuline (glycoprotéine iodée de poids moléculaire élevé de 660 Kdaltons). Elle présente un aspect clair et homogène.

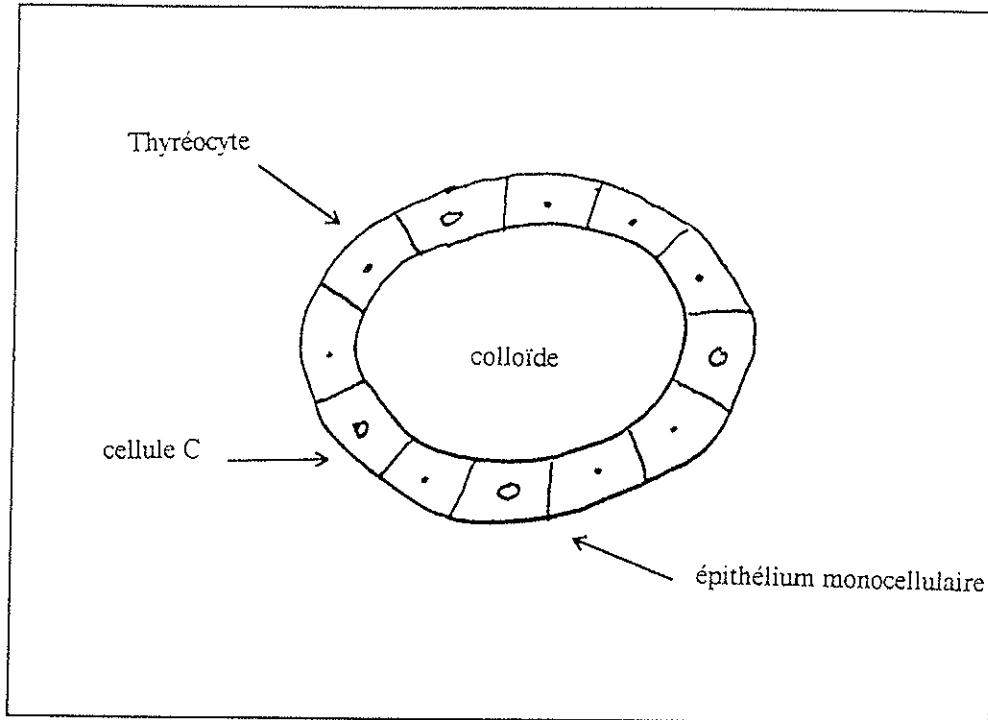


Schéma d'une vésicule thyroïdienne

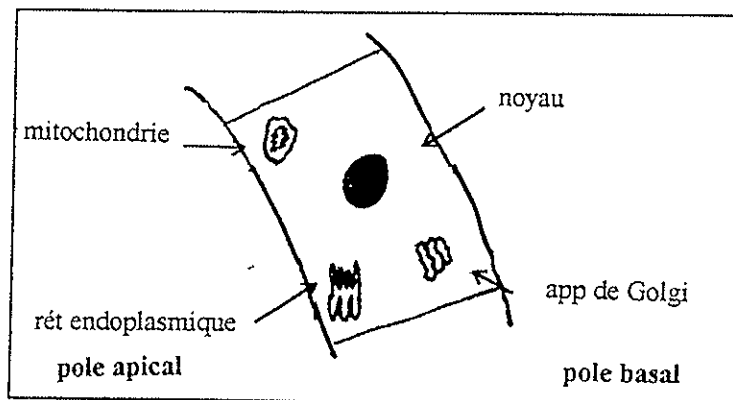


Schéma d'un thyrocyte

III.2. SYNTHÈSE DES HORMONES THYROÏDIENNES.

Les hormones thyroïdiennes telles que la T3 ou tri iodothyronine et la T4 ou tétra iodothyronine ou thyroxine sont des hormones iodées. Leur synthèse s'effectue à partir de la thyroglobuline et est sous la dépendance de l'iode.

L'iode nécessaire à cette synthèse est apporté sous forme d'iodures dans l'alimentation. Ces iodures sont liés à des molécules inorganiques. La pénétration de ces ions dans les thyrocytes a lieu grâce à des pompes à iodures situées au niveau de la membrane basale des cellules folliculaires, elles sont sous la dépendance directe de la TSH.

La synthèse de la thyroglobuline TG s'effectue selon un mouvement intracellulaire ascendant du pôle basal vers le pôle apical, par assemblage des chaînes polypeptidiques dans les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux puis par incorporation d'hydrate de carbone pendant le transport vers et dans l'appareil de Golgi.

A ce niveau la TG non iodée est assemblée en vésicules d'exocytose qui sont dirigées vers le pôle apical et déversées dans la colloïde.

A l'interface pôle apical - colloïde se produit l'iodation de la molécule de TG sous l'influence d'une peroxydase thyroïdienne.

La TG est une protéine spécifique de la glande thyroïdienne, support de synthèse des hormones thyroïdiennes. Stockée dans la colloïde, elle représente jusqu'à 95% des protéines présentes.

La TG possède un coefficient de sédimentation de 19S, un poids moléculaire de 660 000 daltons. Elle est formée de l'association de deux sous unités 12S d'un poids de 330 000 daltons.

La production des T3 et des T4 se produit par un mouvement intracellulaire inverse ; du pôle apical vers le pôle basal.

La TG est captée sous forme de vésicules d'endocytose puis fusionnent avec des lysosomes. Dans ces structures, la TG sera protéolysée par des hydrolases acides pour aboutir à la formation des T3 et T4.

La glande thyroïdienne normale contient environ 10 milligrammes d'iode soit une concentration d'environ 10 000 fois supérieure à la concentration sanguine. Moins de 1% de cet iode est sous forme d'iodures. Le reste se présente sous forme d'iode organique.

Transport de l'iode :

La majeure partie des iodures accumulés est stockée dans la lumière des follicules.

Pour entrer ou sortir de la glande ils doivent réaliser quatre passages transmembranaires :

- passage vers l'intérieur du thyrocyte à travers la membrane basolatérale.

- passage dans la lumière à travers la membrane apicale.
- passage de la lumière vers la cellule à travers la membrane apicale.
- un flux de la cellule vers l'extérieur à travers la membrane basolatérale.

III.1.3. Mécanismes de synthèse des T3 et T4 et devenir des hormones thyroïdiennes :

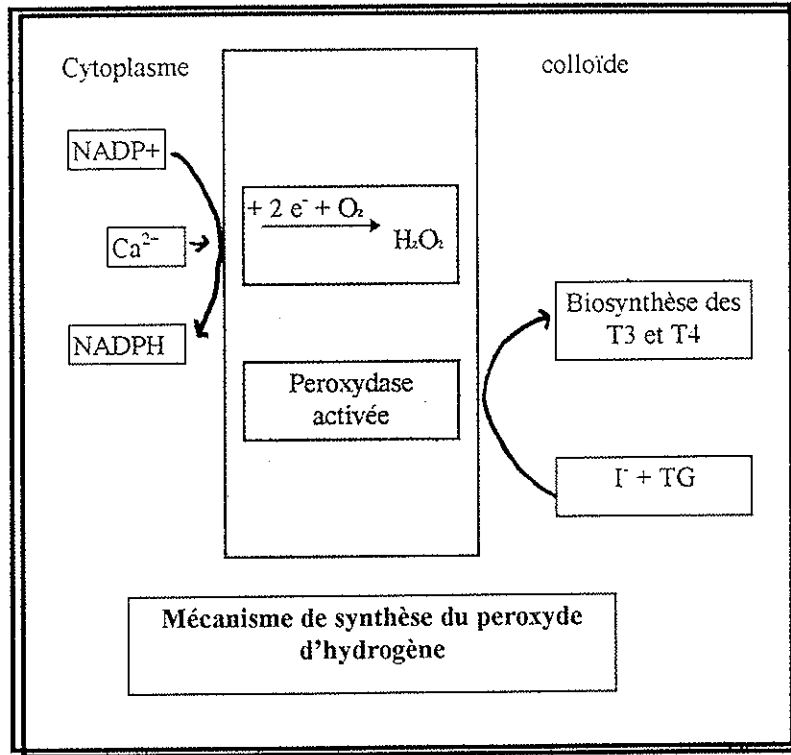
La synthèse des hormones thyroïdiennes se fait en deux étapes :

- iodation de la TG avec formation successive de mono iodothyronine MIT et de di iodothyronine DIT.
- couplage pour former la T3 par condensation entre une molécule de MIT et une molécule de DIT ; et formation de T4 par association de deux molécules de DIT.

Ces deux réactions sont catalysées par la thyropéroxydase fonctionnant avec un système générateur de peroxyde d'hydrogène.

La thyropéroxydase est une enzyme localisée au niveau des microvillosités de la membrane apicale des thyrocytes. Elle est responsable de l'oxydation des

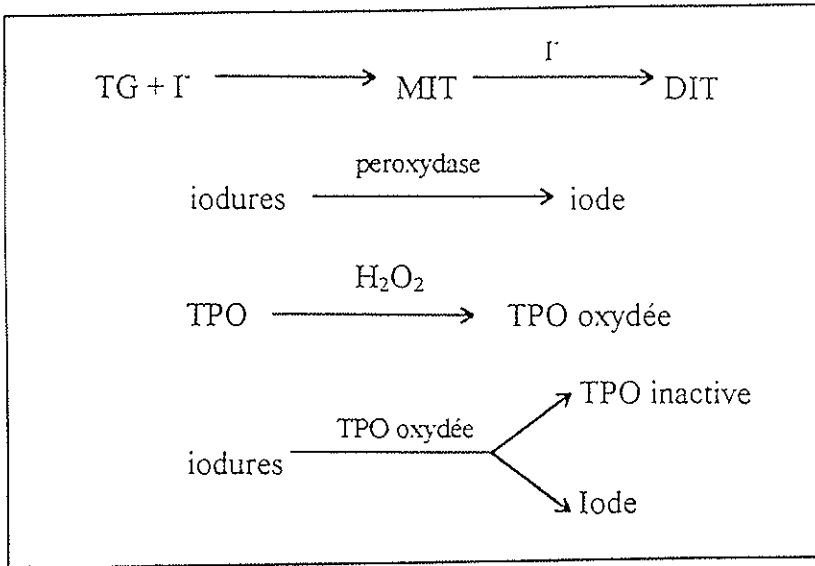
iodures. La thyroperoxydase ou peroxydase thyroïdienne a pour substrat la TG et les iodures. Son action est catalysée par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .



Iodation de la TG :

La peroxydase thyroïdienne permet une oxydation des iodures en iode moléculaire puis en ion iodonium I^+ . Cet ion électrophile pourra en présence de TG se fixer par un mécanisme de substitution sur le noyau de la TG. Cette substitution se fera en para par rapport au groupement $-OH$ porté par le noyau aromatique.

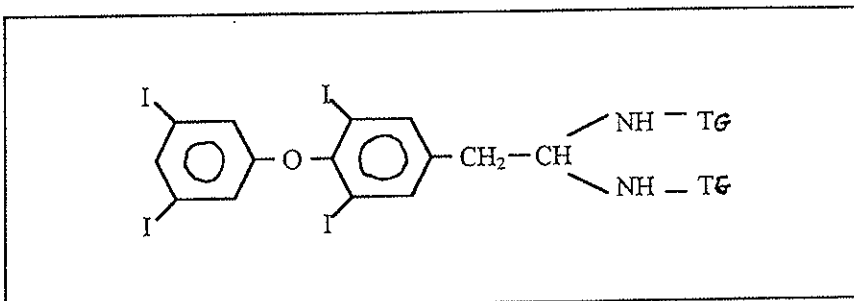
Ce mécanisme de substitution conduit à la formation de MIT et de DIT.



Réaction de couplage :

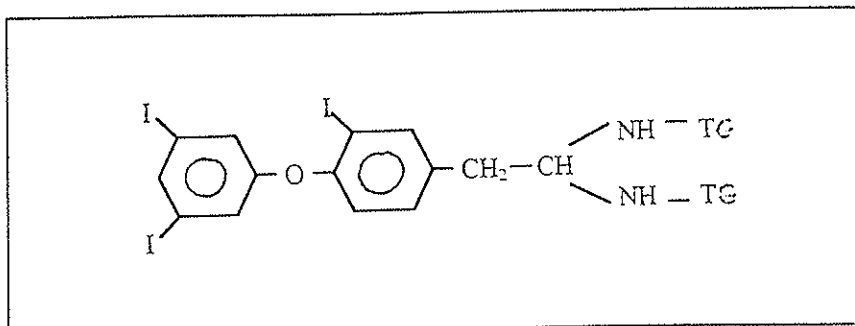
La condensation des MIT et DIT s'effectue dans la colloïde.

L'assemblage de deux molécules de DIT conduit à la formation de T4 ou 3,5,3',5'-tétra iodothyronine ou thyroxine.



Tétraiodothyronine

La T3 provenant du couplage d'une molécule de MIT et de DIT. Il s'agit du 3,5,3'-tri iodothyronine.



Triiodothyronine

Les T3 et T4 ainsi formés libérés de la cellule folliculaire vont être déversés dans les capillaires sanguins entourant le thyrocyte. Dans la circulation générale ces hormones vont contracter des liaisons avec les protéines plasmatiques. Environ 99.9% se trouvent sous forme liée. Seule la forme libre est active et est capable de pénétrer dans les cellules. Il existe un équilibre entre la forme libre et la forme liée ; cette dernière joue donc le rôle de réserve.

Action physiologique des hormones thyroïdiennes :

Effets sur le développement :

Au cours de la vie utérine les T4 ont deux origines ; une maternelle et une foetale. Ils interviennent sur la croissance des organes c'est à dire sur le gain de poids et sur la croissance staturale. Les six premiers mois de la vie sous l'effet des T4 notamment au niveau du développement cérébral.

Effets métaboliques :

Les hormones thyroïdiennes régulent le métabolisme basal de la thermogénèse, elles permettent une stimulation de la production d'énergie qui fait suite à une stimulation de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase. La modification des taux sériques en T3 et T4 va provoquer des thermophobies ou des frilosités ainsi que des bouleversements de la température cutanée.

Effets sur les mitochondries :

Les hormones thyroïdiennes augmentent l'activité respiratoire des mitochondries soit directement en augmentant leur surface soit en augmentant le nombre des enzymes mitochondriales ce qui favorise la production d'ATP.

Métabolisme des lipides :

Si on est en présence d'une hypothyroïdie, il y a une diminution des T4 ce qui va entraîner une baisse du taux circulant de cholestérol et de VLDL (very low density lipoprotein).

En cas d'hyperthyroïdie, il y a augmentation du taux de T4 circulants, ce qui provoque une augmentation de l'élimination du cholestérol par les sels biliaires.

T3 et T4 activent le lipogénèse et stimulent la lipolyse.

Métabolisme des glucides :

Une hyperthyroïdie potentialise le métabolisme glucidique, une stimulation intestinale et une augmentation endogène du glucose.

Métabolisme des protéines :

Les T3 et T4 stimulent la synthèse des protéines et accélèrent leur catabolisme.

Action au niveau de différents tissus :

Os et squelette : les hormones thyroïdiennes sont associées à l'hormone de croissance. Elles n'ont qu'un rôle régulateur sur la maturation et la croissance des os. Si une carence apparaît chez l'enfant cela va provoquer une diminution des points d'ossification soit un nanisme ; au contraire, un excès d'hormones va augmenter les points d'ossification, c'est un gigantisme.

T3 et T4 favorisent la maturation des cartilages.

Muscles squelettiques et cardiaques : une baisse du taux des hormones affecte le développement des muscles squelettiques par réduction de la myosine. Elles ont donc une action sur la synthèse protéique des muscles.

Les hormones augmentent le débit et la fréquence cardiaque. Une hyperthyroïdie entraîne une hypertrophie ventriculaire et une élévation du nombre des récepteurs β au niveau du cœur.

Au niveau du système nerveux central :

La partie la plus concernée est le cervelet. Le taux des hormones thyroïdiennes influence l'arborisation des cellules de Purkinje, la synthèse des protéines cérébrales et des acides nucléiques mais également les phénomènes de myélinisation.

III.2. Pathologies thyroïdiennes :

Les taux de T3 et de T4 sont régulés par l'axe hypothalamo-hypophysaire qui maintiennent des taux constants sériques. Une diminution des T3 et T4 provoque une sécrétion hypothalamique de TRH (thyrotrophin releasing hormon) et par suite de TSH qui va stimuler la thyroïde. Inversement, une élévation des T3 et T4 induit une baisse de sécrétion de TRH et de TSH.

III.2.1. Hyperthyroïdies :

L'hyperthyroïdie est due à une sécrétion en excès des hormones thyroïdiennes.

Signes cliniques :

L'hyperthyroïdie dont la cause la plus fréquente est la maladie de Basedow, il s'agit d'une pathologie auto-immune avec stimulation permanente des récepteurs de la TSH par des immunoglobulines G. Elle est caractérisée par

l'association d'un goitre, de tachycardie permanente et régulière, d'une hypertension systolique, tremblements et d'un amaigrissement par amyotrophie et fonte grasseuse. L'exophtalmie Basedowienne n'est pas directement liée à l'hyperthyroïdie mais est induite par les perturbations immunes provoquant un épaissement du tissu conjonctif rétro-orbitaire et une myosite des muscles oculomoteurs. On peut également noter une thermophobie, des troubles nerveux, une polydipsie, une hyperphagie, des sueurs, polyurie ainsi qu'une asthénie liée à l'atteinte musculaire.

On retrouve également des signes psychiques tels que des dépressions, une irritabilité augmentée et une baisse de la libido.

L'hyperthyroïdie est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes selon une étude réalisée en Grande Bretagne en 1977 par Tunbridge et coll.

Signes biologiques :

Une analyse sanguine complète montre :

- Une anémie soit microcytaire avec ferritine basse, soit macrocytaire avec diminution des folates et/ou de la vitamines B12.
- Une intolérance aux hydrates de carbone, une cholestérolémie et une triglycéridémie basse.

- Une élévation de la bilirubine totale, des transaminases, des phosphatases alcalines, des gamma GT et une albumine basse.
- Un bilan montre une résorption osseuse avec une hypercalcémie et une hypocalciurie.

On peut distinguer deux formes d'hyperthyroïdie.

- Hyperthyroïdies à T3

On trouvera des taux plasmatiques de T4 libres ou circulants normaux.

Des valeurs élevées de la T3 plasmatique.

Cette forme est rencontrée dans les cas de déficit en apport iodé.

- Hyperthyroïdies à T4

III.2.2. Hypothyroïdies :

L'hypothyroïdie est due à une carence en T3 et en T4 par destruction ou inhibition de la glande. La destruction de la thyroïde peut être due à une atteinte auto-immune, à des lésions virales (thyroïdite de De Quervain), à des lésions iatrogènes ou par surcharge iodée.

Signes cliniques :

Les signes caractérisants une hypothyroïdie sont nombreux :

Syndrome cutanéomuqueux

Dépilation au niveau des aisselles et du pubis

Ongles striés

Sécheresse de la peau

Pâleur jaunâtre

Modification du timbre de la voix

Syndrome d'hypermétabolisme

Ralentissement global des fonctions vitales

(asthénie, bradycardie, somnolence, frilosité, constipation).

Diminution de la libido

Hypercholestérolémie

Ralentissement de l'absorption digestive du glucose

Diminution de la masse musculaire avec augmentation des enzymes musculaires (CPK, LDH, SGOT et aldolase).

On note une diminution du débit sanguin, avec possibilité d'un épanchement péricardique.

Signes biologiques :

On peut trouver une anémie macrocytaire modérée. Si l'atteinte apparaît avant la puberté, la carence en hormones provoquera un arrêt de croissance.

On note dans le cas d'une hypothyroïdie une TSH élevée, la concentration en hormones thyroïdiennes libres est à un niveau normal ou discrètement abaissée.

Dans le cas d'une hypothyroïdie secondaire à une atteinte hypothalamo-hypophysaire, on peut trouver une TSH abaissée.

Le bilan sanguin révèle une anémie.

L'ionogramme montre une hyponatrémie par sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique.

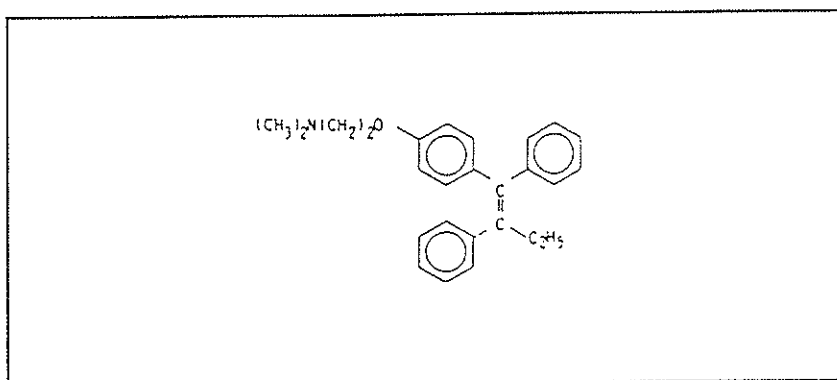
On retrouvera également une hypercholestérolémie pure (type IIa) avec parfois des triglycérides augmentés (type IIb).

Les hypothyroïdies peuvent provoquées par un surdosage en ATS (antithyroïdien de synthèse), par une surcharge iodée ou une carence, l'utilisation de médicaments tels que les sels de lithium ; ainsi que par une consommation excessive de certains aliments comme le chou, le manioc ou encore les rutabagas.

**IV.PRESENTATION DES MOLECULES
ETUDIEES**

IV.1. Présentation :

A partir de la formule développée du tamoxifène nous avons essayé de décomposer la formule chimique en molécules se rapprochant le plus possible des chaînes portant les fonctions essentielles du tamoxifène.



(Z)-2-[4-(1,2)diphenyl-1-butenyl]-phenoxy]-N,N-dimethylethanamine

La première molécule qu'il nous a semblé nécessaire d'étudier est le diméthyléthanolamine, qui correspond à la chaîne latérale du tamoxifène portant la chaîne azotée :



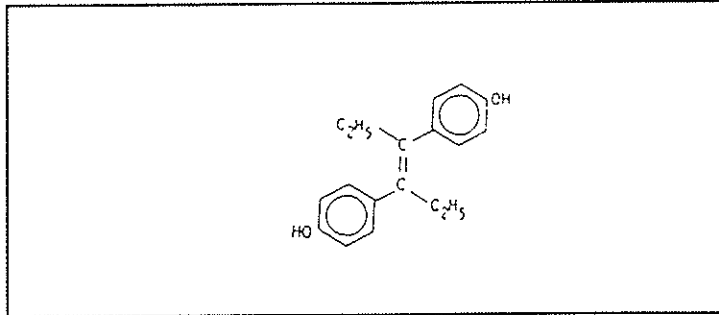
Formule brute : $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}$.

Poids moléculaire : 89.14 g/mole.

Densité : $d=0.8866$.

Cette molécule est utilisée en thérapeutique humaine comme stimulant. Elle est connue par sa dénomination commune internationale (DCI) : déanol.

La seconde molécule que nous avons retenue contient les noyaux benzéniques du tamoxifène avec le même enchaînement ; il s'agit du diéthylstilbestrol ou DES. Comme nous l'avons vu dans l'historique du tamoxifène cette molécule est le chef de file de cette classe thérapeutique.



(E)-4,4'-(1,2)-diéthyl-1,2-éthénediyl bisphenol

Formule brute : $C_{18}H_{20}O_2$.

Poids moléculaire : 268.36 g/mole.

Le DES fut découvert en 1938 par Dodds. Son activité est comparable à celle du 17β estradiol. Le diéthylstilbestrol est utilisé dans le traitement du cancer de la prostate.

Ces deux premières molécules sont utilisées couramment en thérapeutique et seront donc testées dans l'expérimentation in vivo avec le tamoxifène.

Il nous est apparu intéressant d'étudier une autre molécule qui n'est pas connue de la médecine, mais dont la structure chimique nous permettait de déterminer l'impact des effets électroniques d'un cycle benzénique sur la chaîne latérale azotée.

Cette nouvelle molécule devait donc comporter une chaîne latérale identique à celle du tamoxifène mais également un cycle benzénique, il s'agit d'un étheroxyde ayant pour formule :



Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ON}$

Poids moléculaire : 165 g/mole.

IV.2. Synthèse du diméthylphénylaminoéthanol :

Ce composé a été synthétisé selon la réaction de Williamson par transfert de phase.

Cette réaction est une substitution nucléophile de type 2 qui s'effectue à partir du phénol et du chlorure de diméthylaminoéthanol. La synthèse de ce composé est réalisée en milieu basique et en présence d'un catalyseur : le bromure de tetra-N-butylammonium.

Pour la réalisation de cette synthèse nous avons utilisé un ballon de 100 ml surmonté d'un réfrigérant à eau, un agitateur magnétique chauffant, un bain d'huile et une ampoule à décanter de 100 ml.

IV.2.1 Mode opératoire :

Dans un ballon, nous avons introduit 1.68g d'hydroxyde de sodium en pastilles soit 0,042 mole, 3,9g de phénol (0,042 mole), 0,042 mole de chlorure de diméthylaminoéthanol et 25 ml d'eau distillée. Nous avons ensuite ajouté 0,44g de catalyseur soit 1,3 mmole. Sur le ballon est adapté le réfrigérant. Le montage est placé dans un bain d'huile et porté à une température de 250°C pendant 2 heures sous agitation constante et vigoureuse.

Après refroidissement, le mélange est transféré dans l'ampoule à décanter. La phase organique est lavée avec 25 ml d'une solution de soude 1M afin d'éliminer le phénol résiduel n'ayant pas réagi puis avec 25 ml d'hexane.

Le produit synthétisé étant soluble dans ce solvant, nous avons dû réaliser une évaporation de la phase organique.

Le produit ainsi obtenu se présente sous la forme d'un liquide épais de couleur jaunâtre.

Cette réaction permet d'obtenir un rendement de 40%.

IV.2.2 Contrôle du produit synthétisé :

Pour vérifier que le produit que nous avons obtenu était le diméthylphénylaminoéthanol, nous avons deux techniques complémentaires à notre disposition : spectrométrie infrarouge et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire.

IV.2.2.1. Spectrométrie par résonance magnétique

nucléaire :

Cette spectrométrie également appelée RMN est une méthode physique nous permettant de déterminer l'environnement, la nature et le nombre des hydrogènes présents au sein d'une molécule. Ceci nous permet de déterminer le squelette de la molécule.

La RMN permet d'étudier tous les atomes possédant un spin (moment angulaire). Ici, nous n'avons étudié que les atomes d'hydrogène.

Cette technique est basée sur l'utilisation d'un champ magnétique H_0 . Les atomes d'hydrogène possédant un moment magnétique μ auront tendance à s'aligner par rapport au champ extérieur qu'on leur applique.

Soit I le nombre quantique de spin du noyau. Il existe $2I+1$ orientations possibles dans le champ magnétique auxquelles correspondent $2I+1$ niveaux d'énergie du noyau.

Dans le cas d'un atome d'hydrogène, il possède un nombre quantique de spin de $\frac{1}{2}$. Il y a donc $2(\frac{1}{2})+1$ soit 2 orientations possibles. Elles sont dites parallèles ou antiparallèles au champ magnétique H_0 .

Entre les deux orientations possibles la différence d'énergie est proportionnelle au champ appliqué :

$$\Delta E = k H_0$$

$$k = h\gamma/2\pi$$

γ : rapport magnétogyrique

(constante pour un noyau)

h : constante de Planck

Pour une valeur donnée de H_0 , le proton peut passer d'un niveau énergétique à l'autre par absorption ou émission d'un quantum d'énergie :

$$\Delta \varepsilon = h \nu$$

$$\nu = \gamma/2\pi H_0$$

ν est la fréquence de la radiation absorbée ou émise.

En pratique, dans un spectromètre par résonance magnétique nucléaire, l'échantillon est placé dans un champ magnétique et un champ de radiofréquence qui permet de détecter les retournements des noyaux sous forme d'un voltage.

Le spectre RMN traduit les variations de voltage en fonction des variations du champ magnétique.

Notions de blindage :

On parle de blindage pour les protons quand le champ induit par un proton s'oppose au champ externe. Dans ce cas, les électrons blindent le proton contre les effets du champ magnétique extérieur.

Les noyaux d'hydrogène sont donc blindés ou déblindés (effet inverse : augmentation de l'effet du champ) selon leur environnement. Le proton est soumis à un champ extérieur et un champ magnétique local :

$$H_{\text{effectif}} = H_{\text{externe}} - H_{\text{induit}}$$

Résultats :

δ	
1,3	6 H
3,7	4 H
7,2	5 H
<i>référence TMS</i>	

Le spectre obtenu après examen de notre produit de synthèse et par comparaison avec des tables de références ; nous révèle la présence de 6 atomes à $\delta=1,3$ qui traduit de groupements méthyle, ils devraient correspondre au 2 groupements de la chaîne latérale azotée.

Nous avons également 4 atomes à $\delta= 3,7$: ces atomes sont ceux du groupe $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

Enfin un dernier pic traduisant la présence de 5 hydrogènes à $\delta= 7,2$ caractéristique des noyaux aromatiques.

Ce spectre nous a donc permis de déterminer le squelette du produit étudié qui semble correspondre à celui de la molécule que nous désirions obtenir.

Après avoir déterminé le squelette de cette molécule, il nous faut rechercher les groupes fonctionnels.

IV.2.2.2. Spectrométrie infrarouge :

La spectrométrie infrarouge est une méthode d'analyse qui permet de distinguer la nature des groupes fonctionnels dans une molécule.

Le domaine de l'infrarouge va de 2,5 à $15,0 \cdot 10^{-6}$ m.

On utilise couramment comme unité en spectrométrie infrarouge le nombre d'onde ν (nombre d'ondes par cm) :

$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

ν exprimé en cm^{-1}

λ exprimé en cm

L'infrarouge correspond à un domaine compris entre 700 et 4000 cm^{-1} .

Le niveau énergétique des rayons infrarouges étant très faible, il ne permet pas d'agir sur les électrons. Ce rayonnement va agir sur certains atomes en provoquant des vibrations ou des oscillations :

■ Vibrations de valence :

Les atomes se déplacent longitudinalement selon leur axe de liaison.

■ Vibrations de déformation :

Modification des angles valentiels selon un mouvement pendulaire.

Notre produit se présentant sous la forme liquide, nous avons réalisé un spectre en phase liquide.

Pour cette manipulation, il nous a fallu préalablement réaliser deux pastilles de KBr (bromure de potassium anhydre) très fines. Entre ces deux pastilles nous avons déposé une petite goutte du produit obtenu après synthèse.

Le spectre ainsi obtenu est analysé à partir de tables indiquant les corrélations entre un spectre et la structure (Stanford research Labs, American cyanamid Co) pour chaque groupement. Nous avons noté deux pics ; le premier est compris entre 2980 et 3200 qui correspond à la présence de groupements méthyles et le second entre 1470 et 1490. pic caractéristique d'un noyau benzénique.

IV.2.3. Conclusion :

Les spectres infrarouges et RMN nous confirment que le produit que nous avons synthétisé est le diméthylphénylaminoéthanol.

Ce composé ainsi obtenu sera conservé pour la réalisation des tests de complexation à l'abri de la lumière et de l'air, à une température inférieure à 8°C afin d'éviter tous risques de dégradation de la molécule.

V.MODELISATION MOLECULAIRE

V.1. Principe de la modélisation moléculaire :

La modélisation moléculaire est une technique qui permet une visualisation et une manipulation des structures moléculaires. Ceci permet d'effectuer une étude de la structure et de la stabilité des molécules, de comprendre les mécanismes réactionnels au niveau atomique.

Cette étude s'effectue par ordinateur grâce à des algorithmes dont la nature dépendra de la taille et de la complexité de la structure de la molécule.

La modélisation nous permet d'obtenir des résultats de précision croissante selon que l'on utilise une méthode mécanique classique ; semi-empirique ou ab initio (résolution complète de l'équation de Schrödinger).

Dans notre étude nous avons effectué une recherche selon une méthode semi-empirique.

Principe :

La manipulation entièrement effectuée sur ordinateur consiste tout d'abord à fournir à la machine une structure de la molécule en deux dimensions. Il faut donc réaliser avec les outils fournis par le logiciel un dessin du produit à étudier et à placer les atomes correspondants ainsi que le type de la liaison existant entre les deux atomes.

A partir des données qui lui sont fournies, l'ordinateur effectue une estimation d'une structure en trois dimensions qui sera basée soit sur les longueurs des liaisons et la valeur des angles standards soit en utilisant un algorithme de minimisation d'énergie par mécanique moléculaire.

La fonction d'onde Φ est calculée en utilisant des approches semi-empiriques ou *ab initio*. Elle représente la solution d'énergie minimale relative à la disposition des charges électroniques autour des positions nucléaires fixes. Le calcul de la fonction d'onde nous donne la distribution des charges électroniques et l'énergie de chaque configuration en trois dimensions.

Ce logiciel nous permet enfin de déterminer les structures tridimensionnelles optimisées, c'est à dire la structure la plus stable : c'est la recherche conformationnelle.

Les résultats ainsi obtenus nous renseignent sur la taille et la structure réelle de la molécule ; ce qui nous a permis de visualiser l'encombrement stérique autour d'un atome susceptible de complexer notre halogène.

Nous avons également obtenu la distribution des charges électroniques mises en jeu dans les liaisons chimiques. Cette distribution est utilisée pour connaître les charges atomiques partielles, les densités électroniques dans les orbitales frontières HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Pour notre étude nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'HOMO qui est l'orbital permettant une complexation par transfert de charge.

Nous avons enfin pu déterminer les différentes énergies : l'énergie totale des différentes molécules, l'énergie des orbitales HOMO et LUMO, l'énergie de formation des complexes, l'enthalpie de ces réactions.

L'énergie de l'orbitale HOMO détermine la capacité de la molécule à se comporter comme un réactif nucléophile ; les densités électroniques dans cette orbitale désignent le site le plus probable pour une attaque électrophile.

V.2. Modélisation des complexes par transfert de charge :

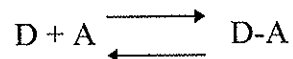
V.2.1. Théorie de la formation du complexe de transfert de charge :

La théorie usuelle de formation d'un complexe de transfert de charge, due à Mulliken, est basée sur l'interaction entre la plus haute orbitale occupée (HOMO) du donneur avec la plus basse orbitale inoccupée (LUMO) de l'accepteur.

L'énergie de la HOMO est une mesure de la capacité du donneur à servir de donneur d'électrons, et elle peut être considérée, en première approximation, comme le potentiel d'ionisation du composé.

On désigne par complexe moléculaire l'association de deux ou plusieurs molécules. L'association que nous avons étudiée est une complexation par transfert de

charge. Cette réaction implique une interaction entre une molécule donneuse(D) et une molécule acceptrice(A) d'électrons. C'est une réaction d'équilibre de la forme :



Il existe donc un équilibre entre le complexe formé et les produits de départ. Le complexe formé étant plus ou moins stable.

V.2.2. Méthodes :

Une étude conformationnelle des molécules étudiées et de leurs complexes avec l'iode a été faite avec le champ de force PM3, à l'aide des logiciels HyperChem 5.01 et ChemPlus 1.6 sur un ordinateur IBM-PC(10),(11).

Les géométries de départ ont été construites manuellement puis à l'aide de la fonction Model Builder d'HyperChem. Elles ont été optimisées dans le champ de force PM3 (méthode quantique semi-empirique), à l'aide de l'algorithme de Polak-Ribiere (gradient conjugué) jusqu'à un gradient terminal de 0,1. Chaque molécule a ensuite fait l'objet d'une recherche conformationnelle en utilisant le module Conformational Search de ChemPlus. Tous les angles de torsion des liaisons à libre rotation ont été soumis à variation; la progression de la recherche se fait en utilisant comme conformation initiale la structure de plus basse énergie précédemment trouvée. Le gradient terminal est fixé à 0,1.

Les complexes avec l'iode ont été construits à partir des conformations de plus basse énergie de chaque molécule à caractère électrodonneur. Deux positions initiales de la molécule d'iode ont été envisagées :

- la molécule d'iode a été placée initialement à une distance de 3 Å de l'atome d'azote du donneur, en présentant un angle de 180° avec cet atome et un angle de 110° avec chaque atome de carbone lié à l'azote (angle C-N-I).

- la molécule d'iode a aussi été placée au voisinage des cycles benzéniques et de la liaison éthylénique, de manière à mettre en évidence un éventuel complexe .

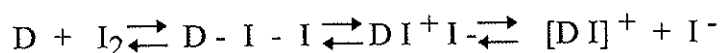
Pour chaque molécule étudiée, deux paramètres calculés ont été examinés : l'énergie de la plus haute orbitale occupée (HOMO) et l'enthalpie de formation. L'énergie de stabilisation du complexe donneur (D) - accepteur (A) est calculée selon:

$$\Delta H_f(D/A) = \Delta H_f(\text{complexe}) - \Delta H_f(D) - \Delta H_f(A)$$

V.2.3. Résultats

Les trois composés donneurs présentent la même chaîne diméthyléthanolamine. L'atome ayant le plus fort coefficient dans la HOMO est toujours l'atome d'azote, qui est logiquement le site de complexation de l'iode. Les trois complexes formés ont des chaleurs de réaction calculées de l'ordre de -4,5 à -5,0 kcal/mol. Cette réaction de complexation est donc favorisée.

La géométrie du complexe de transfert de charge est la même, quel que soit le donneur. L'atome d'azote porte une charge -0,071 (champ de force PM3) dans la molécule isolée, il prend une charge +0,154 dans le complexe avec l'iode. Simultanément, une nette différence de charge apparaît dans la molécule d'iode. On note également que la distance interatomique s'accroît, de 2,67 Å pour la molécule isolée à 2,72 Å dans le complexe. Ces observations traduisent le transfert de charge et la formation d'un complexe externe puis interne :



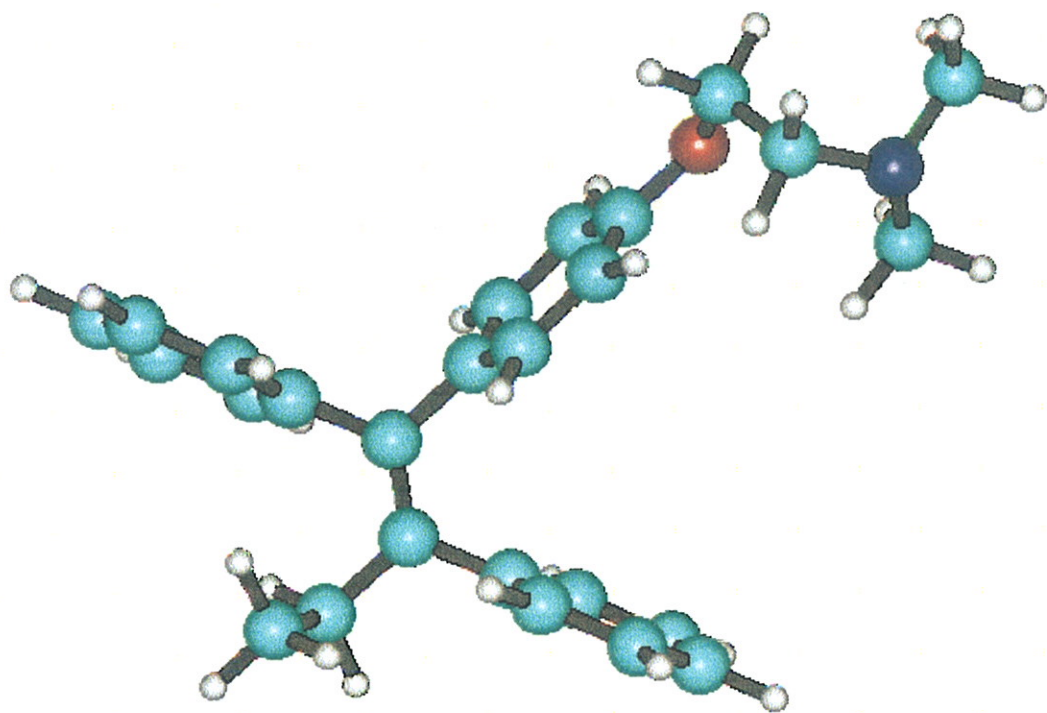
Le tamoxifene est la molécule ayant la plus grande valeur de K_C . Il présente le plus faible potentiel d'ionisation calculé (8,84 eV) et son complexe avec l'iode est le plus stable.

Les deux autres molécules à pouvoir électrodonneur ont des potentiels d'ionisation calculés voisins (9,01 eV et 8,97 eV). Cependant, la diméthyléthanolamine a une constante de complexation nettement plus élevée que la phényldiméthyléthanolamine. On peut en effet noter que l'énergie de stabilisation du complexe DMEA- I_2 est sensiblement plus grande que celle du complexe DMPEA- I_2 , ce premier complexe serait donc un peu plus stable.

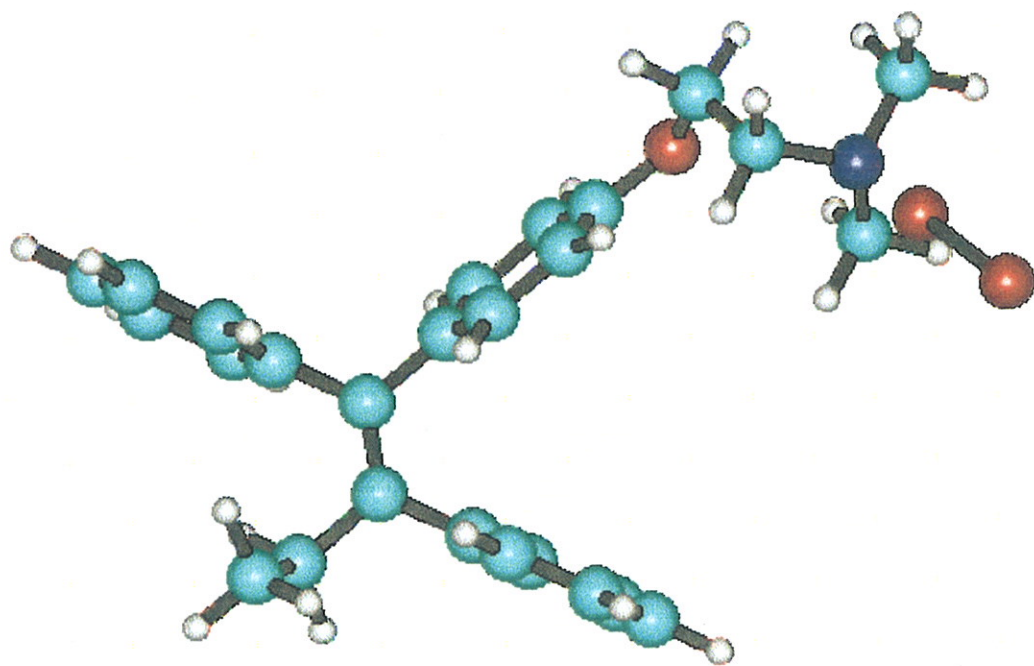
D'autre part, dans la diméthyléthanolamine, le doublet de l'azote est moins délocalisé qu'il ne l'est dans le diméthylphényléthanolamine, ce que traduit la plus forte

valeur du coefficient de l'atome d'azote dans la HOMO. La nette localisation de l'orbitale donneuse sur le site réactionnel favorise la formation du complexe.

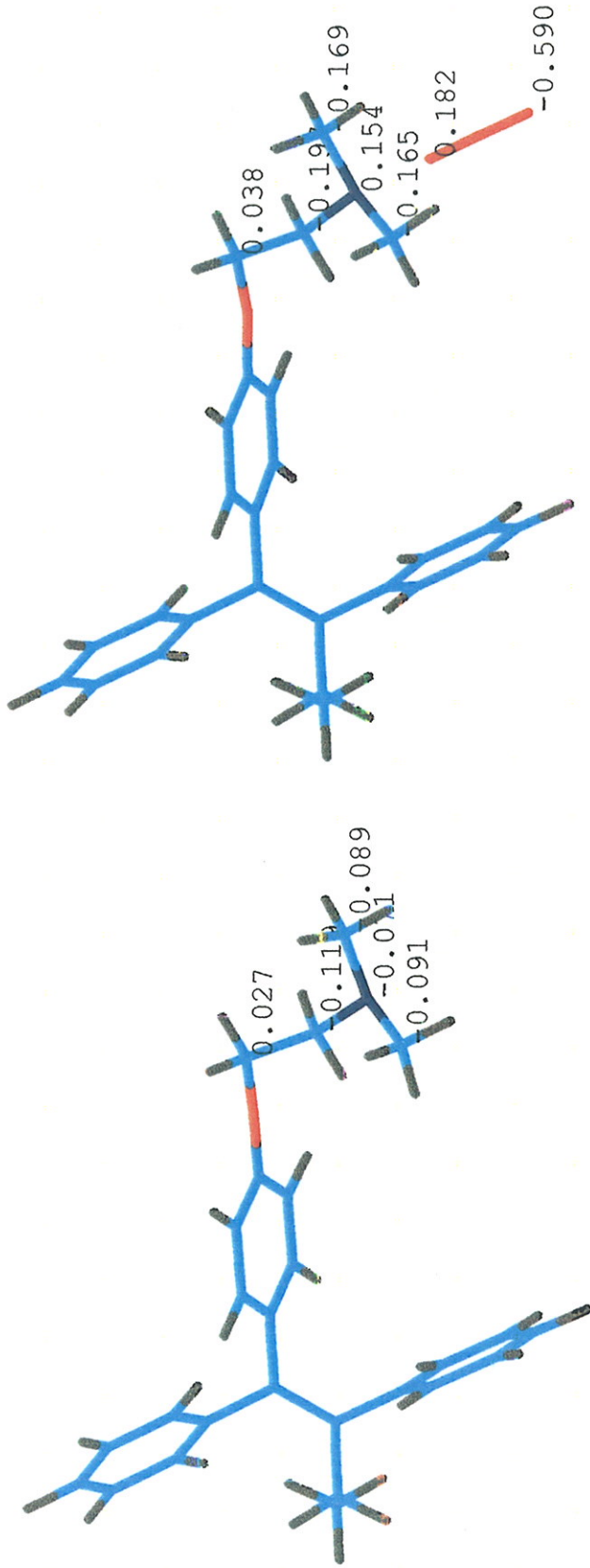
Une seule des molécules étudiées, le diéthylsilbestrol, ne forme pas de complexe avec l'iode. Il se différencie des autres molécules par l'absence de la chaîne diméthyl éthanolamine et donc par l'absence d'atome d'azote. Les atomes d'oxygène ont un pouvoir électrodonneur très inférieur à celui de l'atome d'azote. La modélisation moléculaire confirme cette observation. Le complexe construit en positionnant la molécule d'iode au voisinage de l'atome d'oxygène présente une chaleur de réaction très élevée, ce complexe ne peut donc pas se former. Par ailleurs aucun complexe n'a été mis en évidence.



Modélisation du Tamoxifène

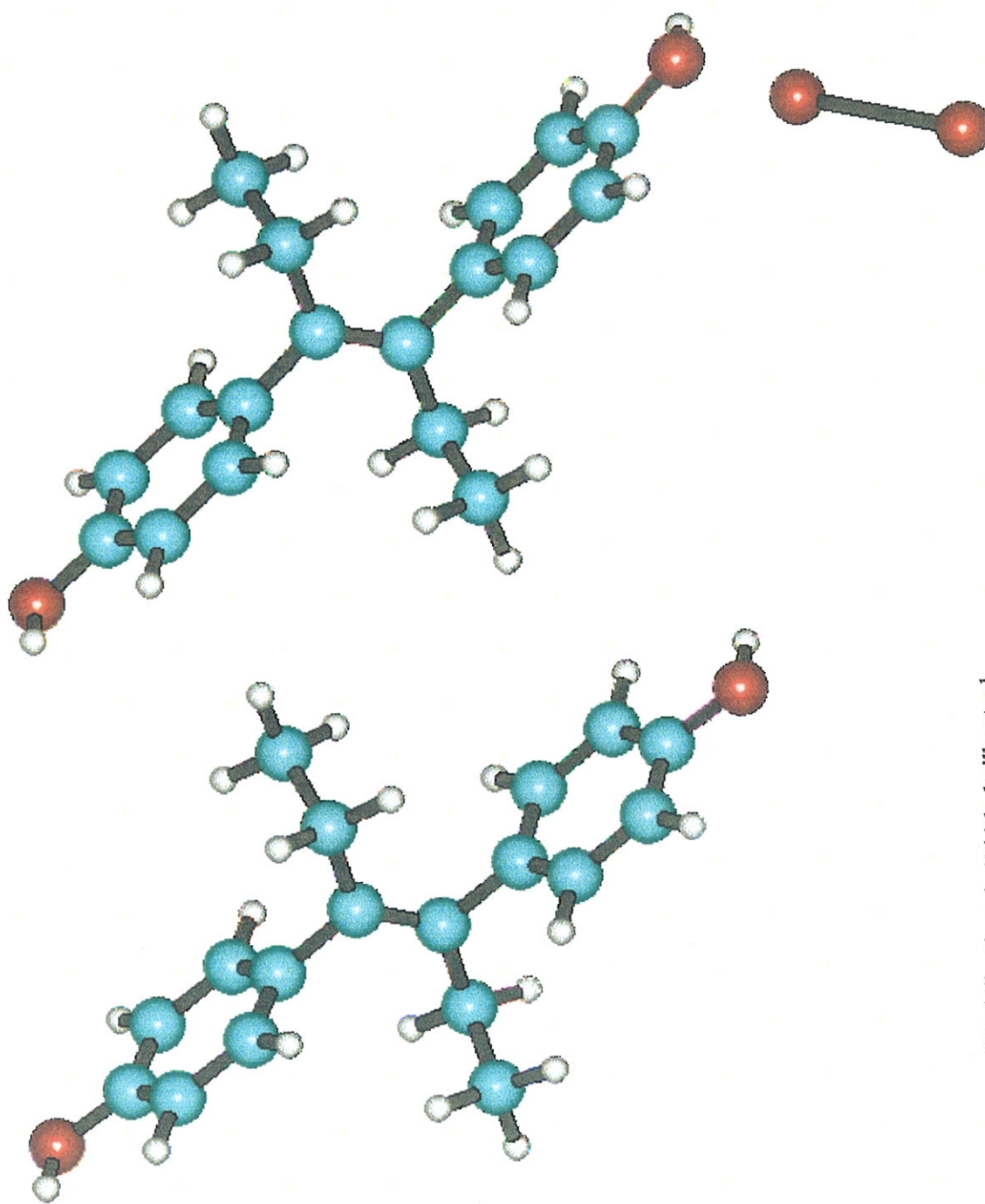


Modélisation du complexe I₂-Tamoxifène



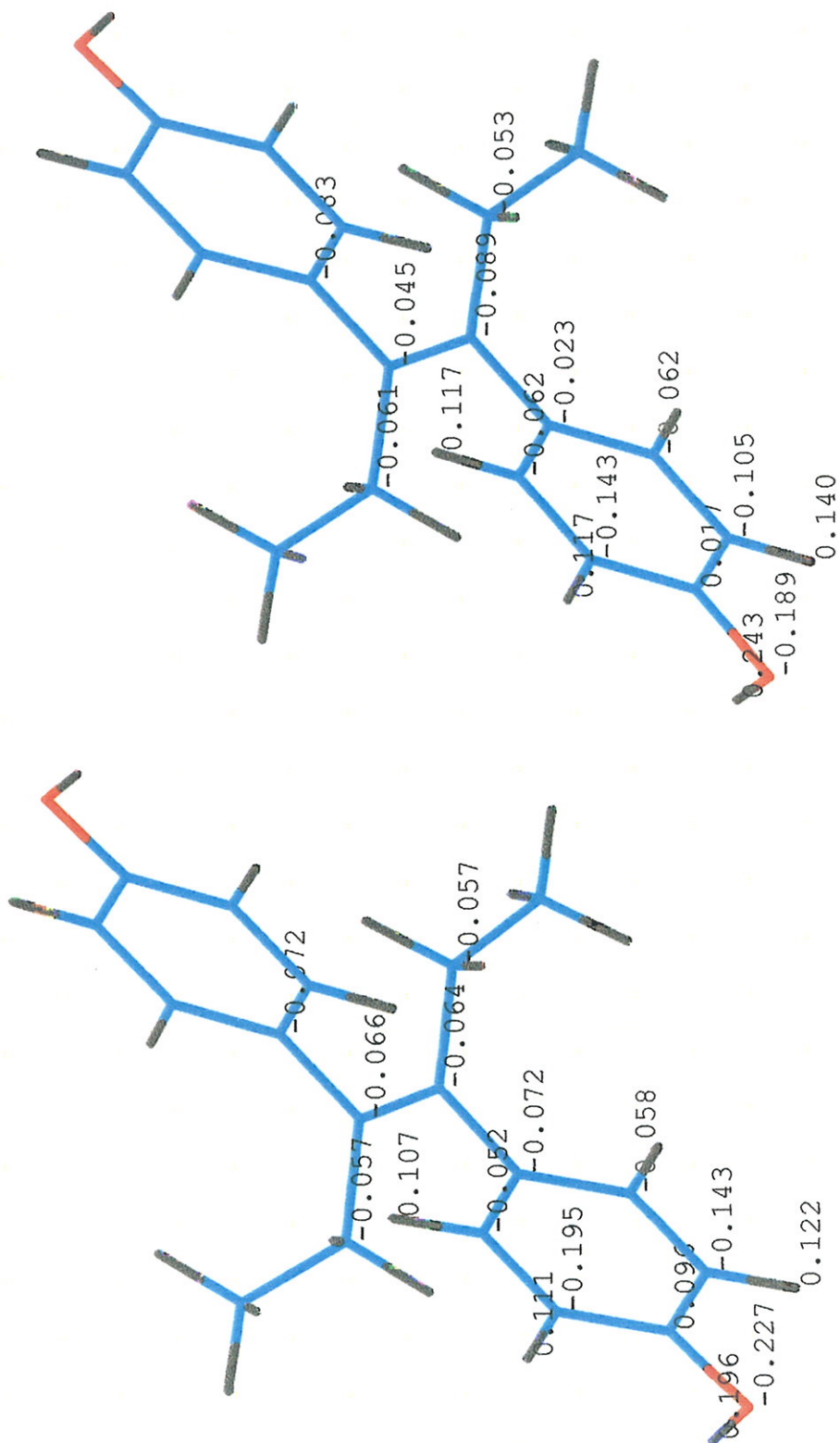
Visualisation des charges partielles atomiques dans le Tamoxifène

Visualisation des charges partielles atomiques dans le complexe I₂-Tamoxifène



Modélisation du Diéthylstilbestrol

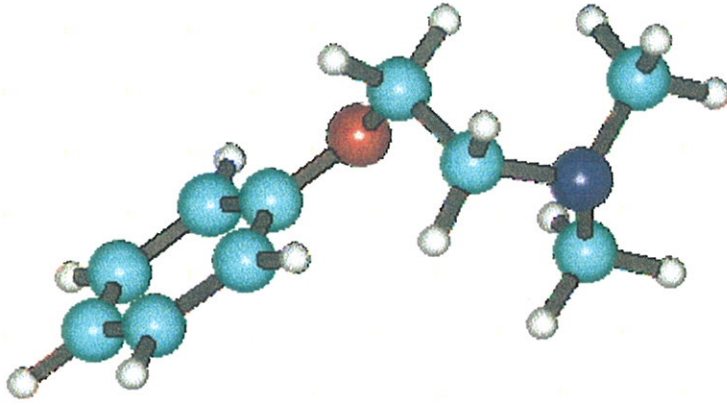
Modélisation du complexe I₂-Diéthylstilbestrol



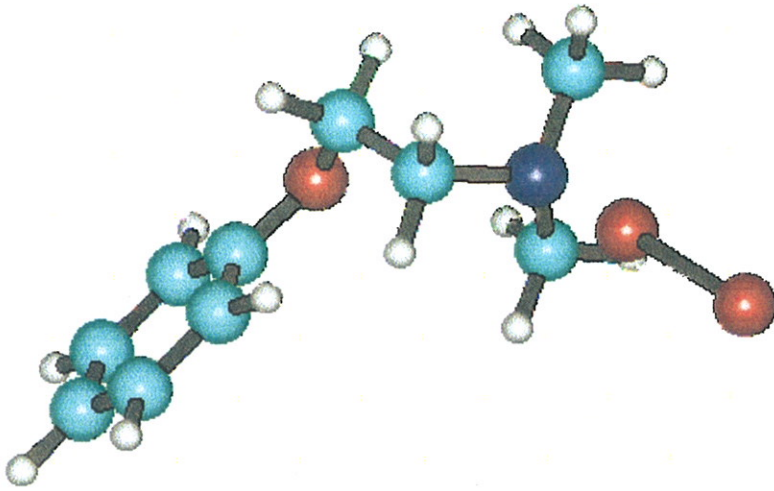
Visualisation des charges partielles atomiques dans le
Diéthylstilbestrol

Visualisation des charges partielles atomiques dans le complexe
L₂-Diéthylstilbestrol

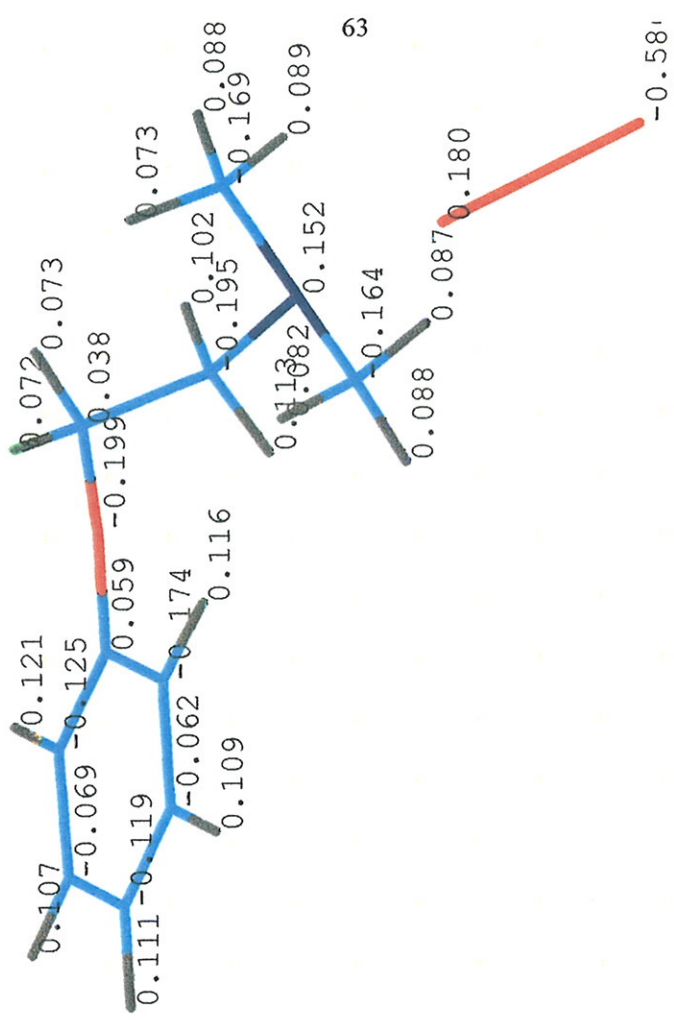




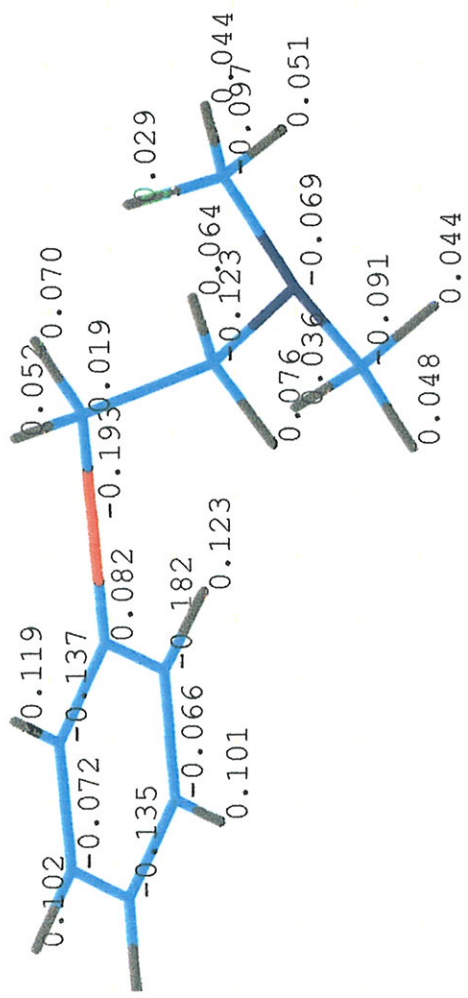
Modélisation du Diméthylphényléthanolamine



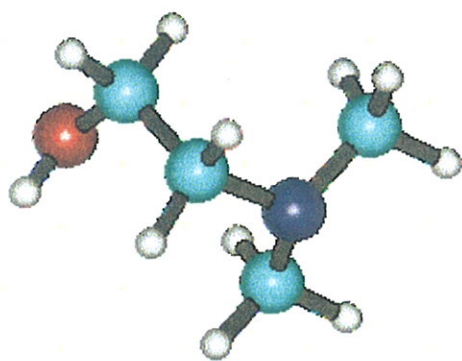
Modélisation du complexe I₂-Diméthylphényléthanolamine



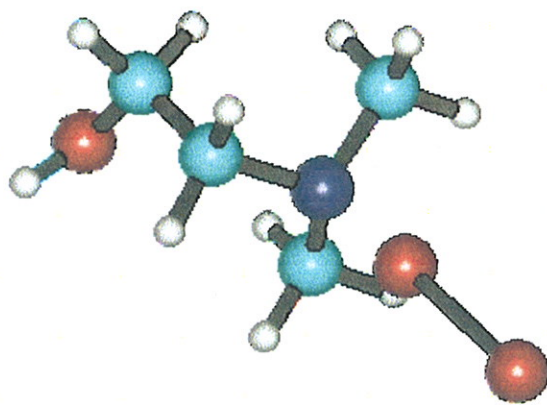
Visualisation des charges partielles atomiques dans le complexe
I₂-Diméthylphényléthanolamine



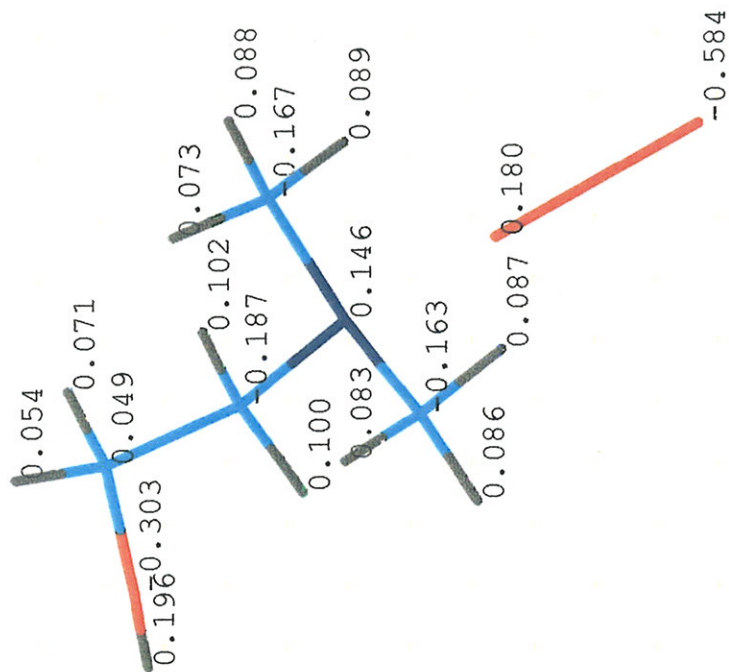
Visualisation des charges partielles atomiques dans le
Diméthylphényléthanolamine



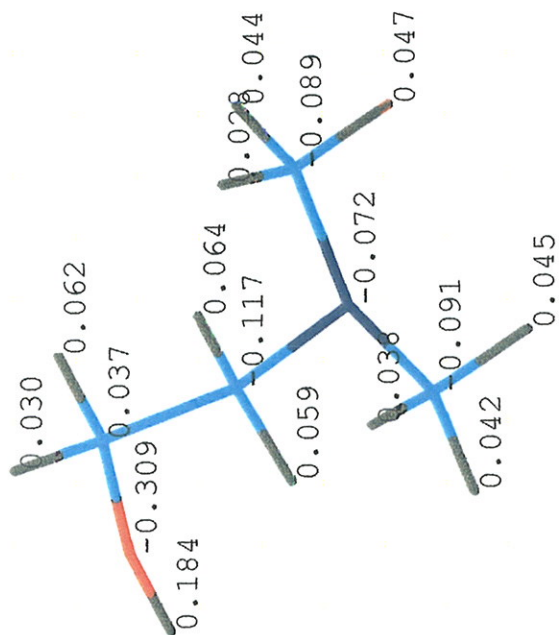
Modélisation du Diméthyléthanolamine



Modélisation du complexe I₂-Diméthyléthanolamine



Visualisation des charges partielles atomiques dans le complexe I₂-Diméthyléthanolamine



Visualisation des charges partielles atomiques dans le Diméthyléthanolamine

V.2.4. Conclusion :

	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔH_f (Kcal/mol)	ΔH_f D-A (Kcal/mol)	ΔH_f réaction (Kcal/mol)
Tamoxifene	-8.84	0.19	37.65	53.36	-5.02
DMEA	-9.01	2.58	-56.32	-40.36	-4.77
DMPEA	-8.97	0.29	-17.89	-1.67	-4.51

La présence d'un atome à fort pouvoir électrodonneur est nécessaire à la formation du complexe de transfert de charge. La complexation est favorisée par une orbitale HOMO d'énergie haute et bien localisée sur le site réactionnel.

Nous pouvons remarquer que le diéthylstilbestrol ne présente pas la capacité de former de complexe par transfert de charge avec l'iode. L'approche d'une molécule d'iode vers l'atome d'oxygène fixé sur le cycle benzénique ne provoque aucune modification des charges partielles atomiques.

Avec les autres molécules que nous avons testées nous pouvons remarquer que l'atome d'azote de la chaîne latérale joue un rôle prépondérant dans la formation d'un tel complexe : l'étude montre que dans chacune des molécules cet atome présente une charge partielle négative. L'approche d'une molécule d'iode vers ce site provoque une modification importante de la charge portée par cet azote puisqu'elle prend une valeur positive. Sur la molécule d'iode ; nous avons noté l'apparition d'une charge positive

pour l'atome dirigé vers l'azote et une charge négative sur l'atome le plus éloigné du site. Cette molécule d'iode étudiée seule ne présente aucune charge partielle.

Ces modifications électroniques traduisent l'apparition d'une liaison entre les deux atomes. Il y a donc en théorie formation d'un complexe entre l'iode et le tamoxifène ; ainsi qu'avec le diméthylaminoéthanol et le diméthylphénylaminoéthanol.

La formation de tel complexe est justifié par les valeurs déterminées pour l'enthalpie de réaction. Cette complexation ne nécessite aucun apport d'énergie ; elle se déroule spontanément, de plus nous pouvons voir que les complexes qui se sont formés sont stables.

VI. ETUDE IN VITRO

Avant d'affirmer que les molécules étudiées exercent une action sur le métabolisme de l'iode, et pour confirmer les résultats obtenus par modélisation moléculaire ; nous devons nous assurer qu'elles ont bien la capacité de complexer l'iode in vitro et de modifier l'activité de la peroxydase thyroïdienne.

VI.1. Présentation :

L'étude in vitro que nous avons réalisée comporte trois points :

Etude spectrophotométrique dans le domaine du visible avec détermination de la constante K_c de formation des complexes.

Etude spectrophotométrique dans l'ultraviolet.

Etude de l'inhibition de la peroxydase.

VI.2. Spectrophotométrie :

La formation d'un complexe selon la théorie que nous avons vu précédemment se traduit par une décoloration d'une solution d'iode. Ce premier test a été réalisé avant tout, il consiste à dissoudre quelques cristaux du produit dans une solution d'iode de concentration variable. Ceci nous a permis de voir que le diéthylsilbestrol n'avait pas la capacité de former un complexe ; confirmant les résultats obtenus avec la modélisation moléculaire.

Avec ce même test, les autres produits semblent donner des résultats que nous avons étudiés par spectrométrie.

Afin d'éviter lors de ces manipulations toute interférence du solvant avec la formation du complexe, nous avons utilisé le chloroforme qui ne présente pas d'absorption dans le même domaine que l'iode.

Les courbes que nous avons obtenues ont été réalisées par un spectrophotomètre double faisceaux Perkin Lambda permettant un enregistrement continu des spectres sans décalage de D.O. Les courbes ont été restituées sur informatique grâce au programme lambda UVlab© fonctionnant sous un environnement Windows©. Ce logiciel permet de déterminer avec exactitude la valeur des pics des courbes obtenues, ainsi que les valeurs nécessaires à la détermination de la constante K_c de formation des complexes.

Le matériel utilisé lors de ces manipulation est de la verrerie volumétrique de précision débarrassée de toute trace d'humidité ; en effet la présence d'eau amène la formation d'ion polyhalogéné perturbant la méthode d'analyse employée. Pour cela tout le matériel a subi un lavage à l'eau puis à l'alcool et enfin dans le chloroforme avant d'être séché sous un courant d'azote.

VI.2.1. Préparation des solutions à tester :

La solution d'iode utilisée a été préparée de façon extemporanée et préservée de la lumière. La concentration de cette solution est voisine de $10^{-3}M$.

Les solutions des produits à tester ont été réalisées dans le chloroforme. Nous avons dû effectuer plusieurs essais afin de déterminer la concentration nécessaire pour pouvoir obtenir des résultats permettant une étude comparative. Ces solutions ont également été réalisées de façon extemporanée par gravimétrie.

Pour réaliser les courbes suivantes, nous avons déterminé l'action de ces solutions dites solutions mères ainsi qu'à des dilution au $1/8^e$, $1/6^e$, $1/4^e$, et au $1/2^e$.

Nous disposions pour cette étude d'une série de cuves en quartz de 3 ml et de 1 cm de parcours optique.

Nous avons dans une première cuve une solution de référence qui ne contenait que la solution d'iode.

Une série de cuves fût ensuite testée avec un mélange à part égale de cette solution d'iode et des différentes dilutions de médicaments.

VI.2.2. Spectrophotométrie visible :

L'étude des spectres dans le visible va nous fournir les renseignements sur l'effet complexant de la molécule. Ils nous permettent de mettre en évidence la diminution de la concentration en iode dans la cuve avec les différentes dilutions réalisées. Ils permettent également de visualiser la présence d'un point

isosbestique. Ce point est important car il traduit la stoechiométrie 1 : 1 des complexes. Sa présence ainsi que la consommation régulière d'iode et l'apparition d'une bande de transfert de charge prouvent l'existence de la formation d'un seul et unique complexe.

A partir de cette même étude, nous avons la possibilité de déterminer de façon mathématique la constante K_c de formation du complexe. Dans le cas où la concentration en donneur est sensiblement égale à celle de l'accepteur, la méthode de calcul est une méthode dérivée de la méthode de Lang.

On utilise l'équation suivante :

$$K_c = \frac{[C]}{([A_0]-[C])([D_0]-[C])}$$

$[A_0]$ et $[D_0]$ sont les concentrations initiales respectives en accepteurs et en donneurs.

$[C]$: concentration du complexe.

K_c : constante de formation du complexe.

Il existe une relation entre la concentration d'une substance en solution et sa densité optique, elle est donnée par l'équation de Beer Lambert :

$$DO = \epsilon.l.[C]$$

[C] : concentration de la substance dans la solution.

l : longueur de la cuve.

ϵ : coefficient d'extinction molaire.

DO : densité optique.

Aux longueurs d'onde que nous avons choisies (400, 405, 410, 415, 420 et 425 nm) ; l'iode absorbe avec le complexe de façon négligeable, ce qui impose une correction de la densité optique lue : la densité optique du complexe correspond à la densité optique de la solution moins la densité optique de l'accepteur libre.

On obtient donc l'équation réarrangée suivante :

$$\frac{[A_0] \times [D_0]}{DO} = \left[[A_0] + [D_0] - \frac{DO}{\epsilon} \right] \frac{1}{\epsilon} + \frac{1}{\epsilon.Kc}$$

La résolution de cette équation est effectuée sur un ordinateur PC grâce à un programme mis au point par le Laboratoire de chimie organique et chimie thérapeutique.

VI.2.3. Etude dans l'UV :

La manipulation pour cette recherche a été effectuée avec les mêmes concentrations que pour le visible. Ceci a pour but de déterminer la présence d'une bande d'absorption appelée bande de transfert de charge ou BTC. Cette bande apparaît dans une région proche de l'UV où les deux composés absorbent, celle-ci est d'intensité supérieure à la somme de celles de chacun des composés. Elle est plus ou moins décalée vers les grandes longueurs d'ondes et possède un maximum à une longueur d'onde caractéristique du complexe par transfert de charge.

VI.2.4. Résultats :

VI.2.4.1. Le tamoxifène :

Nous avons réalisé une solution mère à une concentration de $[M] = 3,4724 \cdot 10^{-4} M$. A partir de cette première solution, nous avons préparé 4 autres solutions diluées :

au $1/8^e$ soit $[8] = 2,7779 \cdot 10^{-4} M$.

au $1/6^e$ soit $[6] = 2,0834 \cdot 10^{-4} M$.

au $1/4^e$ soit $[4] = 1,3889 \cdot 10^{-4} M$.

et au $1/2^e$ soit $[2] = 6,9448 \cdot 10^{-5} M$.

La concentration de la solution d'iode est $[I] = 5,6102 \cdot 10^{-4}M$.

Dans le visible :

L'étude de ces différentes concentrations nous permettent d'obtenir un spectre avec la présence d'un point isosbestique ainsi que de voir une consommation régulière de l'iode. Le tamoxifène possède un pouvoir électrodonneur.

$$K_c = 876 \pm 52 \text{ l/mol.}$$

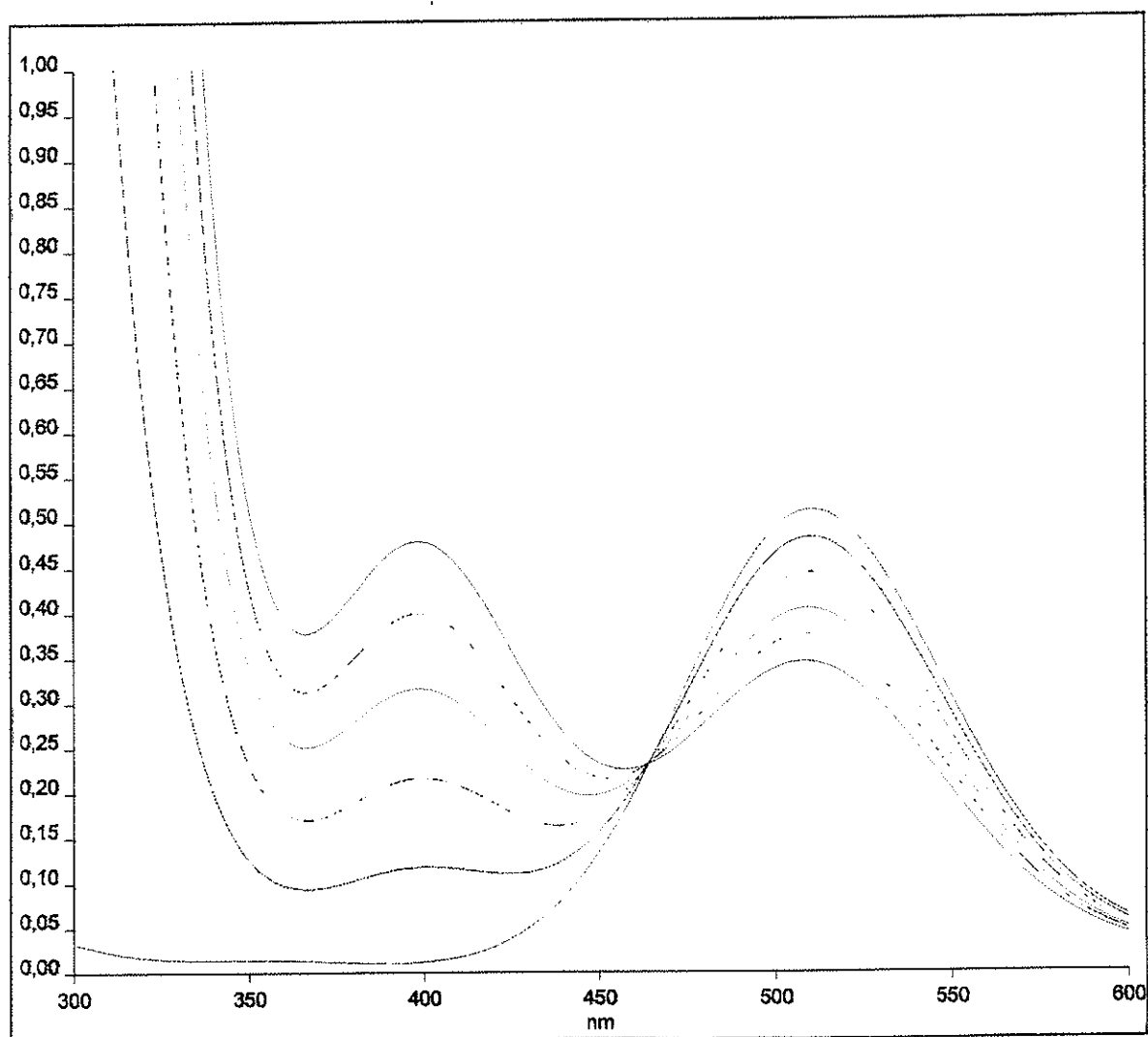
Dans l'UV :

La concentration de la solution d'iode est de $[I_2] = 5,6102 \cdot 10^{-4}M$. La concentration en donneur est une dilution au demi de la solution mère utilisée précédemment soit $[D] = 6,9448 \cdot 10^{-5}M$.

Le spectre fait apparaître une nouvelle bande de transfert de charge BTC dont le maximum a été déterminé à 273,5 nm.

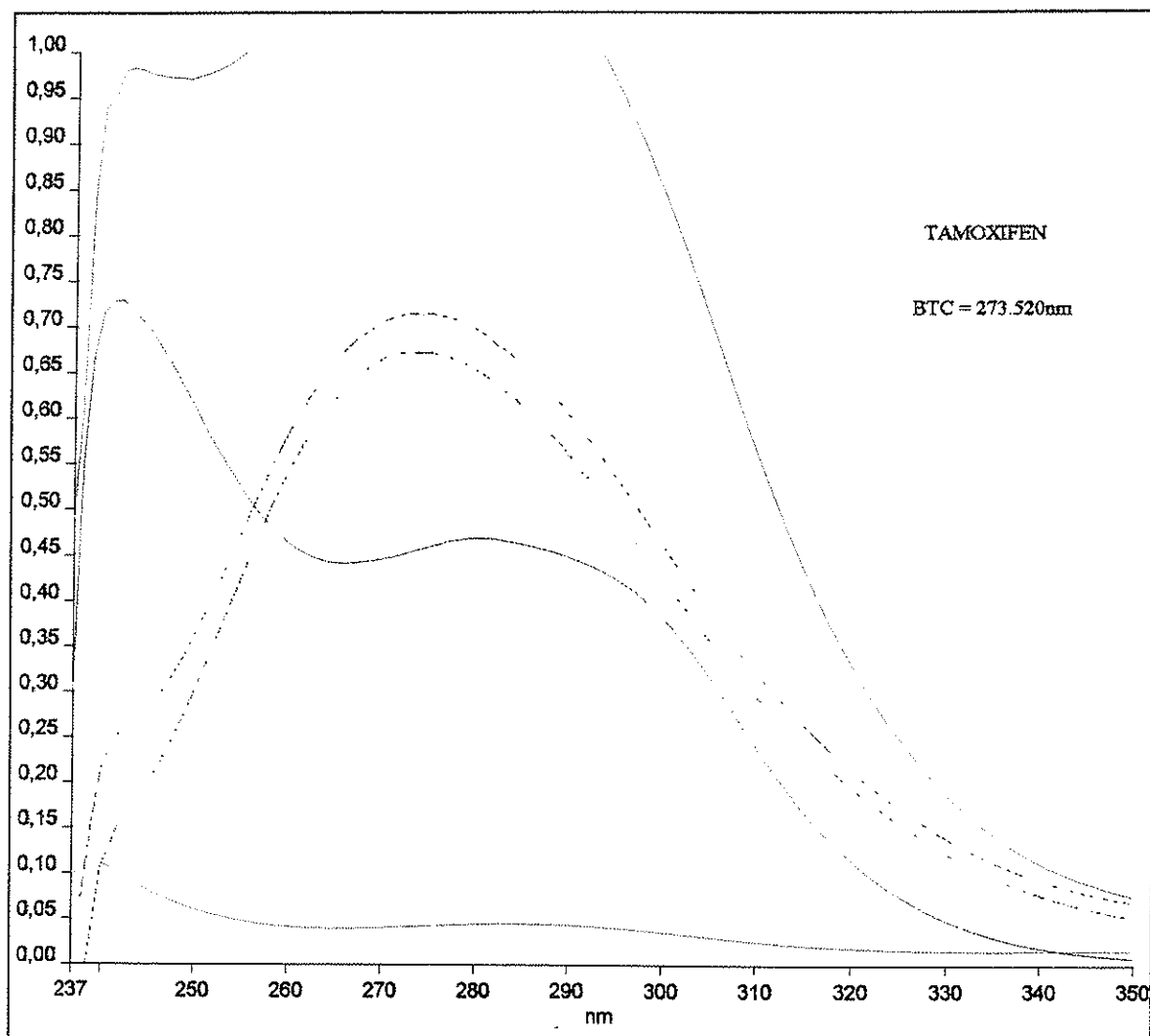
Les résultats obtenus par l'étude spectrométrique confirme la formation d'un complexe par transfert de charge avec l'iode.

Le tamoxifène a bien la capacité de complexer l'iode et donc de perturber la synthèse des hormones thyroïdiennes.



- [I₂] = 5,6102.10⁻⁴ M
- [M] = 3,4724.10⁻⁴ M
- - [8] = 2,7779.10⁻⁴ M
- [6] = 2,0834.10⁻⁴ M
- [4] = 1,3889.10⁻⁴ M
- [2] = 6,9447.10⁻⁵ M

Spectre d'absorption visible du tamoxifène et de I₂



- Donneur/solvant
- - - Complexe/solvant
- · - Complexe/donneur
- · · Iode
- - - BTC

Spectre d'absorption UV du tamoxifène

VI.2.4.2. Le diméthyléthanolamine :

Pour cette molécule, nous avons travaillé avec les concentrations suivantes :

$$[I_2] = 5,5314 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[M] = 9,6477 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[8] = 7,7181 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[6] = 5,7886 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[4] = 3,8590 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[2] = 1,9295 \cdot 10^{-4}M.$$

Dans le visible :

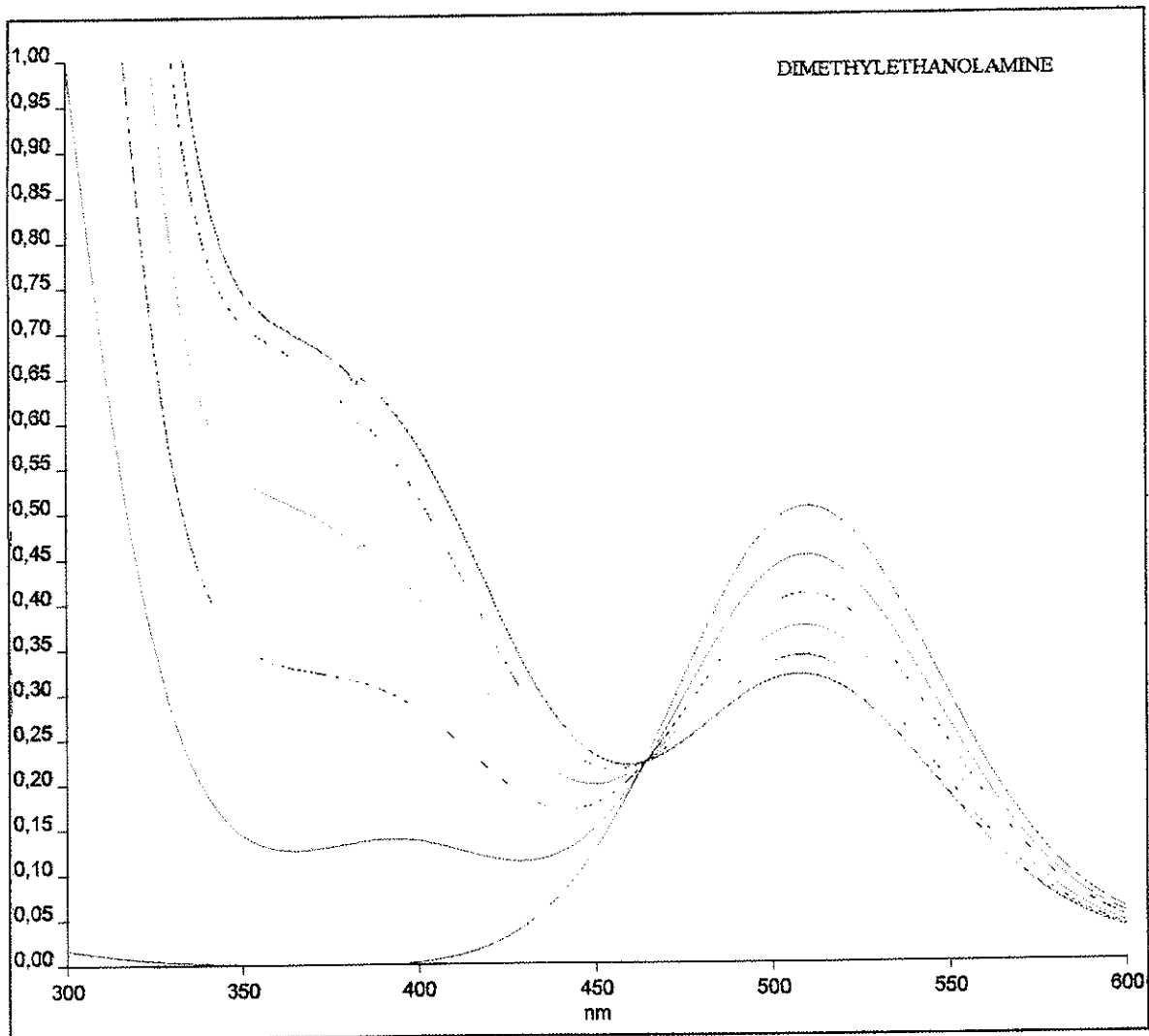
Cette recherche nous a montré la présence d'un point isosbestique ainsi qu'une consommation régulière en iode. La détermination du K_c nous a permis d'obtenir une valeur de $401,06 \pm 48$ l/mol.

Dans l'UV :

Les concentrations utilisées sont identiques à celles que nous avons utilisé pour l'étude dans le visible.

L'étude du diméthyléthanolamine dans ce domaine ne nous a pas permis de mettre en évidence de BTC.

Il semble que cette molécule soit complexante vis à vis de l'iode, elle aurait donc elle aussi la capacité d'induire des troubles thyroïdiens par captation de l'iode in vivo.



- [I_2] = $5,5314 \cdot 10^{-4} M$
- [M] = $9,6477 \cdot 10^{-4} M$
- - [8] = $7,7181 \cdot 10^{-4} M$
- [6] = $5,7886 \cdot 10^{-4} M$
- [4] = $3,8590 \cdot 10^{-4} M$
- [2] = $1,9295 \cdot 10^{-5} M$

Spectre d'absorption visible du DMEA et de I_2

VI.2.4.3. Le diméthylphényléthanolamine :

Le produit que nous avons synthétisé fut étudié aux concentrations :

$$[M] = 8,2424 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[8] = 6,5939 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[6] = 4,9454 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[4] = 3,2969 \cdot 10^{-4}M.$$

$$[2] = 1,6484 \cdot 10^{-4}M.$$

L'iode fut utilisé à une concentration de $[I_2] = 5,6496 \cdot 10^{-4}M$.

Dans le visible :

Les spectres nous indiquent, comme pour le tamoxifène et le diméthyl-éthanolamine, la présence d'un point isosbestique ainsi que la consommation d'iode.

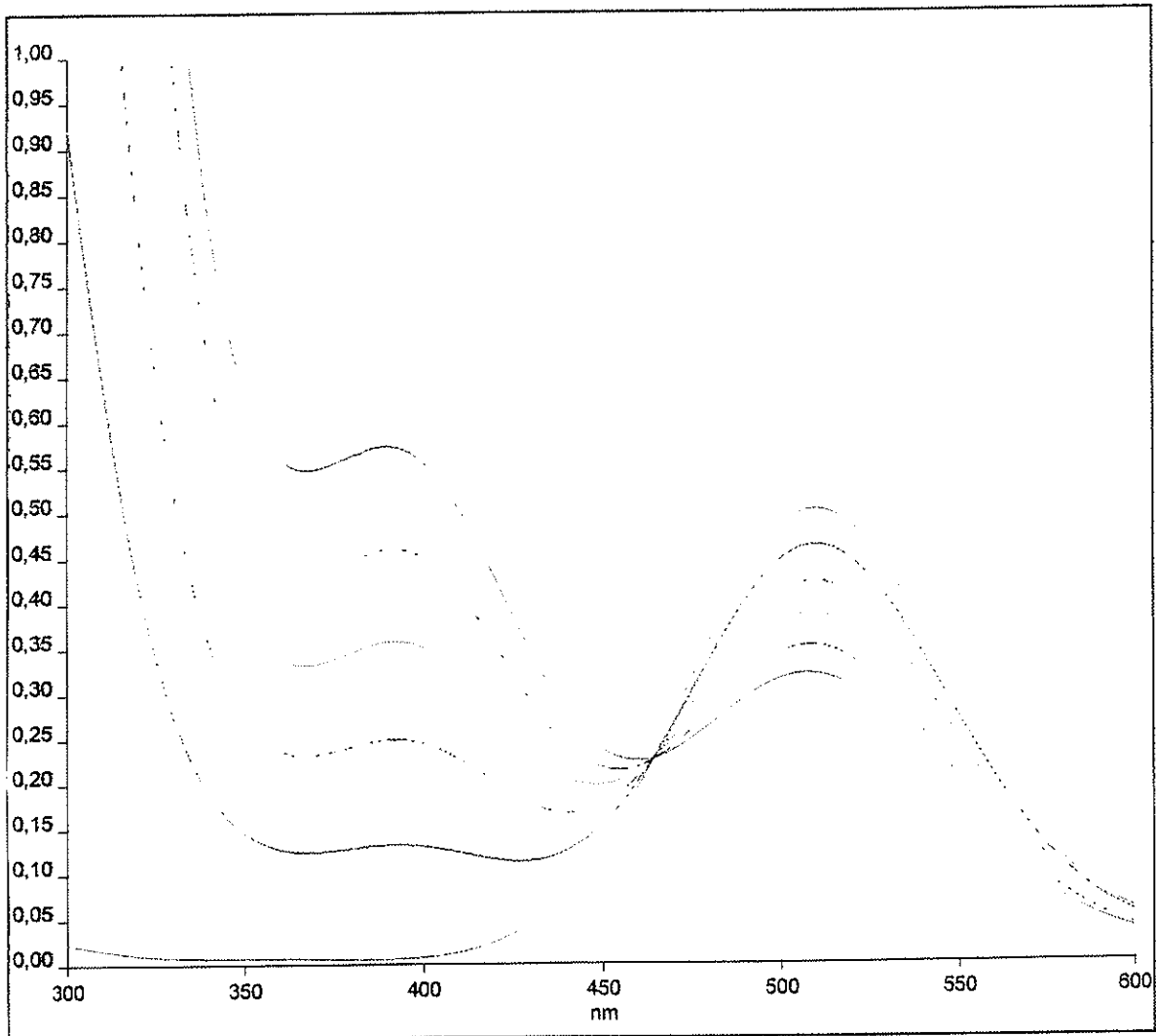
Nous avons pu déterminer une constante $K_c = 595,53 \pm 24$ l/mol.

Dans l'UV :

Les concentrations des solutions utilisées pour l'étude dans l'UV sont les mêmes que celles de l'étude dans le visible.

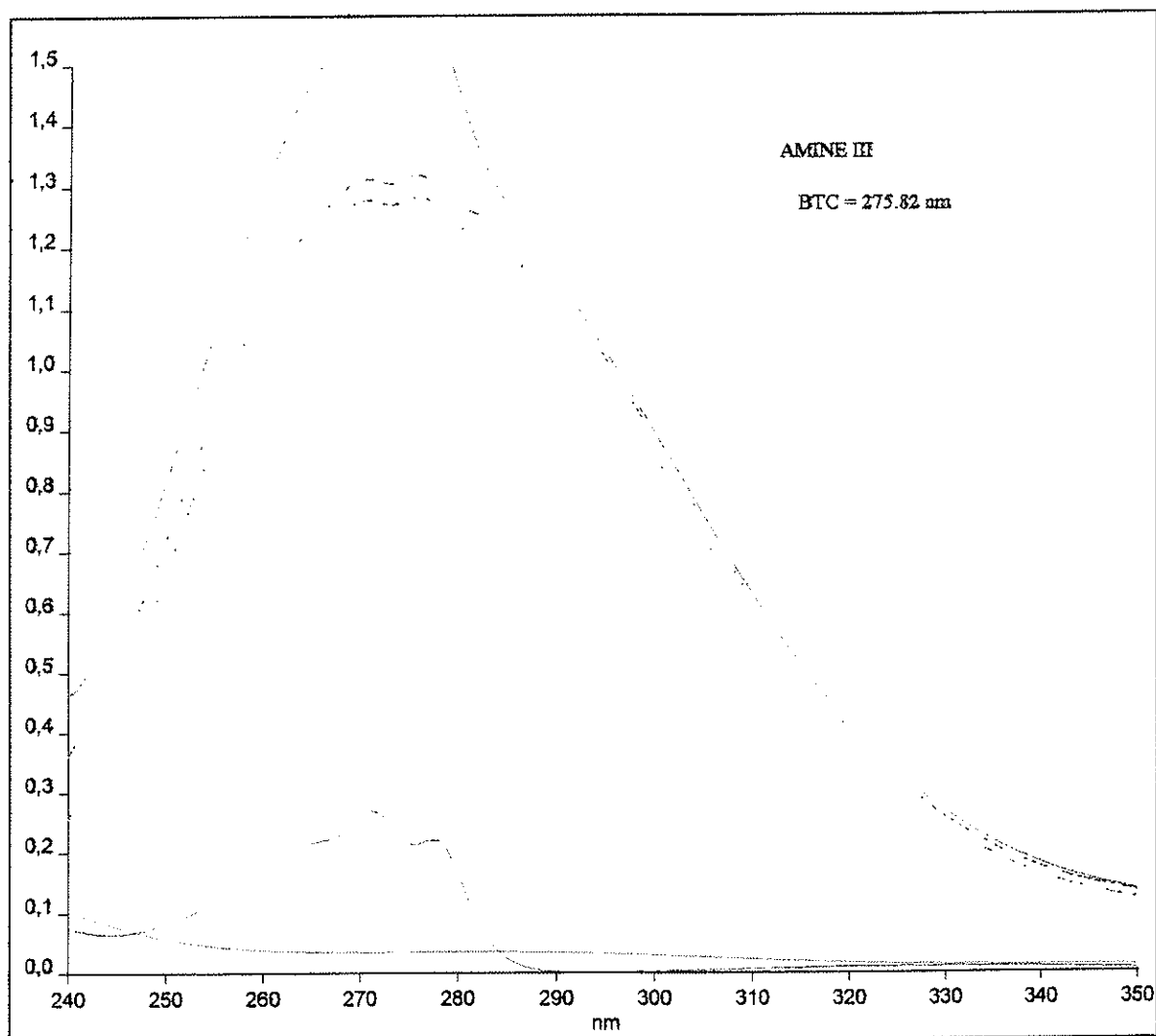
Nous avons remarqué la présence d'une bande par transfert de charge avec un pic maximum à 275,82 nm.

Le diméthylphényléthanolamine est donc électrodonneur au même titre que les deux précédentes molécules que nous venons d'étudier. Cet effet lui confère donc la capacité de complexer l'iode *in vivo* et d'induire des désordres thyroïdiens.



- [I₂] = 5,6496.10⁻⁴ M
- [M] = 8,2424.10⁻⁴ M
- [8] = 6,5939.10⁻⁴ M
- [6] = 4,9454.10⁻⁴ M
- [4] = 3,2969.10⁻⁴ M
- [2] = 1,6484.10⁻⁵ M

Spectre d'absorption visible du DMPEA et de I₂



- Donneur/solvant
- - - Complexe/solvant
- ... Complexe/donneur
- . - Iode
- BTC

Spectre d'absorption UV du DMPEA

VI.2.4.4. Le Méthimazole :

Le méthimazole ne fut pas étudié dans cette partie de notre recherche, nous avons utilisé ce produit comme référence dont l'étude et les valeurs avait été déterminées par M J.F.Lagorce.

Cet ATS possède selon les recherches déjà établies, dans le visible, un point isobestique et complexe l'iode avec une constante $K_c = 23194 \text{ l/mol}$.

VI.2.5. Conclusion :

L'étude spectrophotométrique de la formation des complexes a confirmé les résultats de la modélisation moléculaire que nous avons effectuée. Cet effet complexant apparaît être dû à la présence de l'azote sur la chaîne latérale du tamoxifène.

Cette fixation de l'iode par ces molécules pourra être à l'origine in vivo d'une carence iodée pour la formation des hormones thyroïdiennes.

VI.3. Peroxydase :

L'action de certains médicaments peut également se situer au niveau d'une enzyme : la peroxydase thyroïdienne. En inhibant son action, ces substances empêchent l'oxydation des iodures en iode ainsi que l'action catalytique de la peroxydase dans la biosynthèse des T3 et T4.

On peut retrouver une activité antithyroïdienne pour un produit grâce à cette action inhibitrice. Les ATS comme le méthimazole possèdent une double action en formant des complexes par transfert de charge avec l'iode mais aussi en inhibant l'action de cette enzyme.

Dans notre étude, nous avons utilisé la peroxydase de Raiford qui possède des propriétés similaires à l'enzyme thyroïdienne.

VI.3.1. Principe :

Nous avons déterminé l'activité normale de la peroxydase à pH7 dans un tampon phosphate à 20°C, en mesurant la variation de la densité optique d'une solution d'iodure de potassium en présence de peroxyde d'hydrogène. Cette activité est déterminée grâce à l'étude cinétique de la réaction.

Le milieu réactionnel sera placé dans une cuve en quartz de 3ml. La cinétique de la réaction est déterminée grâce à un spectrophotomètre type Kontron 860 UV-visible.

Pour chaque concentration de produit nous avons réalisé un essai cinétique et un essai de référence. Nous étudions ainsi le pourcentage d'inhibition ou d'activation de cette enzyme grâce à la formule :

$$\frac{V_{0x} - V_0}{V_0} = \text{pourcentage d'activation ou d'inhibition}$$

V_{0x} = vitesse initiale de la réaction avec le médicament

V_0 = vitesse initiale sans le médicament

VI.3.2. Solutions :

Tampon phosphate :

Pour réaliser ce tampon qui nous servira pour la préparation de toutes nos solutions, nous avons préparé une solution A contenant 3,57 g de $H_2K_2O_4P$ dans

500 ml d'eau distillée et une solution B avec 4,44 g de Na_2HPO_4 dans 500ml d'eau distillée. Après dissolution complète des cristaux, le mélange de 350ml de la solution A avec 500ml de la solution B, permet d'obtenir le tampon phosphate avec un pH de 7 à 20°C. Cette solution sera conservée à +4°C.

Peroxyde d'hydrogène :

Il est préparé de façon extemporanée à partir de 51µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% dans 20ml de tampon phosphate. Cette solution se conserve à +4°C et à l'abri de la lumière.

Iodure de potassium :

Nous avons utilisé une solution 0.1M.

Solution de peroxydase :

Réalisée avec 0,01g de peroxydase de Raifort dans 500ml de tampon.

Les solutions de médicament seront réalisées également dans le tampon phosphate.

VI.3.3. Résultats :

Le MMI, comme nous l'avons déjà cité, a fait l'objet de nombreuses études que nous n'avons pas refaites ; il possède une forte activité inhibitrice sur la peroxydase.

Le diéthylstilbestrol est insoluble dans le tampon phosphate, il est soluble dans le diméthylsulfoxyde(DMSO) mais il forme un louche avec l'addition d'une solution aqueuse qui rend toute étude en photométrie impossible.

Le tamoxifène est insoluble dans les solutions aqueuses ainsi que dans le DMSO.

Le diméthylphényléthanolamine est soluble dans le tampon phosphate ; il montre une activité légèrement activatrice sur la peroxydase de Raifort.

VI.3.4 Conclusion :

Les essais sur l'impact des médicaments sur l'activité de la peroxydase ne nous ont pas fourni de renseignements supplémentaires puisque la détermination de ces effets n'a pu être réalisée à cause de problèmes de solubilité qu'imposent cette manipulation. On ne pourra donc pas émettre de conclusion positive quant à une possible inhibition de cette enzyme.

VII. ETUDE IN VIVO

VII.1. Présentation :

Au vu des résultats obtenus dans l'étude in vitro, il nous est apparu nécessaire de réaliser une étude sur l'animal afin de vérifier notre conclusion.

Pour réaliser cette expérimentation, nous avons décidé de tester le MMI qui nous servira de témoin positif, le tamoxifène, le diméthyléthanolamine ainsi que le diéthylstilbestrol.

Nous avons également réalisé un lot de rats témoin qui nous servira de référence pour une euthyroïdie. Ces animaux ne recevront pas de traitement particulier mis à part une solution de gomme.

Au cours de cette étude nous avons effectué un contrôle hebdomadaire du poids des animaux.

Nous avons également contrôlé et comparé le poids des thyroïdes dans les différents lots, réalisé un dosage des hormones thyroïdiennes et une étude histologique de la glande.

L'étude in vivo a donc été réalisée sur 5 lots comprenant chacun trois rats de type Wistar mâles pendant un période de trois semaines.

Pendant la durée de l'expérience, chaque lot a reçu une alimentation spéciale afin de contrôler l'apport en iode par la nourriture. Nous leur avons fourni

un régime de Remington qui contient 30 μg d'iode par Kg. L'eau de boisson utilisée est une eau distillée additionnée en iodure de potassium à raison de 0,5 mg/l.

Chaque animal recevra en plus une dose du médicament à étudier à raison de 50 mg/kg/jour, 5 jours par semaine. L'administration a lieu par intubage gastrique, le produit ayant été préalablement mis en suspension dans une solution de gomme arabique à 12%. Ces suspensions sont conservées pendant une semaine à une température de $+4^{\circ}\text{C}$. Ces suspensions ont donc été préparées au début de chaque semaine. La quantité de produit mis en suspension a été modifiée en fonction du poids de chaque animal ceci afin de respecter la dose à administrer sans modifier le volume de suspension à leur distribuer.

Tous les animaux ont reçu un volume de 0,5 ml de suspension. Le lot témoin a donc reçu un volume de 0,5 ml de la solution de gomme arabique pure à titre de placebo.

Préparation de la solution de gomme arabique et des suspensions:

Après avoir mesuré un volume de 200 ml d'eau distillée et les avoir mis dans un erlenmeyer, nous avons porté cette eau à une température comprise entre 50 et 70°C .

L'eau tiédie est ensuite versée dans un mixer, dans lequel nous avons ajouté 24 g de gomme arabique. Après avoir obtenu une suspension homogène,

nous avons porté le mélange à ébullition pendant 30 mn sous agitation constante.

La solution de gomme ainsi préparée est ramenée à température ambiante, les médicaments y sont ensuite incorporés. Les poudres insolubles en solution aqueuse sont mises en suspension dans cette solution par agitation. Avant chaque administration nous avons veillé à remettre cette poudre en suspension.

A la fin de la période d'essai les animaux sont endormis à l'éther. Après ouverture de la cage thoracique, nous avons prélevé le sang de chaque animal par ponction cardiaque ; puis nous avons prélevé les deux lobes thyroïdiens au niveau du cou. Nous avons pour cela dégagé la trachée au niveau de la glande puis prélevé une partie de la trachée (environ 1 à 2 cm) ou était rattachée la thyroïde. Chaque glande a été aussitôt pesée puis congelée en vue de réaliser ultérieurement une coupe.

VII.2. Résultats :

VII.2.1. Evolution pondérale des animaux :

Pour réaliser une étude de l'évolution du poids des animaux, nous avons pesé chacun des quinze animaux avant les tests puis à la fin de chaque semaine.

L'analyse des résultats obtenus se fera sur une valeur moyenne de chaque lot ; ceci afin de limiter les erreurs dues aux variations individuelles des animaux.

Au début du traitement ; les animaux ont été répartis de telle sorte que nous ayons un poids moyen par lot équivalent. Les résultats repris dans le tableau « évolution pondérale » nous permettent de voir que les animaux traités par tamoxifène et diéthylstilbestrol présentent un retard de croissance très important par rapport aux rats du lots témoin de l'ordre de 50%. Ce retard est plus marqué que pour le MMI considéré comme notre référence positive.

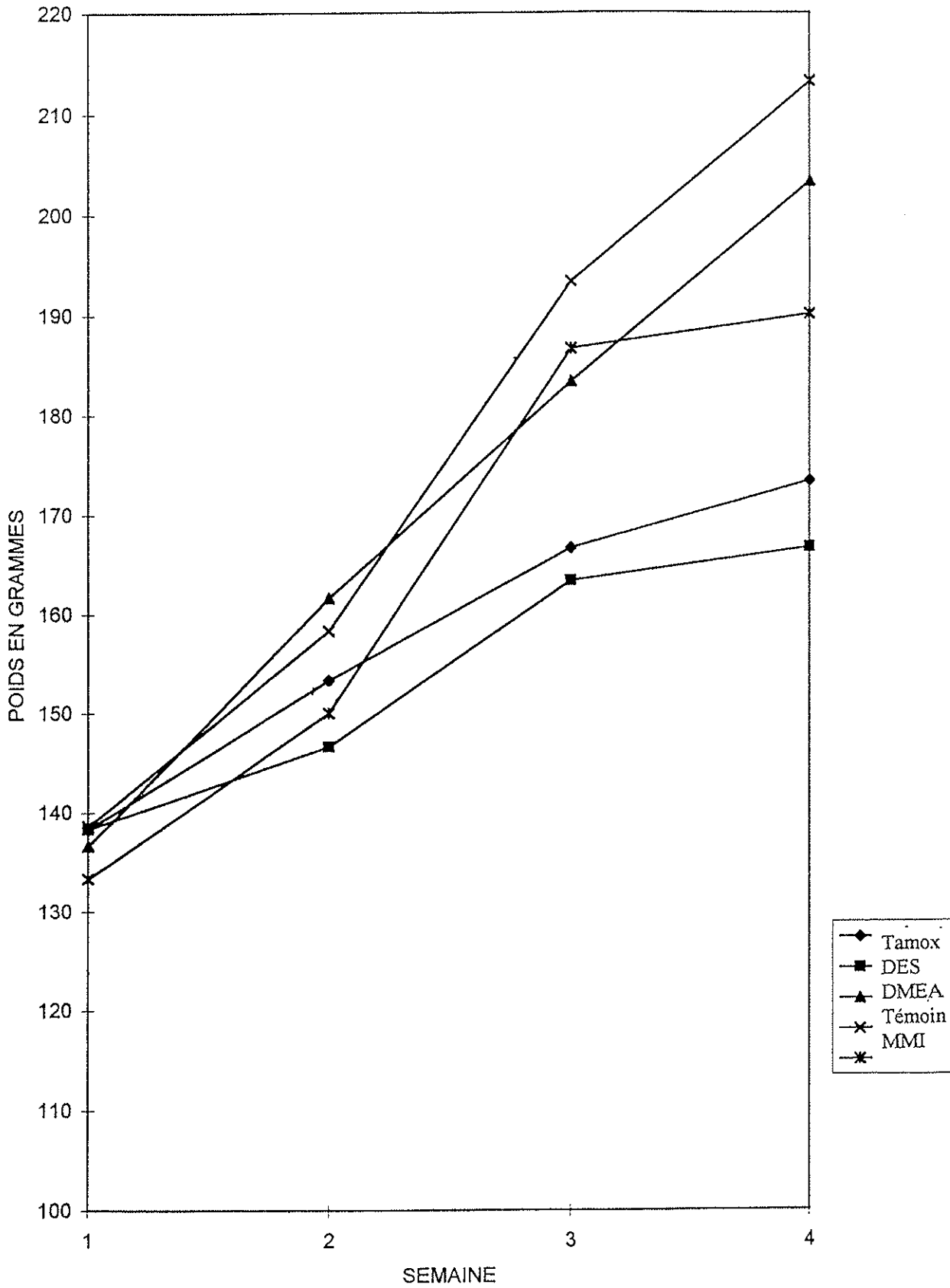
Le DMEA a lui aussi provoqué un léger retard de croissance chez les animaux mais de façon moins marquée.

Ces résultats nous montrent l'importance de la partie cyclique du tamoxifène dans son activité antithyroïdienne.

	Poids avant traitement	Une semaine	Deux semaines	Poids apres trois semaines de traitement	Variation de poids en grammes	Evolution en pourcentage
Tamoxifène	1	160	180	180		
	2	150	160	180		
	3	150	160	160		
	<i>moyenne</i>	<i>153,3</i>	<i>166,6</i>	<i>173,3</i>	<i>35</i>	<i>25,3</i>
Diéthylstilbestrol	1	140	160	160		
	2	150	170	180		
	3	150	160	160		
	<i>moyenne</i>	<i>146,6</i>	<i>163,3</i>	<i>166,6</i>	<i>28,3</i>	<i>20,4</i>
Diméthyléthanolamine	1	160	190	210		
	2	160	180	200		
	3	165	180	200		
	<i>moyenne</i>	<i>161,6</i>	<i>183,3</i>	<i>203,3</i>	<i>66,7</i>	<i>48,8</i>
Témoins	1	145	180	200		
	2	140	200	220		
	3	135	200	220		
	<i>moyenne</i>	<i>138,6</i>	<i>193,3</i>	<i>213,3</i>	<i>74,7</i>	<i>53,9</i>
MMI	1	150	200	190		
	2	150	180	180		
	3	150	180	200		
	<i>moyenne</i>	<i>150</i>	<i>186,6</i>	<i>190</i>	<i>56,7</i>	<i>42,5</i>

EVOLUTION PONDERALE

EVOLUTION PONDERALE DES ANIMAUX



VII.2.2 Evolution poids thyroïde/poids de l'animal :

Après prélèvement de chaque thyroïde, nous les avons soigneusement pesées.

Afin de pouvoir obtenir des résultats comparables, le poids de la glande est rapporté à 100 g de poids de l'animal.

L'étude est réalisée sur les valeurs moyenne de chacun des lots.

Si on utilise le lot de rats témoin comme référence, on devrait avoir un poids pour la thyroïde de 5,76 mg/100 g de rat ; ces animaux étant considérés comme normothyroïdiens.

Tous les autres lots possèdent un poids supérieur à notre référence traduisant un fonctionnement anormal de la thyroïde ; identique à celui que l'on peut rencontrer lors d'une carence iodée.

Le MMI provoque une élévation de 240% du poids de la thyroïde ; le DMEA de 29% et le DES de 62%. Le tamoxifène provoque une augmentation de poids de 45% par rapport au témoin.

Tous les composés testés ont donc une activité antithyroïdienne plus ou moins marquée.

	Poids de l'animal	Poids de la thyroïde	Poids thyroïde/100 g de rat
Tamoxifène	1	0,0101	0,00561
	2	0,0154	0,00855
	3	0,0177	0,01106
	<i>moyenne</i>	<i>0,0144</i>	<i>0,00831</i>
Diéthylstilbestrol	1	0,0123	0,00768
	2	0,0194	0,01077
	3	0,0155	0,00968
	<i>moyenne</i>	<i>0,0157</i>	<i>0,00942</i>
Diméthylethanolamine	1	0,0131	0,00623
	2	0,0147	0,00735
	3	0,0177	0,00885
	<i>moyenne</i>	<i>0,0152</i>	<i>0,00747</i>
Témoin	1	0,0112	0,0056
	2	0,0139	0,00632
	3	0,0118	0,00536
	<i>moyenne</i>	<i>0,0123</i>	<i>0,00576</i>
MMI	1	0,0472	0,02484
	2	0,0307	0,01615
	3	0,0347	0,01735
	<i>moyenne</i>	<i>0,0375</i>	<i>0,01974</i>

Evolution du poids des thyroïdes

VI.2.3. Dosage des T3 et T4 :

La glande thyroïdienne, comme nous l'avons vu précédemment, permet la synthèse de deux hormones : la L-thyroxine ou T4 et la L-triiodothyronine ou T3.

Une hyperactivité de la glande se traduit par une élévation des taux sériques de ces hormones sous leur forme libre ; une hypoactivité par une diminution des valeurs normales(12),(13).

Pour notre étude ; le sang de chaque animal a été prélevé dans des tubes de verres secs. Après coagulation, les échantillons ont été centrifugés à 2500G pendant dix minutes. Le sérum surnageant a ensuite été récupéré afin de réaliser le dosage des T3 et T4.

La teneur en T4 libre a été mesurée par une méthode enzymatique en phase homogène. Cette étude utilise une réaction immunologique par inhibition enzymatique. Ceci consiste à mettre en compétition un T4 inhibiteur enzymatique et la T4 du sérum vis à vis de sites anticorps. Le traceur lié contre le traceur libre est mesuré par la capacité qu'à le conjugué libre d'inhiber de manière irréversible l'activité enzymatique.

Résultats obtenus :

	Dosage des T4 en pg/ml	Dosage des T3 en pg/ml
Témoins	12.1 13.2 10.8 moyenne :12.03	3.6 3.3 3.5 moyenne :3.46
Tamoxifène	14.4 12.3 14.2 moyenne :13.63	4.8 4.7 3.6 moyenne :4.36
Diméthyléthanolamine	10.9 9.9 11.0 moyenne :10.60	3.8 3.1 3.5 moyenne :3.46
MMI	3.7 7.9 5.8 moyenne :5.80	4.1 4.6 4.2 moyenne :4.30
Diéthylstilbestrol	6.4 14.6 13.2 moyenne :11.40	2.5 4.2 3.33 moyenne :3.33

Chez les animaux témoins, les taux de T3 et T4 s'élèvent à 3.46 et 12.03 pg/ml.

Pour les animaux traités par un antithyroïdien de synthèse (ATS), le taux de T4 s'effondre à 5.8 pg/ml.

On peut remarquer que les autres produits ne provoquent pas de modifications significatives des taux sériques des hormones thyroïdiennes.

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure à un effet antithyroïdien de ces produits.

VII.2.4. Etude histologique :

Après prélèvement et pesage de chaque glande, celles-ci sont placées dans une solution.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un cryostat sont ensuite fixées sur lames puis subit une coloration H.E.S.

Principe d'une coloration H.E.S :

Cette coloration permet de mettre en évidence les noyaux des cellules, ainsi que la paroi de ces thyrocytes.

La coloration H.E.S. ou hémateïne - éosine - safran. consiste à mettre en contact les coupes avec de l'hémateïne pendant 5 minutes, puis lavée avec de l'eau, les coupes sont placées dans de l'éosine pendant 3 minutes. Après un bain d'alcool, les lames sont ensuite mises dans un bain de safran pendant 5 minutes. Les coupes sont enfin lavées avec de l'alcool puis montées entre lame et lamelle avant d'être observées sur microscope à un grossissement de 578.

La coupe n°1, de la thyroïde d'un rat témoin correspond à l'activité de la glande au repos. Dans cet état les cellules de l'épithélium présentent un aspect cubique avec un noyau en position centrale. La colloïde présente un aspect homogène et de taille importante.

Dans le cas d'un hyperfonctionnement thyroïdien, l'aspect des thyrocytes est modifié. Ceux-ci apparaissent de taille supérieure à ceux de la glande au

repos, sont de forme plus ou moins cylindrique. La colloïde diminue sensiblement de volume.

On distinguera un aspect de sécrétion (stimulation de fabrication de thyroglobulines) où les noyaux des cellules sont médians avec apparition de vacuoles au pôle basal du thyrocyte ; et un aspect d'excrétion (stimulation de T3 et T4) , dans ce cas les noyaux sont situés au pôle basal, il existe des vacuoles en périphérie de l'épithélium au pôle apical de la cellule.

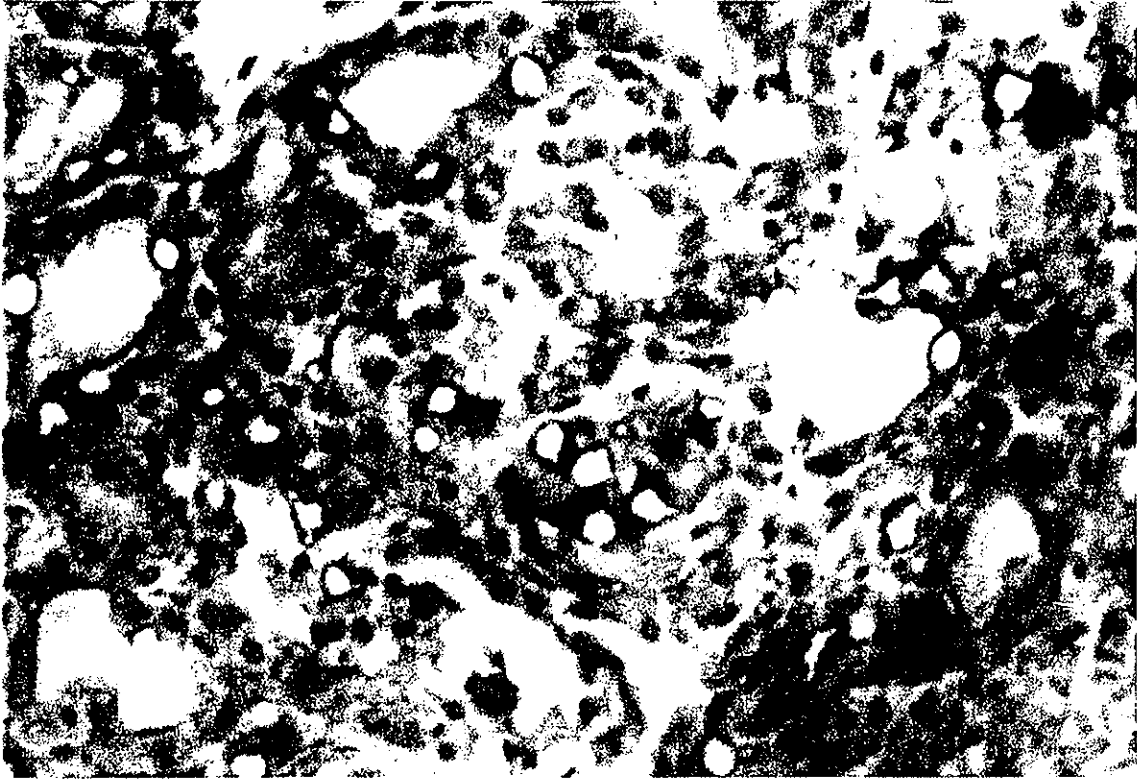


Photo n°1 : Témoin

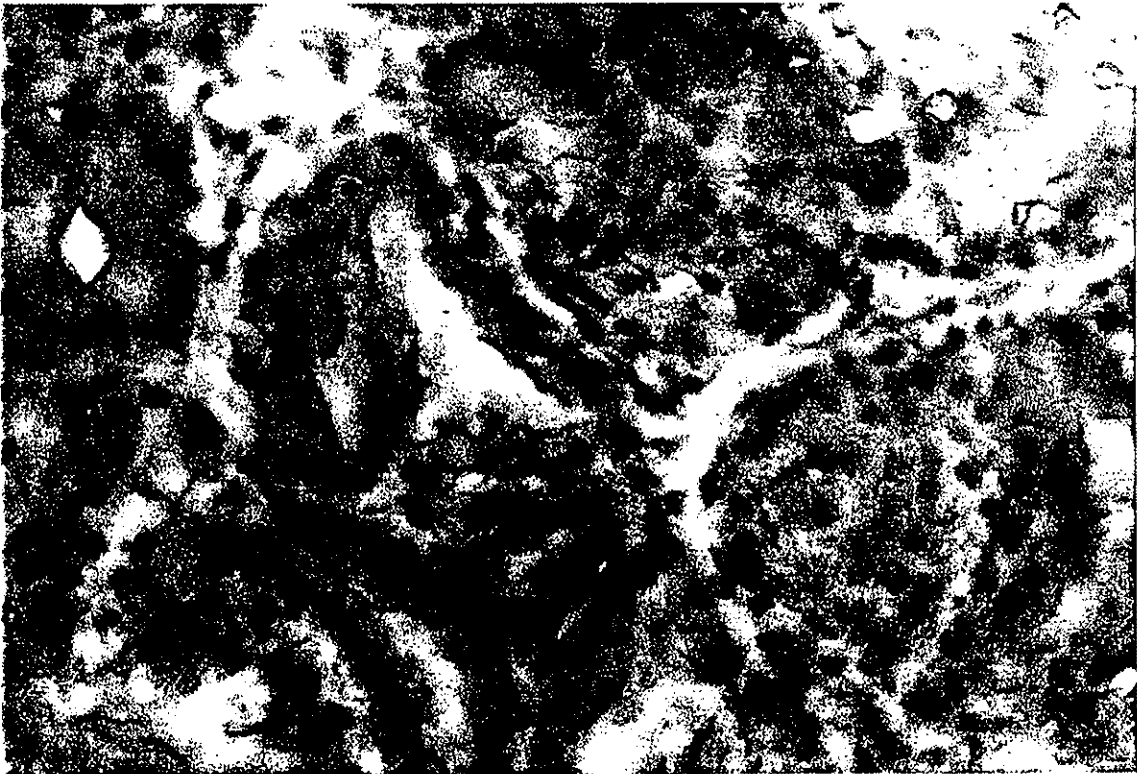


Photo n°2 : Méthimazole

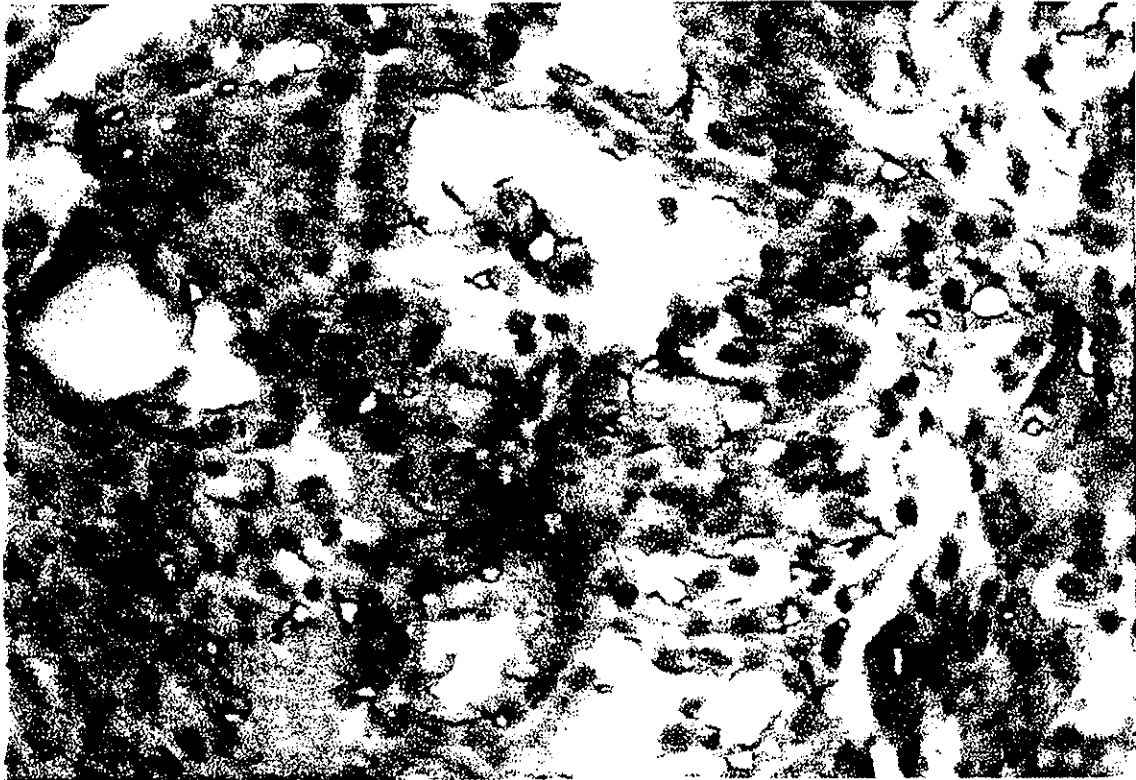


Photo n°3 : Tamoxifène



Photo n°4 : Diéthylsilbestrol

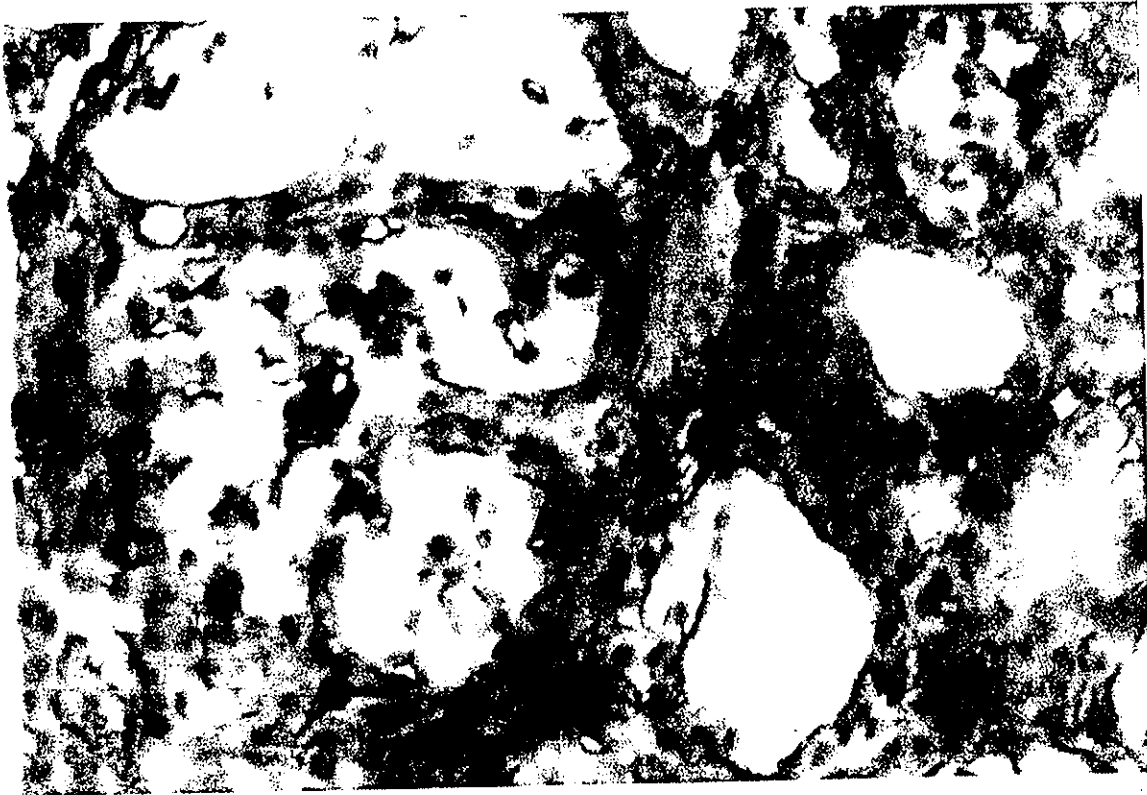


Photo n°3 : diméthyléthanolamine

Coupe n°2 : Méthimazole.

La colloïde présente un aspect nettement réduit par rapport au témoin. L'épithélium est composé de cellules cylindriques. On peut noter l'apparition de vaisseaux conjonctifs. Cette coupe nous donne l'aspect d'une thyroïde à type d'excrétion importante.

Coupe n°3 : Tamoxifène.

La colloïde présente un volume réduit voire inexistant, mais d'un aspect plus clair que chez les animaux témoins. Les cellules sont de forme cylindro-cubique avec un noyau au pôle apical des thyrocytes.

Coupe n°4 : Diéthylstilbestrol.

Vacuoles de grandes tailles dans une colloïde d'aspect homogène, les cellules de l'épithélium sont de forme cylindrocubique avec un noyau en position central.

Coupe n°5 : Diméthyléthanolamine.

Les cellules de l'épithélium sont de forme cubique avec un noyau au pôle basal de la cellule. La colloïde est réduite présentant des vacuoles de résorption.

Tous les produits testés provoquent des modifications de l'aspect de la glande thyroïdienne. L'étude de l'épithélium et de la colloïde traduit un hyperfonctionnement à type d'excrétion.

VII.3. Conclusion de l'étude in vivo :

L'étude in vivo de ces produits nous montre qu'ils ont tous un effet anti-thyroïdien soit par complexation de l'iode soit par inhibition de la peroxydase.

Les effets les plus marqués se retrouvent avec le DES et le tamoxifène. Ces effets se traduisent par une diminution très significative du gain de poids de l'animal et par une élévation du poids de la thyroïde rapporté à 100g de poids vif.

L'étude histologique de la glande nous confirme qu'il y a eu chez ces animaux une perturbation du fonctionnement normal de la glande bien que l'on ne retrouve pas de variations dans le dosage sérique des hormones thyroïdiennes par rapport au lot de rats témoins.

Une étude animale portant sur une période de plusieurs mois nous aurait certainement permis d'affiner ces résultats, de même qu'un nombre plus élevé d'animaux aurait permis d'effectuer une étude statistique plus précise.

VIII. CONCLUSION

Notre étude sur le tamoxifène nous a permis de mettre en évidence que cette molécule avait une structure favorable à la formation de complexes avec l'iode par transfert de charges. Ceci a été démontré par des expériences in vitro. Le complexe formé présente une grande stabilité. Ces résultats que nous avons repris dans le tableau récapitulatif p107 furent confirmés par l'étude in vivo chez le rat.

Le tamoxifène a ainsi la capacité de capter l'iode nécessaire à la formation des hormones thyroïdienne. Il pourra être à l'origine de perturbation plus ou moins importantes chez les femmes ayant recours à cette médication, bien qu'il n'ait pas une activité aussi importante que le MMI.

Cette recherche a permis également de déterminer les sites permettant cette complexation ; l'étude réalisée sur des molécules correspondantes aux chaînes principales du tamoxifène a fait apparaître l'importance de la présence d'atome d'azote dans ces réactions.

Le DES bien que n'ayant pas de chaîne latérale azotée a montré un effet antithyroïdien chez l'animal ; ceci a probablement pour origine une action inhibitrice sur la peroxydase thyroïdienne ; cet effet n'a pu être démontré lors de nos expériences.

Le DMEA, correspondant à la chaîne latérale du tamoxifène a une activité antithyroïdienne relative chez l'animal, les désordres qu'il peut induire sont négligeables sur une courte période.

Le DMPEA semble avoir un pouvoir électrodonneur supérieur au DMEA, nous n'avons déterminé son impact chez l'animal par manque de données pharmacologiques, mais nous pouvons penser que les résultats que nous aurions obtenus seraient proches de ceux obtenus avec le DMEA voire supérieurs.

	Ehomo	Elumo	Hf	Hf réaction	Pt iso	Kc	T3	T4	Peroxydase	poids	poids thyroïde	épithélium
témoins							3,4	12,03		+53.9%	5,76 mg	cubique
tamoxifene	-8,84	0,19	37,65	-5,02	oui	876	4,3	13,6		+25.3%	8,31 mg	cylindro cubique
DMEA	-9,01	2,58	-56,32	-4,77	oui	401	3,46	10,6		+48.8%	7,47 mg	cubique
DES							3,3	11,4		+20.4%	9,42 mg	cylindro cubique
DMPEA	-8,97	0,29	-17,89	-4,51	oui	595			activateur			
MMI					oui	23194	4,3	5,8	inhibiteur	+42.5%	19,74 mg	cylindrique

IX. BIBLIOGRAPHIE

- 1 **D.W.ROBERTSON, J.A.KATZENE.** Synthésis of the E and Z isomers of antiestrogen tamoxifen and its metabolite, hydroxytamoxifen in tritium labeled form. American chemistry society. 1982, 47, 2387.
2. **B.J.A.FURR, J.S.PATTERSON, D.N.RICHARDSON, S.R.SLATER, A.E.WAKELING.** Tamoxifen, pharmacology biochemistry. Prop drug substances. 1979, 2.
3. **B.J.A.FURR, V.C.JORDAN.** The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. Pharmac Ther. 1984, 5, 127.
4. **M.MT.BUCKLEY, K.L.GOA.** Tamoxifen. Adis press drugs. 1989, 37, 451.
5. **C.FABIAN, L.STERNSON, M.EL SERAFI, L.CAIN, E.HEARNE.** Clinical pharmacology of tamoxifen in patients with breast cancer. American cancer society. 1981, 48, 876.
6. **Tamoxifen** : what it is, what it does. NABCO News (national alliance of breast cancer organisation). Vol II. Number 4. 1988, 2p.
7. **R.RICHARD, BARAKAT, MD.** Tamoxifen and endometrial cancer. Cancer control journal. Department of surgery at Meriol Sloan Kelting cancer center, NY. 1996, 9p.
8. **B.BARTMAN.** L'effet cancérigène du tamoxiféne. Libération. 24/02/97, 20.
9. **D.PIEDRAT.** Vos seins mieux surveillés mieux protégés. Top santé. Juin 1996, 34.
10. **J.J.P.STEWART.** Optimization for parameters for semi-empirical methods. 1. Method. J.Comput. Chem. 1989, 10, 209.

11. **J.J.P.STEWART.** Optimization for semi-empirical methods. 2.

Applications. J.Comput. Chem. 1989, 10, 221.

12. **F.COMBY, J.F.LAGORCE, J.A.NICOLAS, C.RABY,**

J.BUXERAUD. Action antithyroïdienne du lévamisole et du triméthoprim

chez le mouton. Revue médicale vétérinaire. 1991, 142, 1, 49.

13. **F.COMBY, A.C.JAMBUT ABSIL, J.C.THOMAS, J.CLAUDE,**

J.BUXERAUD, C.RABY. Action de quelques molécules sur la fonction

thyroïdienne et influence sur la prise de poids des animaux traités. Rec Med Vet.

1989, 165(4), 389.

Ouvrages et thèses consultés :

ALLINGER, CAVA, JOHNSON, DE JONGH, LEBEL, STEVENS,
Mc GRAW HILL. Chimie organique. Tome I. Ed universitaires. 1976, 309p.

A.CASTAIGNE, B.GODEAU, J.L.LEJONC, A.SCHAEFFER.
Sémiologie médicale, initiation à la physiopathologie. 3^o ed. Sandoz. 1992,
561p.

D.GENET. Evaluation épidémiologique dans les cancers mammaires, rôle
du tamoxifène dans l'association cancer du sein cancer de l'endomètre. Faculté
de médecine de Limoges. Thèse. 1995, 196p.

HART, COMIA. Introduction à la chimie organique. Inter éditions.
1987, 567p.

J.F LAGORCE. Synthèse et évaluation des dérivés du triazole et de la
thiazoline. Faculté de pharmacie de Limoges. Thèse. 1989, 516p.

J.LECLERC, B.ROUSSET, J.ORGIAZZI, J.L.SCHLIENGER,
J.C.WENEAU. La thyroïde. Ed Expansions scientifiques françaises. 1976, 573p.

M.MIOCQUE, C.COMBET FARNOUX, H.MOSKOWITZ. Chimie
organique. 5^o ed. Tome I. Masson abrégés. 1997, 294p.

TABLE DES MATIERES

	Pages
I. GENERALITE.....	9
II. LE TAMOXIFENE.....	11
II.1. Historique.....	12
II.2. Synthèse de la molécule.....	13
II.3. Pharmacologie.....	15
II.4. Effets secondaires.....	19
III. LA THYROIDE.....	22
III.1. Physiologie.....	23
III.1.1. Follicule thyroïdien.....	23
III.1.2. Synthèse des hormones thyroïdiennes.....	25
III.1.3. Mécanismes de synthèse des T3 et T4 et devenir des hormones thyroïdiennes.....	28
III.2. Pathologies thyroïdiennes.....	34
III.2.1. Hyperthyroïdies.....	34
III.2.2. Hypothyroïdies.....	36
IV. PRESENTATION DES MOLECULES ETUDIEES.....	39
IV.1. Présentation.....	40
IV.2. Synthèse du Diméthylphénylaminoéthanol.....	42
IV.2.1. Mode opératoire.....	42
IV.2.2. Contrôle du produit synthétisé.....	43
IV.2.2.1. Spectrométrie par résonance	

magnétique nucléaire.....	44
IV.2.2.2. Spectrométrie infrarouge.....	47
IV.2.3. Conclusion.....	49
V. MODELISATION MOLECULAIRE.....	50
V.1. Principe de la modélisation moléculaire.....	51
V.2. Modélisation des complexes par transfert de charge.....	53
V.2.1. Théorie de la formation du complexe de transfert de charge.....	53
V.2.2. Méthodes.....	54
V.2.3. Résultats.....	65
V.2.4. Conclusion.....	66
VI. ETUDE IN VITRO.....	68
VI.1. Présentation.....	69
VI.2. Spectrophotométrie.....	69
VI.2.1. Préparation des solutions.....	70
VI.2.2. Spectroscopie visible.....	71
VI.2.3. Etude dans l'UV.....	74
VI.2.4. Résultats.....	74
VI.2.4.1. Tamoxifène.....	74
VI.2.4.2. Diméthyléthanolamine.....	78
VI.2.4.3. Diméthylphényléthanolamine.....	80
VI.2.4.4. MMI.....	83
VI.2.5. Conclusion.....	83
VI.3. Peroxydase.....	83

VI.3.1. Principe.....	84
VI.3.2. Solutions.....	84
VI.3.3. Résultats.....	85
VI.3.4. Conclusion.....	86
VII. ETUDE IN VIVO.....	87
VII.1. Présentation.....	88
VII.2. Résultats.....	90
VII.2.1. Evolution pondérale.....	90
VII.2.2. Evolution poids thyroïde/poids de l'animal.....	94
VII.2.3. Dosage des T3 et T4.....	96
VII.2.4. Etude histologique.....	97
VII.3. Conclusion de l'étude in vivo.....	104
VIII. CONCLUSION.....	105
IX. BIBLIOGRAPHIE.....	108

BON A IMPRIMER N° 27

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

NADAUD Jacques - Etude de l'effet complexant du tamoxifène ;
influence sur l'hormonogénèse thyroïdienne.- 114 p.
Th. Pharm. : Limoges, 1997.

RESUME

Le tamoxifène possède une structure chimique qui lui permet de complexer l'iode. Cette étude a pour but de mettre en évidence la formation d'un complexe par transfert de charge entre le tamoxifène et l'iode.

Une approche théorique par modélisation moléculaire a tout d'abord été réalisée, puis une étude in vitro pour déterminer les constantes de formation des complexes, enfin une étude in vivo afin de montrer l'influence de la formation d'une tel complexe sur l'hormonogénèse thyroïdienne.

Cette recherche a permis de déterminer grâce à l'étude concomitante du diéthylstilbestrol, du diméthylaminoéthanol et du diméthylphényléthanolamine le site complexant de la molécule de tamoxifène ainsi que l'influence de la chaîne carbonée latérale et des cycles aromatiques de cette molécule.

MOTS CLES

Tamoxifène
Complexation
Modélisation moléculaire
Thyroïde

JURY

Président : Monsieur JF. LAGORCE, Maître de conférences.
Juges : Mademoiselle D. CLEDAT, Maître de conférences.
Mademoiselle ML. BEYSSEN, Docteur en Pharmacie.