



**HAL**  
open science

# Metabolisme oxydatif du chlorotoluron chez des cultures cellulaires de ble: Intervention de monooxygénases a cytochrome P-450

Christian Mougin

## ► To cite this version:

Christian Mougin. Metabolisme oxydatif du chlorotoluron chez des cultures cellulaires de ble: Intervention de monooxygénases a cytochrome P-450. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National Polytechnique (Toulouse), 1990. Français. NNT: . tel-02851244

**HAL Id: tel-02851244**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02851244>**

Submitted on 11 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 395

**THESE**

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Spécialité : Agrochimie

par

Christian MOUGIN

MÉTABOLISME OXYDATIF DU CHLORTOLURON CHEZ DES CULTURES CELLULAIRES DE  
BLÉ : INTERVENTION DE MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450.

Soutenue le 11 décembre 1990 devant le Jury composé de :

M. A. BOUDET           Président

MM. J. CALMON  
F. DURST  
R. SCALLA  
M. TISSUT



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des herbicides de l'INRA, sous la responsabilité de F. Cabanne. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour m'avoir conseillé durant ces trois années, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie le Prof. Boudet d'avoir accepté de présider mon jury, et également messieurs J. Calmon, F. Durst, R. Scalla et M. Tissut, pour avoir accepté de discuter et de juger ce travail.

Ma reconnaissance va également à I. Benveniste, D. Werk-Reichhart et J-P. Salaün pour m'avoir fait profiter de leur précieuse expérience des monooxygénases à cytochrome P-450, et à A. Huc pour sa participation aux études QSAR.

L'aide apportée par D. Clair et J-C. Gaudry, concernant pour l'un la maintenance des cultures cellulaires, et pour l'autre sa contribution à la réalisation de ce mémoire, me fût précieuse.

Je tiens à remercier également tous les membres du Laboratoire des Herbicides pour la sympathie qu'il m'ont témoignée, et pour les conseils qu'ils m'ont prodigués.

Que tous ceux qui m'ont apporté leur collaboration soient remerciés ici.



## RÉSUMÉ

Les systèmes enzymatiques responsables du métabolisme oxydatif d'un herbicide, le chlortoluron, ont été étudiés dans des microsomes isolés de cultures cellulaires de blé, qui renferment également de bons niveaux d'activité cinnamate 4-hydroxylase et laurate hydroxylase. Le chlortoluron est oxydé en un dérivé hydroxylé sur le méthyle du cycle aromatique et en un dérivé N-monodéméthylé. Les deux activités enzymatiques possèdent les propriétés caractéristiques des monooxygénases à cytochrome P-450 (localisation cellulaire, besoins en cofacteurs, sensibilité à des inhibiteurs connus de monooxygénases à cytochrome P-450).

Les quatre activités mesurées (cinnamate 4-hydroxylase, laurate hydroxylase, hydroxylase et N-déméthylase du chlortoluron) et les teneurs en cytochrome P-450 sont augmentées après le traitement des cellules par des composés variés (herbicides, fongicides et antidotes d'herbicides). Des études QSAR ont montré que des analogues structuraux du chlortoluron modifient le métabolisme de celui-ci.

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que des monooxygénases à cytochrome P-450 sont impliquées dans les réactions d'hydroxylation et de N-déméthylation de l'herbicide. Les caractéristiques des deux activités laissent penser que des enzymes distinctes catalysent chacune des deux réactions.

## MOTS CLÉS

blé  
chlortoluron  
cultures cellulaires  
herbicides  
antidotes  
métabolisme  
monooxygénases  
cytochrome P-450



## SUMMARY

Microsomal preparations isolated from cell cultures of wheat were used to study the enzymatic systems responsible for the oxidative metabolism of the herbicide chlorotoluron, and also the cinnamate 4-hydroxylase and laurate hydroxylase activities. Chlorotoluron was ring-methyl hydroxylated and N-monodemethylated. Both enzymatic activities had the characteristic properties of cytochrome P-450 monooxygenases (subcellular localization, cofactor requirements, sensitivity towards known inhibitors of cytochrome P-450 monooxygenases).

The four activities assayed (cinnamate 4-hydroxylase, laurate hydroxylase, chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and N-demethylase), as well as cytochrome P-450 contents, were increased after treatment of cells by various effectors (herbicides, fungicides and herbicide safeners). QSAR studies have shown that structural analogs of chlorotoluron were able to modify its metabolism.

Taken together, the data suggests that cytochrome P-450 monooxygenases are involved in the ring-methyl hydroxylation and the N-demethylation of the herbicide. It is postulated from the characteristics of both activities that two distinct enzymes catalyze each reaction.

## KEY WORDS

wheat  
chlorotoluron  
cell cultures  
herbicides  
safeners  
metabolism  
monooxygenases  
cytochrome P-450





## SOMMAIRE

<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>A. LE MÉTABOLISME DES HERBICIDES CHEZ LES PLANTES SUPÉRIEURES</b>	<b>15</b>
A.1. Le métabolisme modifie la structure des molécules	<b>15</b>
A.2. Le métabolisme oxydatif des herbicides résulte en une modification de la phytotoxicité	<b>16</b>
A.3. Le métabolisme est un facteur clé de la sélectivité des herbicides	<b>17</b>
<b>B. LES SYSTEMES ENZYMATIQUES RESPONSABLES DU MÉTABOLISME DES HERBICIDES CHEZ LES VÉGÉTAUX</b>	<b>18</b>
<b>C. MODELE EXPÉRIMENTAL</b>	<b>19</b>
<b>D. OBJECTIFS</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450 : STRUCTURE, FONCTION ET RÉGULATION</b>	<b>23</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	<b>24</b>
<b>B. PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450</b>	<b>27</b>
B.1. Les chaînes de transport d'électrons	<b>28</b>
B.2. Les cytochromes P-450	<b>30</b>
B.2.1. Le groupe prosthétique	<b>30</b>
B.2.2. L'apoprotéine	<b>30</b>

<b>C. PROPRIÉTÉS SPECTRALES DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450</b>	<b>33</b>
<b>D. MODE D'ACTION DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450</b>	<b>34</b>
D.1. Réactions catalysées	34
D.2. Fonctions des monooxygénases à cytochrome P-450	35
<b>E. RÉGULATION DES ACTIVITÉS DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450</b>	<b>39</b>
E.1. Inhibition des activités enzymatiques	39
E.2. Activation des activités enzymatiques	41
E.3. Diminution des concentrations en cytochrome P-450	42
E.4. Induction	42
E.5. Biologie moléculaire des cytochromes P-450	45
<b>F. CONCLUSION : CARACTÉRISTIQUES DISTINCTIVES DE L'INTERVENTION D'UNE MONOOXYGÉNASE À CYTOCHROME P-450</b>	<b>47</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>48</b>
<b>A. MATÉRIEL VÉGÉTAL</b>	<b>49</b>
A.1. Les suspensions cellulaires de blé	49
A.2. Conditions de culture des suspensions cellulaires	49
A.3. Conditions d'utilisation des suspensions cellulaires	50
A.4. Préparation des microsomes	50
A.5. Séparation des fractions membranaires	51
<b>B. ESSAIS ENZYMATIQUES</b>	<b>51</b>
B.1. Dosages radiochimiques	51
B.1.1. Cinnamate 4-hydroxylase (CA4H)(EC 1.14.14-)	52
B.1.2. Laurate hydroxylase (LAH)(EC 1.14.14-)	52
B.1.3. Chlortoluron hydroxylase (CPUH) et N-déméthylase (CPUDM)	52

B.1.4. Extraction des métabolites pour les analyses par HPLC	53
B.1.5. Extraction des métabolites pour les analyses par CCM	53
B.1.6. Techniques analytiques	54
B.2. Dosages spectrophotométriques	56
B.2.1. Activité cytochrome <i>c</i> oxydase (EC 1.9.3.1)	56
B.2.2. Activité NADPH cytochrome <i>c</i> réductase (EC 1.6.2.4)	56
B.2.3. Activité peroxygénase (aniline oxydase)	57
B.2.4. Activité peroxydase (guaiacol oxydase)(EC 1.11.1.7)	57
B.2.5. Dosage des cytochromes	57
<b>C. DOSAGE DES PROTÉINES</b>	<b>58</b>
<b>D. SYNTHÈSE DU CHLORTOLURON MARQUÉ</b>	<b>59</b>
<b>E. AUTRES TECHNIQUES</b>	<b>60</b>
<b>CHAPITRE 3 : HYDROXYLATIONS DE SUBSTRATS PHYSIOLOGIQUES PAR DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450 DE MICROSOMES DE BLÉ</b>	<b>61</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	<b>62</b>
<b>B. LA CINNAMATE 4-HYDROXYLASE DU BLÉ</b>	<b>63</b>
B.1. Propriétés de la CA4H du blé	63
B.1.1. Mise en évidence de l'hydroxylation du cinnamate en <i>para</i> -coumarate	63
B.1.2. Nécessité de cofacteurs pour l'activité CA4H	64
B.1.3. Influences du temps d'incubation, de la concentration en protéines, de la température d'incubation et du pH sur l'activité CA4H	64
B.1.4. Influence de la concentration en cinnamate	65
B.1.5. Distribution cellulaire de l'activité CA4H	66
<b>Résumé</b>	<b>66</b>
B.2. Intervention d'un cytochrome P-450 dans l'hydroxylation du cinnamate	67

B.2.1. Présence de cytochrome P-450 et spectre d'interaction dans les fractions microsomales de blé	67
B.2.2. Inhibition de la CA4H	68
<b>Résumé</b>	<b>70</b>
B.3. Evolution de l'activité CA4H en fonction de l'âge des suspensions cellulaires	71
 <b>C. LA LAURATE HYDROXYLASE DU BLÉ</b>	 <b>71</b>
C.1. Identification des métabolites	71
C.2. Cofacteurs et inhibiteurs de la LAH	72
C.3. Influence de la concentration en laurate	72
 <b>D. MESURE DES ACTIVITÉS CA4H ET LAH DANS D'AUTRES MATÉRIELS VÉGÉTAUX</b>	 <b>73</b>
 <b>E. CONCLUSION</b>	 <b>73</b>
 <b>CHAPITRE 4 : MÉTABOLISME DU CHLORTOLURON PAR DES FRACTIONS MICROSOMALES DE CELLULES DE BLÉ</b>	 <b>75</b>
 <b>A. INTRODUCTION</b>	 <b>77</b>
 <b>B. PROPRIÉTÉS DES ENZYMES MÉTABOLISANT LE CHLORTOLURON</b>	 <b>78</b>
B.1. Mise en évidence de la transformation du chlortoluron dans des microsomes isolés de cellules de blé. Identification des métabolites	78
B.2. Effets de traitements des cellules de blé par le cyométrinil et le 2,4-D	79
B.3. Besoins en cofacteurs et en oxygène	80
B.4. Influences du temps, de la température d'incubation, de la concentration en protéines et du pH sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase.	82
B.5. Influence de la concentration en chlortoluron sur les activités CPUH et CPUDM	82
B.6. Localisation subcellulaire des activités	83

B.7. Influence de la composition du tampon de broyage des microsomes sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase	84
<b>Résumé</b>	85
<b>C. MISE EN ÉVIDENCE DE LA PARTICIPATION DE CYTOCHROME P-450 DANS LE MÉTABOLISME OXYDATIF DU CHLORTOLURON</b>	86
C.1. Présence de cytochrome P-450 dans les microsomes	86
C.2. Inhibitions des activités CPUH et CPUDM	86
C.3. Effets d'inhibiteurs ou de stimulateurs de différents types d'oxydases sur la CPUH et la CPUDM	90
C.4. Effets de quelques antidotes et synergistes d'herbicides	92
C.5. Effets d'anticorps	93
<b>Résumé</b>	94
<b>D. SPÉCIFICITÉS DE SUBSTRAT DE LA CPUH ET DE LA CPUDM</b>	94
D.1. Effets d'analogues structuraux du chlortoluron	95
D.2. Effets d'herbicides variés	96
D.3. Effets de composés substrats de monooxygénases à cytochrome P-450	97
<b>Résumé</b>	97
<b>E. CONCLUSION</b>	98
<b>CHAPITRE 5 : AUGMENTATION DES TENEURS EN CYTOCHROME P-450 ET DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES À CYTOCHROME P-450 DANS DES MICROSOMES DE BLÉ ISOLÉS DE CELLULES TRAITÉES</b>	102
<b>A. INTRODUCTION</b>	103
<b>B. RÉSULTATS</b>	104
B.1. Effets du 2,4-D	104
B.2. Effets du prochloraz	105
B.3. Effets du mécoprop	106
B.4. Effets du chlortoluron	107
B.5. Effets des antidotes d'herbicides	107

<b>C. CONCLUSION</b>	<b>108</b>
<b>CHAPITRE 6 : MISE EN ÉVIDENCE DE CORRÉLATIONS STRUCTURE- ACTIVITÉ</b>	<b>113</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	<b>114</b>
A.1. Généralités et établissement des corrélations	<b>114</b>
A.2. Paramètres physicochimiques utilisés	<b>116</b>
A.2.1. Paramètres électroniques	<b>116</b>
A.2.2. Paramètres lipophiles	<b>116</b>
A.2.3. Paramètres stériques	<b>118</b>
<b>B. RÉSULTATS</b>	<b>118</b>
B.1. Coefficients de corrélation partiels	<b>118</b>
B.2. Paramètre électronique	<b>119</b>
B.3. Paramètre lipophile	<b>121</b>
B.4. Paramètre stérique	<b>122</b>
B.5. Recherche de meilleures corrélations avec le programme pas à pas	<b>122</b>
B.6. Cas des métabolites	<b>123</b>
<b>C. CONCLUSION</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION</b>	<b>127</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>146</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>162</b>

## ABRÉVIATIONS

2'-AMP	2'adénosine monophosphate
2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2'5'-ADP	2'5'adénosine diphosphate
ABT	1-aminobenzotriazole
ASC	ascorbate
CA4H	<i>trans</i> -cinnamate 4-hydroxylase
CCM	chromatographie sur couche mince
CO	monoxyde de carbone
CPU	chlortoluron
CPUDM	chlortoluron N-déméthylase
CPUH	chlortoluron hydroxylase
DMSO	diméthylsulfoxyde
ECOD	éthoxycoumarine O-déalkylase
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
FAD	flavine adénine dinucléotide
FMN	flavine mononucléotide
fp1	NADPH-cytochrome P-450 réductase
fp2	NADH-cytochrome b5 réductase
G6-P	glucose 6-phosphate
G6-PDH	glucose 6-phosphate déshydrogénase
HPLC	chromatographie liquide haute performance
IC-LAH	laurate hydroxylase dans la chaîne
KCN	cyanure de potassium
LAH	laurate hydroxylase
MF	matière fraîche
MO-CPU	chlortoluron N-monodéméthylé
MS	matière sèche
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
OH-CPU	chlortoluron hydroxylé
P-450	cytochrome P-450
<i>p</i> -CMB	<i>para</i> -chloromercuribenzoate
PMSF	phénylméthyl sulfonyl fluoride
SAB	sérumalbumine bovine
TCA	acide trichloracétique
$\omega$ -LAH	laurate hydroxylase en bout de chaîne





## INTRODUCTION

Jusqu'à une époque assez récente, la destruction des mauvaises herbes se faisait mécaniquement par binage, sarclage ou arrachage des espèces adventices. Au XIX<sup>e</sup> siècle, plusieurs travaux scientifiques prouvèrent l'efficacité de substances minérales (sulfate de fer, acide sulfurique, sulfate de cuivre) pour la lutte contre les mauvaises herbes. L'ère des herbicides organiques de synthèse utilisés en cultures céréalières débuta vers 1930 avec la commercialisation des colorants nitrés (DNOC), et se poursuivit avec celle des phytohormones de synthèse (2,4-D, MCPA) vers 1945. Les phénylurées virent le jour dans les années 1950 (le chlortoluron en 1969), des herbicides comme le diclofop vers 1970, alors que les années 80 révélèrent les sulfonilurées.

La pratique du désherbage chimique et l'emploi des produits phytosanitaires en général sont sans conteste des facteurs importants des progrès réalisés par l'agriculture ces dernières décennies, progrès qui se traduisent par des gains importants de productivité (+ 14,1 qx/ha soit 30,5 % entre 1975 et 1985 pour le blé). Les cultures les plus consommatrices de produits phytosanitaires sont les céréales, et la France se place au troisième rang mondial des pays consommateurs de produits phytosanitaires (9 %, soit 9,4 milliards de francs en 1987 ; My et Lorelle, 1988), les herbicides représentant environ 40 % de ce total.

Le bilan précédent, favorable du point de vue de la productivité, souffre aujourd'hui de plusieurs limites d'ordres économique, technique, toxicologique, écotoxicologique et écologique.

On observe en effet depuis quelques années une stagnation du marché phytosanitaire. Les agriculteurs, dans un contexte européen de surproduction et de quotas freinent leurs dépenses, notamment par une conception plus raisonnée de la protection des cultures. En outre, le coût et la durée de recherche et de développement de molécules nouvelles et originales (350 millions de francs et 8 ans par molécule) poussent les industriels et les organismes de recherche à mieux valoriser des matières actives déjà existantes.

Dans certaines conditions d'utilisation des produits phytosanitaires, des problèmes de phytotoxicité peuvent se poser pour la culture traitée, les cultures voisines ou suivantes. Enfin, l'usage répété d'herbicides sur une même parcelle peut conduire au développement d'individus résistants à ces molécules, soit par une mutation de la cible cellulaire, soit par une détoxification accrue. Des problèmes agronomiques importants sont engendrés par ces résistances puisqu'il devient alors difficile de détruire les adventices sans nuire aux cultures.

Par définition, les pesticides sont des biocides et peuvent être plus ou moins toxiques pour l'applicateur et le consommateur. L'absorption de molécules organiques par les plantes, dont l'énorme biomasse est à la base des chaînes alimentaires animales et humaines, peut conduire à l'accumulation dans les aliments de formes toxiques ou douées de propriétés pharmacodynamiques. La trop grande persistance ou rémanence de résidus (quelquefois mutagènes ou cancérigènes) impose une limitation des traitements. En outre, le métabolisme général des plantes peut être altéré par les traitements phytosanitaires et peut conduire à la production ou à l'accumulation de composés naturels végétaux comme les phénols, les terpènes, les phytostérols potentiellement toxiques, ou du moins indigestes. Il existe également des possibilités de conséquences néfastes pour l'environnement (faune, flore, sol, eau) à court et long terme.

Pour ces raisons, l'usage des pesticides est souvent mal compris, d'autant plus que des accidents industriels (Bhopal, Bâle) se produisent régulièrement. La tendance actuelle tend ainsi à une meilleure utilisation des produits phytosanitaires par le développement de nouvelles stratégies visant à "traiter moins et traiter mieux", stratégies qui s'exercent à plusieurs niveaux :

- création d'associations de matières actives plus efficaces à l'encontre d'espèces adventives particulières (graminées et dicotylédones)

- élaboration de produits actifs à très faibles doses (sulfonylurées), ou à mode d'action spécifique des plantes, sans toxicité pour les animaux

- modification de la sélectivité intrinsèque des herbicides (usage d'antidotes ou de synergistes)

- création de plantes transgéniques résistantes à des herbicides normalement toxiques pour ces espèces.

- développement de la lutte intégrée associant plusieurs types de luttés (biologique, chimique,...).

Ces axes de recherche nécessitent de meilleures connaissances des mécanismes liés au mode d'action des herbicides, terme qui regroupe les phénomènes de pénétration, de transport, de dégradation métabolique et d'action phytotoxique sur la cible cellulaire.

En raison de leurs implications agronomiques et toxicologiques, les modifications de la structure chimique des herbicides dans les plantes sont abondamment étudiées. Elles sont dues principalement aux réactions enzymatiques (métabolisme) par opposition par exemple aux processus photochimiques.

**Tableau 1** : Métabolisme et modification des propriétés des herbicides dans les plantes supérieures (d'après Shimabukuro, 1985).

	Propriétés initiales	Phase I	Phase II	Phase III
Réaction		oxydation réduction hydrolyse	conjugaison	conjugaison secondaire incorporation
Solubilité	lipophile	amphiphile	hydrophile	hydrophile insoluble
Mobilité	sélective	variable	faible	nulle
Toxicité	importante	inférieure égale supérieure	faible nulle	nulle

## A.LE MÉTABOLISME DES HERBICIDES CHEZ LES PLANTES SUPÉRIEURES

### A.1.Le métabolisme modifie la structure des molécules

Les réactions métaboliques aboutissent à la transformation des herbicides en métabolites intermédiaires, rapidement transformés en résidus finaux. Chez les végétaux, le processus de biotransformation peut être décomposé en trois types de réactions (Shimabukuro *et al.*, 1982 ; Shimabukuro 1985)(Tableau 1).

-Les réactions de phase I consistent en l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse du substrat. L'introduction de groupes fonctionnels nouveaux (OH, NH<sub>2</sub>, COOH) confère aux métabolites une polarité accrue, une mobilité et une phytotoxicité modifiées. Ces réactions de phase I modifient directement l'activité biologique des molécules et prédisposent les métabolites aux réactions de phase II. Nature et intensité des réactions de phase I varient avec les espèces végétales et les substrats.

-Les réactions de phase II produisent des métabolites hydrosolubles généralement immobiles, à très faible ou nulle phytotoxicité. Au cours de ces réactions, les métabolites issus des réactions de phase I sont conjugués avec des unités glucose, glutathion, cystéine, malonyl, ou des acides aminés.

-Les réactions de phase III comprennent des conjugaisons secondaires et conduisent à des résidus liés, immobiles et insolubles. Elles aboutissent aussi à l'incorporation de fragments de molécules (cycles aromatiques et hétérocycles) dans certaines structures cellulaires (fractions protéiques, lignines). Dans les deux cas, la détoxification de la molécule initiale est complète. Ce type de réactions est particulier aux végétaux qui, dépourvus de système d'excrétion, séquestrent les métabolites finaux.

**Tableau 2** : Importance des réactions d'oxydation dans le métabolisme des herbicides chez les plantes supérieures.

Familles chimiques*	Herbicide**	Espèce	Référence bibliographique
Composés phénoliques	chlormethoxynil	riz	Niki <i>et al.</i> , 1976
Acides phénoxyacétiques	2,4-D	blé	Bristol <i>et al.</i> , 1977
Acides phénoxypropioniques	diclofop	blé	Shimabikuro <i>et al.</i> , 1979
Acides phénoxybutyriques			
Carbamates	propham	blé	Burt et Corbin, 1978
Urées substituées	chlortoluron	blé	Gross <i>et al.</i> , 1979
Diazines	bromacile	citron	Cole, 1983
Triazines	atrazine	blé	Shimabukuro, 1967
Imidazolinones	imazamethabenz	blé	Brown <i>et al.</i> , 1987
Amides			
Ammoniums quaternaires	difenzoquat	blé	Gressel (com.personnelle)
Benzonitriles	ioxynil	blé	Buckland <i>et al.</i> , 1973
Toluidines	trifluraline	arachide	Biswas et Hamilton, 1969
Triazoles			
Acides aminés			
Dérivés benzoïques	dicamba	blé	Broadhurst <i>et al.</i> , 1966
Dérivés picoliniques	clopyralid	blé	Gressel (com. personnelle)
Dérivés de l'oxadiazole			
Dérivés du benzofuranne			
Dérivés du cyclohexanedione			
Oximes			
Pyridazines	norflurazon	maïs	Strang et Rogers, 1974
Sulfonylurées	chlorsulfuron	blé	Sweetser, 1985
Benzamides	isoxaben	blé	Cabanne <i>et al.</i> , 1987
Quinoxalines			
Pyrimidines	bentazon	blé	Retzlaff et Hamm, 1976

\* Classification chimique d'après ACTA, 1989

\* \* Exemples d'herbicides subissant une ou plusieurs réactions d'oxydation.

Le schéma précédent peut être modifié. En effet, certaines molécules possèdent déjà les groupements réactifs nécessaires à l'action des enzymes de phase II, en particulier des groupes hydroxyles libres, des amines primaires ou secondaires et sont immédiatement conjuguées. D'autres, après les réactions de phase I sont suffisamment hydrophiles et ne subissent pas de conjugaison. Enfin, les conjugués formés peuvent être instables et après hydrolyse libérer les formes douées de toxicité.

Le métabolisme n'aboutit que rarement au catabolisme complet des herbicides alors que la phytotoxicité des métabolites conjugués finaux est toujours nulle. Il est possible que tous les herbicides subissent des réactions de métabolisation.

### **A.2.Le métabolisme oxydatif des herbicides résulte en une modification de la phytotoxicité**

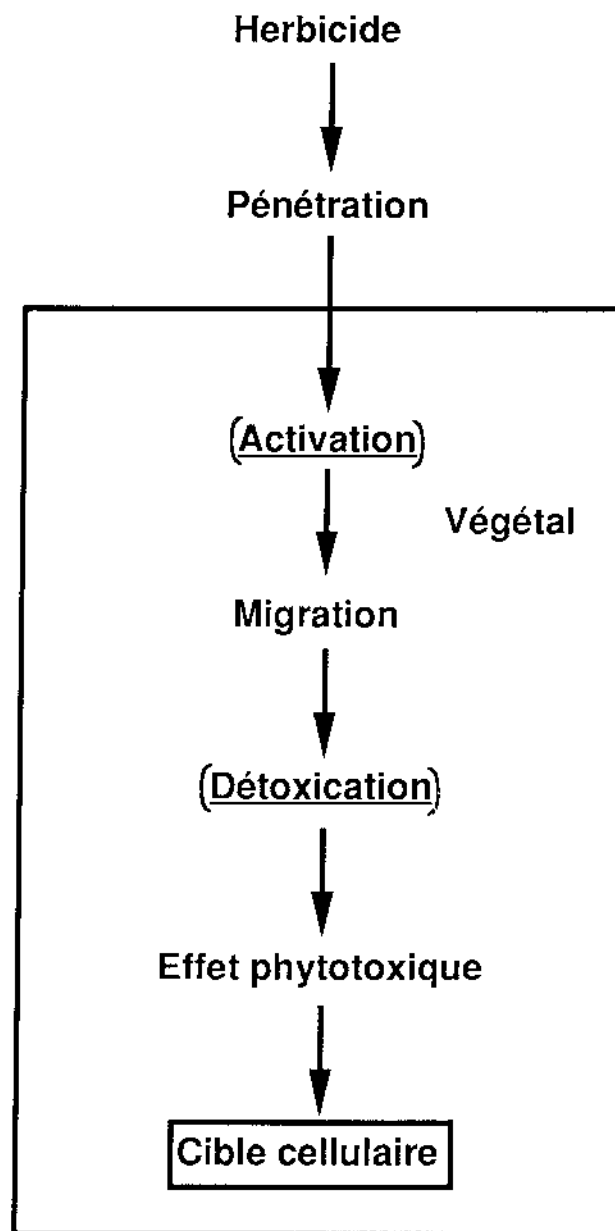
Beaucoup de plantes supérieures métabolisent les herbicides au moyen de réactions d'oxydation. Ces réactions affectent la phytotoxicité des métabolites intermédiaires et de fait influent directement sur l'efficacité des produits phytosanitaires, autrement dit elles conditionnent la réponse des plantes.

*In vivo*, les principales réactions d'oxydation consistent en réactions d'hydroxylation (sur un cycle aromatique ou sur une chaîne aliphatique), en N-, S- ou O-déalkylations, en N-désaminations et de S-oxydations (revues par Hatzios et Penner, 1982 ; Cole 1983 ; Edwards et McMinn, 1985). Le métabolisme oxydatif concerne des herbicides appartenant à de nombreuses familles chimiques distinctes (Tableau 2).

La phytotoxicité des métabolites intermédiaires issus des réactions d'oxydation est variable et souvent difficile à estimer, car les métabolites



**Figure 1** : Mécanismes physiologiques de la sélectivité des herbicides.



sont rapidement conjugués. Le plus fréquemment, les métabolites intermédiaires ont perdu l'activité herbicide des molécules initiales (cas des phénylurées), le métabolisme étant alors synonyme de détoxification. On observe pour d'autres matières actives une conservation de la toxicité (chlorpropham) ou une augmentation. Dans ce dernier cas, la bioactivation d'un pro-herbicide (EPTC, pyridate)(revue par Hutson, 1987) est une étape indispensable à l'expression de l'activité herbicide.

### **A.3. Le métabolisme est un facteur clé de la sélectivité des herbicides**

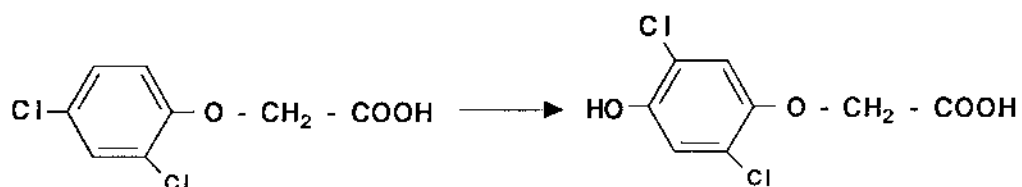
Pour protéger efficacement une culture contre les mauvaises herbes, un herbicide doit être capable de détruire les adventices sans nuire à la culture. On dit dans ce cas que l'herbicide est sélectif. La sélectivité d'un herbicide est gouvernée par un ensemble de facteurs d'ordre agronomique ou technique (profondeur de semis), d'ordre morphologique (port, pilosité et surface des feuilles, mouillabilité de la cuticule) qui influent principalement sur la quantité d'herbicide qui pénètre dans la plante. Des facteurs physiologiques (transport, immobilisation et métabolisme) déterminent la quantité de matière active et la durée de sa présence au voisinage de la cible cellulaire (Figure 1). Le métabolisme apparaît comme un facteur important de la sélectivité des herbicides et il aboutit en général chez une espèce tolérante à une détoxification efficace et rapide, comme à une détoxification imparfaite et lente chez les espèces sensibles (revues par Owen 1987 ; Cole *et al.*, 1987). Un bon exemple est fourni par le chlorsulfuron (Sweetser, 1985). Chez le blé après 24 heures de métabolisme, il reste dans les feuilles 5 % d'herbicide non métabolisé, alors que 60 % de l'herbicide se retrouvent sous forme du métabolite conjugué non toxique. A l'inverse chez la betterave, sensible, on retrouve durant le même temps 97 % d'herbicide non métabolisé.

**Figure 2** : Exemples de réactions d'oxydation de xénobiotiques chez les végétaux.

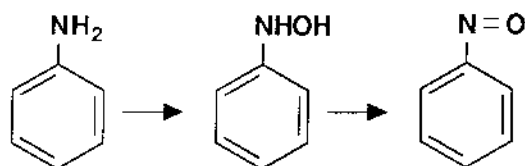
- N-déméthylation du monuron (Frear *et al.*, 1969)



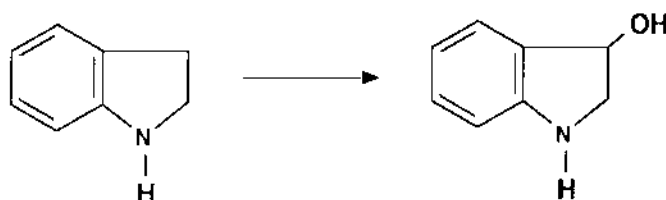
- Aryl-hydroxylation du 2,4-D (Makeev *et al.*, 1977)



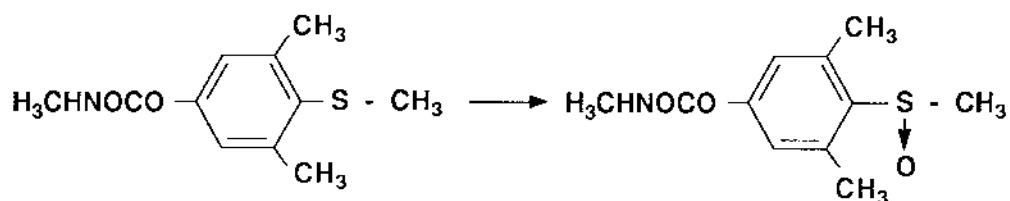
- Hydroxylation de l'aniline (Ishimaru et Yamasaki, 1977)



- Hydroxylation de l'indole (Ishimaru et Yamasaki, 1977)



- Sulfoxydation du méthiocarb (Blée *et al.*, 1985 ; Blée et Schuber, 1989)



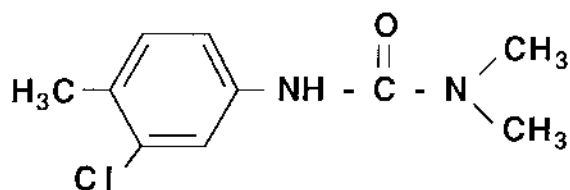
## B. LES SYSTEMES ENZYMATIQUES RESPONSABLES DU MÉTABOLISME DES HERBICIDES CHEZ LES VÉGÉTAUX

Le métabolisme des herbicides est largement étudié depuis de nombreuses années. Cependant, les mécanismes biochimiques responsables sont encore très mal connus, ce qui rend difficile l'implication de types enzymatiques précis dans les réactions d'oxydation. On a mis longtemps en cause la participation de peroxydases, laccases ou polyphénol oxydases (Lamoureux et Frear, 1979 ; West, 1980), en raison de la capacité de ces enzymes à oxyder des xénobiotiques par hydroxylation et N-déméthylation *in vitro*.

L'étude des systèmes animaux (vertébrés et insectes) a permis une meilleure compréhension des phénomènes observés dans les plantes. En particulier, l'implication chez les animaux des monooxygénases à cytochrome P-450 dans le métabolisme des xénobiotiques a orienté la recherche vers de telles enzymes chez les plantes. Les premières démonstrations ont concerné la N-déméthylation du monuron chez le coton (Frear *et al.*, 1969)(Figure 2), et l'aryl-hydroxylation du 2,4-D chez le pois (Makeev *et al.*, 1977). D'autres xénobiotiques se sont avérés être métabolisés par des monooxygénases à cytochrome P-450. Ce sont par exemple la *p*-chloro-N-méthylaniline, le *p*-nitroanisole (Mc Pherson *et al.*, 1975 a et b ; Young et Beevers, 1976 ; Dohn et Krieger, 1984) et le benzopyrène (Higashi *et al.*, 1981). Quoique rarement démontrée, l'hypothèse d'une participation majoritaire des cytochromes P-450 dans le métabolisme des herbicides semble acquise chez les plantes (O'Keefe *et al.*, 1987).

**Tableau 3** : Fiche technique descriptive du chlortoluron (d'après The Pesticide Manual, 1987).

---



Structure

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O

PM : 212,7

3-(3-chloro-*p*-tolyl)-1-diméthylurée

Propriétés physicochimiques

point de fusion : 147-148°C

tension de vapeur : 0,017 mPa à 20°C

solubilité dans l'eau : 70 mg/l à 20°C

solubilité dans l'acétone : 50 g/kg

Utilisation

propriétés herbicides décrites en 1969

action racinaire et foliaire

traitement de pré ou de post levée

sélectif des céréales d'hiver

Mode d'action

inhibiteur du photosystème II

Toxicologie

DL<sub>50</sub> pour le rat par ingestion : > 10000mg/kg

Formulations

utilisé seul

association avec : bifénox, mécoprop, néburon, terbuthylazine, triasulfuron, trifluraline

---

Un second système hydroxylant a été décrit chez le pois (Ishimaru et Yamasaki, 1977 a et b). Il s'agit de peroxygénases fonctionnant avec des hydroperoxydes organiques comme donneurs d'oxygène, ces systèmes étant de nature hémoprotéique (Ishimaru, 1979).

Les enzymes responsables des réactions de sulfoxydation des herbicides n'ont pas toutes été identifiées à ce jour. Une hémoprotéine de type peroxygénase est néanmoins connue pour catalyser la sulfoxydation du méthiocarb (insecticide) chez le soja (Blée *et al.*, 1985 ; Blée et Durst, 1986, 1987 ; Blée et Schuber, 1989).

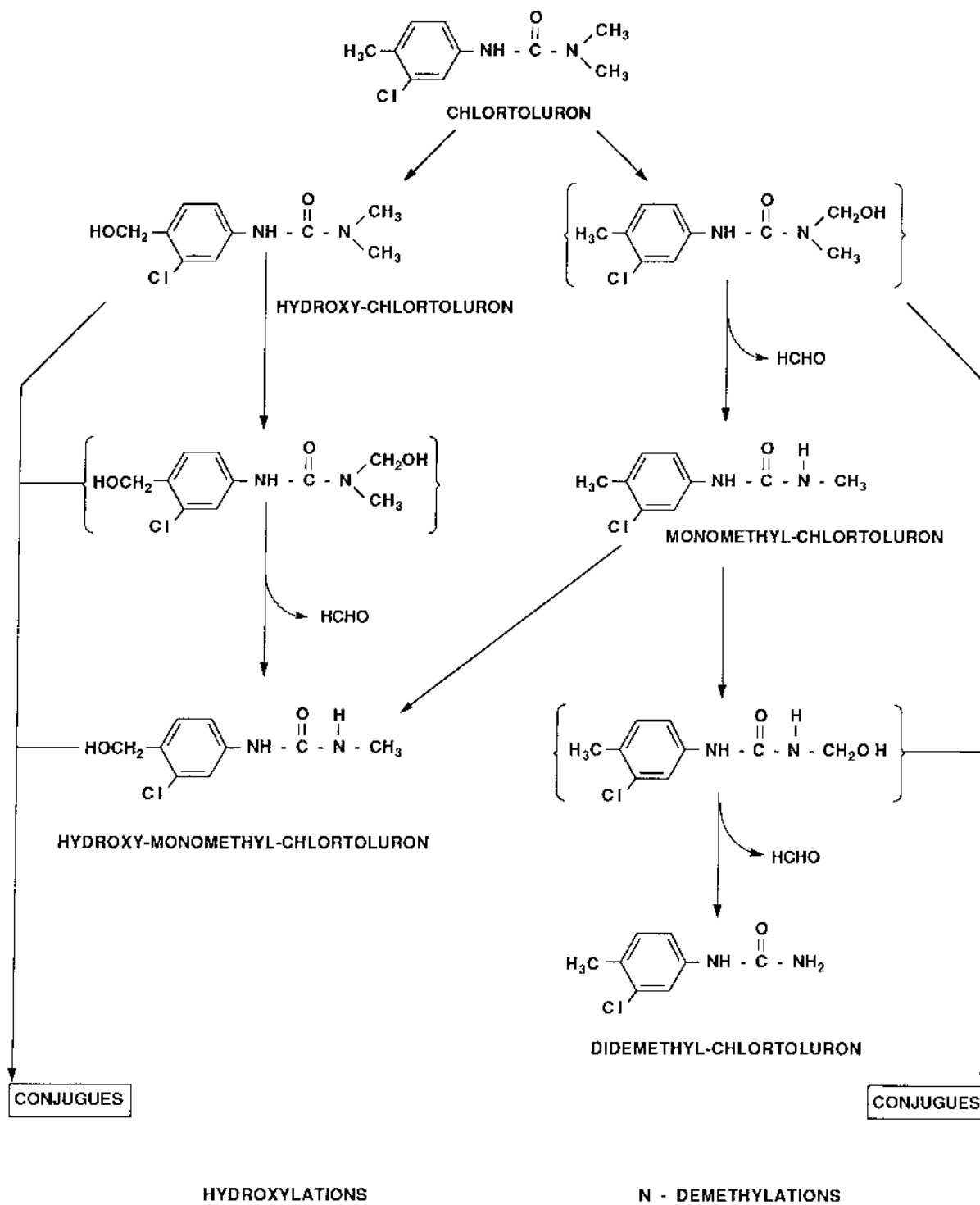
### **C.MODELE EXPERIMENTAL**

Au laboratoire, P. Gaillardon et F. Cabanne ont lancé depuis plusieurs années un programme d'étude du métabolisme du chlortoluron chez le blé. Il convient de préciser ici le choix de ce modèle.

Le chlortoluron est un herbicide de la famille des urées substituées (Tableau 3). Utilisé en pré- ou en post-levée il agit par absorption racinaire et foliaire sur un grand nombre de mauvaises herbes (graminées, dicotylédones) en étant sélectif des céréales d'hiver (blé et orge). Il est commercialisé sous de nombreuses formulations par plusieurs firmes phytosanitaires, parfois en association avec d'autres matières actives pour un meilleur contrôle d'adventices comme le gaillet, le pavot et la véronique.

Le chlortoluron constitue un bon exemple de sélectivité céréale/adventice liée principalement au métabolisme. Il est dégradé chez le blé, tolérant, selon deux voies métaboliques (Figure 3), une hydroxylation du méthyle lié au cycle aromatique, qui est majoritaire, et deux hydroxylation

Figure 3 : Métabolisme du chlortoluron chez le blé.



affectant les groupes N-méthyles (Gross *et al.*, 1979 ; Ryan *et al.*, 1981). Ces derniers dérivés hydroxylés ne sont pas stables et se recombinent en dérivés N-déméthylés. Enfin, les métabolites hydroxylés sont conjugués avec des sucres. Le vulpin est, quant à lui, sensible car il réalise uniquement la première N-déméthylation qui conduit à un métabolite encore phytotoxique. La véronique est un cas particulier car elle réalise rapidement les deux N-déméthylations qui conduisent à un dérivé non phytotoxique (Gonneau *et al.*, 1988). Elle tolère de ce fait l'herbicide.

Le blé s'est aussi imposé pour l'étude du métabolisme du chlortoluron car cette espèce détoxifie beaucoup d'herbicides au moyen de réactions d'oxydation, et principalement par des hydroxylations (Tableau 2). Il existe cependant une sensibilité variétale qui ne semble pas exclusivement corrélée avec le taux de métabolisme (Cabanne *et al.*, 1985).

Il est apparu que l'aminobenzotriazole (ABT) et le pipéronyl butoxyde, deux inhibiteurs de monooxygénases à cytochrome P-450, augmentent la toxicité du chlortoluron dans des plantes entières de blé (Gaillardon *et al.*, 1985). Cette augmentation de toxicité est causée par une inhibition du métabolisme de l'herbicide (Cabanne *et al.*, 1987 a).

M.C. Canivenc a poursuivi l'étude du métabolisme du chlortoluron dans des suspensions cellulaires de blé. Le schéma métabolique cité plus haut a été retrouvé dans ce matériel (Canivenc *et al.*, 1989). Le métabolisme est sensible à des inhibiteurs de monooxygénases à cytochrome P-450 (ABT, paclobutrazol, tetcyclacis), mais il est stimulé par des prétraitements des cellules par le diclormid, le procloraz, le cyométrinil et le 2,4-D. Des microsomes extraits de suspensions cellulaires de blé traitées par les deux derniers composés sont capables de métaboliser le chlortoluron.



Ces résultats laissent à penser que le métabolisme du chlortoluron pourrait être sous la dépendance de monooxygénase(s) à cytochrome P-450. La participation d'une monooxygénase à cytochrome P-450 dans la N-déméthylation du chlortoluron chez le topinambour (Fonné, 1985) appuie cette hypothèse.

Nous avons décidé de conserver comme matériel végétal les suspensions cellulaires dont les caractéristiques sont désormais bien connues. Elles présentent des avantages multiples par rapport aux plantes pour les études de métabolisme, et sont utilisées à cet égard par de nombreuses équipes (revue par Mumma et Davidonis, 1983). Elles offrent également d'autres avantages techniques :

- Elles permettent l'obtention rapide de grandes quantités de matériel végétal nécessaires à la préparation de fractions microsomiques.

- L'absence de pigments (chlorophylles,...) facilite le dosage spectrophotométrique des cytochromes P-450 et d'autres hémoprotéines.

- Les suspensions cellulaires présentent une grande homogénéité intrinsèque qui permet une bonne reproductibilité expérimentale.

- Enfin, elles sont particulièrement adaptées à des traitements par des effecteurs potentiels des activités enzymatiques, en s'affranchissant des problèmes de pénétration, et de transport de ces derniers.

#### **D.OBJECTIFS**

Les objectifs de ce travail sont de préciser la nature et le nombre des enzymes impliquées dans le métabolisme du chlortoluron dans des suspensions cellulaires de blé.

-Nous présenterons tout d'abord les propriétés structurales, les fonctions et les mécanismes de régulation des monooxygénases à cytochrome P-450.

-Ensuite, nous aborderons la description du matériel végétal et des techniques employées.

-Nous déterminerons alors les propriétés de deux monooxygénases à cytochrome type P-450 des plantes, la CA4H et la LAH, dans des microsomes de blé. Ces activités serviront de marqueurs ou d'activités de comparaison lors de l'étude du métabolisme du chlortoluron.

-Cette étape franchie, le métabolisme oxydatif du chlortoluron sera étudié dans des microsomes extraits de suspensions cellulaires de blé, dans le but de déterminer la nature et le nombre des enzymes impliquées.

-Des effets stimulateurs, à la suite de traitements des cellules par diverses molécules organiques, seront recherchés sur les activités enzymatiques catalysées par des monooxygénases à cytochrome P-450.

-Enfin, des études de corrélation structure-activité concerneront l'activité biologique d'analogues structuraux du chlortoluron utilisés en tant qu'inhibiteurs du métabolisme de l'herbicide, et leur structure chimique.



# **CHAPITRE 1 : LES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450 : STRUCTURE, FONCTION ET RÉGULATION.**

## **A.INTRODUCTION**

## **B.PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

B.1.Les chaînes de transport d'électrons

B.2.Les cytochromes P-450

B.2.1.Le groupe prosthétique

B.2.2.L'apoprotéine

## **C.PROPRIÉTÉS SPECTRALES DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

## **D.MODE D'ACTION DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

D.1.Réactions catalysées

D.2.Fonctions des monooxygénases à cytochrome P-450

## **E.RÉGULATION DES ACTIVITÉS DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

E.1.Inhibition des activités enzymatiques

E.2.Activation des activités enzymatiques

E.3.Diminution des concentrations en cytochrome P-450

E.4.Induction

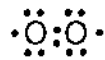
E.5.Biologie moléculaire des cytochromes P-450

## **F.CONCLUSION : CARACTÉRISTIQUES DISTINCTIVES DE L'INTERVENTION D'UNE MONOOXYGÉNASE À CYTOCHROME P-450**

## A.INTRODUCTION

Les réactions d'oxydation/réduction sont d'une importance vitale pour les systèmes biologiques. Elles interviennent dans les processus de stockage de l'énergie, mais aussi dans les voies de biosynthèse de composés organiques faisant intervenir des réactions d'oxydation. Dans la majorité des cas, l'oxydation se traduit par un échange d'électrons avec le centre actif de l'enzyme, qui peut être accompagné par une perte d'hydrogène. Les électrons sont transférés à un cosubstrat qui subit une réduction concomitante. Dans les organismes aérobies, l'accepteur potentiel des électrons provenant des substrats oxydés est le plus souvent l'oxygène moléculaire.

A l'état fondamental, l'oxygène moléculaire est un diradical stable avec deux électrons non appariés

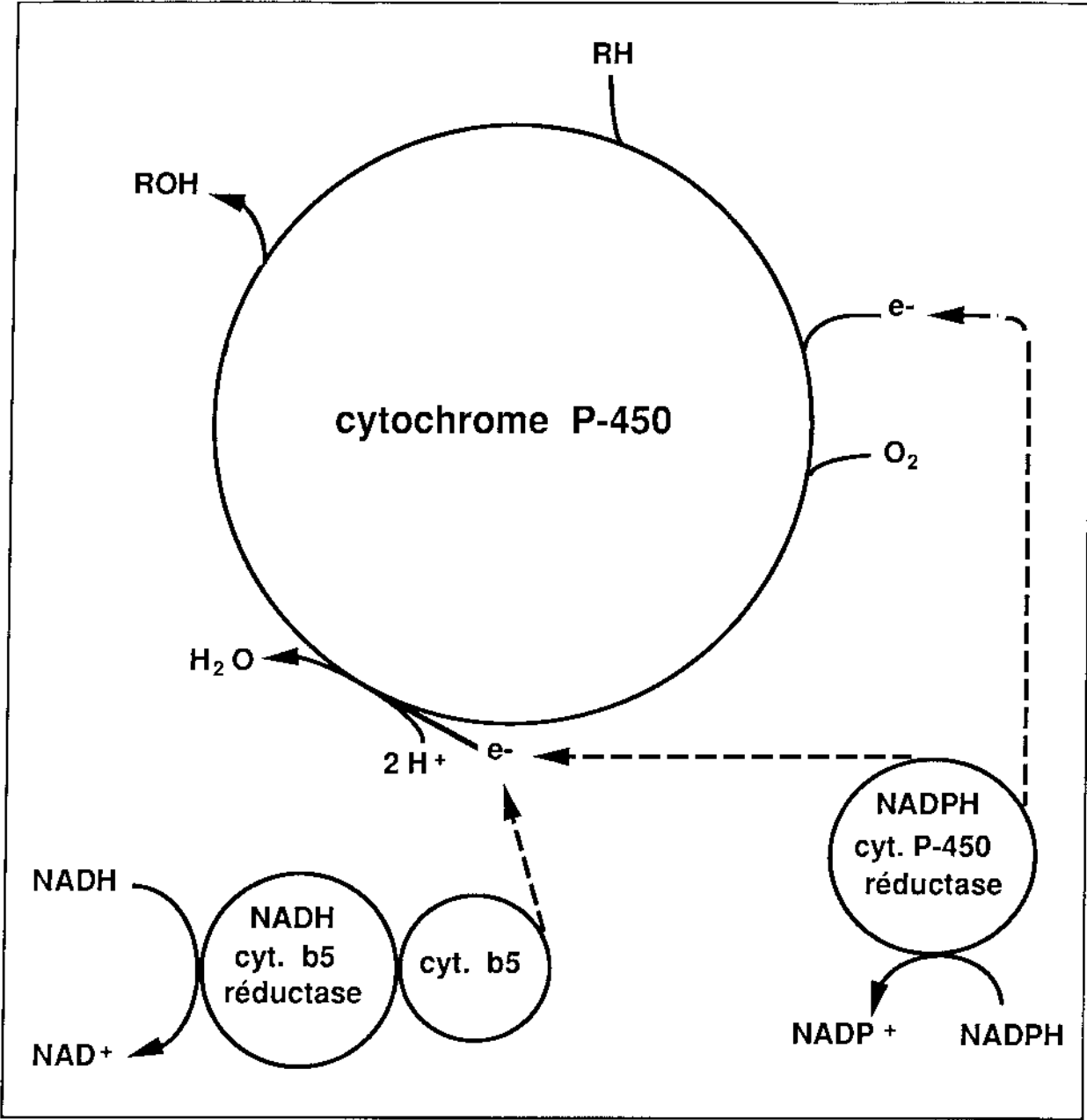


alors que le substrat organique, lui aussi stable, a ses électrons appariés. Une interaction directe entre les deux molécules est difficile. Pour enlever les électrons au substrat, deux mécanismes ont été développés, qui mettent en jeu le plus souvent une protéine associée à un groupe prosthétique qui est soit un métal de transition, soit un coenzyme organique, qui servent de transporteurs d'électrons intermédiaires.

Le premier consiste à réduire l'oxygène moléculaire par 1, 2 ou 4 électrons arrachés du substrat oxydé, pour conduire à la formation d'anion superoxyde, de peroxyde d'hydrogène, ou d'eau. Les enzymes qui catalysent des réactions en faisant intervenir un mécanisme ionique sont des oxydases.

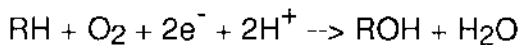
Il est ensuite apparu que l'oxygène moléculaire pouvait être transféré sur le substrat lors de la réaction d'oxydation, faisant intervenir un

Figure 4 : Structure d'une monoxygénase à cytochrome P-450 de plante.



mécanisme radicalaire capable d'activer l'oxygène moléculaire, c'est à dire de lui adjoindre un électron pour former un radical. Les oxygénases catalysent de telles réactions.

Les oxygénases sont divisées en deux catégories, les dioxygénases qui incorporent les deux atomes de la molécule d'oxygène sur le substrat, et les monooxygénases. Parmi ces dernières, on rencontre fréquemment des complexes multienzymatiques qui contiennent une protéine hémique appelée cytochrome P-450 (P-450)(Figure 4). Les cytochromes P-450 reconnaissent les substrats, les fixent et leur transfèrent l'oxygène moléculaire après activation. Le NAD(P)H est souvent le donneur des électrons qui transitent par des chaînes de transport vers l'oxygène moléculaire qui joue le rôle d'accepteur. Les chaînes de transport d'électrons se composent de deux flavoprotéines, les réductases, et du cytochrome b5. Les monooxygénases à cytochrome P-450 sont des enzymes qui catalysent l'activation de l'oxygène moléculaire grâce à deux électrons et deux protons, avec l'insertion d'un des deux atomes d'oxygène sur le substrat et formation d'eau.



Dans les années 1940, plusieurs travaux ont reporté chez les animaux l'existence d'un métabolisme oxydatif concernant les xénobiotiques. C'est en 1958 que Klingenberg et Garfinkel détectèrent simultanément dans les microsomes de foie de mammifère la présence d'un pigment dont les propriétés spectrales étaient celles d'un cytochrome de type b, et fixant le monoxyde de carbone. Le spectre de différence du complexe (réduit + CO/réduit) avait un maximum d'absorption voisin de 450 nm. Omura et Sato précisèrent la structure hémoprotéique de ce pigment qu'ils dénommèrent cytochrome P-450.

**Tableau 4** : Teneurs en cytochrome P-450 de différents matériels (d'après Werck-Reichhart, 1985 ; Vanden Bossche *et al.*, 1987).

Matériel	Fraction subcellulaire	Cytochrome P-450 pmol/mg prot
foie de lapin	microsomes	1449
testicule de porc	mitochondries	430
	microsomes	752
tubercule de topinambour	microsomes	300
spadice d'arum	microsomes	300
bulbe de tulipe	microsomes	140
graines de pois	microsomes	104
<i>S. cerevisiae</i>	microsomes	96
<i>C. albicans</i>	microsomes	83



Le rôle des monooxygénases à cytochrome P-450 fut établi par la suite pour de nombreuses réactions de monooxygénation des xénobiotiques ou de composés endogènes chez les animaux, les plantes et les microorganismes. Enfin, de nombreux auteurs ont montré que le système hydroxylant était inductible par des composés comme le phénobarbital et le méthyl 3-cholanthrène.

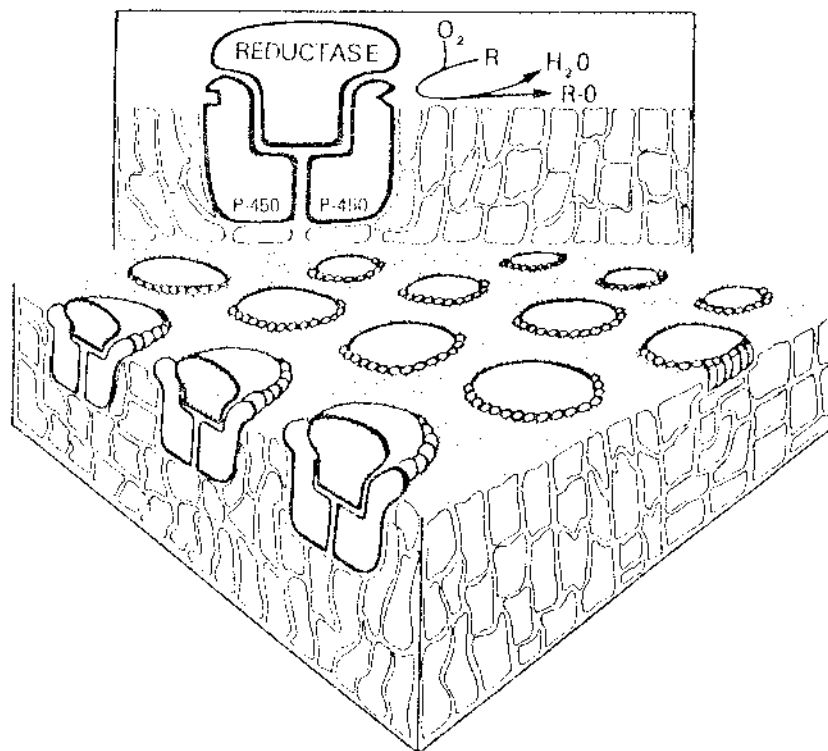
Les monooxygénases à cytochrome P-450 sont des enzymes ubiquistes. Alors que les cytochromes P-450 des vertébrés sont essentiellement localisés dans des organes particuliers (foie, poumons, glandes surrénales), les cytochromes P-450 végétaux ne semblent pas associés à des organes particuliers, mais sont présents en fortes quantités dans certains tissus de réserve (Tableau 4).

Les cytochromes P-450 ont été détectés dans quasiment toutes les fractions membranaires chez les vertébrés, mais sont prédominants dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Chez les plantes supérieures, les cytochromes P-450 détectés à ce jour sont essentiellement localisés dans le réticulum endoplasmique. Leur présence est suspectée dans les mitochondries (Stewart et Schuler, 1989), dans des fractions provacuolaires, dans le tonoplaste et dans le plasmalemma (Kjellbom *et al.*, 1985). A l'inverse, les cytochromes P-450 bactériens ne sont pas liés aux membranes, mais sont des protéines solubles. Les cytochromes P-450 de champignons sont souvent faiblement associés aux membranes.

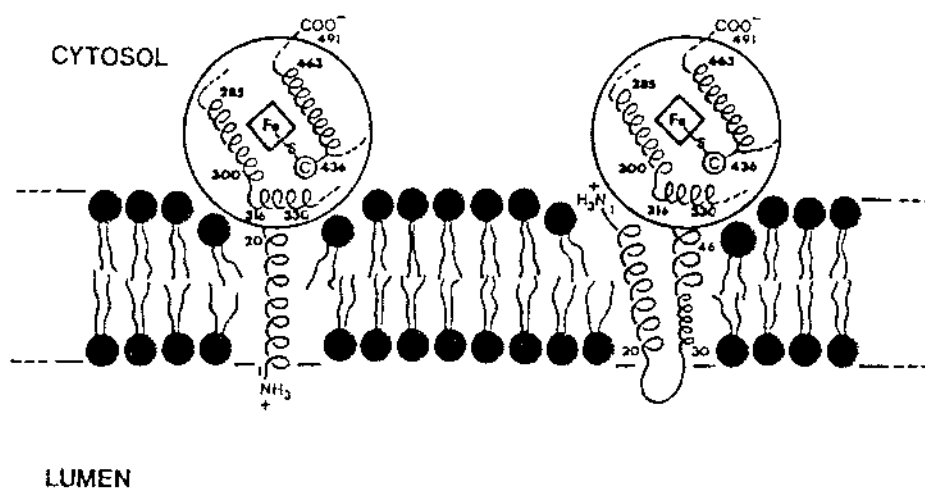
Depuis 30 ans, en raison de leurs implications en biochimie, en pharmacologie et en toxicologie, les cytochromes P-450 ont été le sujet de très nombreuses études. Elles ont montré que ces enzymes forment une catégorie d'oxydo-réductases particulièrement complexe. Ce chapitre a pour

**Figure 5 :** Représentation tridimensionnelle du complexe multienzymatique dans le réticulum endoplasmique (d'après Nebert et Gonzalez, 1987).

R représente le substrat.



**Figure 6 :** Modes d'insertion probables du cytochrome P-450 dans le réticulum endoplasmique de foie de lapin (d'après Brown et Black, 1989).



but d'en souligner la diversité structurale, la diversité des réactions catalysées comme des substrats transformés, ainsi que la complexité des mécanismes de régulation.

Il est cependant admis aujourd'hui que les monooxygénases à cytochrome P-450 végétales, peu connues, présentent de nombreux points communs avec leurs homologues microsomaux de foie de mammifère, peut être les mieux connues. De ce fait, les propriétés des cytochromes P-450 hépatiques seront abondamment exposées dans ce chapitre. Les informations rassemblées ont été pour la plupart extraites des articles de synthèse dont les références figurent en fin de ce mémoire, en caractères gras. Seules les références bibliographiques récentes ou ne figurant pas dans ces articles sont mentionnées dans le texte.

## **B. PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

Les monooxygénases à cytochrome P-450 sont des complexes multienzymatiques dont la membrane microsomale assure l'organisation spatiale. Une molécule centrale de NADPH-cytochrome P-450 réductase est entourée de plusieurs molécules de cytochrome P-450 (Figure 5). L'intégrité membranaire est nécessaire au fonctionnement du système d'oxydo-réduction. Plusieurs hypothèses existent concernant le positionnement du cytochrome P-450 par rapport à la membrane. L'hypothèse la plus probable serait que l'essentiel de la protéine soit situé hors de la membrane, retenue par l'hélice N-terminale ancrée dans la membrane (Nelson et Stroebel, 1989)(Figure 6).

### B.1. Les chaînes de transport d'électrons

Un système de transport d'électrons existe dans toutes les monooxygénases à cytochrome P-450. Celui des mammifères et des plantes supérieures participerait à de nombreux mécanismes métaboliques, incluant la désaturation des acides gras et la peroxydation des lipides, mais son intervention n'est prouvée que dans les réactions d'oxygénation dépendantes de cytochromes P-450. Il se compose de trois enzymes.

-La NADPH-cytochrome P-450 réductase (EC 1.6.2.4).

Cette flavoprotéine contient un mononucléotide flavine (FMN) et un flavine adénine dinucléotide (FAD) par protomère. Son poids moléculaire est voisin de 80,000. Elle a une structure amphiphile comprenant deux domaines. Un petit domaine hydrophobe, localisé dans la région N-terminale sert à la fois à fixer la réductase à la membrane et au cytochrome P-450. Le grand domaine hydrophile contenant l'extrémité C-terminale, fixe les deux flavines et est facilement solubilisable. Le transfert des électrons venant du cofacteur se fait de façon interne du FAD au FMN et ensuite extérieurement à une isoenzyme de cytochrome P-450. Dans un matériel donné et à la différence des cytochromes P-450, la réductase semble exister sous une forme unique.

La NADPH-cytochrome P-450 réductase des plantes possède vraisemblablement les mêmes caractéristiques (Benveniste *et al.*, 1977 ; Benveniste *et al.*, 1986). Seules quelques NADPH-cytochrome P-450 réductases végétales ont été purifiées chez *Cataranthus* (Madyastha et Coscia, 1979), la patate douce (Fujita et Asahi, 1985), le topinambour (Benveniste *et al.*, 1986) et la digitale (Petersen et Seitz, 1988).

-Le cytochrome b5.

Les microsomes contiennent une deuxième hémoprotéine, le cytochrome b5, caractérisée par son spectre de différence entre microsomes oxydés et réduits par le dithionite. Le cytochrome b5, qui ne fixe pas le monoxyde de carbone, est un composant central de la chaîne de transport des électrons de la désaturation microsomale des acides gras, d'un poids moléculaire de 16 (Jollie *et al.*, 1987) à 20 kd. Le rôle du cytochrome b5 sur les réactions catalysées par les cytochromes P-450 a été bien étudié. Il peut exercer un effet stimulateur sur les activités enzymatiques en tant que transporteur synergiste du second électron lors du cycle catalytique du cytochrome P-450.

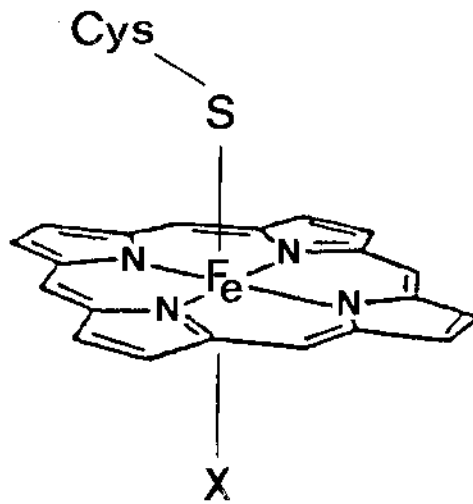
-La NADH-cytochrome b5 réductase (EC 1.6.2.2).

Elle est la flavoprotéine spécifique du transfert d'électron du NADH (FP2). Le groupement prosthétique de cette enzyme de 43 kd est constitué d'un FAD. Galle *et al.* (1984) ont purifié une NADH-ferricyanide réductase à partir de tubercules de pomme de terre. Une purification et la caractérisation de la NADH-cytochrome b5 réductase du pois, ainsi que du cytochrome b5, ont été effectuées par Jollie *et al.* (1987).

Dans les systèmes mitochondriaux et bactériens, les électrons transitent par une réductase qui est une flavoprotéine à FAD, et une protéine fer-soufre. Le couple réductase-protéine est membranaire dans les mitochondries et soluble dans les bactéries.

**Figure 7** : Le groupe prosthétique du cytochrome P-450 (d'après Black et Coon, 1987).

X représente l'ligand exogène.



## **B.2. Les cytochromes P-450**

### **B.2.1. Le groupe prosthétique**

Tous les cytochromes P-450 comprennent un groupe prosthétique formé par un cycle tétrapyrrole (ferriprotoporphyrine IX)(Figure 7), situé dans une cavité de l'apoprotéine. Le fer hémique hexavalent forme un complexe octaédrique. Quatre positions de coordination sont occupées par les électrons des atomes d'azote du cycle tétrapyrrolique, la cinquième et la sixième position, axiales, respectivement par un résidu Cys qui fournit le ligand thiolate et un ligand exogène (O<sub>2</sub>, CO, amine) ou l'atome d'oxygène d'un résidu thyrosine. La structure de l'hème a été mise en évidence par des études spectrales, et confirmée par analyse aux rayons X sur le cytochrome P-450cam bactérien. La sélectivité chimique des réactions dépend de la partie cystéine-fer-porphyrine.

### **B.2.2. L'apoprotéine**

L'apoprotéine est responsable de la fixation du substrat. La spécificité de substrat et la sélectivité des oxydations pour les différentes isoenzymes dépendent de la nature des résidus d'acides aminés de la protéine qui sont dans le site actif et qui déterminent les interactions enzyme-substrat, ce qui implique l'existence de nombreuses structures primaires. De ce fait, il a été proposé que les cytochromes P-450 représenteraient une classe de protéines analogues aux immunoglobulines. Ainsi, chaque isoenzyme pourrait contenir plusieurs structures primaires, et le potentiel existerait pour des centaines de cytochromes. Les premiers résidus de la séquence N-terminale de

**Tableau 5** : Structures primaires du cytochrome P-450 de bulbe de tulipe et de foie de rat (d'après Higashi *et al.*, 1983).

	Bulbe de tulipe		Foie de rat	
	nombre de résidus	%	nombre de résidus	%
Asx	48	10,0	41	8,8
Thr	27	5,6	26	5,5
Ser	37	7,7	31	6,7
Glx	42	8,8	46	9,9
Pro	27	5,6	27	5,7
Gly	42	8,8	36	7,7
Ala	36	7,5	25	5,3
Cys	5	1,0	6	1,2
Val	34	7,0	27	5,7
Met	7	1,5	11	2,4
Ile	19	4,0	26	5,6
Leu	45	9,4	53	11,4
Tyr	16	3,3	14	3,0
Phe	29	6,0	31	6,7
Lys	39	8,1	29	6,3
His	7	1,5	13	2,8
Arg	20	4,2	23	5,0
Trp	ND	/	2	0,4
Total	480		467	
Anioniques (Asx,Glx)		18,8		18,7
Cationiques (Arg,Lys,His)		13,8		14,1
Hydrophobes (Gly,Ala,Val,Leu,Ile)		36,7		35,6
Aromatiques (Phe,Tyr,Trp)		9,3		10,1



l'apoprotéine de cytochromes P-450 microsomaux constituent un signal d'insertion dans la membrane.

Les structures primaires complètes ont été déterminées pour de nombreux cytochromes P-450 (une centaine, Nebert *et al.*, 1987, 1989), soit après purification de la protéine, soit par extrapolation à partir du séquençage du DNA. Les structures primaires contiennent de 400 à 525 résidus. Les résidus hydrophobes sont majoritaires (40%), les anioniques et cationiques représentent entre 10 et 15% (Tableau 5). Le poids moléculaire des cytochromes P-450 varie de 47 à 67 kd.

Les polypeptides présentent des homologies de structure (de 10 à 97 % suivant les cytochromes) au niveau de plusieurs régions, ce qui suggère leurs fonctions dans les propriétés catalytiques ou structurales importantes des cytochromes natifs, et incluraient les sites de fixation de l'hème, de la NADPH-cytochrome P-450 réductase et du cytochrome b5.

Le cytochrome P-450 est inactivable en cytochrome P-420 par modification de la structure tertiaire de l'apoprotéine sous l'action de facteurs endogènes ou d'agents exogènes comme les détergents. Cette inactivation est réversible sous certaines conditions.

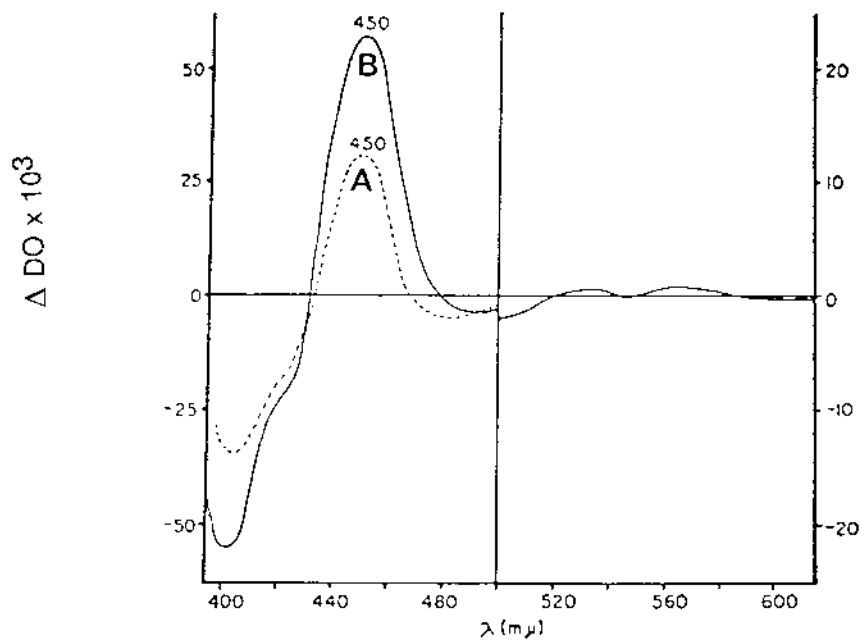
La première structure tridimensionnelle d'un cytochrome P-450 a été réalisée pour le cytochrome P-450cam bactérien. La forme générale de la protéine est celle d'un prisme triangulaire avec une dimension maximale de 60 Å et une minimale de 30 Å. L'hème pentacoordiné est situé entre 2 des 12 hélices alpha qui occupent 40 % du total de la structure. Cependant, bien que la structure primaire du cytochrome P-450cam montre des homologies avec celles des cytochromes P-450 liés aux membranes, il n'est pas certain que sa structure tertiaire soit comparable à celles de ces derniers.

La multiplicité des structures peut aussi expliquer les caractéristiques immunologiques des cytochromes P-450. Ainsi, il existe des réactivités croisées entre différentes isoformes animales (vertébrés et invertébrés), végétales ou bactériennes (Bourett *et al.*, 1989 ; Stewart et Schuler, 1989 ; O'Keefe et Leto, 1989). A l'inverse, certains anticorps peuvent être très spécifiques, comme ceux préparés contre un cytochrome P-450 de tulipe (Higashi *et al.*, 1983), qui réagit uniquement avec des microsomes de quelques cultivars de tulipe et ne présentent pas de réactivité croisée avec des microsomes d'autre espèces végétales (topinambour, avocat,...).

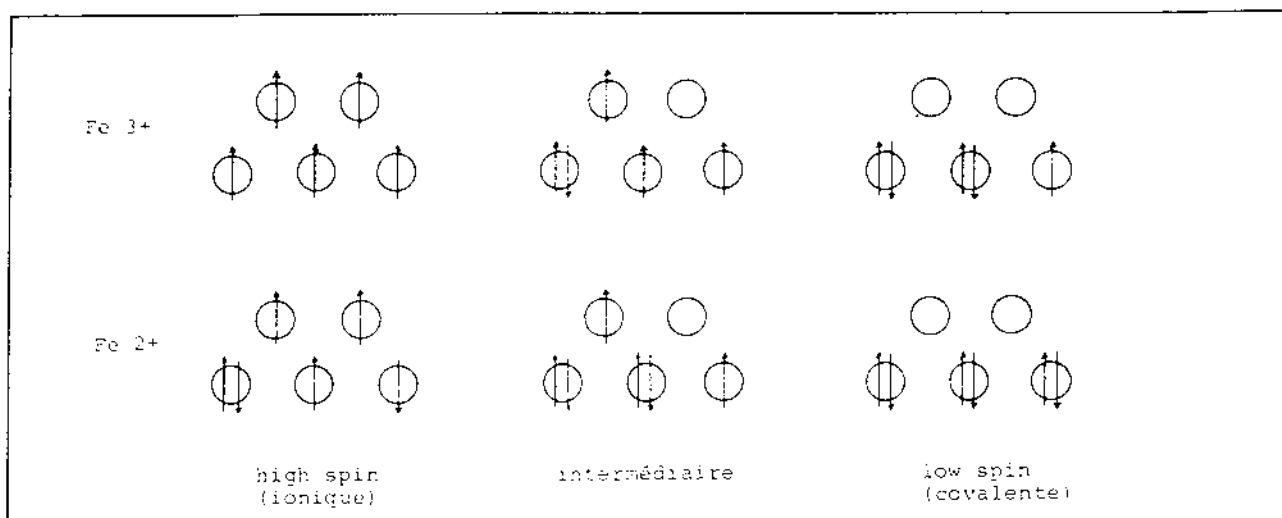
Des anticorps polyclonaux anti-NADPH-cytochrome P-450 réductase de topinambour ne reconnaissent pas les réductases d'animaux et de végétaux primitifs mais inhibent toutes les réductases des plantes supérieures testées (Benveniste *et al.*, 1989 ; Zimmerlin et Durst, 1990 a).

Plusieurs purifications partielles des différentes composantes du système multienzymatique ont conduit à des reconstitutions, mais les activités enzymatiques obtenues sont faibles. C'est ainsi le cas chez *Catharanthus*, capable d'hydroxyler le géraniol, chez le topinambour dans le cas de la CA4H (Gabriac *et al.*, 1985 ; Benveniste *et al.*, 1986) et chez la digitale où Petersen et Seitz (1988) ont reconstitué une activité digitoxine hydroxylase. Les purifications à l'homogénéité n'ont été menées à bien que chez quelques espèces végétales comme la tulipe et l'avocat (Higashi *et al.*, 1983 ; O'Keefe et Leto, 1989). D'autre part, l'éthoxycoumarine O-déalkylase et la CA4H du topinambour sont également purifiées (D. Werk-Reichhart, communication personnelle).

**Figure 8** : Spectres de différence de microsomes de foie de rat réduits par le NADH (A) et le dithionite (B) en présence de monoxyde de carbone (d'après Black et Coon, 1987).



**Figure 9** : Configuration électronique de la couche 3d des complexes hémiques, ferreux et ferriques (d'après Rivière, 1984).



## C.PROPRIÉTÉS SPECTRALES DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME

### P-450

Le maximum d'absorption inhabituel du complexe fer réduit-carbonyl à 450 nm (448 à 454 nm) différencie les cytochromes P-450 des autres hémoprotéines (myoglobine 435 nm, peroxydase 438 nm). Ce pic déplacé vers le rouge est dû à la présence de l'atome de soufre du résidu Cys qui fournit le cinquième ligand du fer hémique. Le spectre du cytochrome P-450 montre à l'état oxydé deux bandes  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement à 568 et 535 nm, caractéristiques des cytochromes de type b, ainsi qu'une bande de Soret entre 390 et 420 nm (Figure 8).

Ce sont les cinquième et sixième ligands du cycle tétrapyrrolique qui conditionnent les caractéristiques spectrales. En effet, *in vitro*, certaines molécules modifient le spectre d'absorption du cytochrome P-450 oxydé en altérant la configuration électronique du fer. L'atome de fer contient 5 ou 6 électrons répartis en 5 orbitales 3d, dont trois ont une énergie plus faible que les deux autres (Figure 9). Le cytochrome P-450 natif est en équilibre entre deux formes. En l'absence de substrat, les électrons d'un ligand fort (par exemple un résidu contenant un OH) déplaceront ceux du fer vers des orbitales de basse énergie en réduisant le nombre d'électrons célibataires du métal. Ils créent ainsi un état "low spin" (Soret à 418 nm), hexacoordiné à deux ligands axiaux. La fixation d'un substrat conduit à un déplacement de l'équilibre vers le complexe pentacoordiné (Figure 10). Les électrons occupent au maximum les orbitales et créent un état "high spin" (Soret = 394 nm) comprenant le seul résidu Cys comme ligand axial. L'état de spin se répercute sur les spectres d'absorption. Les formes "high spin" présentent un maximum d'absorption vers 390 nm, maximum déplacé vers 420 nm pour les formes "low spin".

En spectrophotométrie différentielle, on distingue trois types de

Figure 10 : Représentation schématique du complexe octaédrique (d'après Rivière, 1984).

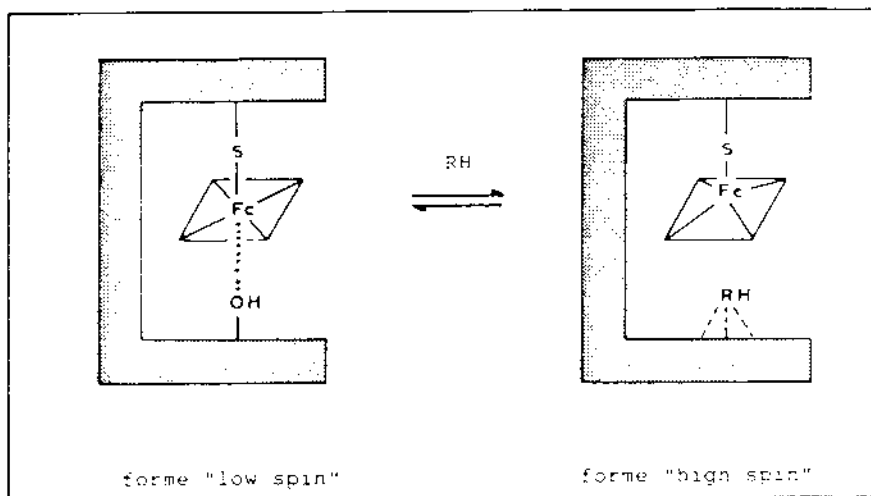
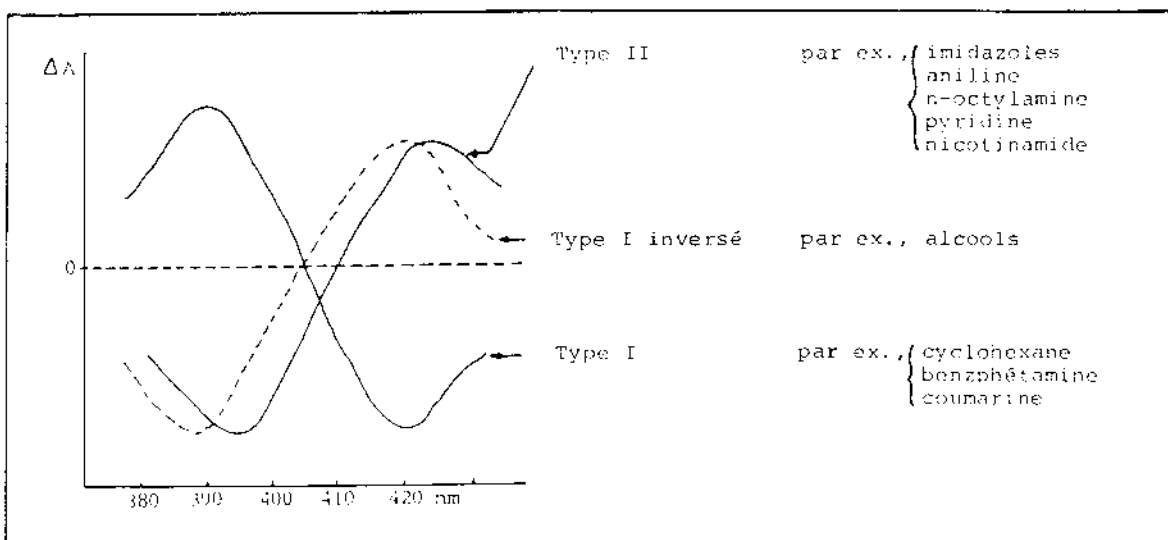


Figure 11 : Les différents spectres d'interaction du cytochrome P-450 oxydé (d'après Rivière, 1984).



spectres (Figure 11). La formation des spectres dépend de l'équilibre initial entre les formes "high" et "low spin" du cytochrome P-450, des capacités de coordination de l'effecteur et de l'abondance de l'enzyme concernée. L'intensité du changement spectral est aussi proportionnelle à la concentration du complexe enzyme-effecteur.

-Les spectres de type I (max 390 nm, min 420 nm) concernent la plupart des substrats des cytochromes P-450. Le substrat, en se fixant, provoque la rupture du sixième ligand de coordination du fer hémique, et le passage de ce dernier de l'état "low spin" à l'état "high spin". On peut, à partir des spectres, calculer une valeur  $K_s$  (constante de dissociation spectrale) qui représente l'affinité du substrat pour le cytochrome P-450.

-Les spectres de type II (max 425/435 nm, min 390/410 nm) sont caractéristiques des molécules qui sont le plus souvent des inhibiteurs comme les amines. En effet, la fixation directe de l'atome d'azote de la molécule sur le fer de l'hème empêche la fixation ultérieure de l'oxygène moléculaire et du monoxyde de carbone et accentue le caractère "low spin".

-Les spectres de type I inversé, (ou II modifié) (max 420 nm, min 390 nm) sont formés en présence d'alcools, de phénols, de drogues, d'alcaloïdes et de stéroïdes, substrats ou non des cytochromes P-450. Ils se fixent sur l'apoprotéine en d'autres points que le site catalytique.

## **D.MODE D'ACTION DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

### **D.1.Réactions catalysées**

Les cytochromes P-450 sont des enzymes clé de la biosynthèse et du catabolisme de composés endogènes, comme de l'élimination, la détoxification et l'activation métaboliques de substrats exogènes par insertion de groupes fonctionnels. Très souvent, les modifications chimiques de la molécule

**Tableau 6** : Réactions catalysées par des monooxygénases à cytochrome P-450 chez les végétaux supérieurs.

---

Métabolisme des terpènes

oxydation de l' <i>ent</i> -kaurene	Murphy et West, 1969
hydroxylation du géraniol et du nérol	Meehan et Coscia, 1973
hydroxylation de l'acide abscissique	Gillard et Walton, 1976

Métabolisme des stéroïdes

déméthylation en C-14 des stéroïdes	Burden <i>et al.</i> , 1987
hydroxylation de la digitoxine	Petersen et Seitz, 1988

Métabolisme des phénylpropanoïdes et flavonoïdes apparentés

hydroxylation de l'acide cinnamique	Benveniste et Durst, 1974
hydroxylation de l'acide férulique	Grand, 1984
hydroxylation de l'ipoméamarone	Fujita <i>et al.</i> , 1982
hydroxylation du psoralen	Hamerski et Mattern, 1988
hydroxylation de la S-naringénine	Hagmann <i>et al.</i> , 1983
	Kochs et Grisebach, 1986
hydroxylation du 3,9-dihydroxyptérocarpan	Hagmann <i>et al.</i> , 1984
hydroxylation du 5-O-(4-coumaroyl)shikimate	Heller et Kuhn, 1985
isoflavone synthase	Fritsch <i>et al.</i> , 1986
biosynthèse de la glycéolline	Ebel et Grisebach, 1988

Métabolisme des acides gras

désaturation des acides gras	Ben Abdelkader <i>et al.</i> , 1973
époxydation des acides gras	Croteau <i>et al.</i> , 1975 ; Salaün <i>et al.</i> , 1989
$\omega$ -hydroxylation de l'acide palmitique	Soliday et Kolattukudy, 1977
IC-hydroxylation de l'ac. hydroxypalmitique	Soliday et Kolattukudy, 1978
IC-hydroxylation de l'acide laurique	Salaün <i>et al.</i> , 1978
$\omega$ -hydroxylation de l'acide laurique	Benveniste <i>et al.</i> , 1982

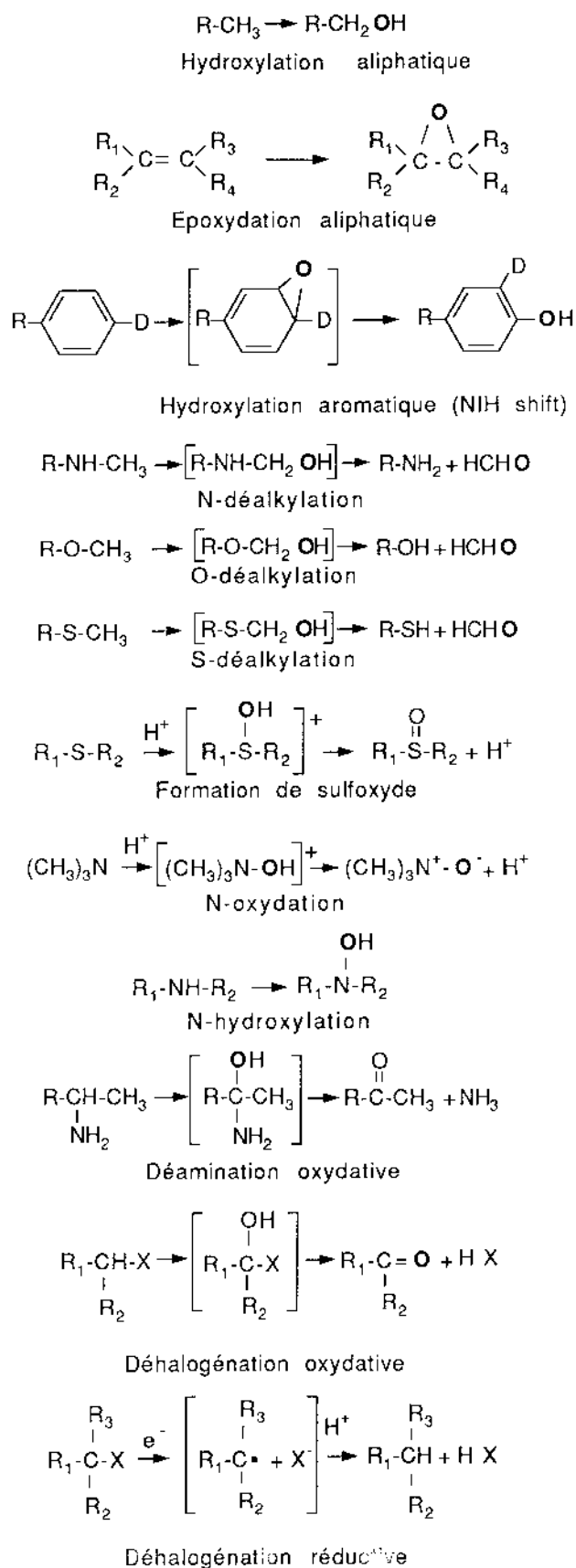
Métabolisme des composés exogènes

N-déméthylation du monuron	Frear <i>et al.</i> , 1969
O-déalkylation du <i>p</i> -nitroanisole	McPherson <i>et al.</i> , 1975 a
hydroxylation du benzo[a]pyrène	McPherson <i>et al.</i> , 1975 b
N-déméthylation de la N-méthylaniline	Young et Beevers, 1976
hydroxylation du 2,4-D	Makeev <i>et al.</i> , 1977
N-déméthylation de l'aminopyrine	Fonné-Pfister <i>et al.</i> , 1988
N-déméthylation du chlortoluron	Fonné, 1985
O-déalkylation du métolachlor	Moreland <i>et al.</i> , 1989 a
hydroxylation du diclofop	McFadden <i>et al.</i> , 1989 ; Zimmerlin et Durst, 1990 a
hydroxylation du bentazon	McFadden <i>et al.</i> , 1990
hydroxylation du primisulfuron	Fonné-Pfister <i>et al.</i> , 1990 a
hydroxylation du chlortoluron	Fonné-Pfister <i>et al.</i> , 1990 b
hydroxylation du chlorsulfuron	Frear et Mardaus, 1990
O-déalkylation de l'éthoxycoumarine	Werck-Reichhart <i>et al.</i> , 1990
O-déalkylation de l'éthoxyrésorufine	Werck-Reichhart <i>et al.</i> , 1990

---

Figure 12 : Principaux types de réactions catalysées par des cytochromes P-450.

L'oxygène provenant de l'oxygène moléculaire est noté en gras (d'après Dawson et Eble, 1986; Nebert et Gonzalez, 1987).





abolissent leur effet biologique ou thérapeutique, mais les cytochromes P-450 participent aussi à l'activation de composés par formation de sulfoxydes, de N-oxydes et en général d'agents électrophiles, qui, après fixation covalente sur l'ADN, sont la source de mutations et de dérégulations de la transcription.

Le métabolisme des composés endogènes concerne principalement les lipides (acides gras, prostaglandines, stéroïdes) précurseurs de nombreuses hormones, vitamines,... Les cytochromes P-450 sont responsables du métabolisme de xénobiotiques lipophiles comme les pesticides, les polluants, les additifs alimentaires, les drogues et les agents thérapeutiques.

Chez les plantes, l'intervention des cytochromes P-450 a d'abord été établie dans le métabolisme de substrats physiologiques appartenant à plusieurs voies du métabolisme secondaire des végétaux (Tableau 6). Ces protéines seraient en outre impliquées dans le développement du goût lors de la maturation des fruits (Bozak *et al.*, 1990). Comme leurs homologues animaux, ils affectent aussi le métabolisme de composés exogènes.

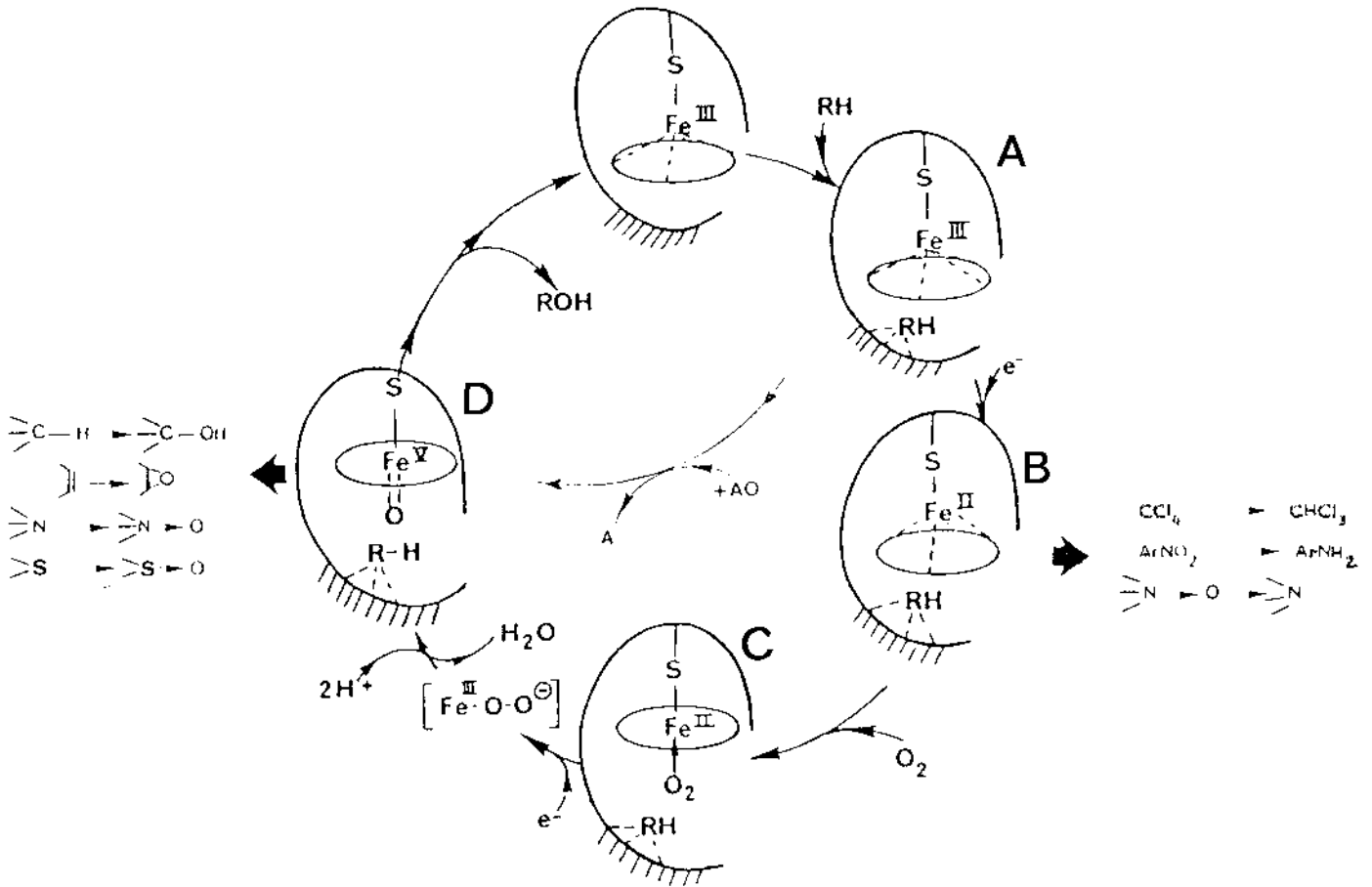
Les cytochromes P-450 catalysent typiquement des hydroxylations aliphatiques et aromatiques de substrat, mais aussi d'autres réactions d'oxydation, et des réductions (Figure 12). Récemment, les cytochromes P-450 ont été décrits comme responsables de la conversion d'aldéhydes en acides carboxyliques, et d'alcools en aldéhydes (Watanabe *et al.*, 1990 ; Ullah *et al.*, 1990).

## **D.2.Fonctions des monooxygénases à cytochrome P-450**

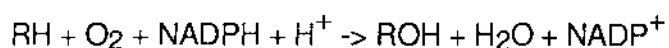
Dans la catalyse typique des hydroxylations, le cytochrome P-450 fonctionne comme une monooxygénase où RH représente le substrat et ROH le

**Figure 13** : Cycle catalytique du cytochrome P-450 (d'après Mansuy *et al.*, 1989).

RH représente le substrat, ROH le produit oxydé. AO est un peroxyde organique. Les électrons proviennent de la NADPH-cytochrome P-450 réductase.



produit oxygéné correspondant. L'oxygénation d'un substrat nécessite l'apport d'oxygène moléculaire et d'électrons provenant le plus souvent du NADPH. Elle comprend plusieurs étapes (Figure 13).



#### A. Formation du complexe enzyme-substrat.

La fixation du substrat sur le cytochrome oxydé entraîne le déplacement du complexe vers la forme pentacoordinée "high spin" dont le potentiel rédox augmente.

#### B. Réduction du complexe.

Le complexe "high spin" enzyme-substrat Fe<sup>III</sup>-RH est réduit par un électron apporté du NADPH par la NADPH-cytochrome P-450 réductase. Ce complexe est fortement donneur d'électrons. Il est alors capable de fixer des ligands comme l'oxygène moléculaire, le monoxyde de carbone, les amines.

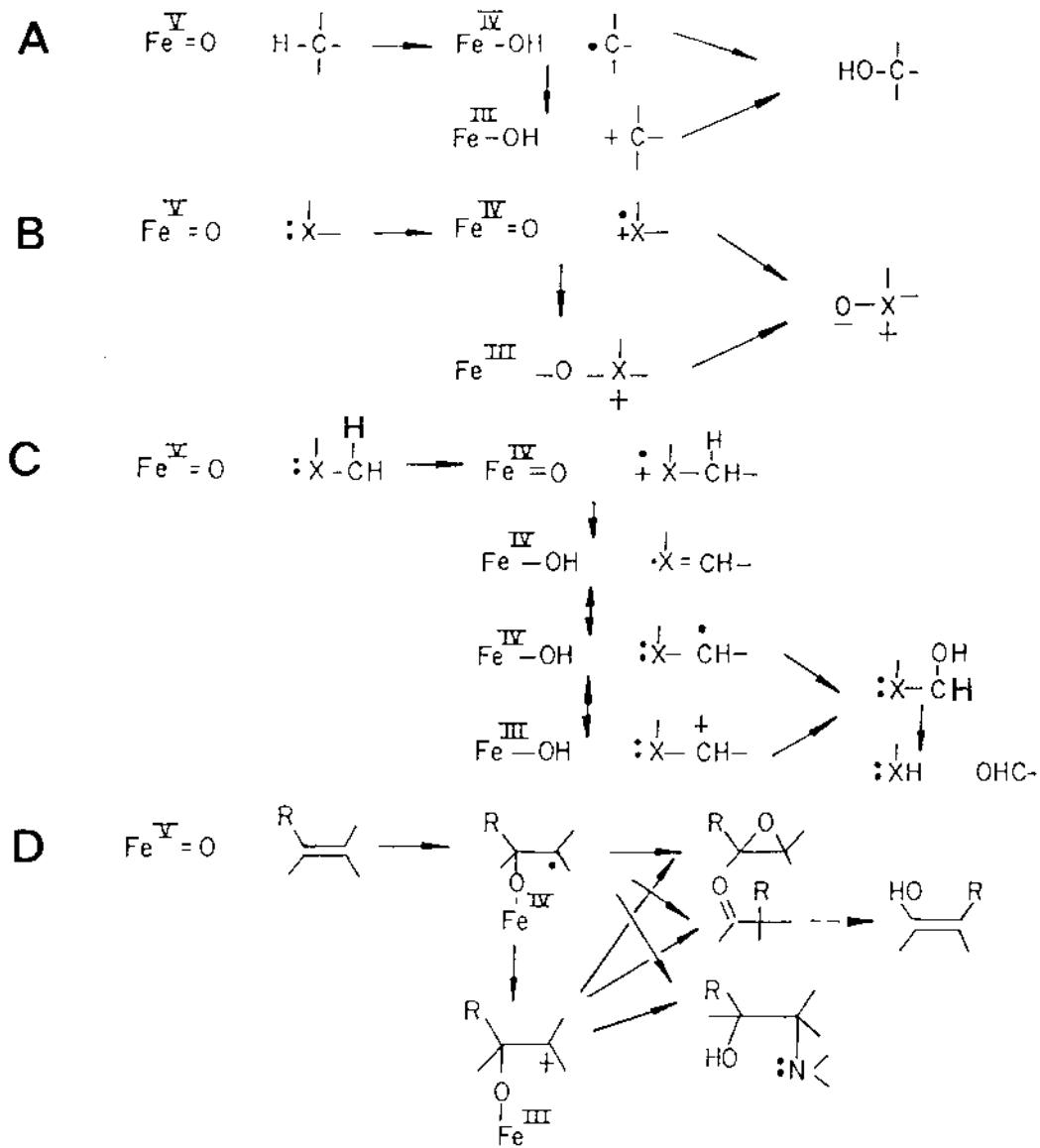
#### C. Fixation de l'oxygène sur le fer.

L'oxygène moléculaire se fixe sur l'hème et conduit au complexe Fe<sup>I</sup>-O<sub>2</sub>-RH "low spin" relativement stable. A ce niveau le monoxyde de carbone peut entrer en compétition avec l'oxygène. Cette fixation est photoréversible, la longueur d'onde la plus favorable étant 450 nm.

#### D. Activation et transfert de l'oxygène au substrat.

Un second électron apporté par la NADPH-cytochrome P-450 réductase ou par le système cytochrome b<sub>5</sub> et sa réductase réduit le complexe par activation de l'oxygène moléculaire de l'hème et aboutit à la forme Fe<sup>III</sup>-O-O<sup>-</sup>. Le transfert du second électron est souvent considéré comme l'étape limitante du cycle. Deux protons provenant du milieu aqueux sont oxydés en H<sub>2</sub>O par un

**Figure 14** : Mécanismes réactionnels de l'oxydation d'un substrat par le cytochrome P-450, par l'intermédiaire du complexe FeV=O (d'après Guengerich et Liebler, 1985).



atome d'oxygène. Un complexe  $FeV=O$  (ferryloxo en équilibre avec  $FeIV-O^\ominus$ ) à fort pouvoir oxydant est ensuite formé. Le transfert du second atome d'oxygène au substrat peut se faire suivant plusieurs mécanismes radicalaires dépendant du point d'attaque du ferryloxo (Figure 14). Dans tous les cas, la première étape serait l'arrachement d'électrons ou de  $H^\ominus$ .

-L'insertion d'oxygène sur une liaison sigma entre un hydrogène et un carbone  $sp^3$  (hydroxylation aliphatique, O- et S-déalkylations, N-alkyl hydroxylation et déalkylation) comprend deux étapes (A) : arrachement d'un atome d'hydrogène par le ferryloxo et oxydation du radical libre intermédiaire par le  $FeIV-OH$  dans le site actif qui transfère le ligand OH.

-L'oxygénation d'un hétéroatome portant un doublet électronique libre (B)(O-, N-, S- et thioesters oxydations) est initiée par le transfert d'un électron générant un cation radical, suivi de la recombinaison de l'oxygène actif avec l'hétéroatome électrophile.

-La déalkylation d'un hétéroatome (C) est causée par les abstractions successives par le ferryloxo d'un électron de l'hétéroatome et d'un proton du carbone en  $\alpha$ . Le rebond de  $HO^\ominus$  produira l'hydroxylation de ce carbone, puis la décomposition de l'intermédiaire hydroxylé pour aboutir à l'hétéroatome déalkylé.

-L'oxygénation de liaisons  $\pi$  de carbones  $sp^2$  (D)(époxydation de liaisons doubles et de cycles aromatiques, hydroxylations aromatiques, oxydation d'esters) s'effectue sur le carbone le plus substitué. Des cations ou des radicaux libres intermédiaires sont formés par l'addition de  $Fe=O$  à la double liaison induisant une réaction intramoléculaire avec formation de l'époxyde correspondant. Ce mécanisme est similaire à celui qui se produit lors des N-alkylations de l'hème (liaison covalente de certains substrats suicides sur la porphyrine). Lors des hydroxylations aromatiques, des migrations de groupes (protons, deutérium, chlore) peuvent survenir traduisant ainsi la formation d'intermédiaires époxydes. C'est le mécanisme de "NIH shift".

C'est lors de cette étape d'activation et de transfert de l'oxygène que les substrats suicides sont activés.

Quel que soit le mécanisme d'insertion de l'oxygène, la suite des réactions conduit à la libération d'une molécule de produit hydroxylé et à la régénération du cytochrome P-450.

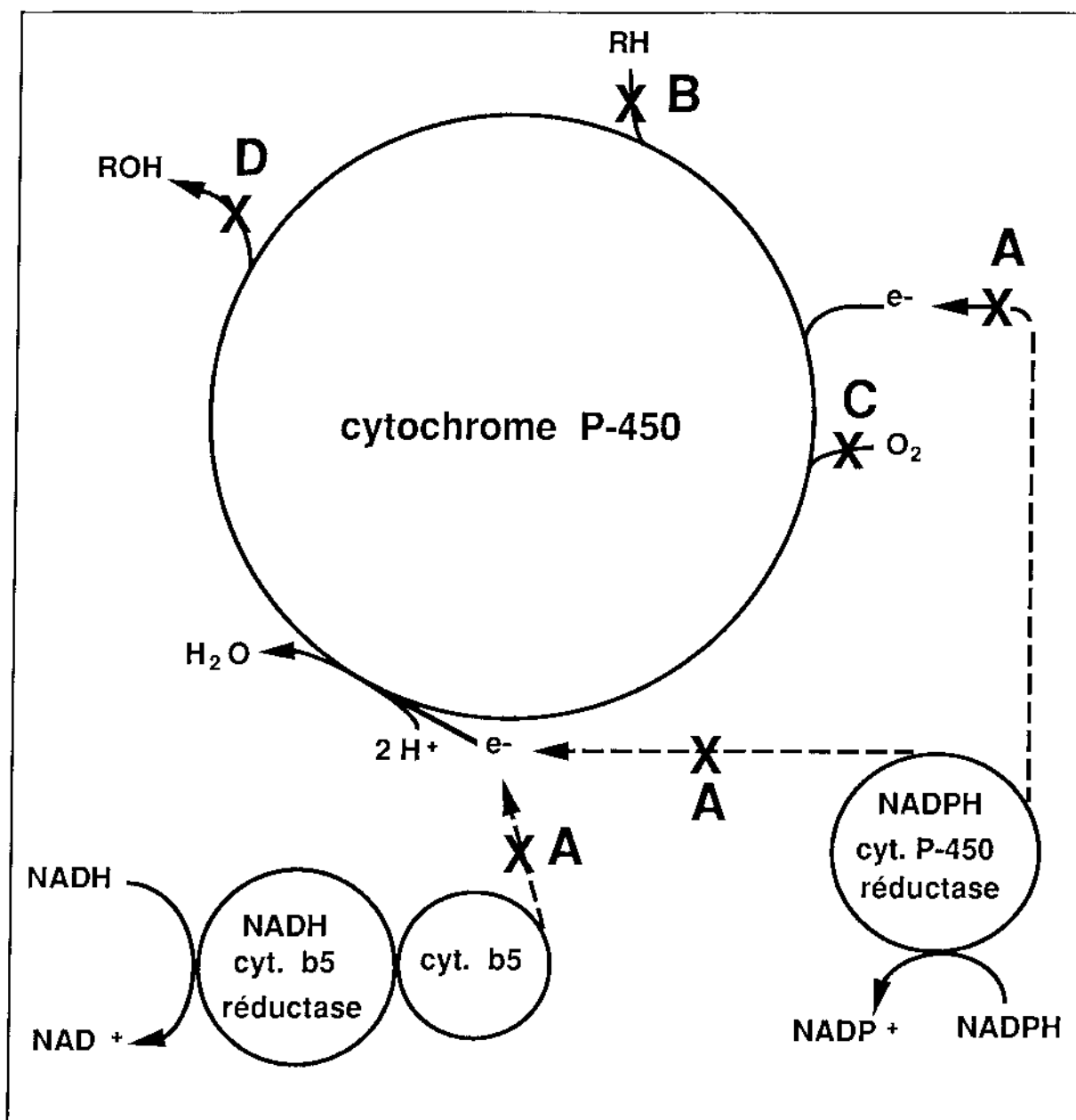
Dans certains cas, la réduction de l'oxygène n'est pas toujours étroitement couplée à l'hydroxylation du substrat. Le complexe ferreux-dioxygène relargue des anions superoxydes qui génèrent du peroxyde d'hydrogène. Celui-ci peut, dans certains cas, servir de donneur d'oxygène pour l'hydroxylation du substrat, car les cytochromes P-450 animaux et végétaux ont la capacité d'oxyder des substrats organiques aux dépens d'un (hydro)peroxyde organique.



De telles réactions sont d'un grand intérêt car elles permettent les études de mécanismes en l'absence d'oxygène, de réductase, de NADPH. Le fer reste sous forme oxydée. Dans de tels systèmes, l'espèce réactive n'est pas fixée au métal et apparaît être un radical  $\text{RO}^\circ$  ou  $\text{ROO}^\circ$ .

Enfin, sous faible pression en oxygène ou sous conditions anaérobies, des transferts d'électrons à partir du cytochrome P-450 ferreux servent à la réduction de certains xénobiotiques comme les N-oxydes, les composés nitrés et les époxydes.

Figure 15 : Les étapes sensibles du cycle catalytique d'une monooxygénase à cytochrome P-450.



## **E.RÉGULATION DES ACTIVITÉS DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450**

Plusieurs niveaux de régulation des activités des monooxygénases à cytochrome P-450 existent. Les effecteurs contrôlent l'augmentation ou la réduction des activités enzymatiques, par des inhibitions ou des stimulations, ou ils agissent sur les concentrations en cytochromes P-450.

### **E.1. Inhibition des activités enzymatiques**

De très nombreux travaux ont porté sur les inhibiteurs des cytochromes P-450, à la suite desquels plusieurs classifications ont été proposées. Ces molécules interviennent au niveau de plusieurs étapes sensibles du cycle catalytique (Figure 15).

- A. Transfert des électrons des réductases au cytochrome P-450.
- B. Fixation du substrat (compétiteurs du substrat)
- C. Fixation de l'oxygène moléculaire (ligands non métabolisés qui forment des liaisons avec le fer)
- D. Oxydation du substrat (molécules qui sont activées lors de la catalyse en intermédiaires réactifs qui se lient de façon covalente à l'hème ou à l'apoprotéine : substrats suicides).

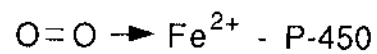
Enfin, des inhibiteurs qui se fixent simultanément sur les régions lipophiles et sur le fer hémique peuvent induire des modifications structurales et des dénaturations. Ces composés comprennent les alcools, des chélateurs de métaux,....

A. Les inhibiteurs du transfert d'électrons entre les réductases et le cytochrome P-450 sont :

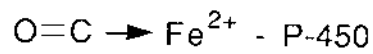


**Figure 16** : Formation de complexes stables par des ligands qui empêchent la fixation de l'oxygène moléculaire sur le fer hémique au cours du cycle catalytique.

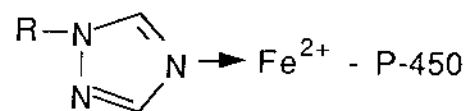
Fixation de l'oxygène



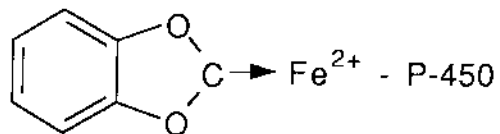
Fixation du monoxyde de carbone



Fixation d'hétérocycles azotés



Fixation de composés à structure méthylène dioxobenzène



-des compétiteurs du NADPH au niveau du site de fixation du donneur d'électrons :  $\text{NADP}^+$ , 2'-AMP

-des agents qui agissent sur la réductase par blocage des SH libres du site actif (mercuriels) : *p*-chloromercuribenzoate

-des découplants (accepteurs exogènes d'électrons) : cytochrome *c*, DCPIP

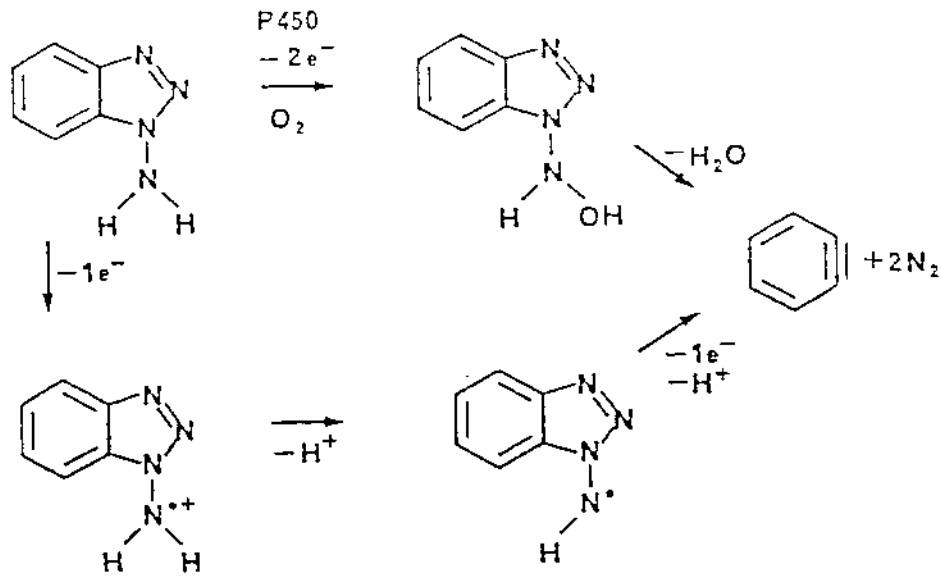
B. Les inhibiteurs de la fixation du substrat comprennent des substrats alternatifs qui entrent en compétition pour le site actif. Leur rôle est important en pharmacocinétique et leur action est tributaire de la spécificité de substrat des enzymes.

C. Les inhibiteurs de la fixation de l'oxygène moléculaire (Figure 16) regroupent les ligands qui se coordinent avec le fer ferreux (monoxyde de carbone). La réduction des cytochromes P-450 est alors plus difficile. Des composés très actifs (induisant des spectres de type II), comme les amines aromatiques et aliphatiques (SKF 525A, pyridine, imidazoles, métyrapone, ellipticines, hydrazines), se fixent sur l'hème au niveau du sixième ligand axial par le doublet libre de l'atome d'azote et empêchent la fixation de l'oxygène. De même les composés possédant une fonction méthylène dioxobenzène (pipéronyl butoxyde) forment avec le fer des liaisons C-Fer qui aboutissent aux mêmes conséquences. De tels inhibiteurs sont transformés en intermédiaires réactifs qui se coordinent de façon quasi-irréversible au groupement prosthétique.

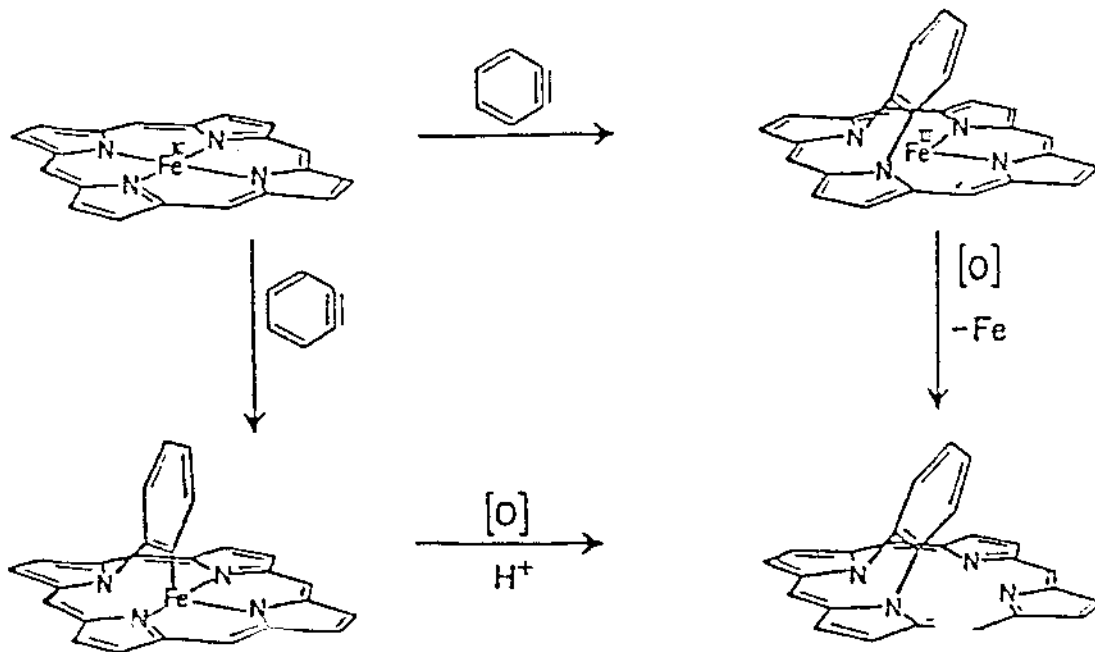
D. Les inhibiteurs irréversibles détruisant le cytochrome P-450 agissent après activation lors de la catalyse enzymatique pendant ou après le transfert de l'oxygène. Ce sont des substrats suicides reconnus par l'enzyme qui sont activés en intermédiaires instables et réactifs alkylants. L'utilisation de tels

Figure 17 : Mode d'action d'un inhibiteur suicide, l'ABT (d'après Ortiz de Montellano *et al.*, 1984).

A. Mécanismes possibles de la formation de la benzyne lors de l'activation de l'ABT par le cytochrome P-450.



B. Modes de fixation possibles de la benzyne sur l'hème du cytochrome P-450.



substrats est intéressante pour plusieurs raisons. Ils ne sont, en principe, reconnus que par l'enzyme concernée. La spécificité des substrats suicides se situe au niveau de la réaction chimique qui est nécessaire pour démasquer la fonction réactive et déclencher le processus d'inactivation, et au niveau de l'analogie de structure avec le substrat.

Ils se répartissent en deux classes :

- les agents qui se fixent de façon covalente aux protéines. Ce sont des composés contenant du soufre (parathion) ou des halogènes (chloramphénicol).

- les agents qui alkylent l'hème pour qui il existe plusieurs types de structures, par exemple :

- les oléfines et les acétylènes terminales qui provoquent une alkylation de l'hème par activation des liaisons  $Pi$

- les composés à fonction N-N (ABT, hydrazines, alkylsydnones) qui conduisent à des aryl porphyrines (Grab *et al.*, 1988).

De nombreuses molécules sont connues comme inhibiteurs suicides des cytochromes P-450 animaux mais elles ne sont que peu ou pas actives chez les végétaux (Fonné, 1985 ; Werck-Reichhart, 1985). L'ABT est un inhibiteur suicide des cytochromes P-450 animaux également actif chez les végétaux (Reichhart *et al.*, 1982). Le mode d'action de l'ABT est explicité par la figure 17. Il met en jeu la formation d'une benzyne réactive lors de l'oxydation de l'ABT (A), puis la fixation de la benzyne sur l'hème (B).

## **E.2.Activation des activités enzymatiques**

Certains polycations comme les polyamines ont été signalés comme stimulant les activités des cytochromes P-450 hépatiques chez les mammifères. Il a été montré récemment que la spermine pouvait initier la

conversion du cytochrome P-420 en cytochrome P-450 (Hui Bon Hoa *et al.*, 1990). Des flavonoïdes et des stéroïdes peuvent aussi stimuler certaines activités P-450. Ces composés pourraient intervenir en influant sur les interactions NADPH-cytochrome P-450 réductase/cytochrome P-450 ou en stabilisant les différents composants du système multienzymatique microsomal au niveau d'interactions hydrophobes.

### **E.3. Diminution des concentrations en cytochrome P-450**

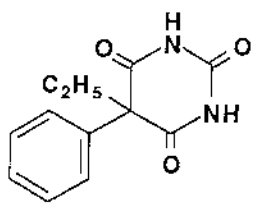
Chez les animaux, des effecteurs endogènes mal connus contrôlent les variations physiologiques et pathologiques de la concentration en cytochrome P-450 (âge, facteurs nutritionnels, sexe, rythmes circadiens,...). Les cytochromes P-450 peuvent ainsi subir des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles (résidus N-bloquants, modification des chaînes latérales par acylation, alkylation et phosphorylation).

Des composés exogènes sont capables de diminuer les teneurs en cytochromes P-450. Ce sont les agents qui dégradent l'hème (peroxydes, halocarbures, cyclopropyl amines), les inhibiteurs de la synthèse de l'hème (ions métalliques : Co ; molécules organiques : acide lévulinique, gabaculine), et les inhibiteurs de la synthèse de l'apoprotéine (éthionine, actinomycine D, cycloheximide, puromycine).

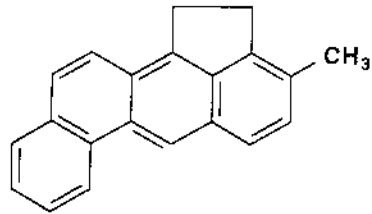
### **E.4. Induction**

Des xénobiotiques peuvent augmenter les teneurs en cytochromes P-450 par des mécanismes complexes qui conduisent à une synthèse accrue et/ou à

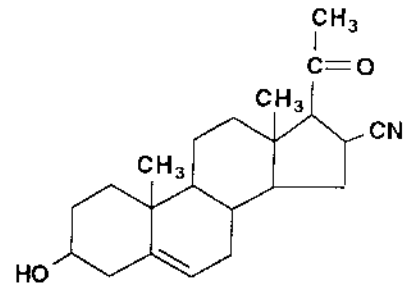
**Figure 18** : Principaux types d'inducteurs de monooxygénases à cytochrome P-450 hépatiques.



**Phénobarbital**



**3-Méthylcholanthrène**



**Prégnénone 16α-carbonitrile**

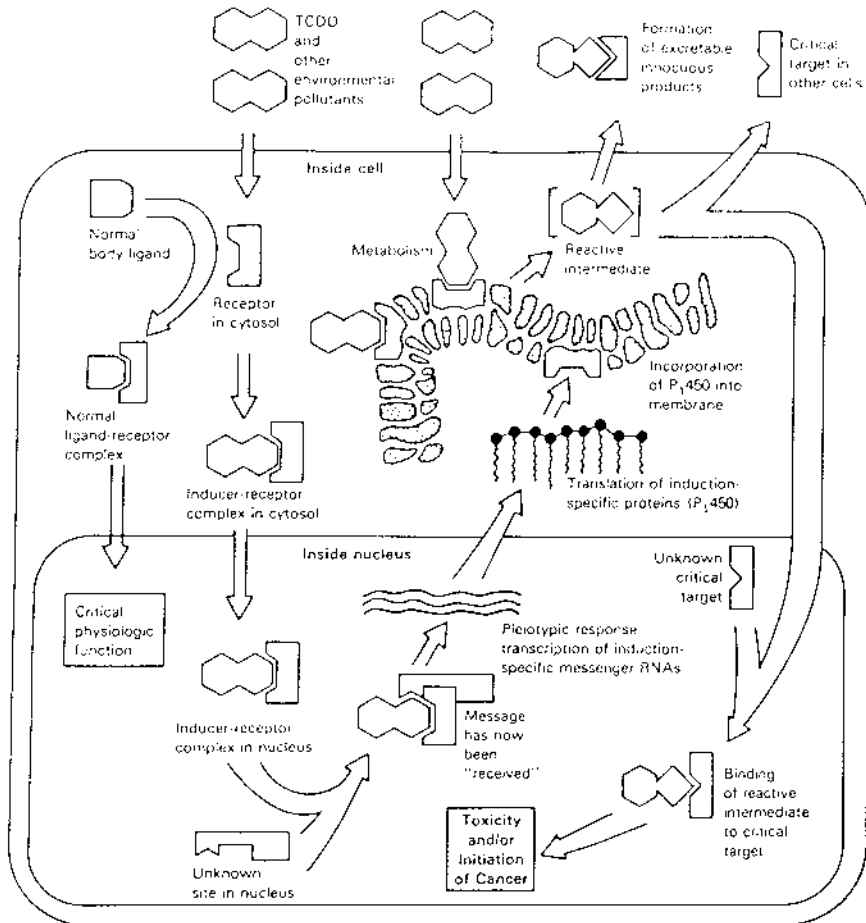
une dégradation diminuée de l'hémoprotéine. Ainsi le manganèse et le sélénium ont un rôle de stabilisation de l'hémoprotéine (Werk-Reichhart, 1985).

Cependant le mécanisme principal entraînant une augmentation des teneurs en cytochromes P-450 est l'induction. Tous les organismes vivants possèdent des mécanismes qui leur permettent de s'adapter à des changements de leur environnement. En particulier, ils peuvent augmenter sélectivement leur concentration cellulaire en certaines protéines. En effet, les cytochromes P-450 existent sous forme de nombreuses isoenzymes constitutives ou inductibles. Les premières sont impliquées dans les réactions physiologiques et leur synthèse s'effectue à taux et vitesse constants, dépendante de régulations hormonales et de messagers secondaires. Les secondes, impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (cytochromes P-450 hépatiques) sont présentes normalement à l'état de traces et sont très rapidement synthétisées en réponse à des stimuli chimiques ou hormonaux spécifiques.

L'augmentation d'activité qui en découle est un phénomène complexe qui peut avoir plusieurs causes. L'induction ne se produit pas en présence d'inhibiteurs de la synthèse des protéines, qui serait une des conséquences essentielles de l'induction. La plupart des connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'induction dérivent des travaux réalisés sur la benzo[a]pyrène hydroxylase.

Les cytochromes P-450 hépatiques de mammifères sont inductibles par les barbiturates, les composés aromatiques polycycliques (3-méthylcholanthrène : M3C) et les stéroïdes (Figure 18). Beaucoup d'inducteurs induisent sélectivement les isoenzymes responsables de leur propre métabolisme.

**Figure 19** : Mécanismes de régulation du cytochrome P-450 hépatique par le récepteur Ah, en présence de tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (d'après Nebert et Gonzalez, 1987).





L'augmentation de l'activité d'enzymes hépatiques comme la benzo[a],pyrène hydroxylase sous l'action de dérivés polycycliques aromatiques (type M3C) est connue depuis presque quarante ans. L'évènement de base serait la fixation de l'inducteur sur un récepteur spécifique. L'existence d'une telle protéine cytosolique (Ah) très affine a été démontrée pour les dérivés polycycliques aromatiques, mais pas pour les barbiturates et les stéroïdes (Figure 19). Le complexe inducteur-récepteur, après translocation dans le noyau, se combinerait avec un site accepteur (gène opérateur) et activerait les gènes structuraux de l'isoenzyme et de quelques autres enzymes. La translocation de l'ARNm et la synthèse de l'apocytochrome dans le réticulum endoplasmique est accompagnée par une synthèse accrue de l'hème (activation de l' $\delta$ -aminolévulinate synthétase) et des phospholipides nécessaires à la prolifération membranaire liée à l'induction.

Les conséquences de l'induction sont une modification spectaculaire des biotransformations. L'induction apparaît non seulement comme un phénomène quantitatif mais aussi comme un phénomène qualitatif dû à la biosynthèse d'une ou de plusieurs formes spécifiques de cytochromes P-450. La nomenclature des cytochromes P-450 (Nebert *et al.*, 1987, 1989) basée sur les homologues entre les gènes, regroupe souvent au sein d'une même famille des cytochromes P-450 inductibles par les mêmes agents.

Certaines molécules ont des effets biphasiques. Ainsi, les activités enzymatiques diminuent quelques heures après leur administration, traduisant la fixation de l'inducteur sur un cytochrome P-450 particulier (SKF 525 A, safrole, prochloraz, antibiotiques,...)(Pershing et Franklin, 1982). L'effet inducteur (augmentation des teneurs en cytochromes), en général très puissant, se manifeste par la suite. Cependant, une fraction assez importante du site actif, bloquée sous forme de complexe stable, demeure inaccessible au

**Tableau 7** : Les agents inducteurs de monooxygénases à cytochrome P-450 chez les plantes supérieures.

---

Facteurs physiologiques

stress : blessure, vieillissement	Benveniste <i>et al.</i> , 1977
mise en survie	Gilevicz Cotte-Martinon <i>et al.</i> , 1974
lumière (phytochrome)	Benveniste <i>et al.</i> , 1978
choc osmotique	Kochs <i>et al.</i> , 1987

Composés endogènes

nérol, géraniol, acide cinnamique	Hendry et Jones, 1984
β-naphtoflavone	Simpson et Kelly, 1989

Eliciteurs fongiques

	Fujita <i>et al.</i> , 1981
	Hagmann <i>et al.</i> , 1984
	Heller et Kuhn, 1985
	Kochs <i>et al.</i> , 1987
	Hamerski et Mattern, 1988
	Kochs et Grisebach, 1989

Xénobiotiques

extrait de levure	Hinderer <i>et al.</i> , 1987
solvants (éthanol, DMSO)	Salaün, 1978 ; Reichhart <i>et al.</i> , 1979
métaux (Fe, Mn, Cu)	Reichhart <i>et al.</i> , 1979 ; Kurosaki <i>et al.</i> , 1989
agents thérapeutiques (phénobarbital, aminopyrine, clofibrate)	Reichhart <i>et al.</i> , 1979 ; Fonné, 1985 ; Salaün <i>et al.</i> , 1986
herbicides (2,4-D, diclobénil, monuron)	Reichhart <i>et al.</i> , 1979 ; Adele <i>et al.</i> , 1981
fongicides (procloraz)	Canivenc, 1989
antidotes (cyometrinil, anhydride naphthalique)	Canivenc, 1989 ; McFadden <i>et al.</i> , 1990 ; Fonné-Pfister <i>et al.</i> , 1990 a et b, Zimmerlin et Durst, 1990 b
composés industriels (diéthylhexylphtalate)	Salaün <i>et al.</i> , 1986

---

substrat. Le complexe cytochrome P-450-inducteur doit être dissocié pour permettre l'expression de l'activité enzymatique maximale (Murray, 1988).

Les inducteurs des cytochromes P-450 végétaux sont nombreux. Ce sont des facteurs physiologiques, des stress, la lumière, des composés endogènes, des éliciteurs fongiques, des xénobiotiques (Tableau 7). On ne connaît que peu de choses sur les mécanismes de contrôle et d'expression des gènes chez les végétaux. Dans les tubercules en survie, le tranchage et l'aération des tissus induisent une activation métabolique et le développement du système d'endomembranes. Cette différenciation serait le résultat de la dérégulation d'un gène, conduisant à une synthèse accrue d'ARN, et à une production de protéines et de lipides, en même temps qu'une dégradation des substances de réserve. Les phénomènes d'induction chez les plantes supérieures sont peu spécifiques, et souvent avec des niveaux d'intensité plus faibles que ceux notés pour les cytochromes P-450 hépatiques. De plus, ils s'accompagnent souvent de l'induction d'autres enzymes (NADPH-cytochrome P-450 réductase,...).

La culture de champignons sur des milieux riches en carbone (acides gras, alcanes, stérols, terpènes) induit certaines activités de type cytochrome P-450. C'est également le cas pour les cytochromes P-450 bactériens. A l'inverse, l'oxygène moléculaire peut être un agent répressif de la biosynthèse des cytochromes P-450 (Sanglard *et al.*, 1984 ; Shoun *et al.*, 1989).

### **E.5.Biologie moléculaire des cytochromes P-450**

De nombreuses équipes ont utilisé l'ADN recombinant pour déterminer le nombre de formes de cytochromes P-450. Chez les mammifères, cette

technique a permis d'isoler et de caractériser les gènes et les ADNc de cytochromes P-450 non isolés par les techniques biochimiques classiques. Enfin les séquences régulatrices de quelques gènes, comme leur localisation chromosomale sont connues. De tels progrès ont nécessité la mise en place d'une nomenclature (Nebert *et al.*, 1987, 1989) car les séquences de 70 à 80 gènes de cytochromes P-450 sont déterminées. On estime qu'une espèce de mammifères contient de 50 à 200 gènes de cytochromes P-450 qui forment une superfamille de gènes (Nelson et Stroebel, 1989). L'analyse moléculaire des gènes des cytochromes P-450 a montré qu'à l'intérieur de la superfamille de gènes, il y a une dizaine de familles (36 % d'homologie dans une même famille) et des sous-familles (70 % d'homologie) regroupées sur des chromosomes différents chez les mammifères, 4 familles chez les microorganismes et une famille pour les végétaux supérieurs (Bozak *et al.*, 1990).

Tous les cytochromes P-450 dériveraient d'un ancêtre commun (Nebert et Gonzalez, 1985). La fonction de cette hémoprotéine (peroxydase, oxydase puis oxygénase) aurait évolué selon un mécanisme adaptatif du métabolisme de composés endogènes vitaux au métabolisme des xénobiotiques en passant par la fourniture d'énergie à partir des agents chimiques de l'environnement. L'analyse des séquences codantes connues révèle plusieurs séquences consensus, en particulier au niveau de la cystéine qui assure la liaison de l'hème à la protéine. Quatre de ces familles auraient évolué et divergé chez les animaux en raison de leur exposition aux métabolites de défense élaborés par les plantes.

## **F.CONCLUSION : CARACTÉRISTIQUES DISTINCTIVES DE L'INTERVENTION D'UNE MONOOXYGÉNASE À CYTOCHROME P-450**

Au terme de cette étude, il apparait que les caractéristiques structurales des protéines, le grand nombre de substrats métabolisés, les mécanismes de régulation font des monooxygénases à cytochrome P-450 des systèmes complexes. Il existe cependant un certain nombre de critères permettant d'identifier une monooxygénation à cytochrome P-450 lors de la mesure d'une activité enzymatique :

- 1.L'activité est localisée, chez les plantes, dans les microsomes
- 2.La réaction dépend le plus souvent du NADPH
- 3.Les substrats forment le plus souvent des spectres d'interaction avec le cytochrome P-450
- 4.L'activité est inhibée par des inhibiteurs de la réductase et du transfert des électrons
- 5.Elle est inhibée par l'anaérobiose, le monoxyde de carbone et dans ce cas l'inhibition est partiellement réversée par la lumière
- 6.Elle est également inhibée par des inhibiteurs sélectifs et connus des cytochromes P-450
- 7.Elle est induite par des inducteurs connus des cytochromes P-450.

Ce sont ces critères d'identification que nous utiliserons au cours de notre travail.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A.MATÉRIEL VEGETAL

- A.1.Les suspensions cellulaires de blé
- A.2.Conditions de culture des suspensions cellulaires
- A.3.Conditions d'utilisation des suspensions cellulaires
- A.4.Préparation des microsomes
- A.5.Séparation des fractions membranaires

### B.ESSAIS ENZYMATIQUES

- B.1.Dosages radiochimiques
  - B.1.1.Cinnamate 4-hydroxylase (CA4H)(EC 1.14.14-)
  - B.1.2.Laurate hydroxylase (LAH)(EC 1.14.14-)
  - B.1.3.Chlortoluron hydroxylase (CPUH) et N-déméthylase (CPUDM)
  - B.1.4.Extraction des métabolites pour les analyses par HPLC
  - B.1.5.Extraction des métabolites pour les analyses par CCM
  - B.1.6.Techniques analytiques
- B.2.Dosages spectrophotométriques
  - B.2.1.Activité cytochrome *c* oxydase (EC 1.9.3.1)
  - B.2.2.Activité NADPH cytochrome *c* réductase (EC 1.6.2.4)
  - B.2.3.Activité peroxygénase (aniline oxydase)
  - B.2.4.Activité peroxydase (guaiacol oxydase)(EC 1.11.1.7)
  - B.2.5.Dosage des cytochromes

### C.DOSAGE DES PROTÉINES

### D.SYNTHESE DU CHLORTOLURON MARQUÉ

### E.AUTRES TECHNIQUES

**Tableau 8** : Composition du milieu B5 utilisé pour la culture des cellules de blé.

Composants	Concentration (mg/l)
<b>Macroéléments</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	150
KNO <sub>3</sub>	2500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	150
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	14
Na <sub>2</sub> EDTA	16
<b>Microéléments</b>	
MnSO <sub>4</sub> ,H <sub>2</sub> O	10
H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	3
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,75
<b>Vitamines</b>	
Acide nicotinique	1
Thiamine	10
Pyridoxine	1
Myoinositol	100
Saccharose	2000
2,4-D	2

Le milieu de culture solide est complété par de l'hydrolysate de caséine (2 g/l), et de l'agar-agar (7 g/l). Il contient également 0,9 mg/l de 2,4-D.  
Le pH du milieu est ajusté à 5,5-5,7.

## A.MATÉRIEL VÉGÉTAL

### A.1.Les suspensions cellulaires de blé

L'ensemble des recherches a été réalisé sur des cultures cellulaires de blé en milieu liquide. Notre choix s'est porté sur ce matériel pour plusieurs raisons, outre celles précédemment énoncées (cf Introduction) :

-les caractéristiques de ces cultures cellulaires (cinétiques de croissance en particulier) sont bien établies car ce matériel est très utilisé au laboratoire

-le métabolisme du chlortoluron *in vivo* dans les cultures cellulaires a fait l'objet d'une étude complète par M.C. Canivenc (1989)

-enfin, des expériences préliminaires ont révélé les capacités de ces cultures cellulaires à métaboliser le chlortoluron *in vitro*.

### A.2.Conditions de culture des suspensions cellulaires

La souche de blé (*Triticum aestivum*, var "Heines Koga II") provient du laboratoire du Pr H. Sandermann (Freiburg, RFA). C'est une souche non chlorophyllienne.

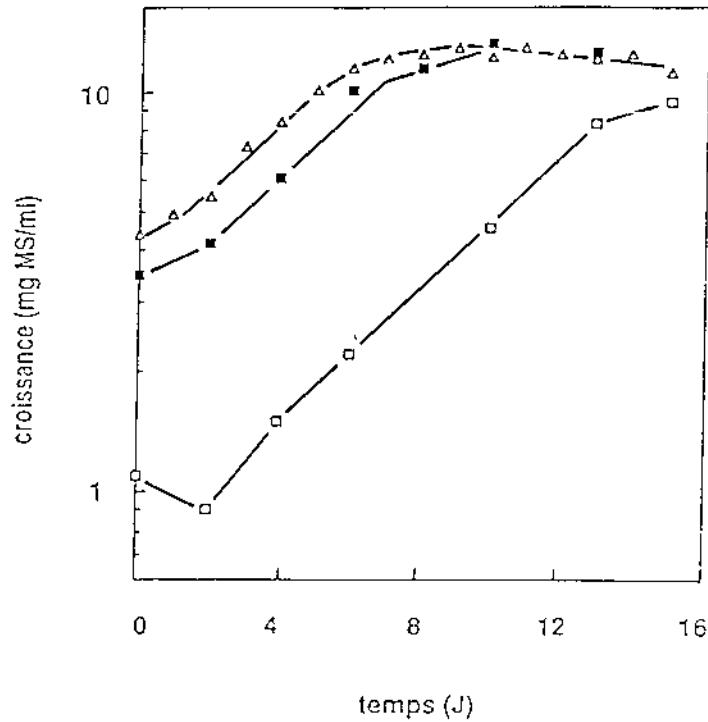
Les cellules sont cultivées sous éclairage continu (20  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}^2$  PAR, 2500 lux) à 25°C. Les cals obtenus à partir de mésocotyle de jeunes plantes sont conservés sur milieu Gamborg B5 gélosé (Gamborg et Everleigh, 1968), complété avec de l'hydrolysate de caséine (2 g/l) et du 2,4-D (0,9 mg/l).

Les études métaboliques sont réalisées avec des cellules cultivées en milieu liquide (Tableau 8) avec 2 mg/l (9  $\mu\text{M}$ ) de 2,4-D, en rotation à 120 rpm dans des ballons contenant 250 ml de milieu.

Les suspensions cellulaires sont repiquées sur milieu neuf tous les 12 jours à une concentration de 3 à 4 mg MS/ml, ce qui permet d'obtenir un cycle



**Figure 20** : Courbes de croissance des suspensions cellulaires de blé (Koga II) en fonction des conditions d'encemencement (d'après Canivenc, 1989).



Conditions expérimentales:

- l'inoculum initial ( $3,5 \pm 0,5$  mg MS/ml) provient d'une suspension cellulaire âgée de 10 jours.
- l'inoculum initial ( $1,1 \pm 0,2$  mg MS/ml) provient d'une suspension cellulaire âgée de 10 jours.
- Δ l'inoculum initial ( $4,2 \pm 0,5$  mg MS/ml) provient d'une suspension cellulaire âgée de 4 jours.

de croissance en 15 jours (Figure 20). Dans ces conditions, les cinétiques de croissance révèlent une phase de latence de un jour environ, une phase exponentielle de croissance (7 jours) suivie d'une phase de décélération (1 à 2 jours) et enfin une phase stationnaire.

En milieu liquide, les cellules sont essentiellement composées d'agrégats, mais aussi de cellules isolées, ces dernières étant incapables de croître seules. Le temps de doublement de la population est de 120 heures pour un inoculum de 4 mg MS/ml.

### **A.3. Conditions d'utilisation des suspensions cellulaires**

Les cellules utilisées dans le cadre du Chapitre 3 sont âgées de 6 à 7 jours. Elles sont repiquées à un taux de 3 mg MS/ml.

Pour l'étude du métabolisme du chlortoluron (Chapitre 4), les cellules sont traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures, ou le 2,4-D 300  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures. Les traitements sont effectués lors d'un repiquage (4 mg MS/ml) sur milieu neuf qui suit une période de croissance de 96 heures.

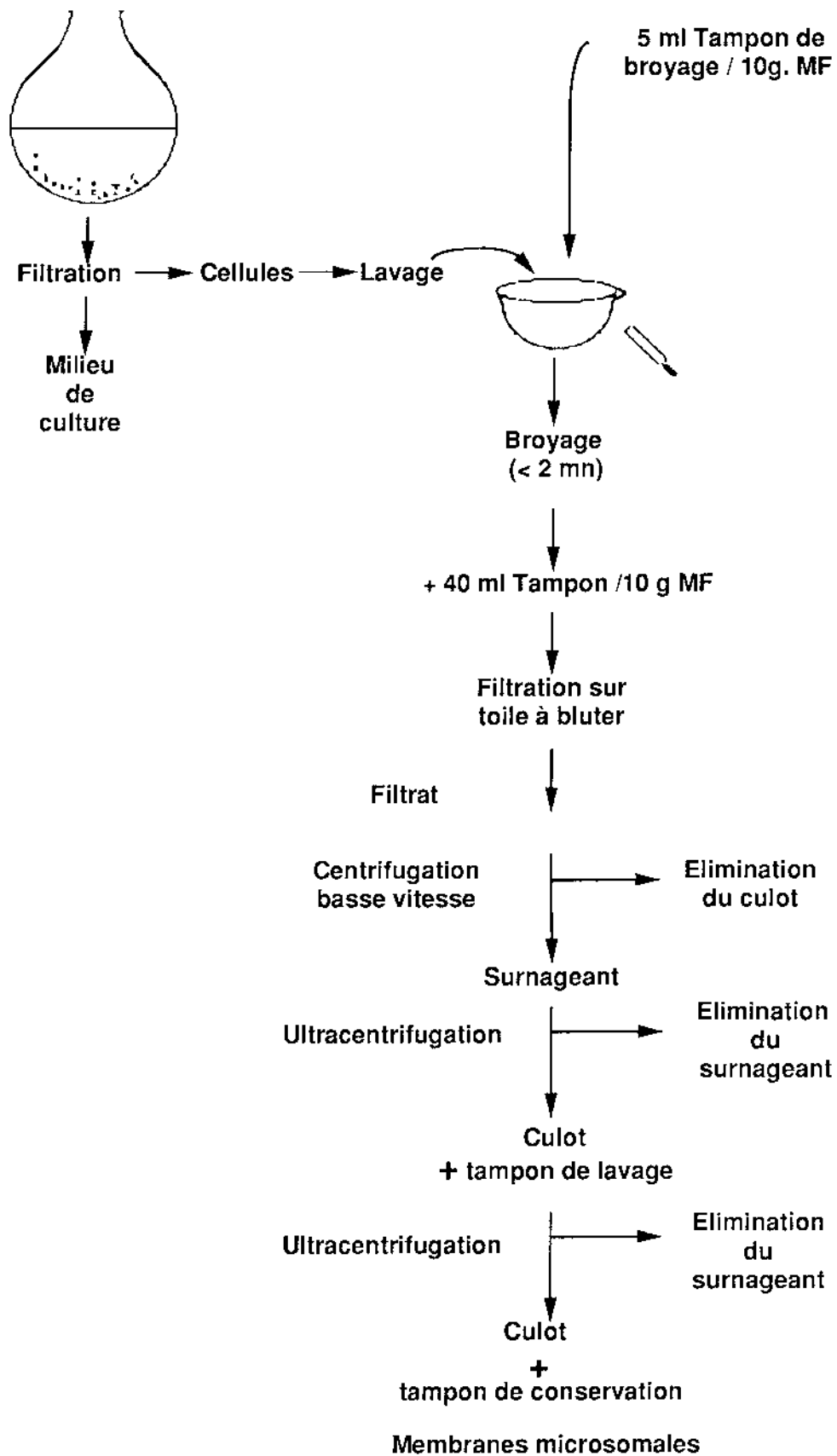
Pour la mise en évidence des propriétés stimulatrices des herbicides, des fongicides et des safeners (Chapitre 5), les cellules sont repiquées (4 mg MS/ml), après 96 heures de croissance, sur un milieu neuf contenant l'effecteur à tester. L'effecteur est, soit incorporé au nouveau milieu lorsqu'il entraîne une variation du pH, soit apporté en solution dans le DMSO (maximum 0,1 % du volume final).

En fonction des expériences, les microsomes sont isolés juste après le repiquage, ou après 24, 48 ou 72 h de croissance en présence de l'effecteur.

### **A.4. Préparation des microsomes**

Toute la préparation des suspensions microsomales est effectuée à 4°C.

Figure 21 : Protocole de préparation des fractions microsomales de cellules de blé.



Après 1 heure de repos en chambre froide, les cultures de blé (50-65 g MF) sont filtrées sur filtre inox de 63  $\mu$ M, rincées par 50 de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5)(Figure 21). Les cellules sont pesées puis broyées rapidement (2 fois 30 sec) dans un mortier avec un petit volume (5 ml/10 g MF) de tampon de broyage dont la composition figure dans le tableau 9. Les broyats sont immédiatement dilués dans un grand volume de tampon (40 ml/10 g MF).

Les broyats sont filtrés à travers 2 épaisseurs de toile à bluter. Les homogénats sont centrifugés à basse vitesse (rotor Beckmann JA 14). Le surnageant subit une ultracentrifugation (rotor Beckmann 45Ti). Le culot 100 000 *g* est homogénéisé dans 2 à 3 ml de tampon de lavage, puis est dilué à environ 50 ml avant une nouvelle ultracentrifugation. Le culot 100 000 *g* lavé est considéré comme la fraction microsomale. Il est repris dans le tampon de conservation de façon à obtenir une concentration en protéines de 2 à 7 mg/ml.

Les microsomes sont immédiatement congelés à -80°C.

#### **A.5.Séparation des fractions membranaires**

La séparation des différentes fractions membranaires est obtenue par centrifugation différentielle. Après broyage, les homogénats filtrés sont soumis à 3 centrifugations : 5 min à 1 000 *g*, 25 min à 10 000 *g* et 45 min à 100 000 *g*. Les culots obtenus, respectivement C1, C10 et C100, sont resuspendus dans le tampon phosphate 0,1 M contenant 30 % (p/v) de glycérol.

### **B.ESSAIS ENZYMATIQUES**

#### **B.1.Dosages radiochimiques**

Pour les réactions enzymatiques (activités de type cytochrome P-450), les conditions générales sont les suivantes. Le volume final des milieux d'incubation, contenant 30 % (p/v) de glycérol, est de 200  $\mu$ l. La température

**Tableau 9** : Conditions de préparation des fractions microsomales de cellules de blé.

Conditions	Chapitre 3	Chapitre 4	Chapitre 5	
Prétraitements	/	Cyométrinil	2,4-D	Inducteurs
Centrifugations basse vitesse	10 000 g 30 min	10 000 g 25 min	10 000 g 25 min	10 000 g 25 min
Ultracentrifugations	100 000 g 60 min	100 000 g 45 min	150 000 g 45 min	150 000 g 45 min
Tampon de broyage	tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 + 20 % (p/v) glycérol			
Mercaptoéthanol	10 mM	/	14 mM	14 mM
Ascorbate	/	20 mM	20 mM	20 mM
KCN	/	1 mM	/	/
PMSF	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
EDTA	/	/	1 mM	1 mM
Piège à phénols	Polyclar AT 10 % (p/p)		XAD-4 10 % (p/p)	
Tampon de lavage	tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 + 20 % (p/v) glycérol			
Mercaptoéthanol	/	/	1,4 mM	1,4 mM
Tampon de conservation	tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 + 30 % (p/v) glycérol			
Mercaptoéthanol	/	/	1,4 mM	1,4 mM

**Tableau 10** : Conditions d'utilisation des substrats lors des dosages radiochimiques.

Substrat	Radioactivité		Concentration finale µM
	spécifique kBq/mmol	utilisée kBq	
[3- <sup>14</sup> C]t-cinnamate	2035	5	200
[3- <sup>14</sup> C]laurate	2035	5	100 et 125
[carbonyl- <sup>14</sup> C]chlortoluron	440	6 à 10	500

d'incubation est de 25°C. Les quantités de protéines utilisées sont de 0,25 à 0,60 mg. Le NADPH est fourni à la concentration de 0,5 à 1,0 mM. Lors des mesures d'activités enzymatiques de durées supérieures à 10 minutes, un système régénérant le NADPH est ajouté, composé de glucose 6-phosphate (G 6-P) 6,7 mM et de 2 unités de glucose 6-phosphate déshydrogénase (G 6-P DH). La déshydrogénase de *Leuconostoc sp.*, capable de réduire le NAD<sup>+</sup> est également utilisée.

#### **B.1.1.Cinnamate 4-hydroxylase (CA4H)(EC 1.14.14-)**

L'hydroxylation du cinnamate en *para*-coumarate est effectuée selon une procédure modifiée de Benveniste *et al.* (1977)(Tableau 10).

Après 2 minutes de préincubation à 25°C sans cofacteur, la réaction débute par l'addition du NADPH. Elle est arrêtée par 10 µl de TCA 20 % après 6 minutes.

#### **B.1.2.Laurate hydroxylase (LAH)(EC 1.14.14-)**

Les essais d'hydroxylation de la laurate dans la chaîne (iC) ou en bout de chaîne (ω) sont effectués selon une procédure unique décrite par Salaün *et al.* (1986)(Tableau 10).

Après 2 minutes de préincubation, le NADPH initialise la réaction qui est arrêtée après 10 à 15 minutes par 10 µl de TCA.

#### **B.1.3.Chlortoluron hydroxylase (CPUH) et N-déméthylase (CPUDM)**

La réaction débute par l'addition du NADPH après 2 minutes de préincubation à 25°C (Tableau 10). Elle est arrêtée par 10 µl de TCA ou 20 µl d'HCl 4N après 15 à 30 minutes.

#### **B.1.4.Extraction des métabolites pour les analyses par HPLC**

Dans le cas de la CA4H et de la LAH, 90 et 190  $\mu$ l d'acétonitrile froid sont respectivement ajoutés aux milieux d'incubation. Après sonication, les métabolites et les substrats sont analysés directement à partir de 2 fractions de 100  $\mu$ l du surnageant résultant d'une centrifugation (5 minutes) des milieux d'incubation.

Plusieurs protocoles d'extraction ont été successivement utilisés pour analyser les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase.

Dans un premier temps, l'extraction et la pré-séparation des fractions sont obtenues sur cartouche SEP-PAK C<sub>18</sub> (Millipore Waters). Après mouillage de la cartouche par 5 ml de méthanol et 10 ml d'eau, le milieu d'incubation dilué à 5 ml dans de l'eau est déposé sur la colonne. Un lavage du tube d'incubation est réalisé à nouveau par 5 ml d'eau, puis par 2 ml d'hexane. Les fractions radioactives contenant environ 70 % du chlortoluron, puis le chlortoluron résiduel et les métabolites sont éluées respectivement par 15 ml d'hexane/chloroforme (9/1 ; V/V) et 8 ml de méthanol. La phase alcoolique est réduite à environ 100  $\mu$ l et sert à l'identification et à la quantification des produits de la réaction.

Un second protocole a été développé. 30-40 % du chlortoluron non métabolisé sont extraits par 0,5 ml d'hexane, puis 90  $\mu$ l d'acétonitrile froid sont ajoutés aux milieux d'incubation. Après sonication, les métabolites et le chlortoluron résiduel sont analysés à partir de 2 fractions de 100  $\mu$ l du surnageant résultant d'une centrifugation (5 minutes) des milieux d'incubation.

#### **B.1.5.Extraction des métabolites pour les analyses par CCM**

Pour les analyses en CCM, le lancement et l'arrêt des incubations s'effectuent comme précédemment décrit. La radioactivité contenue dans les

milieux d'incubation est extraite par 3 fois 1,5 ml d'hexane/éther-éthylique (50/50 ; V/V). Après concentration, la totalité du mélange est déposée sur plaque pour CCM.

### **B.1.6. Techniques analytiques**

Les analyses des essais enzymatiques sont effectuées en routine par HPLC. Des confirmations de l'identité des métabolites sont réalisées par CCM.

#### **-Analyses par HPLC**

Les analyses HPLC sont effectuées en phase inverse sur un chromatographe Waters 680 équipé d'un module de précolonne Guard-Pack et d'une cartouche Novapack C<sub>18</sub> (8 mm x 10 cm, garnissage 4 µm) dans un module Waters RCM. 100 µl sont introduits par un injecteur Rhéodyne 7010.

Le solvant est le mélange acétonitrile/eau en proportions variables. Chaque composant contient 0,1 % d'acide acétique, et est dégazé sous hélium avant chaque utilisation.

Les composés sont détectés simultanément par absorption UV avec un spectrophotomètre Waters 481, et par radioactivité grâce à un détecteur Ramona-D muni d'une cellule de détection à flux continu (verre-lithium de 500 µl) à scintillant solide. L'acquisition des données est réalisée sur un microordinateur Apple IIC.

Les fractions radioactives sont collectées et comptées par scintillation liquide (Beckmann LS 7500) avec 10 ml de mélange scintillant Dynagel™ (Baker). Les courbes de correction de quenching ont été établies par standardisation externe. La précision des comptages est de 2 %.



**Tableau 11** : Composition des phases mobiles et temps de rétention des substrats et des métabolites oxygénés analysés en HPLC.

Phases mobiles	Débit ml/min	Temps min	Acétonitrile %	Eau %	coumarate		cinnamate		Temps de rétention (min)	
					OH-laurates	laurate	OH-CPU	MO-CPU	OH-CPU	chlortoluron
A	1	0	40	60	4,0	7,0	4,0	9,0	11,0	
		10	40	60						
		12	100	0						
		15	100	0						
		16	40	60						
B	2	0	30	70	2,5	8,5	11,5			
		12	30	70						
		14	100	0						
		17	100	0						
		18	30	70						
C	1	0	50	50	5,5	9,5				
		3	100	0						
		10	100	0						
		12	50	50						

Les phases mobiles renferment 0,2 % d'acide acétique.

Les longueurs d'onde utilisées sont respectivement de 288 et 242 nm pour l'essai CA4H et l'essai chlortoluron.

OH-laurates = dérivés laurates hydroxylés à l'intérieur et en bout de la chaîne

OH-CPU = chlortoluron hydroxylé

MO-CPU = chlortoluron N-monodéméthylé.

Plusieurs phases mobiles ont été utilisées pour l'analyse des différents essais radiochimiques (Tableau 11).

La colonne Waters ne permet pas de séparer entre eux les différents hydroxy-laurates formés. C'est pourquoi l'identification de ces métabolites a été effectuée par J.P. Salaün. Il utilise une colonne Beckman Ultrasphère ODS 5  $\mu\text{M}$  C<sub>18</sub> (15 cm x 4,6 mm). Les hydroxy-laurates sont élués par le mélange acétonitrile/eau/acide acétique 25/75/0,2 (V/V/V) au débit de 2 ml/min (Salaün *et al.*, 1986). Dans ces conditions, l'ordre d'éluion des hydroxy-laurates est  $\omega$ -1 et  $\omega$ -2,  $\omega$ -3,  $\omega$ -4,...

Le tableau 11 donne les temps de rétention des métabolites et des substrats utilisés dans les différents essais radiochimiques, pour les trois conditions chromatographiques.

#### -Analyses par CCM

Une vérification de l'identification des produits est effectuée par CCM. Des fractions aliquotes de 50 à 100  $\mu\text{l}$  d'extraits de milieu d'incubation sont déposées sur des plaques de silice (Merck, Kieselgel 60 F254) renfermant un indicateur de fluorescence, en présence de composés standards froids qui jouent aussi le rôle d'entraîneurs.

Les composés sont visualisés sous une lampe UV à 254 nm. Ils sont ensuite quantifiés à l'aide d'un analyseur linéaire (scanner Ramona IM 3000) relié à un microordinateur Apple IIC.

Dans certains cas, les spots radioactifs sont grattés et comptés par scintillation liquide dans les conditions précédemment décrites.

Les divers composés sont chromatographiés dans plusieurs solvants de migration. Leurs R<sub>f</sub> sont reportés dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Rf des métabolites oxygénés et des substrats sous différentes conditions de migration en CCM.

Mélanges	coumarate	cinnamate	L1	L2	Rf laurate	OH-CPU	MO-CPU	chlortoluron
A	0,26	0,55						
B	0,25	0,49	0,32	0,45	0,71			
C	0,57	0,81				0,38	0,63	0,76

L1 = dérivés laurate hydroxylés en position  $\omega$  et  $\omega-1$

L2 = dérivés laurate hydroxylés dans la chaîne  $\omega-n$  (2-5)

OH-CPU = chlortoluron hydroxylé

MO-CPU = chlortoluron N-monométhylé.

A.Phase organique d'un mélange benzène/acide acétique/eau (6/7/3 ; V/V/V)

B.Mélange éther éthylique/éther de pétrole/acide formique (70/30/1 ; V/V/V)

C.Mélange chloroforme/éthanol/acide acétique (135/10/15 ; V/V/V)

Le mélange B permet la séparation des dérivés  $\omega$  et  $\omega-1$  des autres hydroxy-laurates. 100  $\mu$ l du surnageant sont déposés avec 100  $\mu$ g d' $\omega$ -hydroxy-laurate froid. Les pics radioactifs sont détectés et les dérivés hydroxylés sont révélés par exposition aux vapeurs d'iode.

## **B.2.Dosages spectrophotométriques**

### **B.2.1.Activité cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1)**

La cytochrome c oxydase est une enzyme caractéristique de la membrane interne des mitochondries. L'activité cytochrome c oxydase est évaluée selon la méthode de Wharton et Tzagoloff (1967) (Tableau 13).

Le cytochrome c est réduit par quelques grains de dithionite. L'excès de réducteur est inactivé par un barbotage d'air (1 minute) dans les milieux d'incubation. Après addition de l'enzyme et une minute de stabilisation, l'activité est mesurée à 25°C pendant 5 minutes par les variations d'absorption à 550 nm causées par l'oxydation du cytochrome c ( $E_{550} = 18,5/\text{mM}/\text{cm}$ ).

### **B.2.2.Activité NADPH cytochrome c réductase (EC 1.6.2.4)**

L'activité NADPH cytochrome c réductase est mesurée par la réduction du cytochrome c à 550 nm (Benveniste, 1978). Elle est caractéristique du

**Tableau 13** : Composition du milieu d'incubation pour l'essai cytochrome *c* oxydase.

Composés	Essai	Témoin
Cytochrome <i>c</i> réduit	50 µM	50 µM
Protéines	0,2 mg	0,2 mg
KCN	/	1 mM
Tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5	qsp 700 µl	qsp 700 µl

**Tableau 14** : Composition du milieu d'incubation pour l'essai cytochrome *c* réductase.

Composés	Essai	Témoin
Cytochrome <i>c</i> oxydé	50 µM	50 µM
Protéines	0,2 mg	0,2 mg
KCN	2 mM	2 mM
NADPH	600 µM	/
G 6-P	2,6 mM	/
G 6-P DH	3 U	/
Tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5	qsp 600 µl	qsp 600 µl

**Tableau 15** : Composition du milieu d'incubation pour l'essai aniline oxydase.

Composés	Essai	Témoin
Aniline	2 mM	/
Protéines	0,3 mg	0,3 mg
Hydroperoxyde de cumène	2 mM	2 mM
Tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5	qsp 1 ml	qsp 1 ml

**Tableau 16** : Composition du milieu d'incubation pour l'essai guaiacol oxydase.

Composés	Essai	Témoin
Guaiacol	2 mM	2 mM
Protéines	0,3 mg	0,3 mg
Peroxyde d'hydrogène	2 mM	/
Tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,5	qsp 1 ml	qsp 1 ml

réticulum endoplasmique. La réduction du cytochrome *c* est suivie pendant deux minutes à 25°C. Les milieux d'incubation sont décrits dans le tableau 14.

### **B.2.3. Activité peroxygénase (aniline oxydase)**

L'activité peroxygénase est mesurée par la réaction d'oxydation à 25°C de l'aniline en nitrosobenzène à 310 nm ( $E_{310} = 6833/M/cm$ ) (Blée et Durst, 1987). La composition du système d'essai figure dans le tableau 15.

### **B.2.4. Activité peroxydase (guaïacol oxydase) (EC 1.11.1.7)**

La dimérisation du guaïacol en un composé à structure quinonique est catalysée par les peroxydases (Maehly et Chance, 1954). Elle est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 436 nm ( $E_{436} = 25500/M/cm$ ) à 25°C. Le tableau 16 résume la composition du système d'essai.

### **B.2.5. Dosage des cytochromes**

Les cytochromes liés aux membranes microsomales sont détectés par spectrophotométrie grâce à leurs spectres de différence. Ceux ci sont réalisés à 15°C dans un spectrophotomètre Uvikon 860.

#### **-Dosage du cytochrome b5**

Les microsomes oxydés (1mg protéines/ml) sont répartis dans deux cuves et la ligne de base est établie entre 400 et 500 nm. Les microsomes de la cuve essai sont totalement réduits par le dithionite. Le spectre de différence oxydé/réduit est tracé, on obtient un pic d'absorption à 427 nm et un minimum à 410 nm.

Grâce au coefficient d'extinction molaire calculé par Omura et Sato (1964) ( $E = 185/\text{mM}/\text{cm}$ ), la différence d'absorption entre 427 et 410 nm donne la quantité de cytochrome b5.

#### -Dosage des cytochromes P-450 et P-420

Les microsomes sont réduits par quelques grains de dithionite et répartis dans deux cuves. La ligne de base est établie entre 400 et 500 nm. Les microsomes de la cuve essai sont saturés en monoxyde de carbone. Le spectre de différence réduit+CO/réduit présente un pic d'absorption à 450 nm. La différence d'absorption entre 490 et 450 nm (intensité de la bande de Soret à 450 nm du complexe cytochrome P-450-réduit-CO) permet de calculer la quantité de cytochrome P-450 présente ( $E = 91/\text{mM}/\text{cm}$ ) (Omura et Sato, 1964).

Le spectre de différence en présence de monoxyde de carbone peut révéler un pic à 420 nm. Ce pic correspond au cytochrome P-420, qui est une forme inactive du cytochrome P-450. Son coefficient d'extinction molaire est de  $100/\text{mM}/\text{cm}$  entre 420 et 490 nm.

#### -Spectres d'interaction entre cytochrome P-450 et effecteurs

Les microsomes oxydés sont répartis dans deux cuves. La ligne de base est tracée entre 370 et 450 nm, puis l'effecteur est ajouté dans la cuve essai. Les longueurs d'onde des pics d'absorption et des minima permettent de déterminer le type du spectre de différence.

### **C.DOSAGE DES PROTÉINES**

Les concentrations en protéines sont déterminées avec la méthode de Bradford (1976), utilisant la SAB comme protéine standard. La quantification





de chaque échantillon est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre Uvikon 860 à partir de la droite de régression d'une gamme étalon.

## **D.SYNTHESE DU CHLORTOLURON MARQUÉ**

Le chlortoluron marqué est synthétisé selon une méthode modifiée de Gilbert et Sorma (1956) par P. Gaillardon. La synthèse s'effectue en deux étapes (Figure 22), suivies par des étapes de purification et de détermination de la radioactivité spécifique..

### **A.Synthèse de la phénylurée symétrique**

540  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -urée (0,579 mg, 2035 kBq/mmol) et 2 mg d'urée froide sont ajoutés à 1 ml de 3-chloro 4-méthylaniline. L'ensemble est chauffé 2 heures à  $180^\circ\text{C}$  (distillation à reflux). Les cristaux blancs d'urée symétrique sont lavés par 0,5 ml d'EtOH, afin d'éliminer une bonne partie de l'aniline en excès.

### **B.Susbtitution par la diméthylamine**

La diphenylurée est mise en présence d'un excès de diméthylamine gazeuse. Le mélange est chauffé à  $210^\circ\text{C}$  pendant 1 heure 20 dans un autoclave Prolabo. Le culot jaunâtre est repris dans le méthanol.

### **C.Purification**

Une pré-purification est réalisée par CCM. La solution méthanolique est déposée sur plaque de silice. L'éluant est le mélange éther/acétone (9/1 ; V/V). La silice correspondant au pic radioactif de chlortoluron est grattée. Le chlortoluron est extrait par le mélange benzène/éther (9/1 ; V/V).

#### D.Détermination de la radioactivité spécifique

La concentration en chlortoluron d'une solution méthanolique est déterminée pour 5 essais indépendants à l'aide de son coefficient d'extinction molaire ( $E_{242} = 19700/\text{mM}/\text{cm}$ ). Le comptage en scintillation liquide d'une fraction aliquote de concentration connue permet de déterminer la radioactivité spécifique.

#### E.AUTRES TECHNIQUES

Des techniques ou des protocoles expérimentaux particuliers ont été utilisés pour certaines expériences. Ils seront explicités cas par cas en commentaire des illustrations.



## CHAPITRE 3 : HYDROXYLATIONS DE SUBSTRATS PHYSIOLOGIQUES PAR DES MONOOXYGÉNASES À CYTOCHROME P-450 DE MICROSOMES DE BLÉ.

### A.INTRODUCTION

#### B.LA CINNAMATE 4-HYDROXYLASE DU BLÉ

##### B.1.Propriétés de la CA4H du blé

B.1.1.Mise en évidence de l'hydroxylation du cinnamate en *para*-coumarate

B.1.2.Nécessité de cofacteurs pour l'activité CA4H

B.1.3.Influences du temps d'incubation, de la concentration en protéines, de la température d'incubation et du pH sur l'activité CA4H

B.1.4.Influence de la concentration en cinnamate

B.1.5.Distribution cellulaire de l'activité CA4H

##### **Résumé**

B.2.Intervention d'un cytochrome P-450 dans l'hydroxylation du cinnamate

B.2.1.Présence de cytochrome P-450 et spectre d'interaction dans les fractions microsomales de blé

B.2.2.Inhibition de la CA4H

##### **Résumé**

B.3.Evolution de l'activité CA4H en fonction de l'âge des suspensions cellulaires

#### C.LA LAURATE HYDROXYLASE DU BLÉ

C.1.Identification des métabolites

C.2.Cofacteurs et inhibiteurs de la LAH

C.3.Influence de la concentration en laurate

#### D.MESURE DES ACTIVITÉS CA4H ET LAH DANS D'AUTRES MATÉRIELS VÉGÉTAUX

#### E.CONCLUSION

Figure 23 : Hydroxylation du cinnamate par la CA4H.

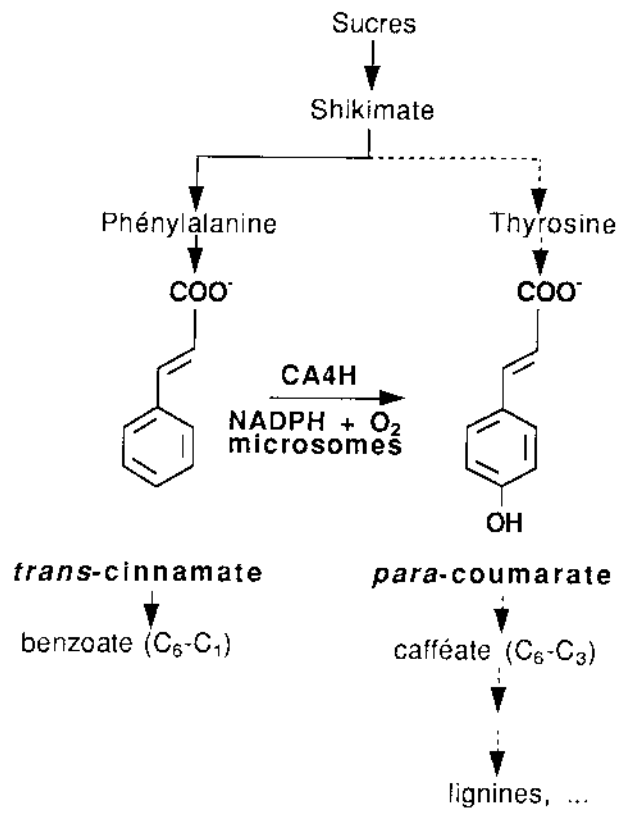
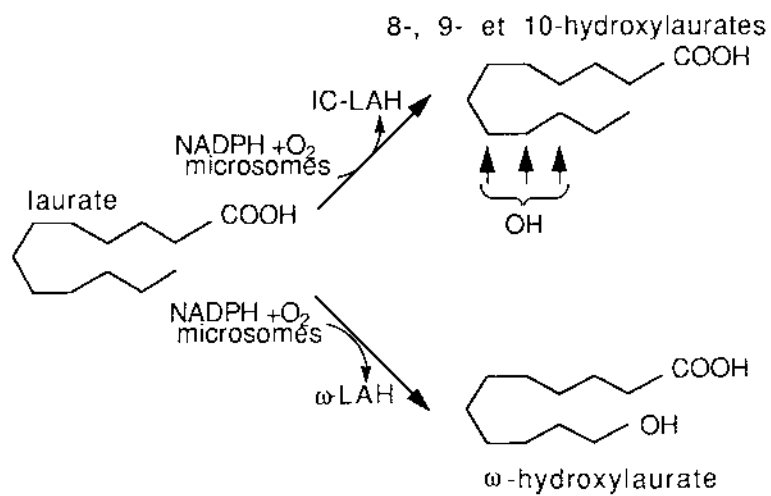


Figure 24 : Hydroxylation de la laurate par la LAH.



## A.INTRODUCTION

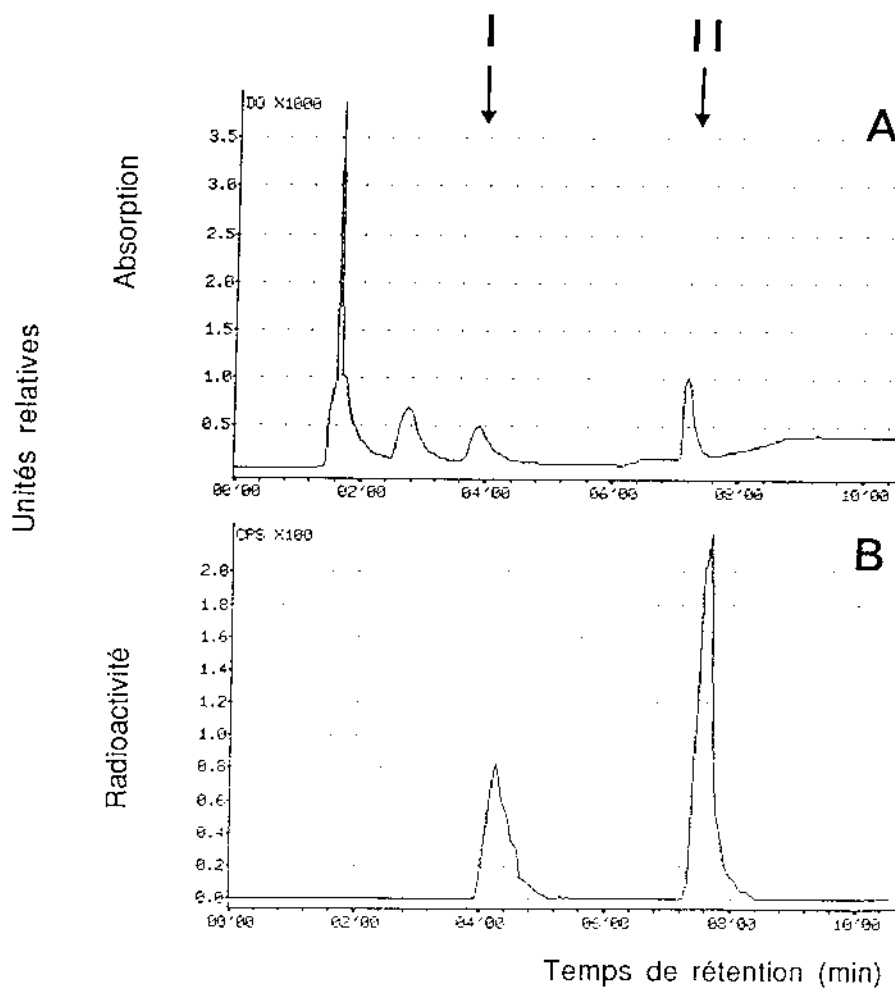
A notre connaissance, il n'existait lorsque nous avons débuté notre travail, que très peu de données publiées sur les monooxygénases à cytochrome P-450 du blé. Avant d'entreprendre l'étude des systèmes enzymatiques responsables du métabolisme oxydatif du chlortoluron, il nous a semblé important de pouvoir disposer d'activités de référence de type cytochrome P-450. Il a été ainsi nécessaire d'isoler, dans les meilleures conditions possibles, une fraction microsomale susceptible de contenir les activités que nous nous proposons d'étudier tout au long de ce travail. Ces activités de référence sont la cinnamate 4-hydroxylase (CA4H) et la laurate hydroxylase (LAH).

La CA4H est l'enzyme clé de la voie de synthèse des composés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, qui conduit notamment aux lignines (Figure 23). Elle catalyse l'hydroxylation du cinnamate en *para*-coumarate. Cette activité enzymatique est désormais bien connue car la CA4H fut la première monooxygénase à cytochrome P-450 reconnue chez les végétaux supérieurs (Benveniste et Durst, 1974). Elle a été, depuis, détectée et étudiée par plusieurs équipes chez de nombreuses espèces au nombre desquelles figurent essentiellement des dicotylédones. La CA4H est certainement présente chez toutes les espèces végétales avec, en général, de bons niveaux d'activité, et peut représenter jusqu'à 40 % des cytochromes P-450 totaux (cas du topinambour, Reichhart *et al.*, 1982).

La LAH est également bien connue chez les végétaux depuis les travaux de J.P. Salaün (1979). Cette enzyme intervient dans l'hydroxylation de la laurate (Figure 24). L'acide laurique est un acide gras en C<sub>12</sub> constitutif des plantes, dont l'importance physiologique, comme celle de ses dérivés hydroxylés, est une question pour laquelle il n'existe pas encore de réponse

**Figure 25** : Profil d'éluion en HPLC phase inverse d'une fraction aliquote du milieu d'incubation de microsomes de blé en présence de cinnamate radioactif (éluant Acétonitrile/Eau/Acide acétique ; 25/75/0,2 ; v/v/v ; débit de 1,5 ml/min).

Le métabolite oxygéné (I = *p*-coumarate) et le substrat (II = *t*-cinnamate) sont détectés en UV à 288 nm (A), ainsi qu'en radioactivité (B).



claire (Salaün *et al.*, 1984). Les dérivés hydroxylés des acides gras végétaux en C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> prennent part à la structure polymérique de la subérine et de la cutine (Croteau et Kolattukudy, 1974). Les produits hydroxylés par la LAH pourraient alors constituer des substrats pour des élongases qui participent à la synthèse des précurseurs des polymères cuticulaires. Les hydroxylations d'acides gras constitueraient aussi des réactions cataboliques. La LAH existe sous plusieurs isoformes qui catalysent des hydroxylations en bout de chaîne ( $\omega$ -LAH) ou dans la chaîne (IC-LAH). Les deux types d'hydroxylation ne sont jamais présents simultanément dans une même espèce végétale. Le premier type est plutôt spécifique des légumineuses alors que le second a été mis en évidence dans le topinambour et certaines monocotylédones (Salaün *et al.*, 1982). Les différentes isoformes de la LAH sont également distribuées chez tous les organismes vivants, procaryotes et eucaryotes.

Ce chapitre est essentiellement consacré à l'étude des propriétés de la CA4H du blé. La LAH ne fait, quant à elle, que l'objet d'une mise en évidence, ainsi que d'une mesure de ses niveaux d'activité.

## **B.LA CINNAMATE 4-HYDROXYLASE DU BLÉ**

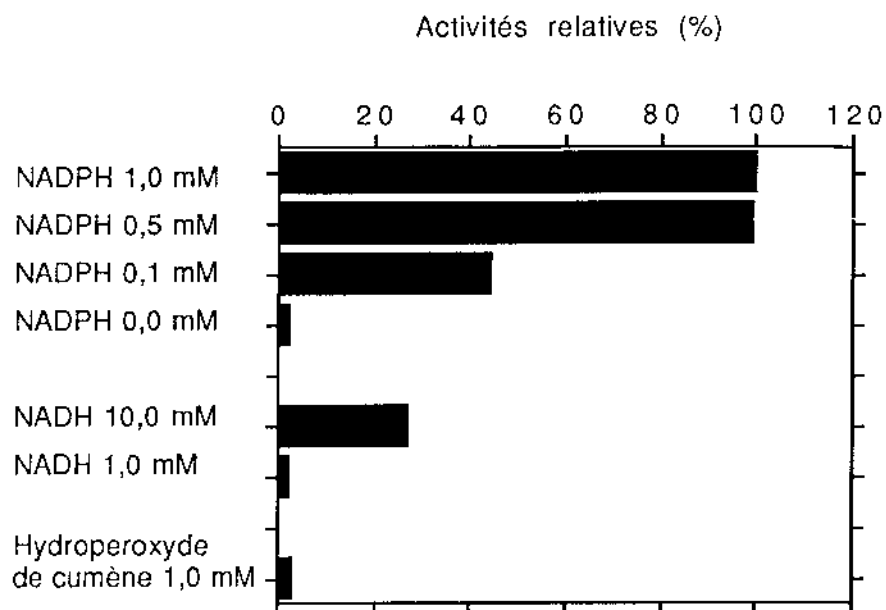
### **B.1.Propriétés de la CA4H du blé**

#### **B.1.1.Mise en évidence de l'hydroxylation du cinnamate en *para*-coumarate**

Au cours de l'incubation de cinnamate et de microsomes en présence de NADPH et en conditions aérobies, un produit radioactif polaire est formé (Figure 25). Sa formation est probablement due à une réaction enzymatique car il n'apparaît pas lors d'essais réalisés avec des microsomes bouillis 15



**Figure 26** : Effets de cofacteurs sur l'activité CA4H mesurée dans des microsomes de blé.



100 % d'activité correspondent à une activité de 1489,9 pmol/min/mg.

Les incubations sont réalisées en présence d'un système régénérant le NADPH et le NADH (cf Matériel et méthodes).

**Tableau 17** : Mise en évidence d'un effet synergique du NADH sur l'activité CA4H en présence de NADPH dans des microsomes de blé.

Conditions d'incubation	Activité CA4H pmol/min/mg	% de synergie
NADPH 0,1 mM	658,7	
NADH 10,0 mM	403,9	
NADPH 0,1 mM + NADH 10,0 mM	1404,9	32,2

Les incubations sont réalisées en présence d'un système régénérant le NADPH et le NADH.

Le % de synergie est calculé par la formule  $(A-B)/B \times 100$  avec :

A = activité quand les deux cofacteurs sont présents simultanément

B = somme des activités mesurées en présence de NADPH et de NADH séparément.

minutes à 80°C. L'identification du produit réactionnel est basée sur la comparaison de ses comportements chromatographiques avec ceux du *para*-coumarate pur. En HPLC (Figure 25) comme en CCM (non montré), les deux comportements sont identiques.

### **B.1.2.Nécessité de cofacteurs pour l'activité CA4H**

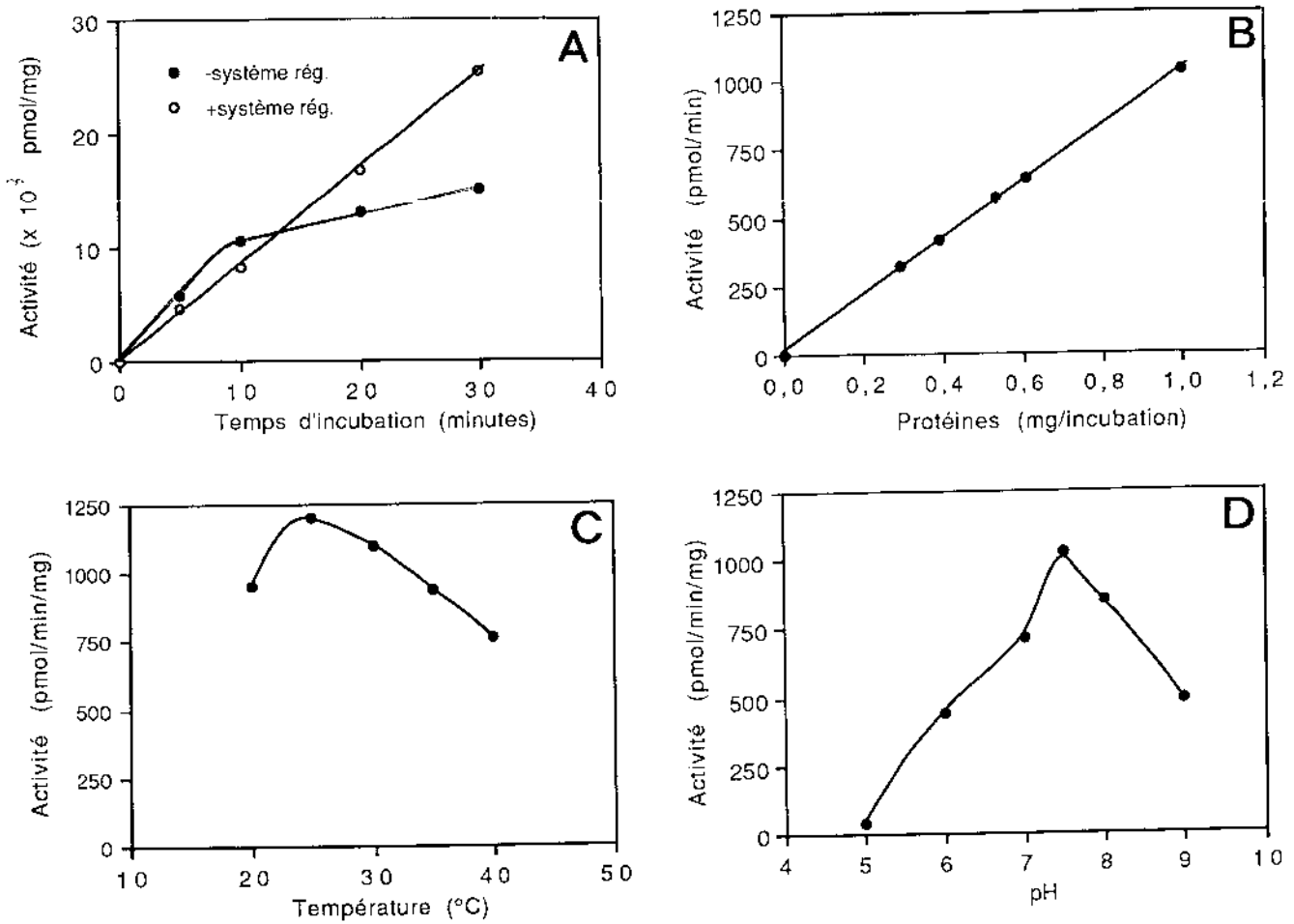
L'expression de la CA4H est dépendante de cofacteurs pyridiniques (Figure 26). En absence de tout cofacteur externe, aucune activité n'est dosable. Le NADPH semble saturant à 0,5 mM. Le NADH à forte concentration permet l'expression d'une activité représentant 27 % de l'activité maximale obtenue avec le NADPH. Enfin le NADH 10 mM comme l'hydroperoxyde de cumène ne sont pas de bons cofacteurs pour la CA4H du blé.

Le NADH 10 mM produit un effet synergique de 30 % environ sur l'activité enzymatique en présence de NADPH (Tableau 17).

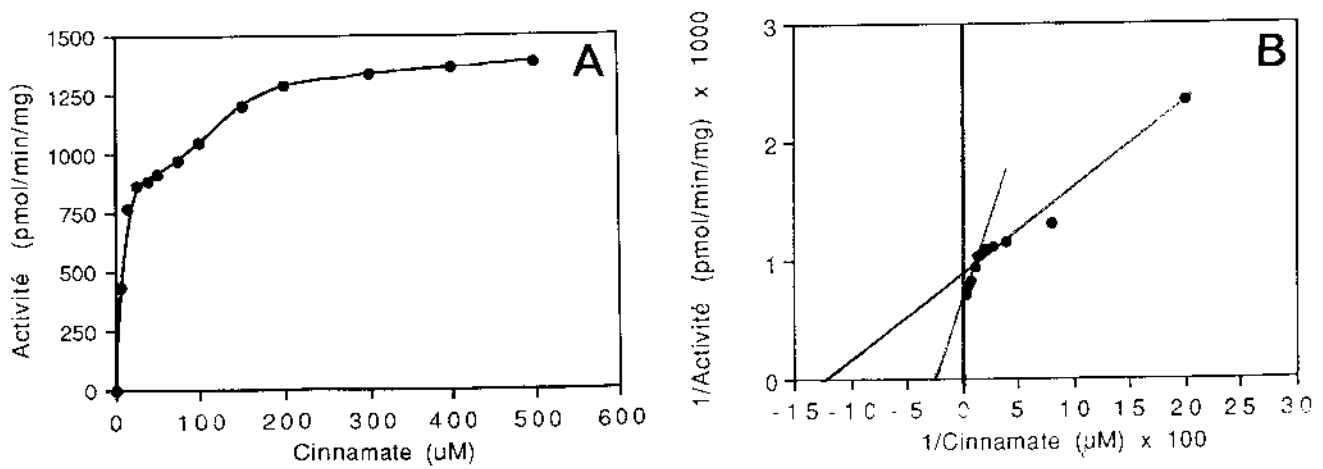
### **B.1.3.Influences du temps d'incubation, de la concentration en protéines, de la température d'incubation et du pH sur l'activité CA4H**

La réaction est linéaire pour les temps d'incubation et les concentrations en protéines utilisés, à savoir 0-30 minutes et 0-1 mg/incubation (Figure 27 A et B). Pour des incubations de durées supérieures à 10 minutes, un système de régénération du NADPH est indispensable. Les microsomes de blé consomment une quantité importante de NADPH, ce qui compte tenu des niveaux d'activité CA4H, serait dû à la présence de systèmes enzymatiques concurrents de la CA4H. En effet le NADPH réduit, lors d'essais spectrophotométriques en absence de substrat exogène des cytochromes

**Figure 27** : Influences du temps d'incubation (A), de la concentration en protéines (B), de la température d'incubation (C) et du pH (D) sur l'activité CA4H mesurée dans les microsomes de blé.



**Figure 28** : Influence de la concentration en cinnamate sur l'activité CA4H en coordonnées normales (A) et inversées (B).



Les concentrations en cinnamate sont de 12,5 à 500 µM.

P-450, est oxydé à une vitesse 10 fois supérieure à l'activité CA4H obtenue pendant les tests radiochimiques.

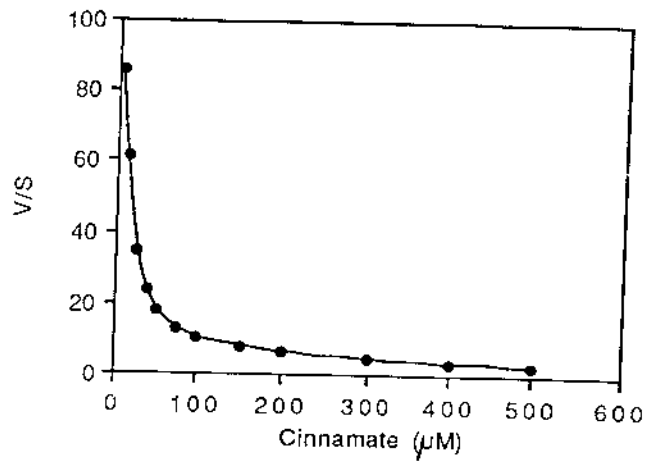
L'activité CA4H dépend également de la température, elle est maximale à 25°C et fortement inhibée à 40°C (Figure 27 C). L'effet de la température est à corrélérer avec celui du temps d'incubation, ces deux paramètres influant sur les cinétiques enzymatiques ainsi que sur la stabilité du complexe enzymatique et des membranes. Cette hypothèse est avancée chez le pois (Benveniste, 1978), où l'on note concernant la CA4H des optima voisins de 30°C et 25°C pour des temps d'incubation respectivement de 5 et 10 minutes.

Comme pour beaucoup de monooxygénases à cytochrome P-450, le pH optimal de la CA4H se situe à 7,5 compte tenu de nos conditions expérimentales (Figure 27 D). Une variation de plus ou moins une unité pH par rapport à la valeur optimale entraîne une baisse d'activité d'environ 50 % et pour des pH inférieurs à 6, l'enzyme est inactive.

#### **B.1.4. Influence de la concentration en cinnamate**

L'activité enzymatique varie en fonction de la concentration en cinnamate. La courbe d'évolution de la vitesse en fonction du substrat (coordonnées normales) révèle un pallier d'activité caractéristique de cinétiques non Michaéliennes (Figure 28 A). En coordonnées inversées, les points expérimentaux peuvent être ajustés à l'aide de deux droites (Figure 28 B). Les  $K_m$  apparents calculés  $K_{m1}$  (faibles concentrations) et  $K_{m2}$  (fortes concentrations) sont respectivement 3,3 et 43,2  $\mu\text{M}$ , valeurs caractéristiques des substrats physiologiques, pour des  $V_{\text{max}}$  respectives de 970,9 et 1526,7 pmoles/mg/min. Suivant la représentation de Eadie-Hoffstee (Figure 28 bis), les points se répartissent sur une exponentielle. Cette caractéristique est en

**Figure 28 bis** : Influence de la concentration en cinnamate sur l'activité CA4H en représentation de Eadie-Hoffstee.



Les concentrations en cinnamate sont de 12,5 à 500 µM.

**Tableau 18** : Répartition de l'activité CA4H dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle d'un homogénat de cellules de blé.

	Activités relatives (%)			Activités spécifiques (pmol/min/mg)		
	C15	C100	S100	C15	C100	S100
CA4H	traces	99,9	0,0	non mesuré	980,0	0,0
Cyt. coxydase	90,1	8,9	0,0	113,4	6,7	0,0

Les activités relatives sont exprimées en % des activités totales trouvées dans les fractions C15 + C100 + S100

C15 = culot 15 000 g ; C100 = culot 100 000 g ; S100 = surnageant 100 000 g.

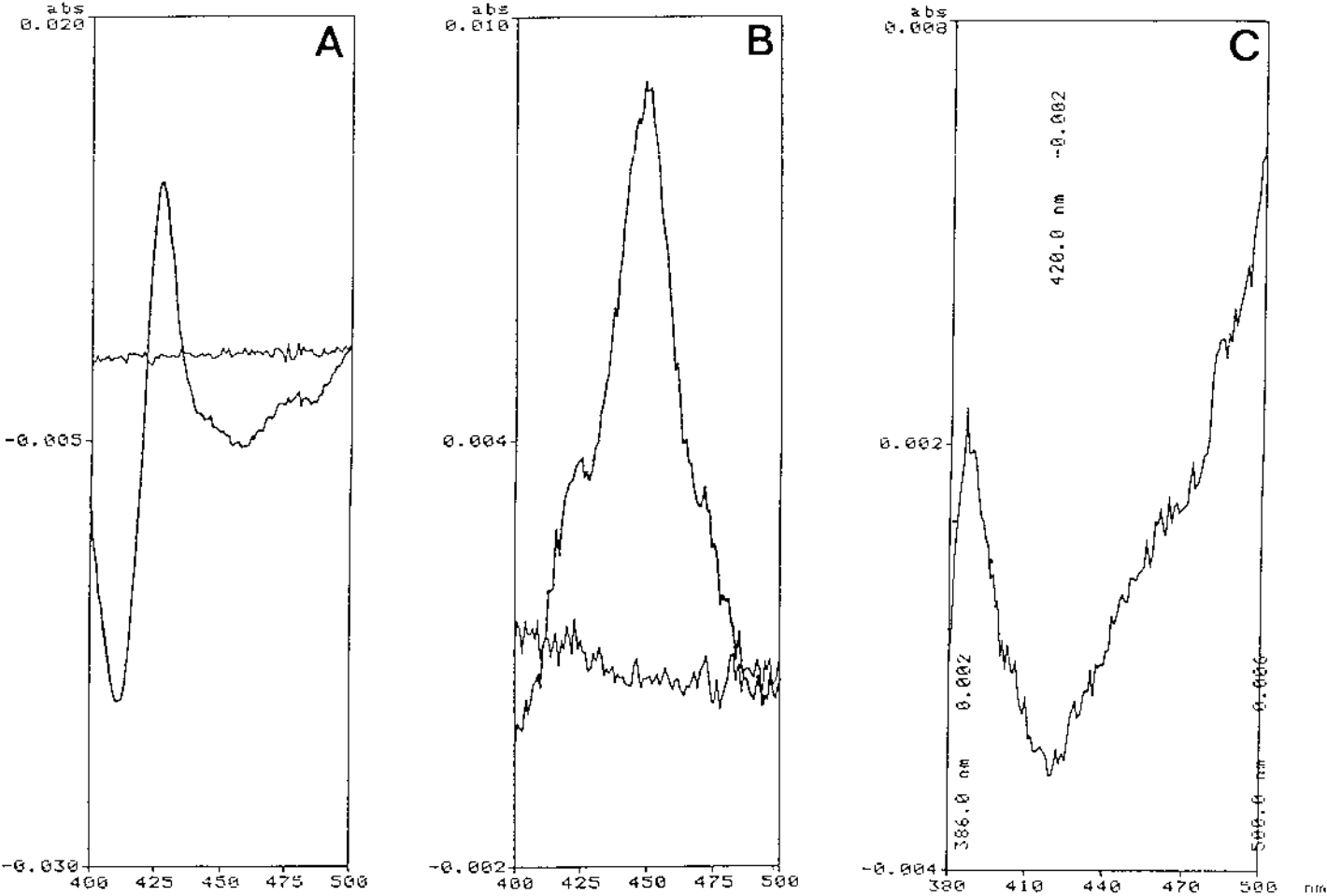
accord avec la participation de plusieurs (iso)enzymes dans l'activité CA4H, ou à différentes interactions des composants membranaires avec l'enzyme. Elle est souvent observée concernant les monooxygénases à cytochrome P-450 animales (Gander et Mannering, 1980) et végétales (Benveniste *et al.*, 1982 ; Fonné-Pfister *et al.*, 1988).

#### **B.1.5. Distribution cellulaire de l'activité CA4H**

La centrifugation différentielle de l'extrait brut révèle que l'activité CA4H est essentiellement localisée dans les microsomes (C100)(Tableau 18). Cependant, des traces d'activité se retrouvent également dans les mitochondries et les débris cellulaires (C13). La présence d'une activité CA4H dans ces fractions pourrait être due à l'aggrégation de fragments de RE avec les mitochondries et les parois lors de l'extraction. Aucune activité n'est décelable dans les surnageants S100. Ces résultats sont en accord avec les résultats antérieurs qui ont montré que la CA4H est une enzyme caractéristique du réticulum endoplasmique (Benveniste *et al.*, 1982). Le lavage des culots microsomaux simplement suivi d'une centrifugation n'améliore pas les activités enzymatiques. Par contre il diminue notablement les quantités de protéines. Dans notre cas, le gain d'activité spécifique susceptible de résulter d'un lavage est vraisemblablement annulé par l'allongement du temps de la préparation, qui influe défavorablement sur la structure des membranes microsomales. Compte tenu des différentes conditions d'obtention des microsomes utilisées dans les chapitres suivants, cette étape de lavage sera néanmoins conservée.

**Résumé** : Une activité enzymatique présente dans les microsomes de cellules de blé catalyse l'hydroxylation du cinnamate en *para*-coumarate.

Figure 29 : Spectres de cytochrome b5 (A), de cytochrome P-450 (B) et d'interaction avec le cinnamate (40  $\mu$ M)(C), obtenus avec des microsomes isolés de cellules de blé.



L'activité CA4H nécessite le NADPH comme cofacteur lors d'incubations en conditions aérobies. Le NADH comme l'hydroperoxyde de cumène ne sont pas de bons cofacteurs, bien que le premier ait un effet synergique sur la CA4H en présence de NADPH. L'activité CA4H est linéaire pour les temps d'incubation et les concentrations de protéines utilisées. Elle est maximale à 25°C et à pH 7,5. L'activité CA4H varie également en fonction de la concentration en cinnamate. Elle présente les caractéristiques d'enzymes non Michaéliennes et deux valeurs de Km apparents peuvent être avancées. La CA4H est localisée dans les microsomes.

## **B.2.Intervention d'un cytochrome P-450 dans l'hydroxylation du cinnamate**

### **B.2.1.Présence de cytochrome P-450 et spectre d'interaction dans les fractions microsomales de blé**

Les microsomes de cellules de blé renferment des cytochromes b5 et P-450 (Figure 29 A et B). Leurs teneurs sont respectivement de 350-400 et 150-200 pmoles/mg. Elles sont du même ordre de grandeur que celles trouvées habituellement dans des microsomes végétaux, et comparables aux teneurs mesurées chez le blé dans des microsomes de plantules (Mc Fadden *et al.*, 1989.; Zimmerlin et Durst, 1990 a). Préparées en présence de mercaptoéthanol, les fractions microsomales apparaissent relativement stables et des traces de cytochrome P-420 peuvent être mesurées (Figure 29 B).

Les substrats des monooxygénases à cytochrome P-450 permettent le plus souvent l'obtention de spectres d'interaction de type I. Dans le cas du blé, les spectres obtenus ne présentent pas une très bonne qualité (Figure 29 C). Une situation analogue a déjà été reportée concernant les microsomes de pois en présence de cinnamate (Benveniste, 1978).



**Tableau 19** : Effets du *para*-chloromercuribenzoate sur l'activité CA4H dans des microsomes de blé.

Conditions d'incubation	Activité CA4H pmol/min/mg	% de réversion
Témoin	1473,5	
<i>p</i> -CMB 500 µM	23,1	
<i>p</i> -CMB 500 µM + MSH 4 mM	314,3	20,1

Les essais sont préincubés pendant 5 min à 4°C sans NADPH ou sans *p*-CMB. Les incubations de 10 min débutent après l'addition du NADPH. Le MSH est ajouté après 5 min d'incubation.

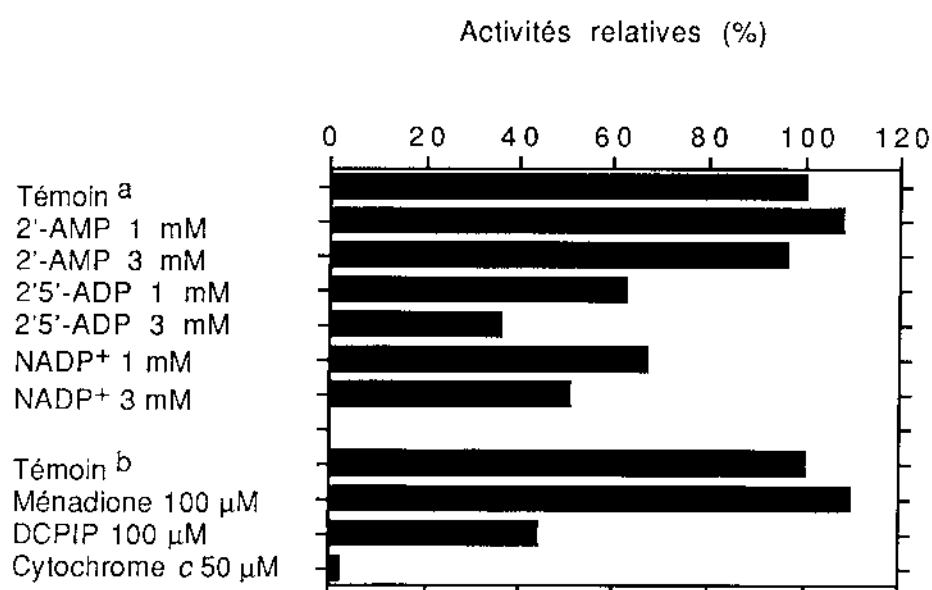
Le % de réversion est calculé par la formule  $(C - B)/(A - B) \times 100$  avec :

A = activité du témoin

B = activité de l'essai *p*-CMB

C = activité de l'essai *p*-CMB + MSH.

**Figure 30** : Effets des analogues structuraux du NADPH et des accepteurs exogènes d'électrons sur l'activité CA4H mesurée dans les microsomes de blé.



100 % d'activité correspondent à des activités de <sup>a</sup>1449,4 et <sup>b</sup>1531,3 pmol/min/mg.

### B.2.2. Inhibition de la CA4H

Les monooxygénases à cytochrome P-450 peuvent être inhibées au niveau de la NADPH-cytochrome P-450 réductase et du transfert des électrons, et au niveau du cytochrome P-450 lui-même.

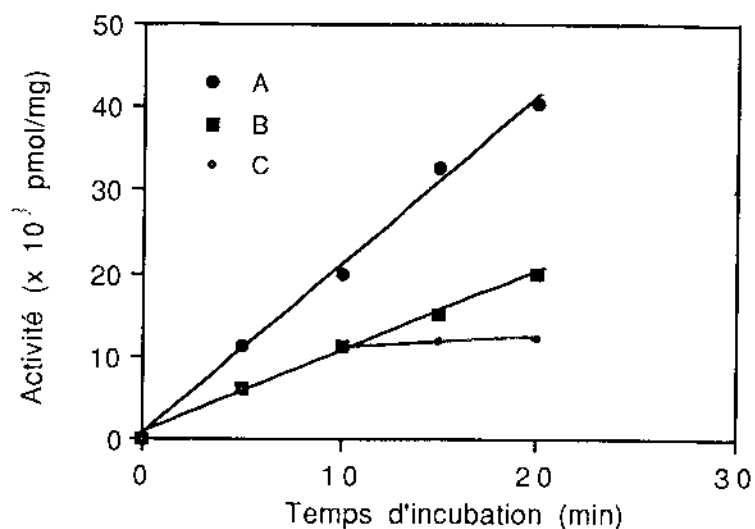
#### -inhibition au niveau de la réductase

Le *para*-chloromercuribenzoate est connu pour réagir avec les groupes thiols des protéines. On explique ainsi son effet inhibiteur sur la NADPH-cytochrome P-450 réductase (Salaün *et al.*, 1978 ; Madyastha et Coscia, 1979). Il est établi également qu'il convertit le cytochrome P-450 en cytochrome P-420 (Potts *et al.*, 1974). A la concentration utilisée, il inhibe presque totalement la CA4H du blé (Tableau 19). Le mercaptoéthanol apporté 5 minutes après le début de l'incubation entraîne une réversion de l'inhibition de 20 % environ.

Des analogues structuraux du NADPH, inhibiteurs compétitifs de la réductase ont été testés (Figure 30). Le 2'-ADP est le meilleur inhibiteur, le NADP<sup>+</sup> a un effet moyen alors que le 2'-AMP est sans effet. Dans les mêmes conditions de rapport inhibiteur/NADPH, les deux derniers composés ont des effets similaires sur d'autres activités de type cytochrome P-450 du blé (Zimmerlin et Durst, 1990 a) ou du topinambour (Fonné, 1985).

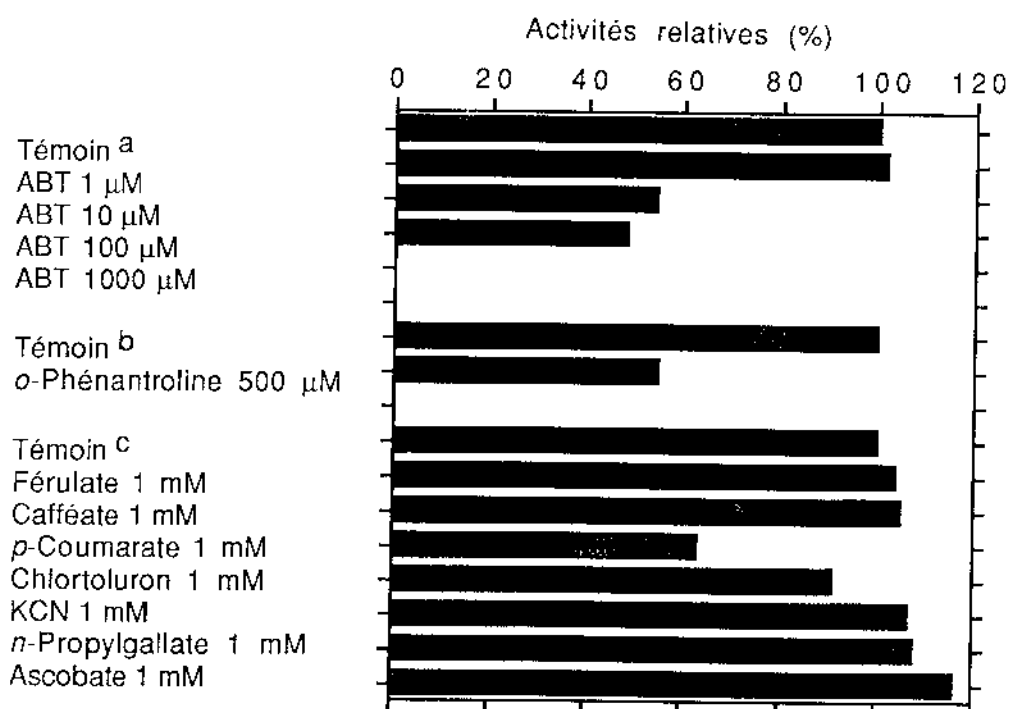
Le DCPIP et le cytochrome c oxydé sont deux accepteurs d'électrons qui détournent le flux d'électrons de la réductase. Ils sont de bons inhibiteurs de la CA4H (Figure 30). A l'inverse, la réductase semble insensible à la ménadione, ce qui contraste avec des résultats publiés auparavant concernant

**Figure 31 :** Effets du monoxyde de carbone sur l'activité CA4H mesurée dans les microsomes de blé.



A = Cinétique en absence de monoxyde  
 B = Cinétique après 30 secondes de barbotage par le monoxyde de carbone  
 C = Cinétique après 30 puis 60 secondes de barbotage par le monoxyde de carbone.

**Figure 32 :** Effets d'effecteurs variés sur l'activité CA4H dans des microsomes de blé.



La figure regroupe les résultats de trois expériences indépendantes dans lesquelles 100 % d'activité correspondent à des activités de :

a 830,0 pmol/min/mg. Les essais sont préincubés pendant 15 minutes à 15°C avec NADPH (Témoin) ou NADPH + ABT. Les incubations débutent par l'addition du cinnamate.

b 1573,6 pmol/min/mg. Les essais sont préincubés pendant 5 minutes à 4°C avec ou sans *o*-phénantroline. Les incubations débutent par l'addition du NADPH.

c 1290,0 pmol/min/mg.

les réductases d'autres matériels (Benveniste, 1978 ; Zimmerlin et Durst, 1990 a).

-inhibition au niveau du cytochrome P-450

Le monoxyde de carbone est un inhibiteur classique de la plupart des monooxygénases à cytochrome P-450. La lumière entraîne une réversion de l'inhibition. Après un barbotage de 30 secondes dans les milieux d'incubation, il réduit les activités enzymatiques de 50 % environ (Figure 31). Administré ensuite pendant 60 secondes, il inactive totalement la CA4H. Nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de vérifier la réversion de l'inhibition par la lumière.

L'ABT est un inhibiteur suicide des monooxygénases à cytochrome P-450 animales et végétales (Ortiz de Montellano et Mico, 1981 ; Werk-Reichhart, 1985), comme de certaines peroxygénases (Blée et Durst, 1987). Son effet inhibiteur se manifeste après activation de la molécule lors de la catalyse enzymatique. L'ABT 1mM inhibe totalement la CA4H du blé pour des temps de préincubation de 15 minutes (Figure 32), son effet diminue pour des concentrations inférieures. Lors de préincubations, le NADPH provoque également une inactivation de l'enzyme de 30 % en 15 minutes en absence du substrat. De tels résultats sont décrits dans la littérature (Werk-Reichhart, 1985).

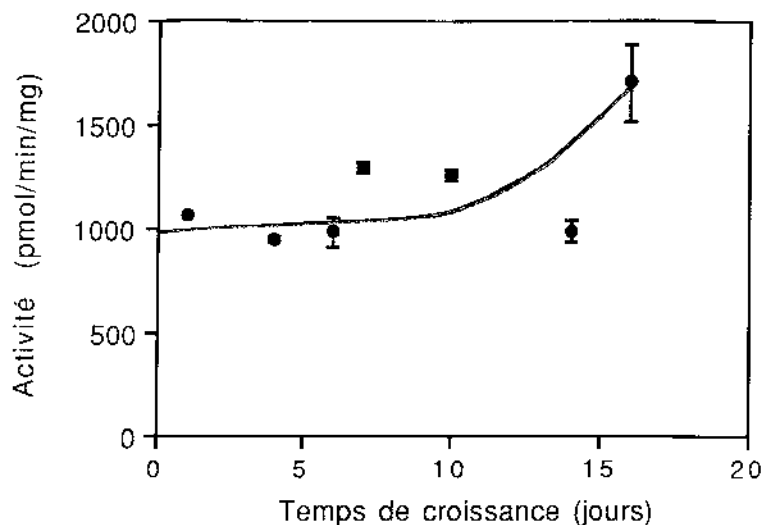
Des composés susceptibles de moduler les activités des monooxygénases ont été testés (Figure 32). L'*ortho*-phénantroline, un chélateur du fer hémique, inactive de moitié la CA4H après 5 minutes de préincubation.

Comme pour la CA4H du pois (Benveniste, 1978), les analogues structuraux du cinnamate comme le férulate et le cafféate en excès (1mM), ne modifient pas l'activité CA4H du blé (cinnamate 200  $\mu$ M), mais semblent même l'augmenter légèrement (Figure 32). Le *para*-coumarate exerce quant à lui un léger effet inhibiteur, comme celà est déjà rapporté pour la CA4H du pois (Russel, 1971) ou du navet (Hill et Rhodes, 1975). Le chlortoluron administré à forte dose est sans effets sur la CA4H.

L'ascorbate et le *n*-propylgallate sont deux antioxydants. Le premier piège les formes activées d'oxygène produites lors des processus d'oxydoréduction entre la réductase et le cytochrome P-450. Il le protège partiellement contre son auto-inactivation en présence de NADPH (Werk-Reichhart, 1985). Lors des incubations, les deux antioxydants stimulent légèrement la CA4H, respectivement de 16 et 8 % (Figure 32). Les effets de ces deux composés semblent indiquer que des formes activées d'oxygène présentes dans les milieux d'incubation altèrent les structures membranaires. Les effets des deux antioxydants sont à rapprocher de ceux du férulate et du cafféate qui sont deux molécules également connues pour leurs propriétés antioxydantes (Larson, 1988). Les antioxydants et le KCN sont connus pour freiner l'oxydation du NADPH par les microsomes (Werck-Reichhart, 1985). Le KCN est également un inhibiteur classique des peroxydases. Il est, lui aussi, faiblement stimulateur (8%). Le KCN a en général des effets peu marqués sur les monooxygénases à cytochrome P-450 (Benveniste, 1978).

**Résumé** : Des cytochromes b5 et P-450 sont détectés et leurs concentrations mesurées dans les microsomes de cellules de blé. Un spectre d'interaction de type I est obtenu entre les microsomes et le cinnamate. L'activité CA4H est inhibée par des inhibiteurs de la NADPH-cytochrome P-450 réductase et du transfert des électrons (*p*-CMB, analogues structuraux du

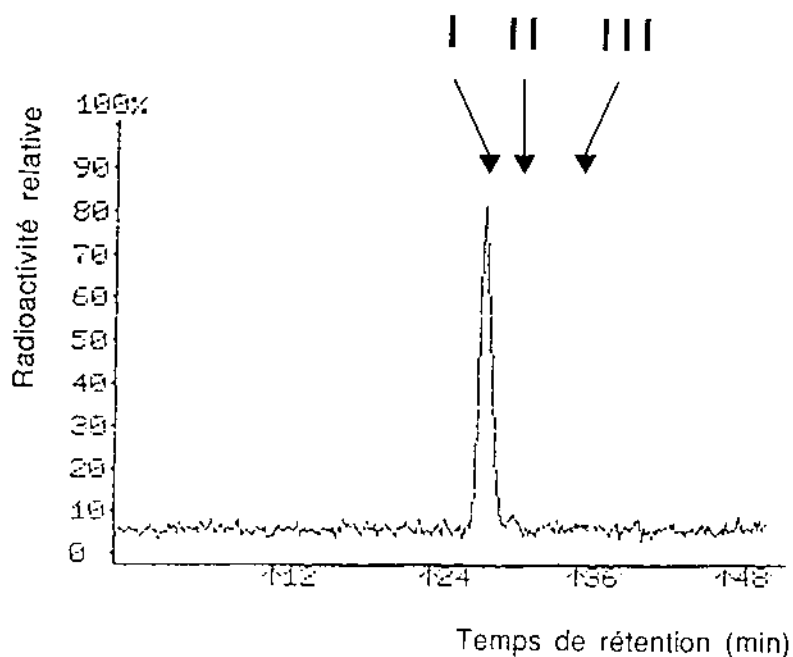
**Figure 33** : Evolution de l'activité CA4H en fonction de l'âge des suspensions cellulaires de blé.



Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=3).

**Figure 34** : Profil d'éluion en HPLC phase inverse d'une fraction aliquote de milieu d'incubation de microsomes de blé en présence de laurate radioactif (éluant Acétonitrile/Eau/Acide acétique ; 25/75/0,2 ; v/v/v ; débit de 2 ml/min).

Les métabolites oxygénés (I = 10- et 11-hydroxy-laurates, II = 9-hydroxy-laurate) sont détectés par leur radioactivité. La flèche III correspond au temps de rétention du dérivé 12-hydroxylé.



NADPH, certains accepteurs exogènes d'électrons). Elle est également sensible à des inhibiteurs agissant directement sur le cytochrome P-450 (monoxyde de carbone, ABT, *o*-phénantroline). Par contre, la CA4H est légèrement stimulée en présence d'analogues structuraux du cinnamate et d'antioxydants dans le milieu d'incubation.

### **B.3. Evolution de l'activité CA4H en fonction de l'âge des suspensions cellulaires**

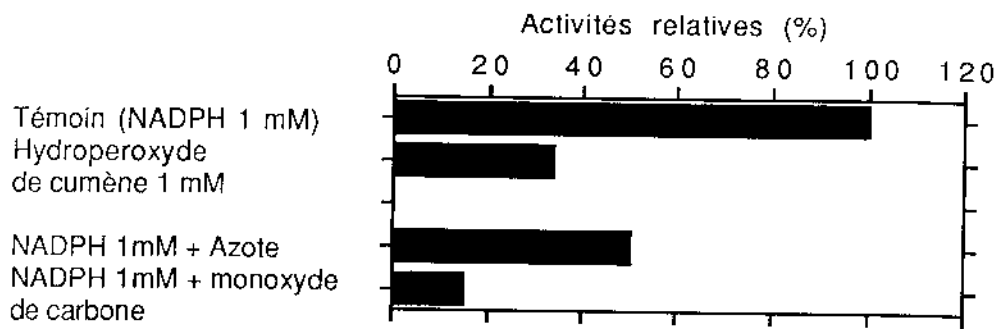
Dans les suspensions cellulaires, l'activité CA4H exprimée par rapport aux protéines microsomales est relativement constante pendant la phase exponentielle de croissance des cellules (Figure 33). Elle augmente lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance.

## **C. LA LAURATE HYDROXYLASE DU BLÉ**

### **C.1. Identification des métabolites**

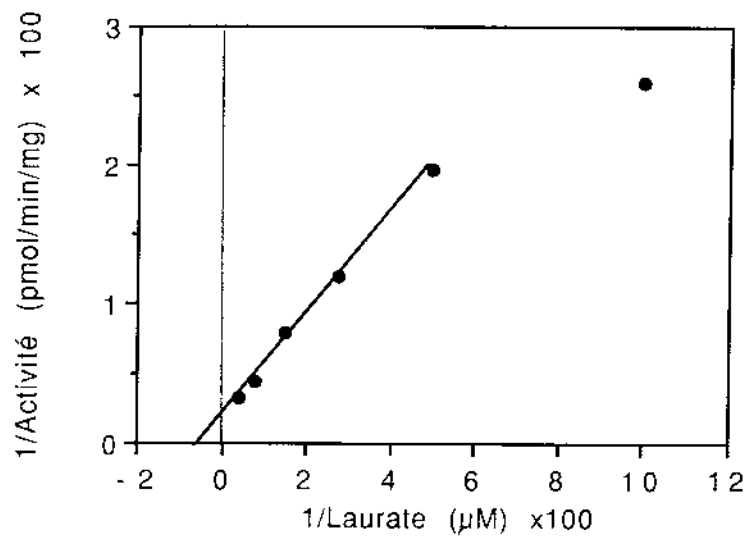
La laurate peut subir deux types de réactions d'hydroxylation catalysés par des (iso)enzymes différentes : une hydroxylation dans la chaîne (IC-LAH) ou une hydroxylation en bout de chaîne ( $\omega$ -LAH). Dans le cas du blé, les métabolites identifiés par J.P. Salaün correspondent à des dérivés hydroxylés sur les positions 9, 10 et 11 représentant respectivement 4, 31 et 65 % (Figure 34), la dernière position est majoritaire. La laurate du blé se distingue ainsi des IC-LAH décrites jusqu'alors qui hydroxylent l'acide laurique sur les positions 8, 9 et 10. Une laurate  $\omega$ -1 hydroxylase n'est actuellement connue que chez quelques espèces végétales (blé, orge, avocat ; J.P. Salaün, communication personnelle) alors qu'elle est décrite chez les mammifères, les champignons (Shoun *et al.*, 1985) et les bactéries (Miura et Fulco, 1975).

Figure 35 : Cofacteurs et inhibiteurs de la LAH dans des microsomes de blé.



100 % d'activité correspondent à une activité de 207,1 pmol/min/mg.  
Les essais sont saturés en air, azote et monoxyde de carbone par barbotage des gaz pendant 2 minutes à 4°C avant le début des incubations.

Figure 36 : Influence de la concentration en laurate sur l'activité LAH dans des microsomes de blé en coordonnées inversées.



Les concentrations en laurate sont de 10 à 247 µM.



### **C.2.Cofacteurs et inhibiteurs de la LAH**

L'activité LAH présente dans les microsomes de blé nécessite l'oxygène moléculaire et le NADPH pour son expression (Figure 35). Toutefois, des incubations sous atmosphère d'azote révèlent un niveau d'hydroxylation non négligeable. Enfin l'hydroperoxyde de cumène peut être aussi un donneur d'oxygène pour la LAH. Chez le topinambour et chez la fève, des hydroperoxydes d'acides gras comme l'hydroperoxyde d'acide linoléique catalysent également des IC- et  $\omega$ -hydroxylations de l'acide laurique (Fonné, 1985).

Le monoxyde de carbone est un bon inhibiteur de la LAH du blé (Figure 35). Nous n'avons pas mesuré la réversion de son effet par la lumière.

### **C.3.Influence de la concentration en laurate**

L'activité laurate totale varie en fonction de la concentration en acide laurique. Nous n'avons cherché à effectuer qu'une approximation du  $K_m$  de la laurate pour justifier la quantité de substrat utilisée lors des tests enzymatiques. En coordonnées inversées, les quelques points expérimentaux se répartissent sur une droite selon une cinétique Michaélienne (Figure 36). Le  $K_m$  apparent ainsi calculé est de 167  $\mu\text{M}$  et la  $V_{\text{max}}$  de 474,6 pmoles/mg/min. Cette valeur de  $K_m$  est supérieure aux valeurs habituelles concernant les hydroxylases d'acides gras (de 1 à 50  $\mu\text{M}$ ), il est probable qu'il existe un second  $K_m$ , plus faible, dont notre protocole ne permet pas la détermination. Ceci est corroboré par le fait que le  $K_m$  de la laurate dans des plantules de blé est de 8,7  $\mu\text{M}$  (Zimmerlin et Durst, 1990 b).

**Tableau 20** : Concentrations en cytochromes P-450 et activités de la CA4H et de la LAH dans des microsomes de diverses espèces végétales.

Matériel	Cyt. P-450 pmol/mg	Activités CA4H pmol/min/mg	Activités LAH
Blé Koga*	184,0±37,5 (3)	1337,1±240,9 (4)	207,1 (1)
Blé Garant**	/	1491,0±58,0 (2)	traces
Maïs**	53,0 (1)	1187,0 (1)	traces
Soja*	70,0 (1)	1200,0 (1)	2450,0±100,0 (2)
Véronique*	271,0±16,5 (3)	9400,0±1231,0 (4)	105,0±4,0 (4)

\* microsomes extraits de suspensions cellulaires

\*\* microsomes extraits de plantules étiolées.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± déviation standard (n).

## D.MESURE DES ACTIVITÉS CA4H ET LAH DANS D'AUTRES MATÉRIELS VÉGÉTAUX

Les niveaux des activités CA4H et LAH ont été mesurés dans des microsomes extraits de plantules de blé et de maïs, ainsi que dans des microsomes extraits de suspensions cellulaires de soja, de vulpin et de véronique (Tableau 20). Dans tous ces matériels, la CA4H présente de bons niveaux d'activité. Les valeurs concernant la LAH traduisent des différences importantes interspécifiques d'activité.

## E.CONCLUSION

Les microsomes extraits de suspensions cellulaires de blé renferment des cytochromes P-450. Les conditions de préparation des microsomes, ainsi que les conditions d'incubation permettent l'expression de monooxygénases à cytochrome P-450 du métabolisme endogène des cellules.

La CA4H présente une bonne activité chez le blé, ce qui est en accord avec la grande proportion de dérivés coumariques dosés dans la lignine de germe de blé (Jung et Himmelsbach, 1989). Les caractéristiques de la CA4H du blé sont comparables à celles des CA4H déjà décrites chez d'autres espèces, ce qui a déjà été rapporté (Maule et Ride, 1983). Comme pour la CA4H du topinambour (Benveniste *et al.*, 1977), la CA4H du blé est bien une enzyme microsomale. Le NADPH est le donneur d'électrons préférentiel. Pourtant le NADH fournit une part d'activité et a un effet synergique en présence de NADPH.

La LAH, de part la nature des dérivés hydroxylés formés se distingue des laurate hydroxylases (IC et  $\omega$ ) précédemment décrites chez les plantes

supérieures. Les positions d'hydroxylations notées chez le blé ne sont actuellement connues que chez quelques espèces végétales (blé, orge, avocat). De plus, les activités enzymatiques dans les cellules de blé sont relativement importantes, en tout cas égales ou supérieures à celles relevées dans les plantules (Zimmerlin et Durst, 1990 a).

Nous avons mis en évidence deux activités de type cytochrome P-450 qui serviront d'activités de référence pour l'étude des systèmes enzymatiques responsables du métabolisme oxydatif du chlortoluron.



## CHAPITRE 4 : MÉTABOLISME DU CHLORTOLURON PAR DES FRACTIONS MICROSOMALES DE CELLULES DE BLÉ.

### A.INTRODUCTION

### B.PROPRIÉTÉS DES ENZYMES MÉTABOLISANT LE CHLORTOLURON

B.1.Mise en évidence de la transformation du chlortoluron dans des microsomes isolés de cellules de blé. Identification des métabolites

B.2.Effets de traitements des cellules de blé par le cyométrinil et le 2,4-D

B.3.Besoins en cofacteurs et en oxygène

B.4.Influences du temps, de la température d'incubation, de la concentration en protéines et du pH sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase

B.5.Influence de la concentration en chlortoluron sur les activités CPUH et CPUDM

B.6.Localisation subcellulaire des activités

B.7.Influence de la composition du tampon de broyage des microsomes sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase

### *Résumé*

### C.MISE EN ÉVIDENCE DE LA PARTICIPATION DE CYTOCHROME P-450 DANS LE MÉTABOLISME OXYDATIF DU CHLORTOLURON

C.1.Présence de cytochrome P-450 dans les microsomes

C.2.Inhibitions des activités CPUH et CPUDM

C.3.Effets d'inhibiteurs ou de stimulateurs de différents types d'oxydases sur la CPUH et la CPUDM

C.4.Effets de quelques antidotes et synergistes d'herbicides

C.5.Effets d'anticorps

***Résumé***

**D.SPÉCIFICITÉS DE SUBSTRAT DE LA CPUH ET DE LA CPUDM**

D.1.Effets d'analogues structuraux du chlortoluron

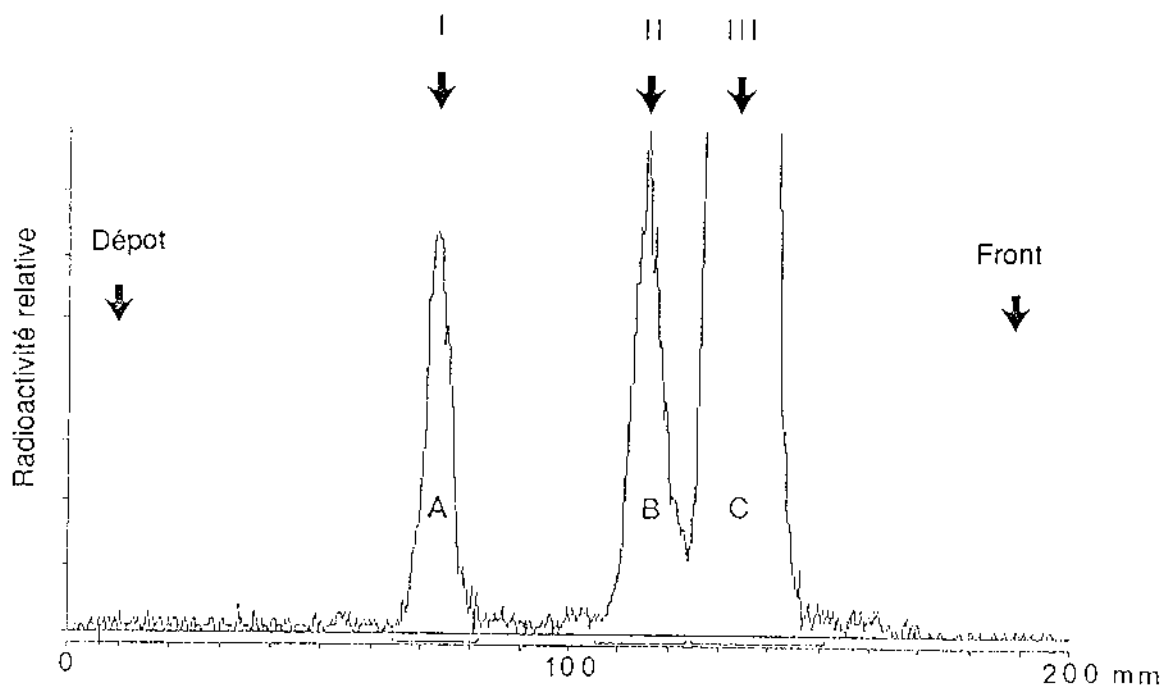
D.2.Effets d'herbicides variés

D.3.Effets de composés substrats de monooxygénases à cytochrome P-450

***Résumé***

**E.CONCLUSION**

Figure 37 : Radiochromatogramme CCM des métabolites (A,B) formés lors d'incubations de microsomes de blé en présence de chlortoluron marqué (C).



Les flèches concernent la mobilité des produits standards qui sont :

- I le chlortoluron hydroxylé
- II le chlortoluron N-monodéméthylé
- III le chlortoluron.

Le solvant de migration est le mélange : chloroforme/éthanol/acide acétique 135/10/15 (V/V/V).



## **B.PROPRIÉTÉS DES ENZYMES MÉTABOLISANT LE CHLORTOLURON**

### **B.1.Mise en évidence de la transformation du chlortoluron par des microsomes isolés de cellules de blé. Identification des métabolites**

Si du chlortoluron marqué est incubé avec des microsomes de cellules de blé, en conditions aérobies et en présence de NADPH, on observe la formation de deux métabolites plus polaires que l'herbicide. Aucune métabolisation n'est détectée lorsque les milieux d'incubation contenaient du TCA 2 %.

L'identité de ces composés, le dérivé hydroxylé sur le méthyle du cycle aromatique et le dérivé N-monodéméthylé a d'abord été recherchée sur la base des comportements chromatographiques des métabolites en CCM (Canivenc, 1989). Dans ce système, les métabolites présentent des comportements identiques à ceux des métabolites de référence fournis par Ciba-Geigy (Figure 37). Les temps d'éluion des produits en HPLC phase inverse sont également identiques.

L'identification des deux métabolites a été ensuite confirmée par spectrométrie de masse. Les analyses ont été réalisées au laboratoire des médiateurs chimiques (INRA, Brouessy), sur un spectromètre de masse Nermag R10-10C piloté par le système d'acquisition de données Sidar. Les composés de référence, puis les fractions issues des milieux d'incubation, séparées et purifiées par HPLC et CCM, sont fragmentés par impact électronique (70 eV) après introduction directe. Seuls les ions moléculaires sont retrouvés avec certitude pour chaque métabolite dans les spectres des produits standards et dans ceux des fractions issues des milieux d'incubation (Annexe), car les spectres révèlent la présence de fragments de contaminants (phtalates,...)

**Tableau 21** : Effets du cyometrinil et du 2,4-D administrés à des cellules de blé sur les activités chlortoluron hydroxylase et *N*-déméthylase mesurées *in vitro*.

Conditions de traitement	Activité CPUH pmol/min/mg	Activité CPUDM
Témoin	12 à 22	6 à 10
Cyométrinil	34	22
2,4-D	37	45

Les cellules sont traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures, ou par le 2,4-D 300  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures avant la préparation des microsomes.

provenant notamment de l'éluant utilisé en HPLC. L'ensemble de ces données permet de confirmer la présence des dérivés hydroxylés et N-monodéméthylés dans les fractions issues des milieux d'incubation.

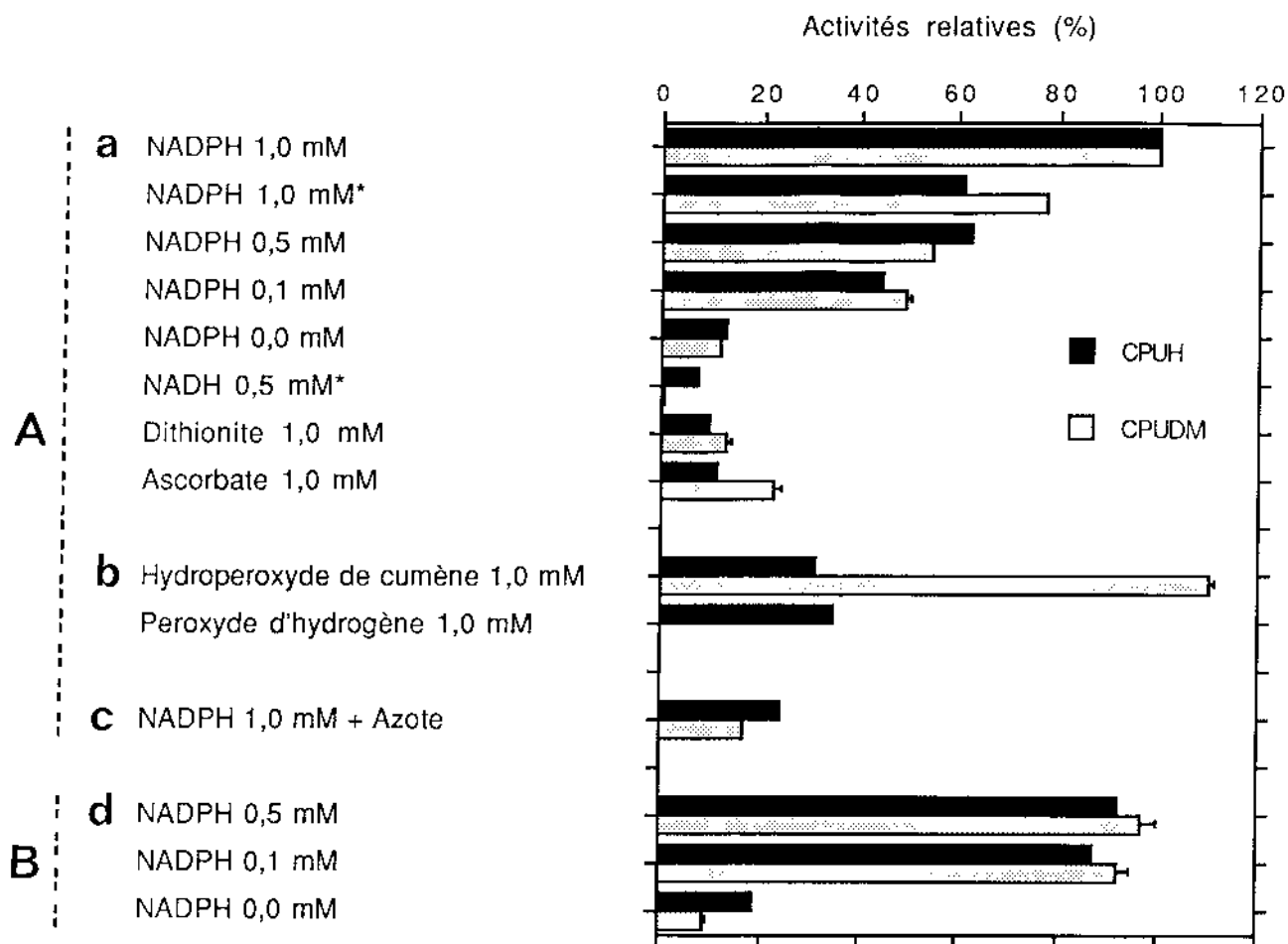
## **B.2.Effets de traitements des cellules de blé par le cyométrinitil et le 2,4-D**

Un travail antérieur a montré que la demi-vie du chlortoluron dans les cellules de blé (ensemencées à 4 mg MS/ml) est d'environ 22 heures, quand il est administré à une dose inférieure à 20 nmol/mg MS (Canivenc, 1989). Il a été établi également que des composés comme le cyométrinitil ou le 2,4-D peuvent doubler ou tripler la vitesse de transformation de l'herbicide. Nous avons cherché à savoir si leurs effets établis *in vivo* peuvent être retrouvés *in vitro* en utilisant des microsomes.

Les microsomes isolés de cellules repiquées sur milieu de Gamborg depuis deux ou trois jours métabolisent le chlortoluron à des niveaux respectifs de 10 à 20 et 6 à 12 pmoles/min/mg pour les activités chlortoluron hydroxylase (CPUH) et N-déméthylase (CPUDM)(Tableau 21). Ces valeurs constituent ce que nous appelons "des niveaux de base".

Lorsque les cellules sont cultivées pendant trois jours en présence de cyométrinitil (400  $\mu$ M soit 60 nmoles/mg MS), les activités hydroxylase et N-déméthylase sont augmentées d'un facteur respectif de 1,6 et 3,3 (Tableau 21). Lorsque les microsomes sont préparés à partir de cellules cultivées pendant deux jours en présence de 2,4-D (300  $\mu$ M soit 45 nmoles/mg MS), les facteurs de stimulation sont 2,5 et 4,5 (Tableau 21). Les activités CPUH et CPUDM sont donc différemment stimulées par les traitements des cellules par le cyométrinitil et le 2,4-D.

**Figure 38** : Influence de cofacteurs et d'oxygène sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu$ M pendant 72 heures (A) ou par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures (B).



La figure regroupe les résultats de 4 expériences indépendantes dans lesquelles 100 % d'activité, obtenus en présence de NADPH 1 mM et d'un système régénérant le NADPH et/ou le NADH, correspondent aux activités maximales de :

- a  $32,8 \pm 0,2$  ;  $28,1 \pm 0,1$
- b  $30,8 \pm 0,9$  ;  $36,3 \pm 1,3$
- c  $25,2 \pm 3,0$  ;  $27,9 \pm 2,4$
- d  $34,0 \pm 0,9$  ;  $42,5 \pm 3,6$  pmol/min/mg.

Les essais signalés par \* sont effectués sans système régénérant.

Pour examiner les effets de l'azote, les milieux d'incubation sont dégazés à 4°C sous vide léger pendant 15 minutes. Puis l'air ou l'azote barbotent dans les milieux pendant 5 minutes, avant addition du NADPH.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 ou 3).

Le cyométrinil a d'abord été utilisé comme agent stimulateur du métabolisme du chlortoluron *in vitro* car il était, lorsque nous avons débuté notre travail, le composé le plus efficace *in vivo*. Ensuite le 2,4-D s'est révélé être le meilleur agent stimulateur (Canivenc *et al.*, 1989).

### **B.3. Besoins en cofacteurs et en oxygène**

Les activités hydroxylase et N-déméthylase sont facilement détectées en présence de NADPH comme cofacteur (Figure 38) dans les microsomes de cellules traitées au cyométrinil, et présentent des valeurs optimales lorsque les milieux d'incubation contiennent un système régénérant le NADPH (G 6-P et G 6-P-déshydrogénase). Ce système d'incubation est utilisé lors des essais témoins destinés à vérifier si d'autres cofacteurs, apportés à la même concentration que le NADPH, peuvent permettre des niveaux d'activité comparables (Figure 38). Le NADH est inefficace seul, comme l'ascorbate et le dithionite. Une activité métabolique de base subsiste même en l'absence de tout cofacteur externe.

Cependant, l'hydroperoxyde de cumène, à la différence du peroxyde d'hydrogène, est aussi capable de supporter une activité N-déméthylase significative (Figure 38). Cette activité n'apparaît pas dans des témoins bouillis en présence de l'hydroperoxyde, ni dans des témoins sans enzymes.

Les incubations réalisées sous atmosphère d'azote montrent que l'oxygène moléculaire est nécessaire aux activités NADPH dépendantes (Figure 38).

**Tableau 22** : Effets du NADH sur les activités CPUH et CPUDM mesurées en présence de NADPH dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.

Conditions d'incubation	Activités (pmol/min/mg)	
	CPUH	CPUDM
NADPH 0,1 mM	29,7 $\pm$ 2,1	39,3 $\pm$ 2,5
NADH 1,0 mM	18,2 $\pm$ 1,1	16,3 $\pm$ 1,9
NADPH 0,1 mM + NADH 1,0 mM	29,8 $\pm$ 2,0	30,3 $\pm$ 3,2
NADH 10,0 mM	29,2 $\pm$ 3,3	20,6 $\pm$ 2,5
NADPH 0,1 mM + NADH 10,0 mM	27,3 $\pm$ 1,2	29,8 $\pm$ 3,1

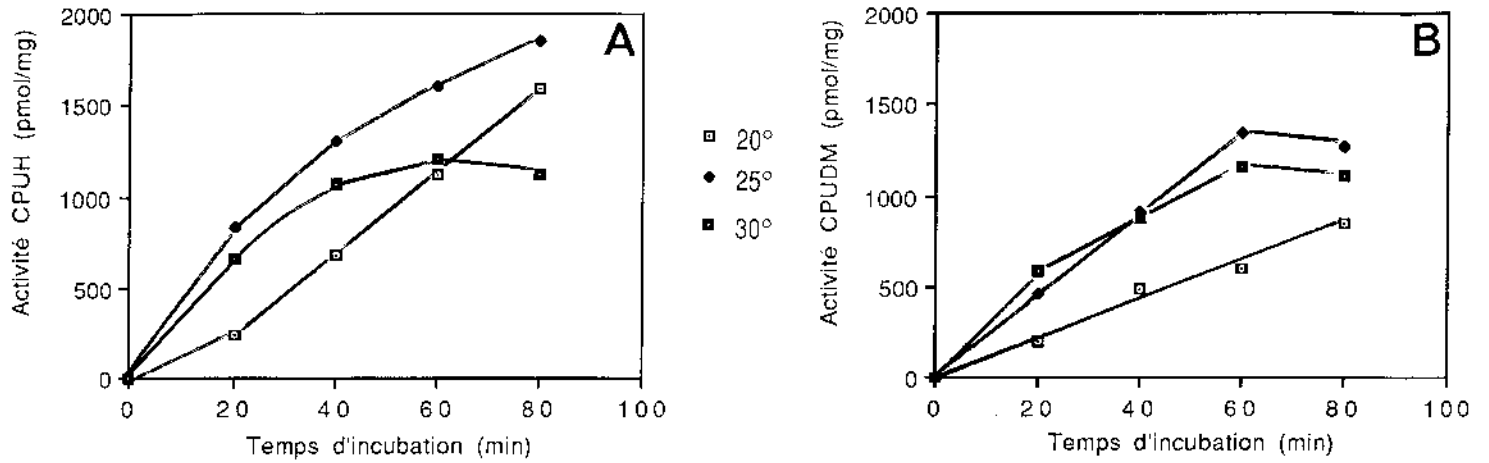
Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=3).

Dans les microsomes isolés de cellules traitées au 2,4-D, des activités résiduelles sont également décelées en l'absence d'un donneur externe d'électrons (Figure 38). Le NADPH à la concentration de 0.1 mM permet de fortes activités correspondant à 90 % des activités maximales obtenues avec 1 mM de NADPH. Des quantités de NADPH inférieures à celles utilisées dans les microsomes de cellules traitées par le cyométrinil permettent des activités enzymatiques importantes.

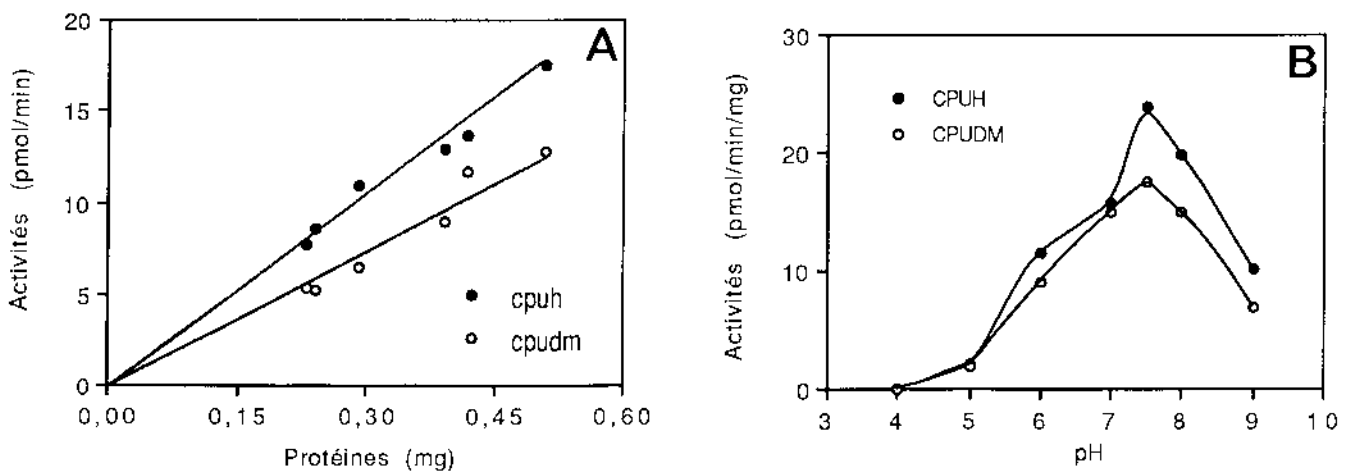
Le NADH 1 mM permet l'expression d'activités hydroxylase et N-déméthylase respectivement égales à 54 et 38 % des activités maximales (Tableau 22). A forte concentration, l'activité hydroxylase atteint 86 %, tandis que l'activité N-déméthylase ne dépasse pas 48 % de l'activité maximale. En présence de NADPH 0.1 mM, aucune des deux concentrations additionnelles de NADH (1 et 10 mM) ne permet le développement d'un effet synergique (Tableau 22). Dans ces conditions, les activités de l'hydroxylase et de la N-déméthylase ne sont jamais supérieures à celles obtenues avec le NADPH 0,1 mM seul. Il est possible que la concentration de NADPH utilisée soit saturante et ne permettent pas au NADH de fournir des électrons.

Il ne fut pas possible de déterminer le  $K_m$  pour le NADPH de la CPUH et de la CPUDM. En effet, La consommation de ce cofacteur dans les microsomes apparaît bien supérieure à celle due aux activités hydroxylase et N-déméthylase. Il semble qu'une part importante du NADPH soit utilisée dans les microsomes par des activités enzymatiques autres que celles que nous étudions (cf Chapitre 3).

**Figure 39** : Influences du temps et de la température d'incubation sur les activités CPUH (A) et CPUDM (B) dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu$ M pendant 72 heures.



**Figure 40** : Influences de la concentration en protéines (A) et du pH (B) sur les activités CPUH et CPUDM dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu$ M pendant 72 heures.





#### **B.4. Influences du temps, de la température d'incubation, de la concentration en protéines et du pH sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase.**

En fonction de la température d'incubation, les cinétiques des activités traduisent un net ralentissement après 40 minutes d'incubation. Chlortoluron hydroxylase (Figure 39 A) et N-déméthylase (Figure 39 B) présentent des sensibilités différentes à la température d'incubation.

Les activités semblent linéaires pour les concentrations en protéines utilisées, à savoir de 0,2 à 0,55 mg/incubation (Figure 40 A).

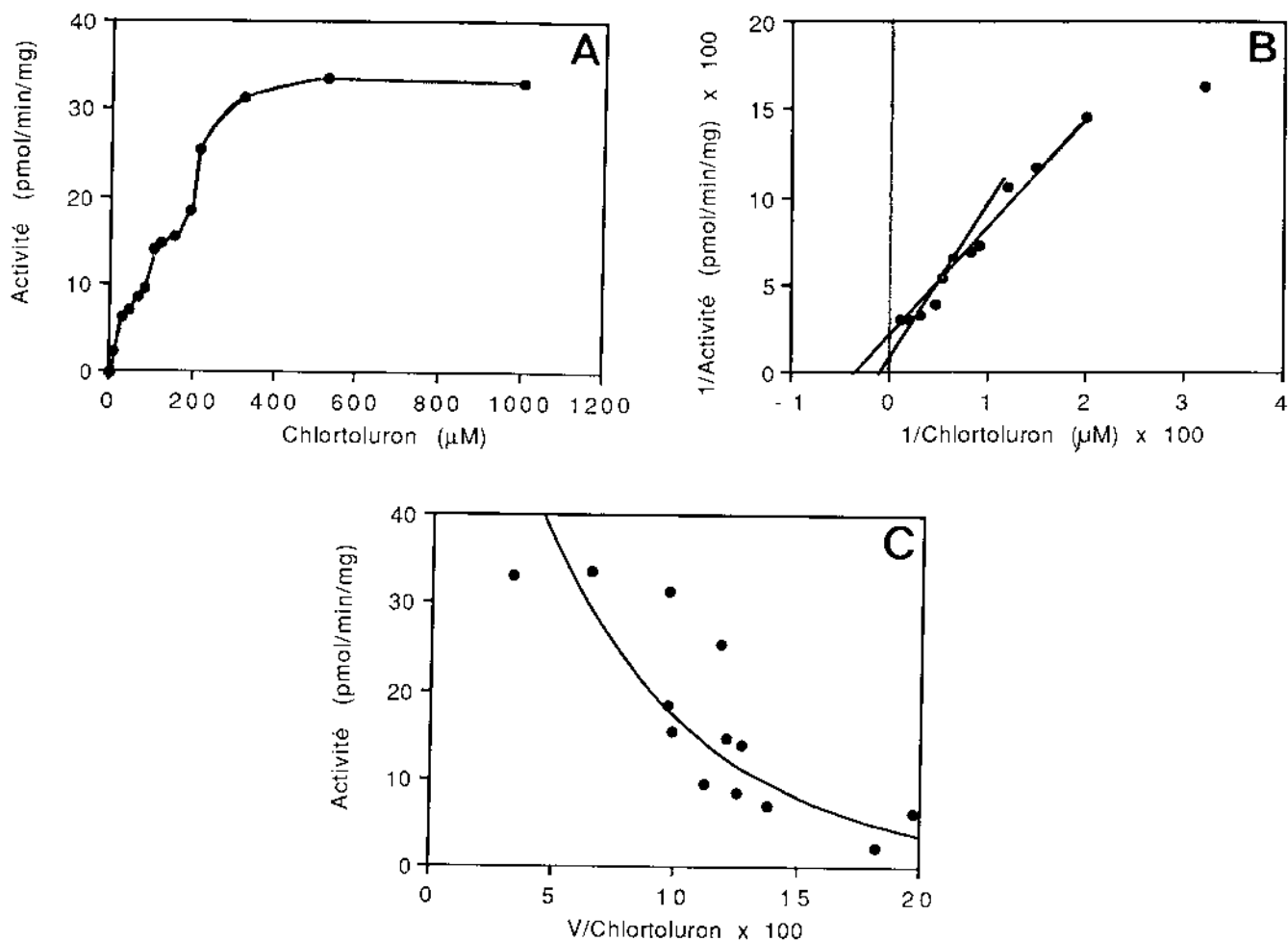
La courbe des activités hydroxylase et N-déméthylase en fonction du pH est caractéristique de la plupart des enzymes membranaires du type cytochrome P-450 : les maxima d'activité se situent autour de pH 7,5 dans nos conditions expérimentales (Figure 40 B). Une perte d'activité importante (50 %) survient pour un écart de  $\pm 1$  unité pH par rapport à 7,5.

#### **B.5. Influence de la concentration en chlortoluron sur les activités CPUH et CPUDM**

Les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase varient en fonction de la concentration en chlortoluron.

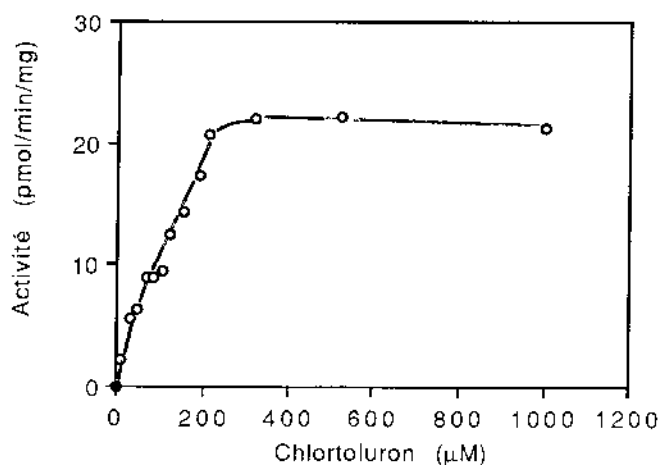
Représentée en coordonnées normales, l'activité hydroxylase ne suit pas une cinétique Michaélienne (Figure 41 A). Une réponse non linéaire est obtenue lorsque les données sont représentées en coordonnées inverses ou selon Eadie-Hoffstee (Figures 41 B et C). Deux  $K_m$  apparents peuvent être calculés, respectivement égaux à 50 et 400  $\mu\text{M}$ , pour des  $V_{\text{max}}$  de 16 et 133 pmoles/min/mg. Une situation analogue est décrite à propos de l'aminopyrine

**Figure 41** : Influence de la concentration en chlortoluron sur l'activité CPUH en coordonnées normales (A), inversées (B) et en représentation de Eadie-Hoffstee (C) dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures.



La concentration en chlortoluron varie de 12 à 1000  $\mu\text{M}$ .

**Figure 42** : Influence de la concentration en chlortoluron sur l'activité CPUDM dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures.



La concentration en chlortoluron varie de 12 à 1000  $\mu\text{M}$ .

et de la chlortoluron N-déméthylase du topinambour (Fonné, 1985 ; Fonné-Pfister *et al.*, 1988). De plus, les valeurs avancées pour les Km de la CPUH sont comparables à celles précédemment établies pour ces deux activités cytochrome P-450.

Concernant des complexes multienzymatiques membranaires comme les monooxygénases à cytochrome P-450, des propriétés cinétiques non Michaéliennes peuvent être la conséquence de contraintes dues à la faible diffusion de la réductase et du cytochrome dans le plan de la membrane, ou d'effets de charge à la surface des membranes, ou encore du coefficient de partition du substrat entre la membrane et le milieu d'incubation.

L'activité N-déméthylase semble suivre une cinétique Michaélienne lorsque les points expérimentaux sont représentés en coordonnées normales (Figure 42). Exprimées en coordonnées inversées ou selon Eadie-Hoffstee, les valeurs numériques présentent une variabilité trop grande pour permettre une analyse correcte et pour trancher entre les caractères Michaéliens ou biphasiques des cinétiques. De toute façon, une valeur de Km apparent de l'ordre de 160  $\mu$ M est envisageable pour une  $V_{max}$  de 22 pmoles/min/mg dans le cas de l'hypothèse Michaélienne.

### **B.6. Localisation subcellulaire des activités**

La localisation subcellulaire des activités hydroxylase et N-déméthylase est étudiée par centrifugation différentielle du broyat cellulaire. Le tableau 23 regroupe la répartition des deux activités et celles de "marqueurs" dans les différents culots correspondant aux parois et débris ( $C_1$ ), aux mitochondries ( $C_{10}$ ) et aux fractions microsomales ( $C_{100}$ ). La quasi-totalité du cytochrome P-450 est associée au culot 100 000 g. Les activités relatives et spécifiques CPUH et CPUDM sont maximales dans la fraction microsomale. Cependant, les pourcentages de ces dernières activités ainsi que

**Tableau 23** : Localisation subcellulaire des activités CPUH et CPUDM, NADPH-cytochrome P-450 (cyt c) réductase et cytochrome c oxydase dans des microsomes de bié isolés de cellules traitées par le cyométril 400 µM pendant 72 heures.

	Activités relatives (%)			Activités spécifiques		
	C1	C10	C100	C1	C10	C100
Chlortoluron hydroxylase	2,9 ± 0,2	20,2 ± 0,5	76,9 ± 1,1	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,1	23,9 ± 0,6
Chlortoluron N-déméthylase	0,1 ± 0,1	30,5 ± 1,4	69,4 ± 1,3	0,1 ± 0,1	4,4 ± 0,4	30,6 ± 0,6
NADPH-cytochrome c réductase	1,6 ± 0,1	32,8 ± 1,9	65,6 ± 1,9	5,8 ± 0,3	14,7 ± 1,2	90,0 ± 0,7
Cytochrome c oxydase	7,2 ± 1,1	91,9 ± 1,4	0,9 ± 0,2	88,0 ± 20,1	138,6 ± 1,3	4,0 ± 1,3

Les activités relatives sont exprimées en % des activités totales trouvées dans les culots C1 + C10 + C100. Les activités spécifiques sont données en pmol/min/mg pour les activités CPUH et CPUDM, et en nmol/min/mg pour les activités cytochrome c réductase et oxydase.

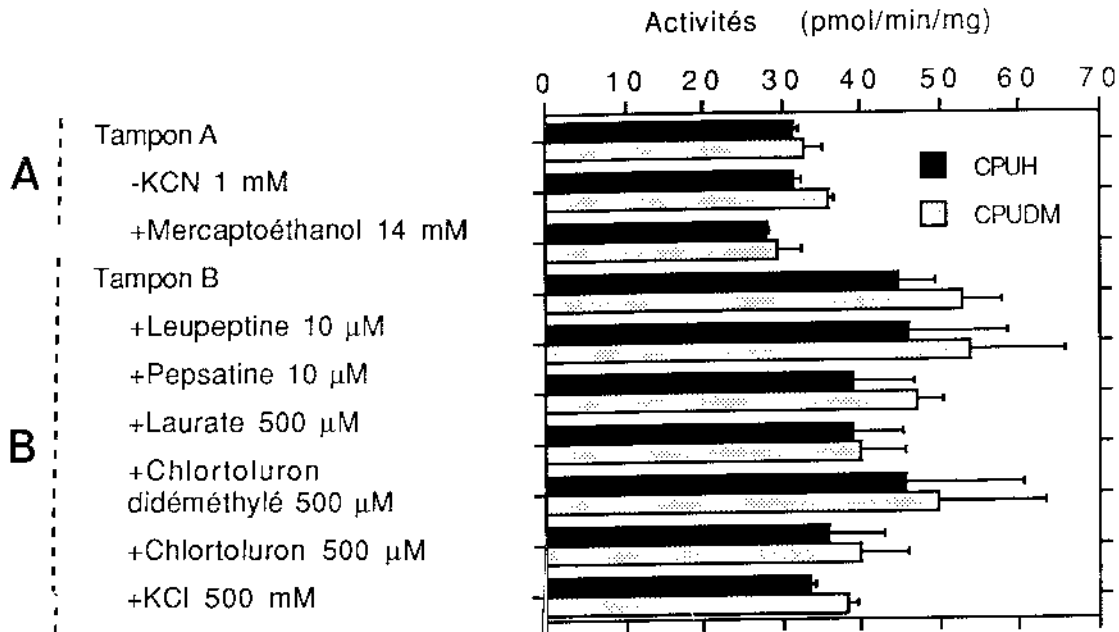
Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± déviation standard (n=2).

NADPH-cytochrome P-450 réductase dans les mitochondries sont compris entre 20 et 33 %. Il est possible que des fragments de réticulum endoplasmique restent agrégés aux mitochondries pendant l'extraction (Fonné-Pfister *et al.*, 1988). En effet, la réductase est généralement connue pour être localisée dans le réticulum endoplasmique (Benveniste *et al.*, 1977). En revanche, les fractions microsomales ne sont que très faiblement contaminées par des mitochondries. Les activités CPUH et CPUDM apparaissent ainsi localisées dans les mêmes fractions membranaires que les cytochromes P-450 et la NADPH-cytochrome P-450 réductase.

#### **B.7. Influence de la composition du tampon de broyage des microsomes sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase**

Plusieurs compositions de tampon de broyage ont été utilisées dans le but d'augmenter les activités enzymatiques. La suppression du KCN 1 mM dans le tampon de broyage A (ascorbate/KCN, cf Chapitre 2) est sans effet sur les activités hydroxylase et N-déméthylase dans les cellules traitées au cyométrinil (Figure 43). L'addition de MSH 14 mM provoque une légère inhibition (10 %). Les microsomes de cellules traitées au 2,4-D sont ensuite préparés dans le tampon B dans lequel le KCN 1 mM est remplacé par le MSH 14 mM (cf Chapitre 2). Dans ces conditions, la présence des inhibiteurs de protéases leupeptine et pepsatine modifie peu les activités enzymatiques. De même, l'addition de substrats des monooxygénases à cytochrome P-450 ou de leurs analogues structuraux (chlortoluron, dérivé N-didéméthylé, et laurate) ne stimule pas non plus les activités contrairement à ce qui a été observé pour la CA4H du pois (Stewart et Schuler, 1989). A l'inverse, la laurate inhibe fortement la LAH dans ces conditions (non montré). Le chlortoluron et son métabolite N-didéméthylé restent en partie adsorbés sur les structures

**Figure 43** : Influence de la composition du tampon de broyage sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures (A) ou par le 2,4-D 300  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures (B).



Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 4).

Tampon A = tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 + 20 % (p/v) glycérol + Ascorbate 20 mM + KCN 1 mM + PMSF 1 mM.

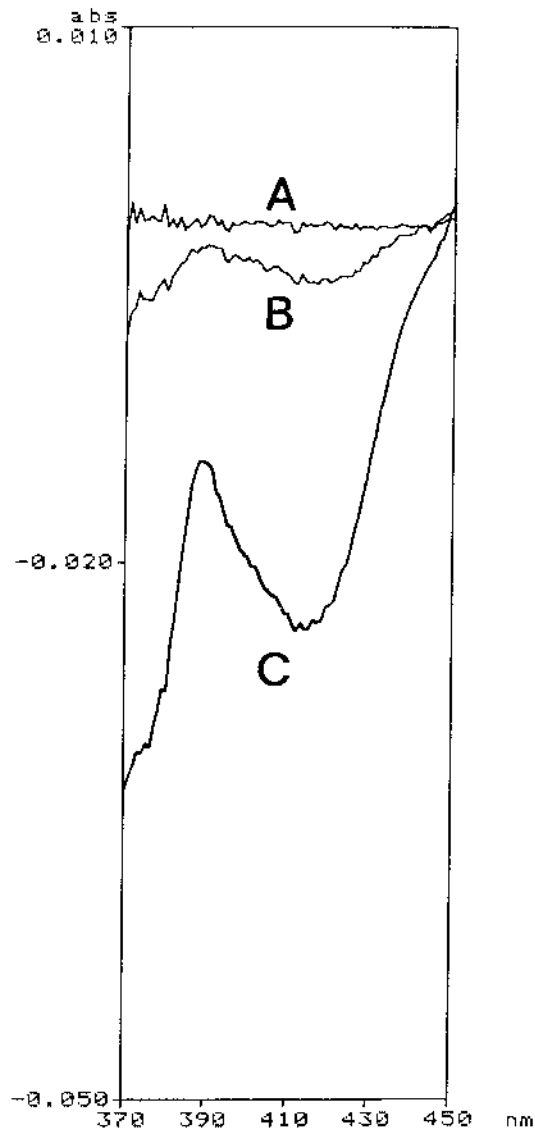
Tampon B = tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 + 20 % (p/v) glycérol + Mercaptoéthanol 14 mM + Ascorbate 20 mM + PMSF 1 mM + EDTA 1 mM.

membranaires à l'issue de la préparation car ils sont détectés en HPLC. La préparation des microsomes avec un tampon contenant du KCl 500 mM en vue de la solubilisation des peroxydases faiblement liées aux membranes conduit à une légère diminution des activités hydroxylase et N-déméthylase, peut être en rapport avec une augmentation de la force ionique du milieu, un facteur souvent inhibiteur de l'activité des monooxygénases à cytochrome P-450.

**Résumé :** Deux activités enzymatiques présentes dans les microsomes isolés de cellules de blé catalysent l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron, deux réactions importantes du métabolisme de l'herbicide *in vivo* dans les plantes et les suspensions cellulaires. Les niveaux d'activités sont augmentés par le traitement des cellules par le cyométrinil et le 2,4-D, l'hydroxylase étant moins stimulée que la N-déméthylase. Les activités CPUH et CPUDM nécessitent le NADPH comme cofacteur en présence d'oxygène moléculaire, plutôt que le NADH. Ce dernier cofacteur n'exerce pas d'effet synergique quand il est administré en mélange avec le NADPH. Seule l'activité de la N-déméthylase est importante lorsque l'oxygène est fourni par l'hydroperoxyde de cumène. Lors de cinétiques, CPUH et CPUDM présentent des sensibilités différentes à la température d'incubation. Les deux activités sont linéaires pour les concentrations de protéines utilisées et leurs activités sont maximales à pH 7,5. Les deux activités varient en fonction de la concentration en chlortoluron, la CPUH présente des caractéristiques d'enzymes non Michaéliennes et deux valeurs de Km peuvent être avancées. Il n'est pas possible de déterminer les caractéristiques de la CPUDM en présence d'une trop grande dispersion des points expérimentaux en coordonnées inversées. Les activités CPUH et CPUDM apparaissent localisées dans les mêmes fractions membranaires que les cytochromes P-450 et la NADPH-cytochrome P-450 réductase. Elles sont peu sensibles aux différentes compositions de tampon de broyage utilisées.

**Figure 44** : Spectres d'interaction de type I obtenus avec des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures, en présence de chlortoluron.

- A Microsomes oxydés contre microsomes oxydés
- B + chlortoluron 100  $\mu\text{M}$
- C + chlortoluron 160  $\mu\text{M}$



Les microsomes, préparés selon le protocole classique, sont déposés sur coussin sucrose 30 % (p/v) et centrifugés 90 min à 80 000  $g$  (Beckman SW 27). La fraction restant à l'interface du coussin est utilisée pour la réalisation des spectres.

La concentration en protéines pour les essais est de 1 mg/ml.

Le chlortoluron est apporté en solution dans de la SAB 1mg/ml.



## **C.MISE EN ÉVIDENCE DE LA PARTICIPATION DE CYTOCHROME P-450 DANS LE MÉTABOLISME OXYDATIF DU CHLORTOLURON**

### **C.1.Présence de cytochrome P-450 dans les microsomes**

La présence des cytochromes b5 et P-450 dans les microsomes extraits de cellules de blé a été établie au chapitre précédent.

La figure 44 représente un spectre d'interaction entre des microsomes de blé et le chlortoluron. Malgré une dérive de la ligne de base, il présente un maximum d'absorption à 389 nm et un creux à 412 nm typiques d'un spectre de type I. Nous pouvons penser que le chlortoluron a bien accès à la poche catalytique d'un cytochrome P-450 et qu'il active le fer hémique à l'état "high spin". C'est la condition préliminaire pour qu'il soit substrat d'une monooxygénase à cytochrome P-450.

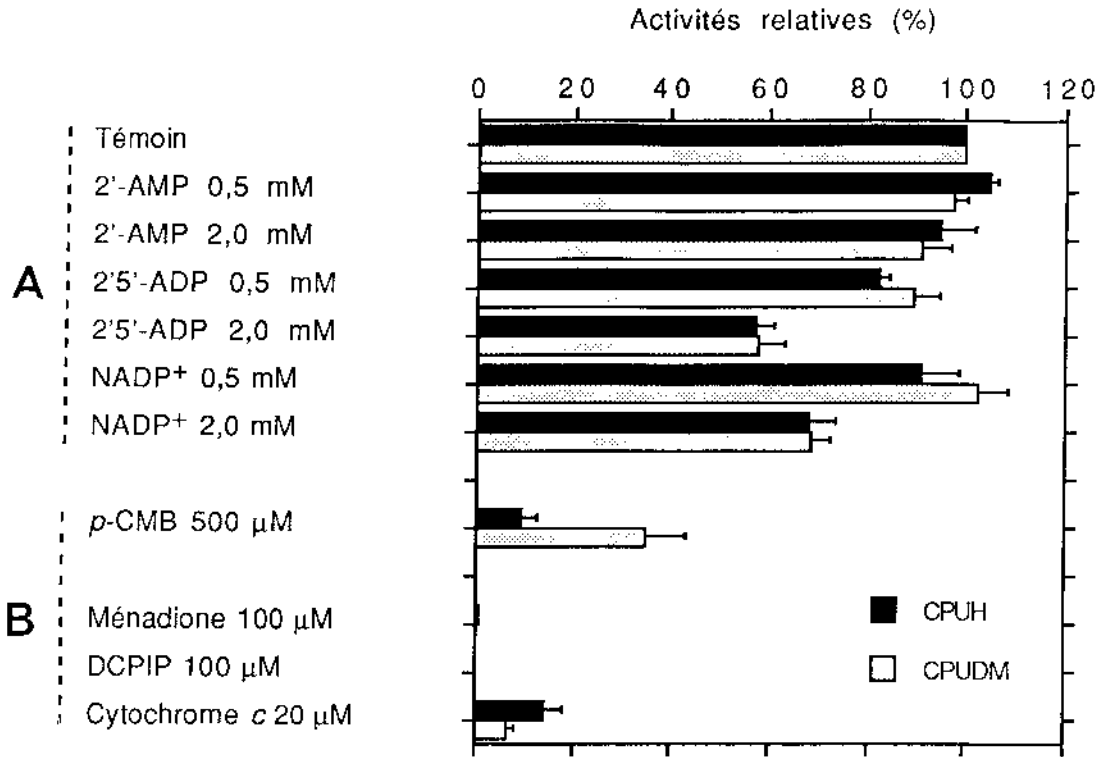
### **C.2.Inhibitions des activités CPUH et CPUDM**

De nombreuses possibilités d'inhibition existent concernant les monooxygénases à cytochrome P-450 (cf Chapitre 1). Elles se situent au niveau de la NADPH-cyt P-450 réductase et du transfert des électrons, ou au niveau du cytochrome P-450 et de son cycle catalytique.

-Inhibition de la NADPH-cytochrome P-450 réductase et du transfert des électrons

Les analogues structuraux du NADPH sont mis en compétition avec le NADPH (Figure 45). A forte concentration (2,0 mM), le 2'5'-ADP est le meilleur compétiteur (42 % d'inhibition), le NADP<sup>+</sup> est moins actif (32 %) tandis que le

**Figure 45** : Effets des inhibiteurs de la NADPH-cytochrome P-450 (cyt *c*) réductase sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures (A) ou par le cyométrinil 400  $\mu$ M pendant 72 heures (B).



100 % d'activité correspondent respectivement pour la CPUH et la CPUDM à des activités de :  
 42,5  $\pm$  0,4 ; 55,8  $\pm$  1,1 pmol/min/mg dans l'expérience A

31,5  $\pm$  2,6 ; 33,1  $\pm$  2,0 pmol/min/mg dans l'expérience B.

Les effets des analogues structuraux du NADPH sont évalués en présence de NADPH 0,5 mM sans système régénérant.

Les effets du *p*-CMB sont évalués en préincubant les microsomes avec le chlortoluron et l'inhibiteur à 4°C pendant 5 minutes. Les réactions enzymatiques débutent par l'addition du NADPH.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2).

2'-AMP est sans effet. Des effets similaires sont notés concernant la CA4H du blé (cf Chapitre 3) et la chlortoluron N-déméthylase du topinambour (Fonné, 1985). A de plus faibles concentrations, égales à celle du NADPH (0,5 mM), les trois analogues ne sont que peu ou pas inhibiteurs. Dans tous les cas, les niveaux d'inhibition des activités CPUH et CPUDM sont comparables. Ils sont cependant inférieurs à ceux notés dans le cas de la CA4H (cf Chapitre 3).

Les activités CPUH et CPUDM sont inhibées par le *p*-CMB (Figure 45), un inhibiteur de la NADPH-cytochrome *P-450* (*cytochrome c*) réductase qui bloque les groupes thiols de la protéine (Salaün *et al.*, 1978 ; Madyastha et Coscia, 1979).

La ménadione, le DCPIP et le cytochrome *c*, accepteurs exogènes des électrons de la NADPH-cytochrome *P-450* (*cytochrome c*) réductase, inhibent très fortement les deux activités (Figure 45). L'effet de la ménadione sur les activités CPUH et CPUDM contraste cependant avec celui précédemment observé sur la CA4H du blé.

Pris dans leur ensemble, ces résultats sont en accord avec la participation de la NADPH-cytochrome *P-450* réductase dans le transfert des électrons lors des deux réactions enzymatiques responsables de l'hydroxylation et de la N-déméthylation du chlortoluron.

#### -Inhibition par les ligands du fer hémique

Une caractéristique de la plupart des cytochromes *P-450* est leur grande sensibilité au monoxyde de carbone, qui empêche la fixation de l'oxygène moléculaire (cf Chapitre 1). Une réversion de l'effet inhibiteur est partiellement obtenue par la lumière.

**Tableau 24** : Effets du monoxyde de carbone sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures.

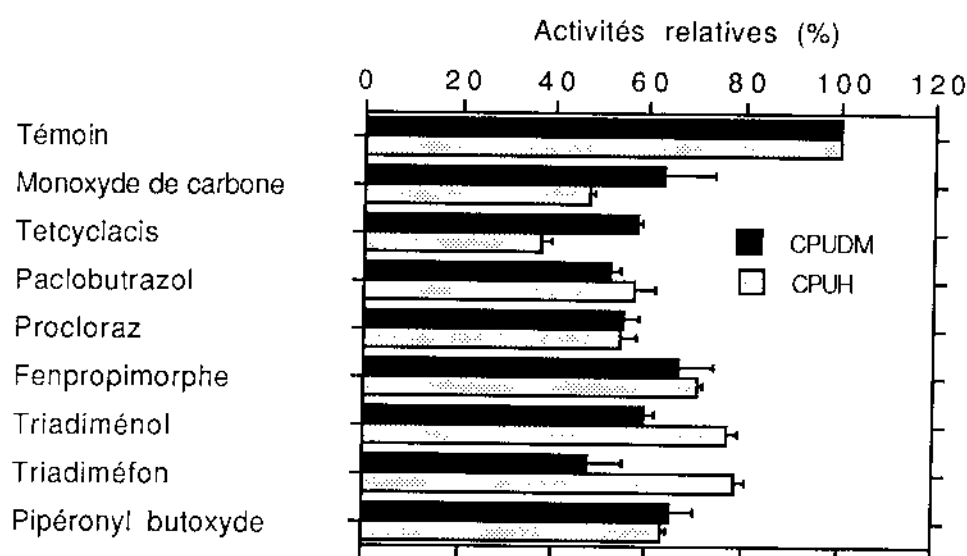
	Activités CPUH (pmol/min/mg)	Activités CPUDM (pmol/min/mg)	% d'inhibition CPUH	% de réversion CPUH
Obscurité	21,5 $\pm$ 1,2	20,2 $\pm$ 1,4		
Obscurité + CO	9,6 $\pm$ 0,9	26,3 $\pm$ 2,1	55,3	
Lumière	29,0 $\pm$ 0,2	25,2 $\pm$ 0,5		
Lumière + CO	16,4 $\pm$ 0,1	26,0 $\pm$ 2,4	43,4	35,1

Le mélange CO/air (50/50 ; V/V) barbote dans les milieux d'incubation pendant 15 minutes à 4°C à l'obscurité. Après addition du NADPH, les incubations se déroulent pendant 15 minutes, soit à la lumière, soit à l'obscurité. La lumière provient d'un projecteur de diapositives (lumière blanche 150 W) placé à 15 cm des milieux d'incubation.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  déviation standard (n=2).

Le % de réversion est calculé par la formule  $(\text{actLum} + \text{CO} - \text{actObs} + \text{CO}) / (\text{actLum} - \text{actObs} + \text{CO}) \times 100$ .

**Figure 46** : Effets des ligands du fer hémique sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures.



100 % d'activité correspondent à des activités de  $44,9 \pm 2,0$  et  $55,6 \pm 1,7$  pmol/min/mg pour la CPUH et la CPUDM.

Le monoxyde de carbone barbote dans les milieux d'incubation pendant 30 secondes.

La concentration des effecteurs est de 100  $\mu\text{M}$ .

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=3).

Les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase enregistrées en conditions aérobies sont plus importantes à la lumière qu'à l'obscurité (Tableau 24).

Par ailleurs, elles montrent différentes sensibilités à un mélange air/CO (50/50) barbotant dans les milieux avant et pendant les incubations (Tableau 24). Dans ces conditions, l'activité hydroxylase est inhibée de 55 % à l'obscurité et de 43 % à la lumière. Le taux de réversion de l'inhibition par la lumière est de 35 %. Par contre, l'activité N-déméthylase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone dans les mêmes conditions expérimentales.

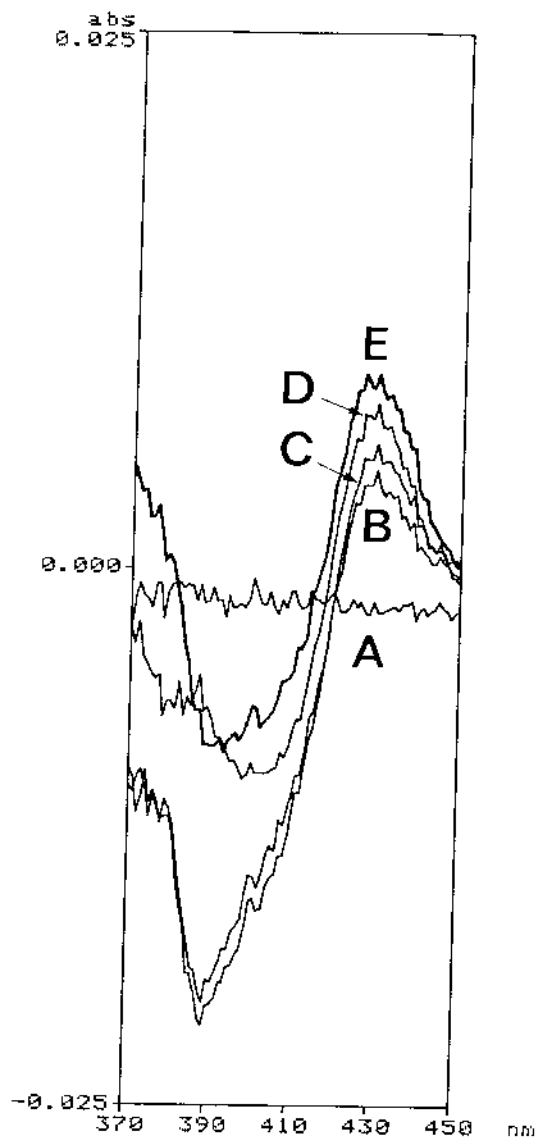
A l'inverse, lorsque le monoxyde de carbone pur barbote pendant 30 secondes directement dans les milieux d'incubation, les deux activités sont inhibées (Figure 46).

En plus du monoxyde de carbone, de nombreux composés sont capables d'inhiber les cytochromes P-450 en formant avec le fer hémique des interactions électroniques qui empêchent la fixation de l'oxygène (cf Chapitre 1). Ce sont principalement les composés azotés aromatiques et aliphatiques dont un atome d'azote possède un doublet libre d'électrons. Ces amines comprennent notamment des régulateurs de croissance des plantes (Coolbaugh et Hamilton, 1976 ; Coolbaugh *et al.*, 1978) et des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes, qui sont connus pour inhiber une ou plusieurs monooxygénases à cytochrome P-450 (Rivière *et al.*, 1984 ; Vanden Bossche, 1987 ; Burden *et al.*, 1987 ; Koller, 1987 ; Corio-Costet *et al.*, 1988 ; Burden *et al.*, 1989). Un mode d'action identique à celui des amines est décrit pour les composés ayant une fonction méthylène dioxobenzène comme le pipéronyl butoxyde, synergiste d'insecticide (Casida, 1970).

Plusieurs de ces inhibiteurs ont été testés sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase (Figure 46). Ainsi, le tetcyclacis et

**Figure 47** : Spectres d'interaction de type II obtenus avec des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures, en présence de prochloraz.

- A Microsomes oxydés contre microsomes oxydés
- B +prochloraz 100  $\mu\text{M}$
- C +prochloraz 200  $\mu\text{M}$
- D +prochloraz 300  $\mu\text{M}$
- E +prochloraz 400  $\mu\text{M}$



Les microsomes, préparés selon le protocole classique, sont déposés sur coussin sucrose 30 % (p/v) et centrifugés 90 min à 80 000  $g$  (Beckman SW 27). La fraction restant à l'interface du coussin est utilisée pour la réalisation des spectres. La concentration en protéines pour les essais est de 1 mg/ml. Le prochloraz est apporté en solution dans le DMSO 15 %.

le paclobutrazol, deux régulateurs de croissance, sont de bons inhibiteurs des deux activités. Cependant, à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , le tetcyclacis inhibe préférentiellement l'hydroxylation d'environ 60 %, alors que le paclobutrazol affecte les deux réactions avec la même intensité (45 %). La sensibilité de la CPUH du blé au tetcyclacis apparaît inférieure à celle du maïs (Fonné-Pfister *et al.*, 1990 b). Le procloraz est un fongicide de la famille des imidazoles. Bien que connu comme un inducteur de monooxygénases à cytochrome P-450, il inhibe du métabolisme le chlortoluron lorsqu'il est administré dans les milieux d'incubation (Figure 46). Le fenpropimorphe, un fongicide de la famille des morpholines, et les triazoles triadiménol et triadiméfon, sont de faibles inhibiteurs de l'hydroxylase. Ces trois composés sont plus actifs sur la N-déméthylase (Figure 46). Le pipéronyl butoxyde est également un inhibiteur des deux activités (35 %).

Le procloraz, administré à des microsomes oxydés produit un spectre d'interaction de type II, avec un creux à 390-400 nm et un pic à 429 nm (Figure 47). Ce type de spectre confirme les potentialités du fongicide à inhiber les monooxygénases à cytochrome P-450.

#### -Inhibition par un substrat suicide

L'ABT est un substrat suicide des cytochromes P-450 et de certaines peroxygénases (cf Chapitres 1 et 3). Administré aux microsomes de blé à la dose de 100  $\mu\text{M}$  lors de préincubations, il inhibe les activités hydroxylase et N-déméthylase du chlortoluron respectivement de 75 et 55 % environ (Tableau 25). La N-déméthylase est moins affectée que l'hydroxylase, comme cela était déjà observé *in vivo* chez les plantes (Cabanne *et al.*, 1987 a ; Gonneau *et al.*, 1988) ou chez les cellules (Canivenc *et al.*, 1989). Administré à la dose de 1 mM, il inhibe totalement les deux activités.

**Tableau 25** : Effets de l'ABT sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu\text{M}$  pendant 72 heures.

Conditions d'incubation		Activités relatives (%)	
		CPUH	CPUDM
Témoin		100,0	100,0
ABT	100 $\mu\text{M}$	26,2 $\pm$ 6,5	43,4 $\pm$ 2,9
ABT	1000 $\mu\text{M}$	0,0	0,0

100 % d'activité correspondent à des activités de  $20,9 \pm 2,4$  et  $15,4 \pm 0,4$  pmol/min/mg pour la CPUH et la CPUDM.

Les préparations sont préincubées à 25°C pendant 10 minutes avec NADPH (Témoin) ou NADPH + ABT, en absence de chlortoluron. Les incubations débutent par l'addition de l'herbicide, et les milieux sont incubés pendant 15 minutes.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2).



### **C.3.Effets d'inhibiteurs ou de stimulateurs de différents types d'oxydases sur la CPUH et la CPUDM**

Les effets de divers composés connus pour leurs capacités à inhiber ou à stimuler des réactions d'oxydation ont été évalués sur les activités hydroxylase et N-déméthylase.

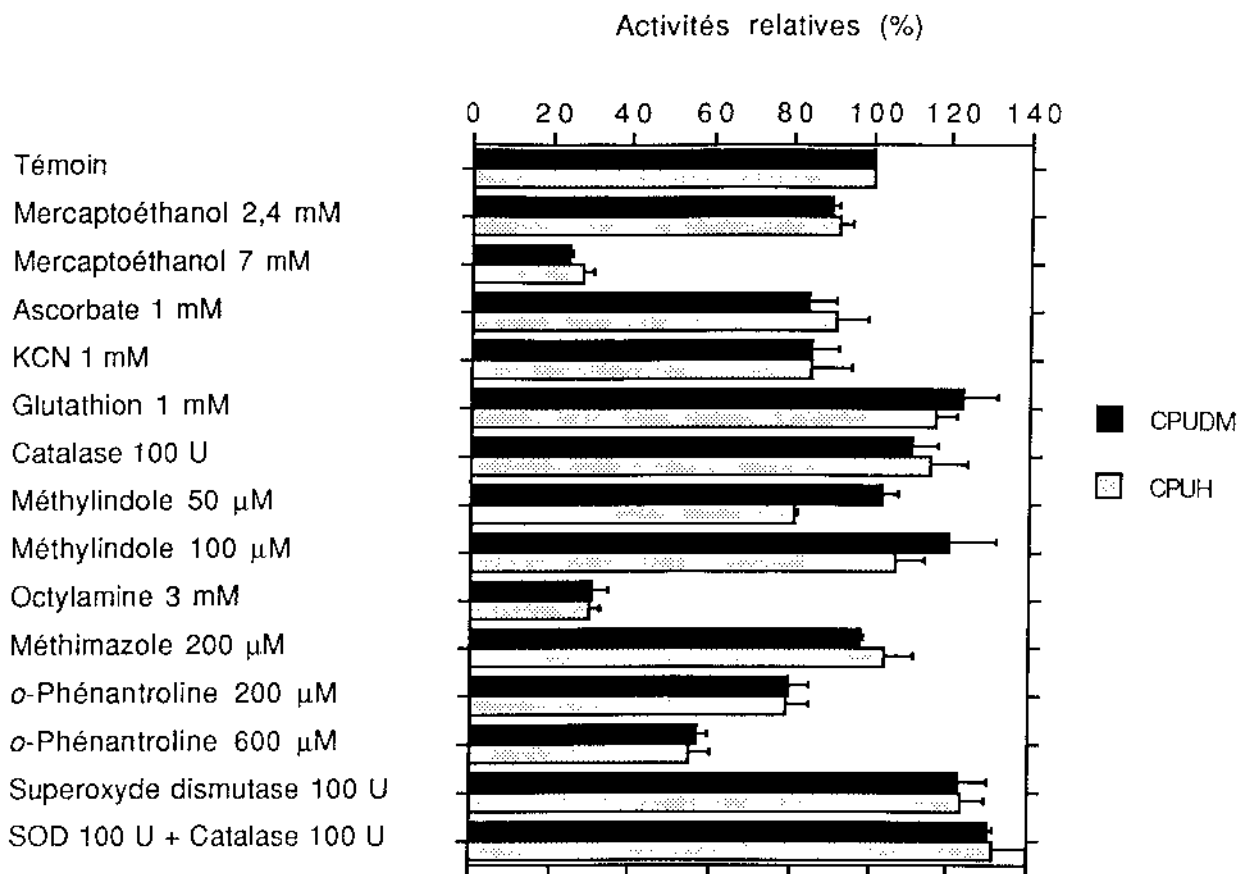
-Effets sur les activités CPUH et CPUDM mesurées en présence de NADPH.

Mercaptoéthanoï, KCN, catalase et glutathion réduit sont décrits comme des inhibiteurs de peroxydases (Güllner et Tyihak, 1987). Le MSH 2,4 mM et le KCN 1 mM inhibent légèrement les activités (10-15 %) alors que le premier exerce un fort effet inhibiteur à une concentration de 7 mM (Figure 48). Un effet inhibiteur du mercaptoéthanoï administré à forte dose lors des incubations a déjà été rapporté pour d'autres monooxygénases à cytochrome P-450 (Grand, 1984). La catalase et le glutathion entraînent une stimulation des activités respectivement de l'ordre de 10 à 20 % environ.

L'ascorbate 1 mM inhibe les activités de 15-20 %. Le méthylindole, un autre inhibiteur de la peroxydation des lipides (Adams *et al.*, 1987) est légèrement inhibiteur à 50  $\mu$ M tandis qu'il stimule préférentiellement la N-déméthylase à 100  $\mu$ M.

La figure 48 rapporte aussi les effets de quelques composés qui ont été testés pour déterminer si la N-déméthylation du chlortoluron pouvait être catalysée par des monooxygénases à flavine (EC 1.14.3.8.8). Ces enzymes solubles et non hémoprotéiques sont spécialisées dans l'attaque oxydative d'hétéroatomes (N, S et P ; Yamada *et al.*, 1983 ; Kinsler *et al.*, 1988) chez les animaux. Elles activent des amines aromatiques secondaires ou primaires, des sulfones, des sulfoxydes. Elles utilisent le NADH et le NADPH comme

**Figure 48** : Effets de composés variés sur les activités CPUH et CPUDM en présence de NADPH, mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.



100 % d'activité correspondent pour la CPUH et la CPUDM à des activités respectives de  $37,2 \pm 1,5$  et  $42,6 \pm 1,0$ .  
 Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=3).

cofacteurs, et leur pH optimum est voisin de 8,3. Le méthimazole, qui est un inhibiteur classique des monooxygénases à flavine (Sabourin et Hodgson, 1984), est sans effets sur les activités CPUH et CPUDM du blé, ni sur la N-déméthylase du chlortoluron chez le topinambour (Fonné, 1985). L'octylamine qui inhibe les cytochromes P-450 et stimule les monooxygénases à flavine (Duffel *et al.*, 1981), diminue très fortement les activités CPUH et CPUDM. Ces résultats excluent la participation de monooxygénases à flavine dans le métabolisme oxydatif du chlortoluron dans les microsomes de blé.

Des pyrroloxygénases (EC 1.13.11.26) ont été décrites dans le germe de blé (Frydman *et al.*, 1972 ; Frydman *et al.*, 1987). Ces oxygénases fonctionnent en présence de dithionite, mais l'oxygène moléculaire et le NADPH sont de mauvais cofacteurs. Elles sont également inhibées par le MSH et peu sensibles au *p*-CMB. L'absence de métabolisme du chlortoluron en présence de dithionite, comme l'insensibilité des deux réactions au MSH et l'inhibition par le *p*-CMB permettent d'exclure la participation de telles enzymes dans l'hydroxylation et la N-déméthylation de l'herbicide *in vitro*.

Un complexant du fer hémique, l'*o*-phénantroline (Soliday et Kolattukudy, 1977) inhibe les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase. Ces résultats sont en accord avec la participation de cytochromes P-450 dans le métabolisme du chlortoluron.

Enfin la superoxyde dismutase, qui piège certaines formes activées d'oxygène, entraîne une stimulation des deux activités de l'ordre de 20 %. En mélange avec la catalase, elle stimule les activités de 30%. Les effets de ces enzymes plaident en faveur de la présence de formes activées d'oxygène dans les préparations, comme cela a déjà été évoqué dans le chapitre précédent.

**Tableau 26** : Effets de divers composés sur les activités CPUDM, aniline oxydase et guaiacol oxydase mesurées en présence d'(hydro)peroxydes dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le cyométrinil 400  $\mu$ M pendant 72 heures (A,B) ou par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures (C).

Conditions d'incubation	Activités enzymatiques		
	CPUDM ( $\mu$ mol/min/mg)	Aniline oxydase (nmol/min/mg)	Guaiacol oxydase (nmol/min/mg)
Sans cofacteur A	3,2 $\pm$ 0,1	0,0	0,0
Avec cofacteur	41,2 $\pm$ 3,0	3,5 $\pm$ 0,8	766,0 $\pm$ 80,6
Avec cofacteur + KCN 1,0 mM	49,9 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,9	0,0
Préincubation B	12,7 $\pm$ 3,7	2,4 $\pm$ 0,1	960,6 $\pm$ 44,7
Avec cofacteur + <i>p</i> -CMB 200 $\mu$ M	0,0	2,4 $\pm$ 0,1	942,9 $\pm$ 169,9
Sans cofacteur C	3,8 $\pm$ 0,4	0,0	0,0
Avec cofacteur	46,1 $\pm$ 1,2	8,0 $\pm$ 0,8	1164,2 $\pm$ 31,0
Avec cofacteur + MSH 1,4 mM	45,4 $\pm$ 1,5	0,0	18,5 $\pm$ 2,2

Les cofacteurs sont l'hydroperoxyde de cumène pour les activités CPUDM et aniline oxydase, et le peroxyde d'hydrogène pour l'activité guaiacol oxydase.

Les effets du *p*-CMB sont évalués après 10 minutes de préincubation à 25°C en présence de l'effecteur, puis les (hydro)peroxydes sont ajoutés.

Les résultats sont exprimés sous formes de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 4).

#### -Effets sur l'activité CPUDM mesurée en présence d'hydroperoxyde

Dans les microsomes de cellules de blé, des peroxygénases pourraient catalyser la N-déméthylation du chlortoluron en présence d'hydroperoxyde de cumène. Les niveaux d'activité de la chlortoluron N-déméthylase en présence d'hydroperoxyde sont comparés à ceux d'activités de référence qui sont l'aniline oxydase (peroxygénase) et la guaiacol oxydase, une activité marqueur des peroxydases, pour plusieurs conditions d'incubation.

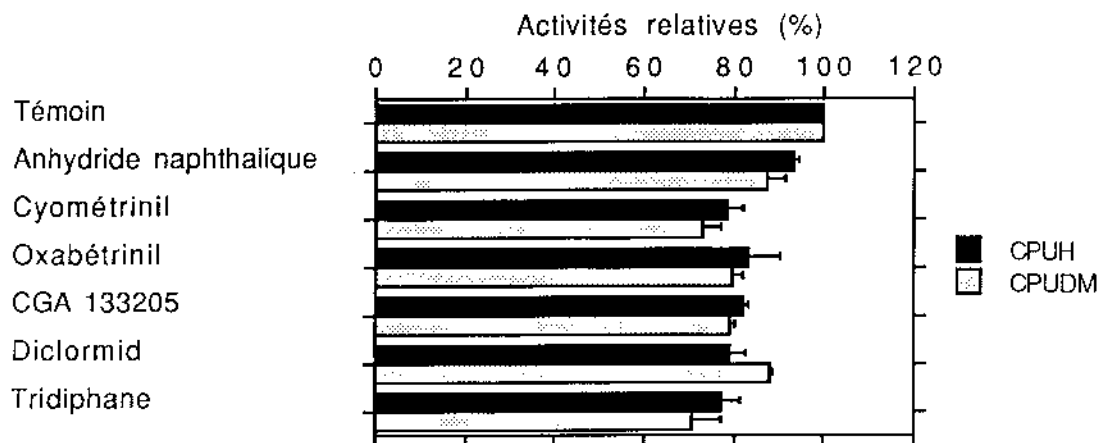
Dans les microsomes, l'activité N-déméthylase est légèrement augmentée par le KCN 1 mM, alors que celle de la peroxygénase est faiblement diminuée et que celle de la peroxydase est nulle (Tableau 26). Lors d'incubations précédées par des préincubations des microsomes en présence de *p*-CMB (qui peut convertir le P-450 en P-420, Potts *et al.*, 1974), la N-déméthylase est totalement inhibée tandis que les deux autres marqueurs ne sont pas affectés. Par contre, la N-déméthylase est insensible au mercaptoéthanol, tandis que les activités peroxydase et peroxygénase sont considérablement réduites. Aucune activités de type peroxygénase ou peroxydase ne sont observées en l'absence d'(hydro)peroxyde(s) externe(s), ou en présence de NADPH dans les milieux d'incubation.

Les caractéristiques des trois activités enzymatiques testées, face à des inhibiteurs potentiels de l'une ou de l'autre laissent penser que la N-déméthylation du chlortoluron en présence d'hydroperoxyde de cumène est assurée par un cytochrome P-450.

#### **C.4.Effets de quelques antidotes et synergistes d'herbicides**

Certains antidotes d'herbicides sont connus pour moduler les taux et les activités de cytochromes P-450 chez le maïs (Komives et Dutka, 1989). Il est également démontré que le diclormid administré *in vivo* en même temps que le

**Figure 49** : Effets des antidotes et des synergistes d'herbicides sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.



100 % d'activité correspondent à des activités spécifiques de  $45,8 \pm 2,6$  et  $56,2 \pm 1,8$  pmol/min/mg pour la CPUH et la CPUDM.

La concentration en effecteurs est de 100  $\mu$ M.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  déviation standard (n=3).

**Tableau 27** : Effets d'anticorps anti-NADPH-cytochrome P-450 réductase, anti-CA4H et anti-ECOD sur les activités CA4H, CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.

Conditions d'incubation	Activités enzymatiques (pmol/min/mg)		
	CA4H	CPUH	CPUDM
Témoin	5831,4	45,9	100,64
+IgG anti-réductase	202,9	0,0	0,0
Témoin	4570,4	51,4	66,9
+IgG anti-CA4H	293,1	49,6	70,5
+IgG anti-ECOD	5355,1	53,5	71,0

Les microsomes sont préincubés pendant 10 minutes à 25°C en présence d'un volume égal de sérum de lapin contenant ou non chaque anticorps. Les incubations débutent par l'addition du NADPH et des substrats.

chlortoluron inhibe le métabolisme de l'herbicide dans les cellules de blé (Canivenc *et al.*, 1989).

Le tridiphane, un synergiste d'herbicides de la famille des triazines chez les plantes (Ezra *et al.*, 1985) qui augmente aussi la toxicité de l'insecticide diazinon chez la mouche (Lamoureux et Rusness, 1987), a également un effet synergique sur les phénylurées (Caseley *et al.*, 1989). Ses effets synergiques sont dus à une inhibition de la conjugaison enzymatique des pesticides avec le glutathion chez les plantes et chez les insectes (Lamoureux et Rusness, 1986, 1987), mais également à l'inhibition de monooxygénases à cytochrome P-450 chez les mammifères (Moreland *et al.*, 1989 b).

Administrés à des microsomes de blé lors des incubations, les antidotes et les synergistes d'herbicides testés montrent des effets inhibiteurs sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase (Figure 49). Les niveaux d'inhibition sont généralement voisins de 20 %, les deux composés les plus actifs étant le cyométrinil et le tridiphane.

### **C.5.Effets d'anticorps**

Des anticorps polyclonaux anti NADPH-cytochrome P-450 réductase de topinambour nous ont été fournis par I. Benveniste. Ils présentent des réactivités croisées avec les réductases de toutes les plantes supérieures testées à ce jour (Benveniste *et al.*, 1989). Administrés aux microsomes de blé, ils inhibent l'activité NADPH cyt *c* réductase de 75 % environ (non montré), alors que la CPUH, la CPUDM et la CA4H sont totalement inactivées (Tableau 27).

D. Werck-Reichhart nous a également fourni des anticorps polyclonaux anti-P-450 contre la CA4H et l'éthoxycoumarine 7-déalkylase (ECOD) du

topinambour. CPUH et CPUDM sont insensibles à ces deux anticorps, tandis que la CA4H est totalement inactivée par les anticorps anti-CA4H (Tableau 27).

**Résumé :** Un spectre d'interaction de type I a été obtenu entre chlortoluron et microsomes. Les activités CPUH et CPUDM sont inhibées par des inhibiteurs de la réductase et du transport des électrons (compétiteurs du NADPH, *p*-CMB, accepteurs exogènes d'électrons). Elles sont également sensibles à des inhibiteurs classiques des cytochromes P-450. La CPUH est plus inhibée par le monoxyde de carbone que la CPUDM. Les ligands du fer hémique (régulateurs de croissance, fongicides et pipéronyl butoxyde) affectent les deux activités. Certains ne font pas de discrimination entre les deux activités. D'autres inhibent préférentiellement la CPUH ou la CPUDM. Enfin, l'ABT est plus efficace sur l'hydroxylase que sur la N-déméthylase. Les incubations réalisées en présence de NADPH et d'inhibiteurs de peroxydases, peroxygénases, monooxygénases à flavine, pyrroloxygénases et monooxygénases à cytochrome P-450 confirment l'implication de ce dernier type enzymatique dans les deux réactions. Elles suggèrent l'existence probable de réactions concurrentes et de formes activées d'oxygène dans les milieux d'incubation. Lorsque le cofacteur est l'hydroperoxyde de cumène, les incubations en présence d'inhibiteurs de peroxygénases et de cytochromes P-450 montrent que la CPUDM est bien de type cytochrome P-450. Ses caractéristiques ne sont pas non plus celles d'une peroxydase. Les antidotes et les synergistes d'herbicides administrés aux microsomes lors des incubations sont dans leur ensemble peu inhibiteurs du métabolisme du chlortoluron. Les activités CPUH et CPUDM sont totalement inhibées par des anticorps anti-réductase de topinambour. Elles sont insensibles à des anticorps anti-CA4H et anti-ECOD.

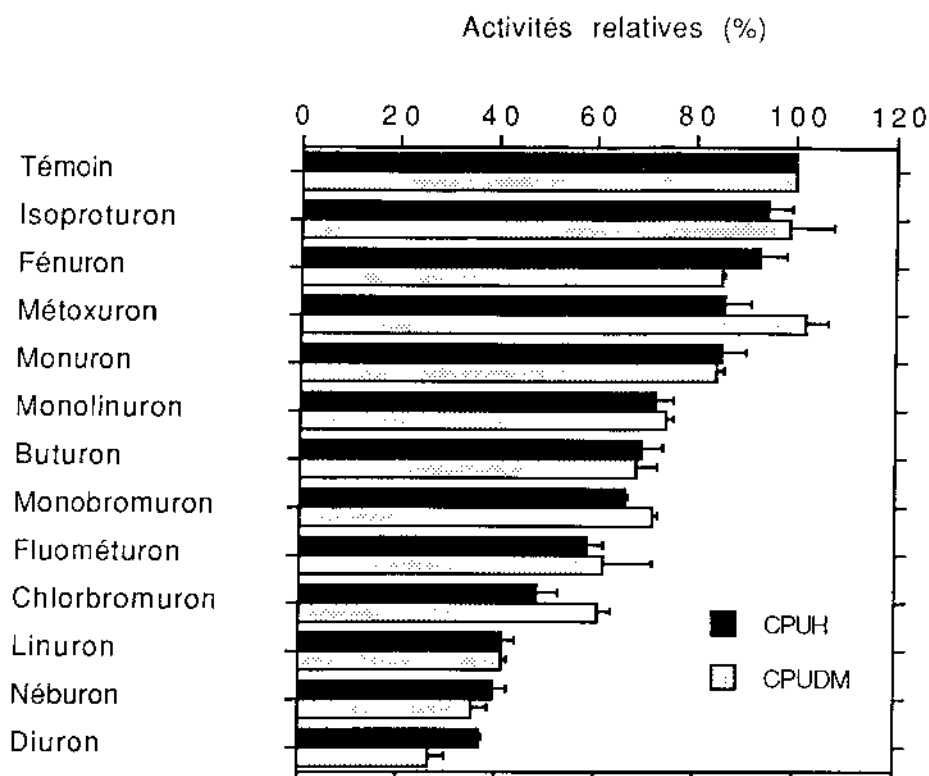
#### D.SPÉCIFICITÉS DE SUBSTRAT DE LA CPUH ET DE LA CPUDM

Les spécificités de substrat de la chlortoluron méthyl-hydroxylase et de la N-déméthylase ont été testées en utilisant :

-des phénylurées analogues structurales du chlortoluron



**Figure 50** : Effets d'analogues structuraux du chlortoluron sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.



100 % d'activité correspondent à des activités de  $41,1 \pm 0,5$  et  $50,7 \pm 0,9$  pmol/min/mg pour la CPUH et la CPUDM.

La concentration des analogues est de 500  $\mu$ M.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 3).

- des herbicides le plus souvent métabolisés *in vivo* par le blé
- divers composés connus comme étant des substrats endogènes ou exogènes de monooxygénases à cytochrome P-450.

Les structures chimiques des analogues du chlortoluron sont illustrées au chapitre 6, celles des herbicides et substrats des cytochromes P-450 figurent en annexe.

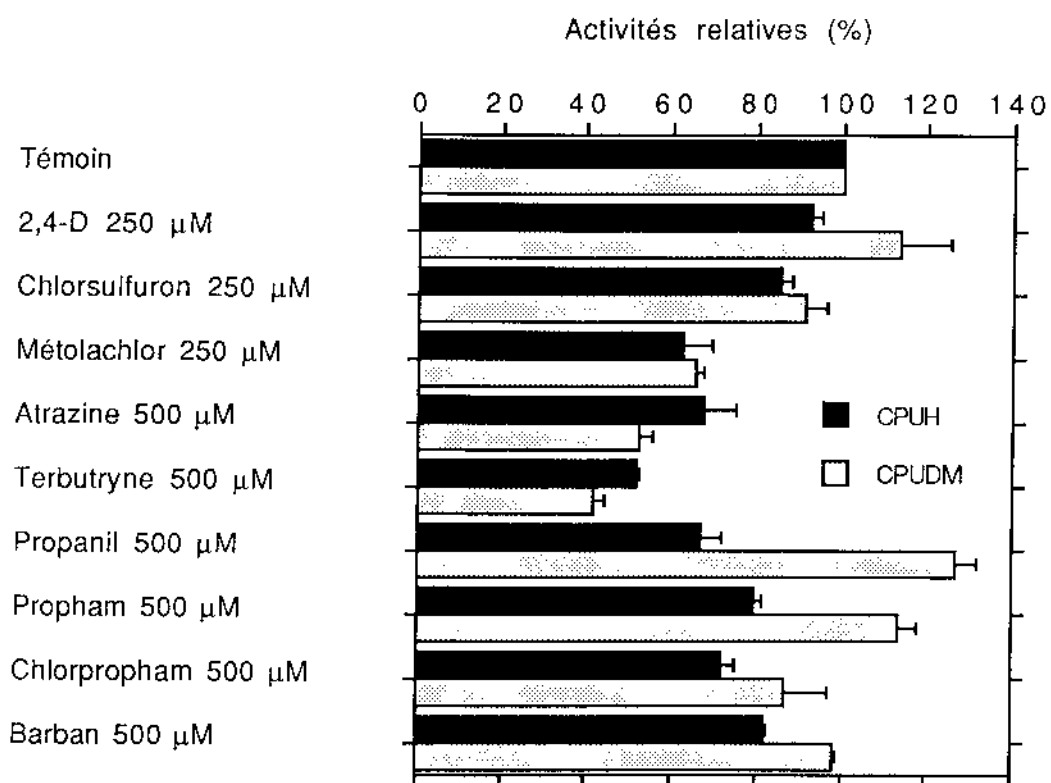
#### **D.1.Effets d'analogues structuraux du chlortoluron**

Nous avons utilisé des phénylurées structurellement proches du chlortoluron, et commercialisées comme herbicides (sélectifs ou non) du blé . Elles diffèrent du chlortoluron par la nature des substituants du cycle aromatique et de l'azote terminal tertiaire.

Ces analogues montrent des effets inhibiteurs variés lorsqu'ils sont ajoutés au milieu d'incubation à la même concentration que le chlortoluron (Figure 50). Ainsi, isoproturon, fénuron, métoxuron et monuron ne sont que peu ou pas inhibiteurs. Un second groupe de composés comprenant monolinuron, buturon, monobromuron et fluométuron présente un effet moyen. Enfin, chlorbromuron, linuron et néburon sont de bons inhibiteurs. Le diuron est le composé le plus actif (70 % d'inhibition). Il est également décrit comme un inhibiteur compétitif de la N-déméthylation du chlortoluron dans les microsomes de tubercule de topinambour (Fonné, 1985). En règle générale, l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron sont affectées avec les mêmes intensités par les différentes phénylurées.

Nous avons voulu vérifier si les niveaux d'inhibition peuvent être corrélés à des paramètres électroniques, lipophiles ou stériques des substituants. Ces études QSAR font l'objet du chapitre 6.

**Figure 51** : Effets d'herbicides variés sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.



100 % d'activité correspondent à des activités de  $41,1 \pm 0,5$  et  $50,7 \pm 0,9$  pmol/min/mg pour la CPUH et la CPUDM.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 3).

Le buturon possède un groupe acétylénique le rendant potentiellement substrat suicide. Nous n'avons cependant pas testé cette potentialité.

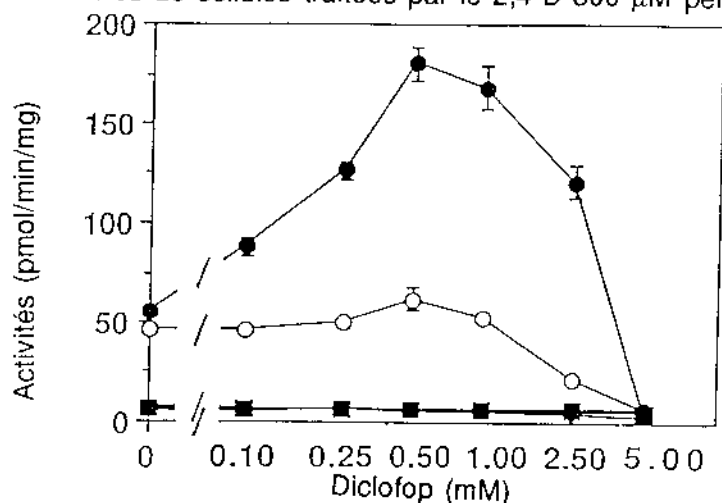
## D.2.Effets d'herbicides variés

Différents herbicides, souvent métabolisés *in vivo* par le blé, ont été mis en compétition avec le chlortoluron dans les milieux d'incubation. Ils présentent des effets variés sur la CPUH et la CPUDM (Figure 51).

Un premier groupe concerne les herbicides substrats de monooxygénases à cytochrome P-450 chez les plantes, tels que le monuron (Frear *et al.*, 1969), le 2,4-D (Makeev *et al.*, 1977), le chlorsulfuron (Frear et Mardaus, 1990) et le métolachlor (Moreland *et al.*, 1989 a). Les effets du monuron sont décrits au paragraphe précédant. Le 2,4-D et le chlorsulfuron sont sans effets sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase. Le métolachlor inhibe de 35 à 40 % les deux activités. Les inhibitions produites par cet herbicide, apporté aux microsomes sous forme de matière formulée (Duélor™), pourraient être causés par les agents de la formulation.

D'autres herbicides sont également testés sur les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase. Ainsi, l'atrazine et la terbutryne, métabolisées par les cellules de blé Koga par des réactions d'oxydation *in vivo* (Edwards et Owen, 1989) sont des inhibiteurs du métabolisme du chlortoluron. Ces deux herbicides inhibent préférentiellement la N-déméthylase. Les effets du propanil, du propham, du chlorpropham, et du barban sont évalués car leurs structures chimiques sont proches de celles des phénylurées. Les quatre herbicides sont de faibles inhibiteurs de l'hydroxylase (20-30 %). Alors que seuls les deux premiers stimulent la N-déméthylase d'un facteur comparable (10-30 %), les deux derniers n'ont que peu ou pas d'effets sur cette activité.

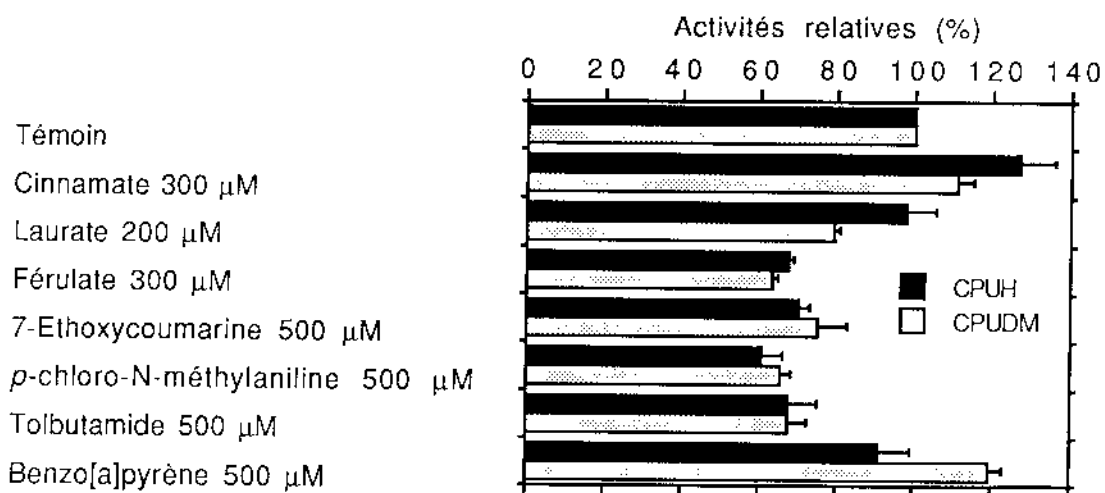
**Figure 52** : Effets du diclofop sur les activités CPUH (○) et CPUDM (●) mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées par le 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.



Les valeurs des témoins (■) sont obtenues lors d'incubations sans protéines microsomiales ou sans NADPH.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 3).

**Figure 53** : Effets de substrats de monooxygénases à cytochrome P-450 sur les activités CPUH et CPUDM mesurées dans des microsomes de blé isolés de cellules traitées au 2,4-D 300  $\mu$ M pendant 48 heures.



100 % d'activité correspondent à des activités de  $41,1 \pm 0,5$  et  $50,7 \pm 0,9$  pmol/min/mg pour la CPUH et la CPUDM.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 3).

Le diclofop est également un herbicide métabolisé par des monooxygénases à cytochrome P-450 chez le blé (McFadden *et al.*, 1989 ; Zimmerlin et Durst, 1990 a). Administré aux microsomes en présence de chlortoluron, il augmente spécifiquement les niveaux de la N-déméthylation (Figure 52). L'effet stimulateur dépend de la concentration en diclofop dans le milieu d'incubation. Dans tous les cas l'hydroxylation n'est pas significativement affectée.

### **D.3.Effets de composés substrats de monooxygénases à cytochrome P-450**

Des substrats endogènes et des xénobiotiques utilisés comme substrats modèles modulent également le métabolisme du chlortoluron *in vitro* (Figure 53). Le cinnamate stimule l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron, alors que la laurate exerce un effet inhibiteur uniquement sur la N-déméthylation. Le férulate, la 7-éthoxycoumarine, la *p*-chloro-N-méthylaniline et le tolbutamide sont tous les quatre inhibiteurs des deux réactions avec la même efficacité (35-40 %). Le benzo[a]pyrène produit quant à lui un léger effet stimulateur sur la N-déméthylation du chlortoluron.

**Résumé :** Des phénylurées analogues structurales du chlortoluron administrées en mélange avec l'herbicide ont des effets variés sur les activités CPUH et CPUDM, bien que les deux activités soient également inhibées. Ainsi l'isoproturon est sans effets alors que le diuron est le meilleur inhibiteur. 2,4-D et chlorsulfuron, deux substrats de cytochromes P-450 sont sans effets. A l'inverse, atrazine et terbutryne sont de bons inhibiteurs des deux réactions, affectant préférentiellement la N-déméthylase. Propanil, propham, chlorpropham et barban sont de faibles inhibiteurs de la CPUDM. Alors que les deux premiers stimulent faiblement la CPUH, les deux derniers

inhibent cette activité. Le diclofop a, quant à lui, un fort effet stimulateur spécifique sur la CPUDM. Des substrats endogènes ou des xénobiotiques utilisés comme substrats modèles montrent également des effets variés sur les deux activités.

## E.CONCLUSION

Les études *in vivo* sur le métabolisme des herbicides laissent à penser que des monooxygénases à cytochrome P-450 pouvaient être impliquées dans les réactions d'oxydation de nombreux herbicides chez les végétaux. Les résultats que nous avons obtenu *in vitro* permettent de confirmer cette hypothèse

En effet, les fractions subcellulaires de blé catalysent deux réactions enzymatiques, qui conduisent à la formation du dérivé hydroxylé sur le méthyle du cycle aromatique et du dérivé N-monodéméthylé. Ces métabolites sont identiques aux métabolites primaires détectés *in vivo* dans les plantes et les cellules.

Les caractéristiques des deux activités enzymatiques sont celles de monooxygénases à cytochrome P-450.

1. Les deux réactions sont associées à des fractions membranaires, les microsomes, qui renferment des quantités appréciables de cytochromes P-450 ainsi que des marqueurs du réticulum endoplasmique, comme la NADPH-cytochrome P-450 (*cytochrome c*) réductase.

2. Elles montrent une préférence pour des équivalents réducteurs provenant du NADPH en présence d'oxygène moléculaire.

3. Des spectres d'interaction de type I ont été obtenus en présence de chlortoluron avec des microsomes de blé. Ils traduisent la capacité du chlortoluron à être substrat de cytochromes P-450.

4. Les deux activités sont sensibles à des inhibiteurs variés de monooxygénases à cytochrome P-450, comme les inhibiteurs de la NADPH-cytochrome P-450 réductase (analogues structuraux du NADPH, *p*-CMB, accepteurs exogènes d'électrons, anticorps anti-réductase), ou des inhibiteurs du cytochrome P-450 (monoxyde de carbone, ligands du fer hémique, ABT).

5. Les niveaux de base de la CPUH et de la CPUDM sont faibles dans les microsomes. Des traitements des cellules par des agents stimulateurs du métabolisme de l'herbicide *in vivo*, le cyométrinil et le 2,4-D entraînent une augmentation des deux activités mesurées dans les microsomes.

Les caractéristiques des deux activités enzymatiques suggèrent la participation d'enzymes distinctes dans l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron.

1. Les cinétiques d'activité de la CPUH et de la CPUDM en fonction de la chaleur sont différentes.

2. Les deux activités présentent également des caractéristiques cinétiques distinctes en fonction de la concentration en chlortoluron.

3. Seule la N-déméthylase peut fonctionner en présence d'hydroperoxyde de cumène.

4. Les ligands du fer hémique ont des effets différentiels sur les deux activités. Il en est de même pour l'ABT.

5. Seul le diclofop est capable de stimuler la N-déméthylase lorsqu'il est administré aux microsomes lors des incubations.

6. La N-déméthylase est plus stimulée que l'hydroxylase par des traitements des cellules par le cyométrinil et le 2,4-D.

Plusieurs types d'enzymes, qui peuvent coexister dans les microsomes avec les monooxygénases à cytochrome P-450, sont potentiellement capables de catalyser des réactions d'oxygénation. Les résultats obtenus permettent



cependant d'éliminer la participation de peroxydases, peroxygénases, monooxygénases à flavine et pyrroloxygénases dans le métabolisme du chlortoluron dans des microsomes de blé.

1. Lorsque NADPH est le cofacteur, les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase sont peu sensibles au mercaptoéthanol, au KCN, et sont stimulées par la catalase et le glutathion. Ceci est renforcé par l'impossibilité de  $H_2O_2$  à soutenir les réactions ainsi que par la conservation des activités CPUH et CPUDM lors d'incubations avec des microsomes préparés en présence de KCl.

2. L'insensibilité des réactions au mercaptoéthanol est aussi en opposition avec l'intervention éventuelle de peroxygénases (Ishimaru et Yamasaki, 1977 a et b). Le NADPH n'est pas non plus utilisé lors des incubations pour générer des (hydro)peroxydes.

3. Lorsque le cofacteur est l'hydroperoxyde de cumène, les caractéristiques de la CPUDM en présence de KCN, de *p*-CMB et de mercaptoéthanol suggèrent un mécanisme de type cytochrome P-450.

4. La participation de monooxygénases à flavine est infirmée par le manque d'effet du méthymazole et la forte inhibition des activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase par l'octylamine.

5. La forte inhibition des activités CPUH et CPUDM par l'*o*-phénantroline est en accord avec l'intervention de monooxygénases à cytochrome P-450 (Testa et Jenner, 1981). Elle élimine la possibilité de participation de pyrroloxygénases, également sensibles au mercaptoéthanol et nécessitant le dithionite comme cofacteur.

6. La stimulation des activités par le glutathion qui est également comme le méthylindole un inhibiteur de la peroxydation des lipides (Bast et Haenen, 1984) laisse penser que ce mécanisme existe dans les microsomes et peut être préjudiciable aux activités enzymatiques que nous étudions. Des activités NAD(P)H oxydase ont d'ailleurs été décrites dans le plasmalemme de

racines de blé (Moller et Berczi, 1986). La stimulation des activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase par la superoxyde dismutase et/ou la catalase qui sont aussi des inhibiteurs de la NAD(P)H oxydase (Chrestin *et al.*, 1984 ; Askerlund *et al.*, 1987) suggère l'existence dans les préparations de formes activées d'oxygène.

Des analogues structuraux du chlortoluron, administrés aux microsomes avec l'herbicide, occasionnent des degrés d'inhibition variés sur les activités CPUH et CPUDM. Les autres composés testés, substrats de cytochromes P-450 ou non, n'ont pas d'effets importants sur le métabolisme du chlortoluron. Le diclofop stimule spécifiquement la CPUDM. Le chlortoluron ne semble pas être métabolisé par la CA4H ou l'ECOD.

Au terme de cette étude, il apparaît que l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron seraient catalysées par au moins deux isoformes de cytochrome P-450, chacune étant responsable d'une des deux réactions. Les études concernant les spécificités de substrat des deux réactions soulèvent de nombreuses questions quant à la multiplicité des isoformes capables de métaboliser les herbicides chez le blé. Il est actuellement difficile de savoir si des isoformes impliquées dans des réactions du métabolisme endogène cellulaire sont capables de métaboliser les xénobiotiques, ou si des isoformes spécifiques interviennent, à l'instar de ce qui se produit chez les mammifères.



**CHAPITRE 5 : AUGMENTATION DES TENEURS EN CYTOCHROME P-450 ET  
DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES A CYTOCHROME P-450 DANS DES  
MICROSOMES DE BLÉ ISOLÉS DE CELLULES TRAITÉES.**

**A.INTRODUCTION**

**B.RÉSULTATS**

B.1.Effets du 2,4-D

B.2.Effets du procloraz

B.3.Effets du mécoprop

B.4.Effets du chlortoluron

B.5.Effets des antidotes d'herbicides

**C.CONCLUSION**

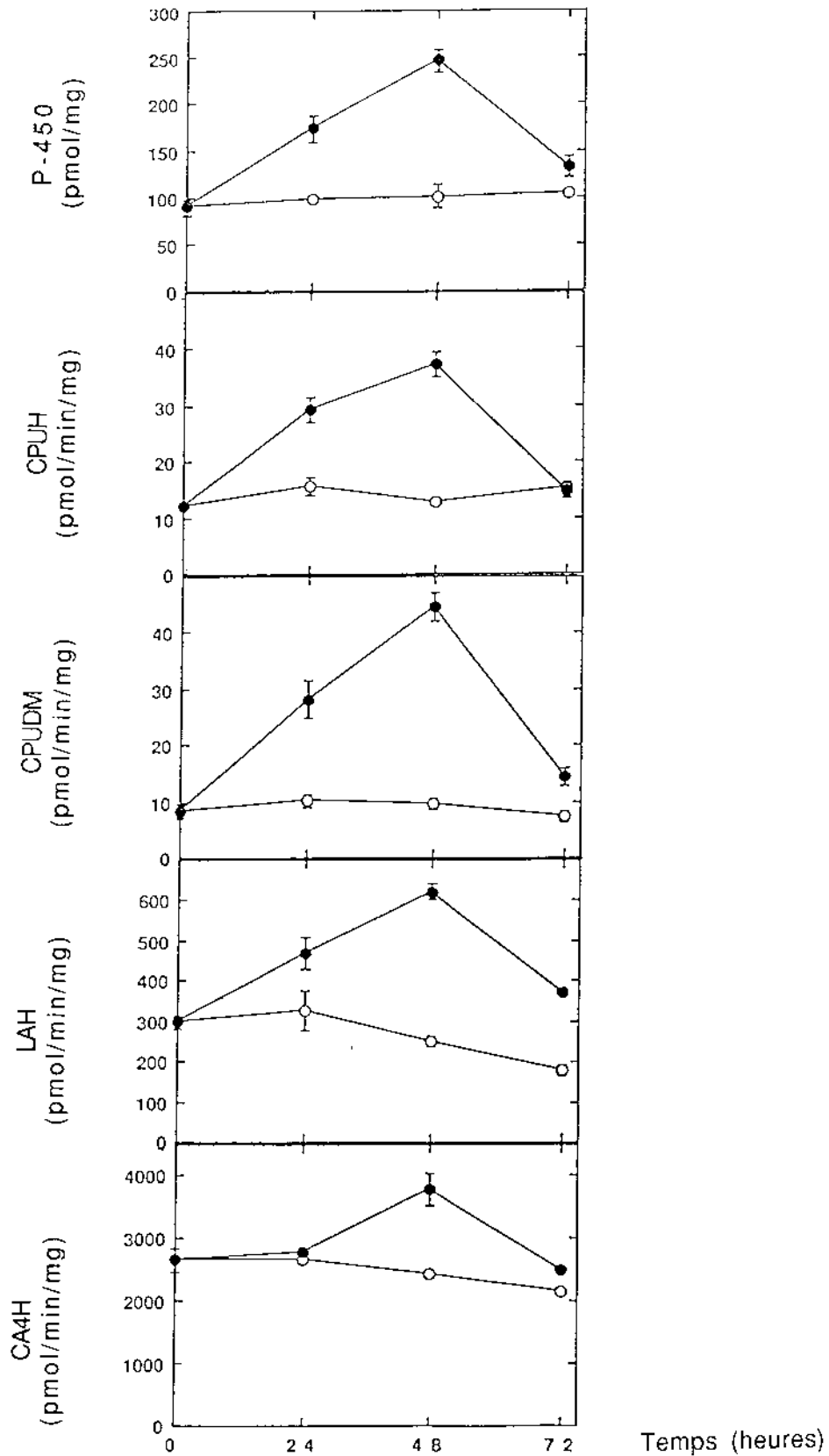
## A. INTRODUCTION

Des augmentations affectant la dégradation oxydative d'herbicides ont souvent été observées dans des tubercules ou des plantes précédemment traitées avec des herbicides ou des antidotes d'herbicides. Ainsi le métabolisme du MCPA dans des tranches de tubercules de pomme de terre (Cole et Loughman, 1983), celui des sulfonylurées chez le maïs et le blé (Sweetser, 1985), ou celui du chlortoluron chez le maïs (Cole et Owen, 1987 a), sont stimulés après des traitements avec le 2,4-D, le MCPA, l'anhydride naphthalique, le cyométril et le diclormid. Rappelons que ces trois derniers composés ont été développés comme antidotes d'herbicides (chloroacétamides et thiocarbamates) chez le maïs et le sorgho.

Il a été montré au laboratoire que le métabolisme oxydatif du chlortoluron était augmenté dans les cellules de blé à la suite de traitements avec le cyométril, le 2,4-D et le diclormid (Canivenc *et al.*, 1989).

Comme nous venons de montrer que des monooxygénases à cytochrome P-450 étaient impliquées dans l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron, il importe de déterminer si les stimulations de la dégradation du chlortoluron observées *in vivo* peuvent être le résultat d'augmentations d'activités de monooxygénases à cytochrome P-450 mesurables *in vitro*. Des stimulations d'activité nous intéressent également d'un autre point de vue. Il est évident, en effet, que le traitement de cellules par des composés stimulateurs du métabolisme du chlortoluron constitue un moyen intéressant pour obtenir des activités enzymatiques suffisamment importantes pour nos études *in vitro*.

**Figure 54** : Teneurs en cytochrome P-450 et activités des monooxygénases dans des microsomes isolés de cellules de blé après 24, 48 et 72 heures de culture en présence de 2,4-D 9  $\mu$ M (Témoin  $\circ$ ) ou de 2,4-D 300  $\mu$ M ( $\bullet$ ).



Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n= 2 à 10).

Nous allons rapporter les résultats d'essais enzymatiques réalisés à l'aide de microsomes isolés de cellules, traitées par des effecteurs dont la structure chimique figure en annexe. Les études étaient faites en fonction du temps séparant le traitement des cellules et la préparation des microsomes. Elles prennent en compte, en plus des activités CPUH et CPUDM, les teneurs en cytochrome P-450 ainsi que les activités de la LAH et la CA4H.

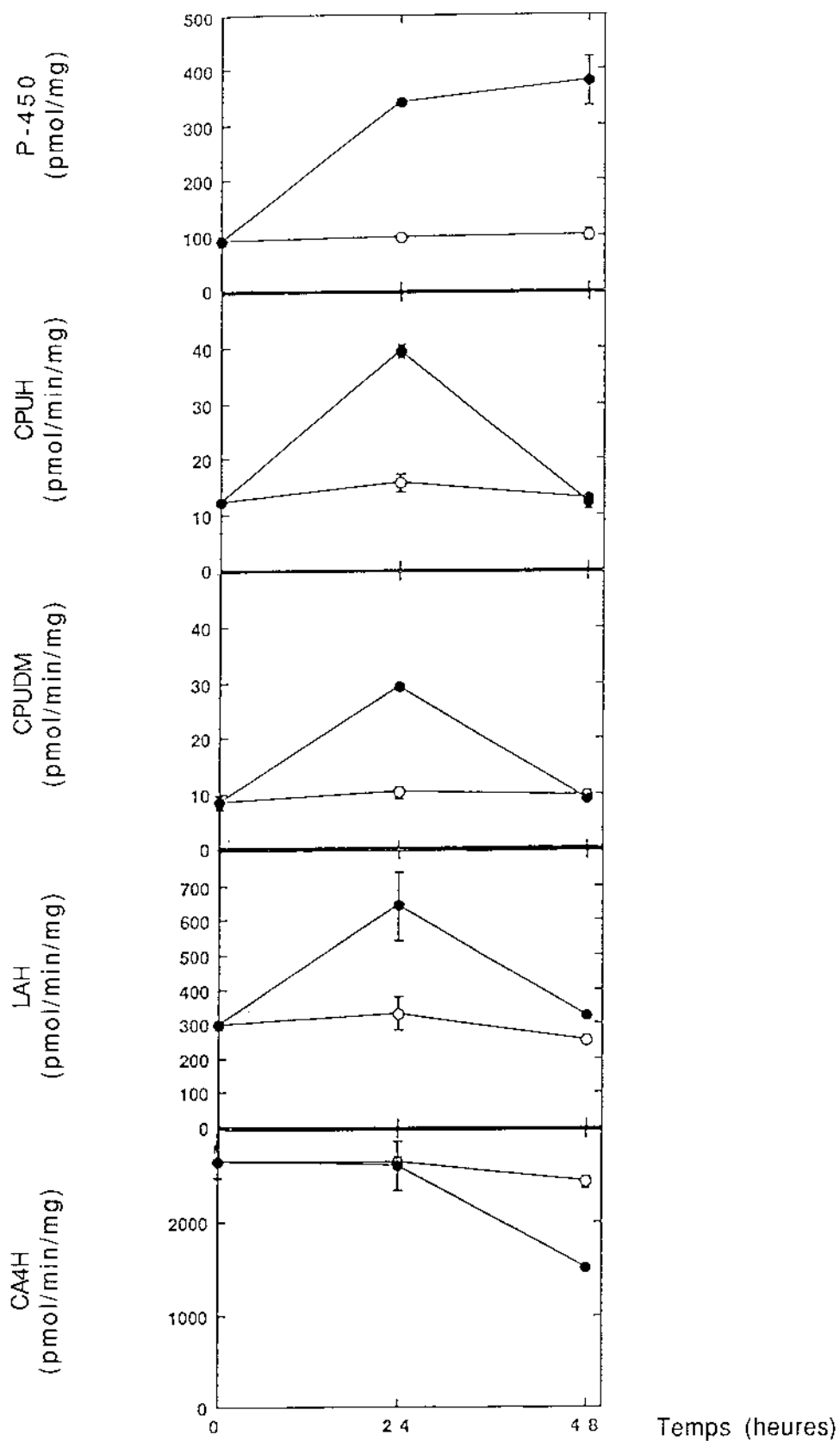
Les résultats sont comparés à ceux concernant l'induction des deux dernières activités chez les végétaux.

## **B. RÉSULTATS**

### **B.1. Effets du 2,4-D**

Les effets du 2,4-D sur les concentrations de cytochrome P-450 et les activités enzymatiques sont évalués après 24, 48 et 72 heures de croissance en présence de l'herbicide. Le traitement des cellules avec du 2,4-D 300  $\mu\text{M}$ , au lieu de la concentration habituelle de 9  $\mu\text{M}$  contenue dans le milieu de culture, a été choisi en raison de la stimulation du métabolisme du chlortoluron qu'il provoque *in vivo* dans les suspensions cellulaires de blé (Canivenc *et al.*, 1989). Pour les trois périodes de traitement (24, 48 ou 72 heures), il aboutit à une augmentation des teneurs en cytochrome P-450 (Figure 54). Tandis que les microsomes de cellules non traitées contiennent environ 100 pmoles de cytochrome P-450/mg protéines, des niveaux 2,5 fois supérieurs sont mesurés après 48 heures de traitement.

**Figure 55** : Teneurs en cytochrome P-450 et activités des monooxygénases dans des microsomes isolés de cellules de blé après 24 et 48 heures de culture sans (○) ou en présence (●) de prochloraz 70  $\mu$ M.



Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  déviation standard (n=2 à 6).



Le traitement au 2,4-D affecte également les quatre activités testées, à savoir l'hydroxylase et la N-déméthylase du chlortoluron, la LAH et la CA4H, ces deux dernières étant prises comme activités de type cytochrome P-450 de référence. Dans les cellules non traitées, les activités de l'hydroxylase et de la N-déméthylase sont pratiquement constantes tout au long de l'expérience, tandis que les activités LAH et CA4H décroissent légèrement. Trois des quatre activités augmentent après 24 heures de traitement, la CA4H constituant une exception. Comme pour les niveaux de cytochromes P-450, les stimulations maximales sont notées après des traitements de 48 heures. L'hydroxylase du chlortoluron est moins affectée que la N-déméthylase, avec des stimulations respectivement de 2,9 et 4,7. Les activités LAH et CA4H sont augmentées 2,5 et 1,5 fois. En revanche, les teneurs en cytochrome b5 ainsi que les activités NADPH cyt c réductase ne sont pas sensibles à des traitements avec le 2,4-D.

## **B.2.Effets du procloraz**

Les effets du procloraz sont estimés après 24 et 48 heures de traitements (Figure 55). Le procloraz est utilisé à la concentration de 70  $\mu\text{M}$  qui fournit la meilleure stimulation de la dégradation du chlortoluron *in vivo* (Canivenc, 1989). Les temps de 24 et 48 heures de traitement par le procloraz augmentent les concentrations de cytochrome P-450. Cependant, ses effets stimulateurs sur les activités enzymatiques n'apparaissent qu'après des traitements de 24 heures. L'hydroxylase du chlortoluron et la N-déméthylase sont plus stimulées que la LAH, dont l'activité est doublée, et la CA4H, qui demeure constante. Après 48 heures, toutes les activités montrent des niveaux comparables à ceux des cellules non traitées, ou réduits, comme dans le cas de la CA4H. Après des traitements de 72 heures, les concentrations en

**Tableau 28 :** Teneurs en cytochrome P-450 et activités des monoxygénases dans des microsomes isolés de cellules de blé après 48 heures de culture en présence de molécules phytosanitaires.

Conditions de prétraitement	Cytochrome P-450 (pmol/mg)	CPUH	Activités spécifiques (pmol/min/mg)		
			CPUDM	LAH	CA4H
Témoin	100.1 ± 12.1	12.8 ± 0.5	9.5 ± 0.9	251.6 ± 13.2	2436.5 ± 60.1
2,4-D 300 µM	246.2 ± 12.5	37.3 ± 2.1	44.7 ± 2.6	620.8 ± 20.0	3783.1 ± 264.0
Mécoprop 300 µM	271.1 ± 21.5	28.3 ± 2.1	33.3 ± 3.6	655.2 ± 37.4	6151.5 ± 285.9
Procloraz 70 µM	378.3 ± 45.0	12.1 ± 1.3	8.8 ± 0.5	322.8 ± 8.2	1510.6 ± 26.4
Chlortoluron 200 µM	285.5 ± 36.5	18.9 ± 5.0	32.4 ± 1.6	398.5 ± 56.1	2992.1 ± 26.7
Cyometrinil 400 µM	315.9 ± 12.0	35.2 ± 0.1	48.3 ± 1.8	649.3 ± 5.8	4298.0 ± 205.2
Oxabetrinil 400 µM	242.7 ± 22.8	33.0 ± 1.2	47.1 ± 1.5	598.9 ± 6.8	2529.0 ± 124.5
CGA 133205 400 µM	218.9 ± 3.0	34.4 ± 1.3	47.3 ± 1.7	635.9 ± 26.5	2651.3 ± 234.0

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± déviation standard (n=2 à 10).

cytochrome P-450 sont encore augmentées, alors que toutes les activités enzymatiques sont inhibées (non montré), comme cela a déjà été rapporté (Canivenc, 1989).

Il est probable que l'effet inhibiteur du procloraz noté au chapitre précédent (spectre de type II), se manifeste au niveau des microsomes après la période de stimulation, le procloraz se complexant probablement avec les cytochromes.

### **B.3.Effets du mécoprop**

Le mécoprop est un herbicide de la même famille chimique que le 2,4-D. Leurs modes d'action sont également similaires, et tous deux sont des herbicides sélectifs du blé. C'est pourquoi une dose identique à celle retenue pour le 2,4-D (300  $\mu$ M) est utilisée pour le mécoprop. Les effets du mécoprop sont comparés à ceux du 2,4-D après des traitements de 48 heures (Tableau 28). Le mécoprop et le 2,4-D augmentent les taux de cytochrome P-450 d'un facteur comparable. De plus, ils produisent des effets similaires sur les activités enzymatiques, stimulant préférentiellement l'activité N-déméthylase. Le mécoprop stimule aussi la LAH, mais des effets plus importants sont observés concernant l'activité CA4H, qui est augmentée 2,5 fois.

Les deux composés, 2,4-D et mécoprop, stimulent les quatre activités d'oxygénation. Cependant, le 2,4-D a des effets plus importants que ceux du mécoprop sur les réactions d'oxygénation du chlortoluron, alors que le mécoprop est plus efficace dans le cas de la LAH et de la CA4H plus spécialement.

#### **B.4.Effets du chlortoluron**

La capacité du chlortoluron à induire son propre métabolisme a été testée après avoir soumis les cellules à une dose de 200  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures (Tableau 28). La dose de 200  $\mu\text{M}$  inhibe la croissance des cellules d'environ 50 % (Canivenc, 1989). L'augmentation des teneurs en cytochrome P-450 (2,9 fois) est intermédiaire entre celles obtenues avec le 2,4-D et le procloraz. Le chlortoluron stimule son propre métabolisme en augmentant principalement l'activité N-déméthylase, et sans avoir d'effets notables sur les activités LAH et CA4H. Des effets supérieurs mais non significatifs sont observés après une application de l'herbicide à la dose de 400  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures (non montré).

#### **B.5.Effets des antidotes d'herbicides**

Trois antidotes de la famille des éthers d'oxime, le cyométrinil, l'oxabétrinil et le CGA 133205 sont testés pour leurs capacités à augmenter la dégradation du chlortoluron *in vitro* (Tableau 28). Administré à la dose de 400  $\mu\text{M}$ , le cyométrinil stimule fortement le métabolisme du chlortoluron dans les cultures cellulaires de blé (Canivenc *et al.*, 1989). Après 48 heures de traitement en présence de cyométrinil, les teneurs en cytochrome P-450 sont triplées, les autres antidotes étant moins actifs à la même dose. Les trois analogues montrent les mêmes potentialités à stimuler le métabolisme du chlortoluron, en agissant principalement sur la N-déméthylation. Les activités LAH sont comparables à celles obtenues lors de traitements avec le 2,4-D. Seul le cyométrinil stimule aussi la CA4H. Les effets du cyométrinil s'observent également après des traitements de 72 heures, avec un effet significatif sur l'activité LAH seule, et aucun effet sur celle de la CA4H

(Canivenc, 1989). Les trois antidotes, de structures chimiques comparables, sont de bons stimulateurs, mais montrent des spécificités vis à vis des teneurs en P-450 et de la CA4H.

### C.CONCLUSION

Les teneurs en cytochrome P-450 et les niveaux de transformation du chlortoluron *in vitro* sont faibles dans les microsomes préparés à partir de cellules témoins. Ceci est une situation commune chez les plantes en comparaison des activités relevées chez les animaux. Les valeurs présentées ici sont comparables, ou supérieures à celles généralement rapportées pour des préparations de microsomes de plantes capables de métaboliser des xénobiotiques.

Nos résultats montrent également l'intérêt de traiter les cellules dans le but d'obtenir des préparations douées d'activités enzymatiques suffisamment élevées. Des conclusions similaires sont fournies par des études *in vitro* récentes concernant la participation de monooxygénases à cytochrome P-450 dans la détoxification du diclofop chez le blé (McFadden *et al.*, 1989 ; Zimmerlin et Durst, 1990 a et b), du bentazon et du primisulfuron chez le maïs (McFadden *et al.*, 1990 ; Fonné-Pfister *et al.*, 1990 a) et du chlortoluron chez le maïs (Fonné-Pfister *et al.*, 1990 b). Dans les suspensions cellulaires de blé, les traitements n'affectent pas seulement les teneurs en cytochrome P-450 et le métabolisme du chlortoluron, mais ils augmentent aussi les activités de la LAH et de la CA4H. Néanmoins, les niveaux de stimulation de ces dernières activités dans le blé sont plus faibles que ceux obtenus dans des microsomes

sur les enzymes affectant le chlortoluron. L'activité  $\omega$ -LAH présente chez *Vicia faba* est stimulée 5 fois dans des graines traitées pendant 48 heures (Salaün *et al.*, 1986). Cet effet n'est pas suivi par une augmentation égale des teneurs en cytochrome P-450 et de la CA4H, qui ne sont que faiblement modifiées. Une interprétation similaire peut être faite pour le mécoprop.

Le procloraz, administré pendant 24 heures, est capable de stimuler l'oxygénation du chlortoluron dans des microsomes de blé. Ceci est en accord avec les résultats obtenus précédemment, où ce fongicide stimule-t-il le métabolisme du chlortoluron dans des cellules de blé (Canivenc, 1989). Il est possible qu'il agisse chez les plantes comme dans les foies de rat et d'oiseaux où il est un inducteur puissant des monooxygénases à cytochrome P-450 (Rivière, 1983 ; Johnston *et al.*, 1989). Il convient de noter que ses effets stimulateurs *in vitro* sont fugaces, quoique la dose de procloraz utilisée ne soit pas toxique. Ce phénomène est typique de celui obtenu avec des agents biphasiques comme les composés azotés et les composés à motif méthylène dioxobenzène abondamment décrits (Franklin, 1977 ; Pershing et Franklin, 1982 ; Marcus *et al.*, 1986 ; Murray, 1988). Quand ils sont administrés *in vivo*, de tels composés produisent une phase initiale d'inhibition associée à la formation d'un complexe avec les cytochromes P-450. Une seconde phase met en jeu la synthèse *de novo* de cytochromes P-450 et la génération de grandes quantités de complexe inactif. Comme les plus fortes teneurs en cytochrome P-450 sont détectables dans les microsomes après 48 heures, il est probable que le procloraz induise différentes isoenzymes de cytochrome P-450 montrant des sensibilités variables à l'égard du fongicide.

Il a été rapporté antérieurement que l'atrazine est capable de stimuler son propre métabolisme dans le maïs (Jachetta et Radosevich, 1981). Nos expériences montrent que le chlortoluron augmente également son propre métabolisme dans le blé, et cette augmentation de métabolisme paraît être du type cytochrome P-450. Ceci rappelle qu'une induction des teneurs en cytochrome P-450 et de l'activité CA4H est décrite dans les tubercules de topinambour par le monuron, un analogue structural du chlortoluron (Reichhart *et al.*, 1980).

Le traitement des cellules de blé par le cyométrinil stimule le métabolisme du chlortoluron *in vivo* (Canivenc *et al.*, 1989) et *in vitro*. Cet antidote semble donc actif dans le blé où il augmente aussi le métabolisme du chlorsulfuron (Sweetser, 1985). Comme il ne présente pas d'effet direct positif sur l'oxygénation du chlortoluron quand il est administré directement aux microsomes (cf Chapitre 4), nos résultats semblent indiquer qu'il pourrait agir comme un inducteur de monooxygénases à cytochrome P-450. Le cyométrinil comparé à l'oxabétrinil et au CGA 133205, produit des effets différents sur les teneurs en cytochrome P-450 et les activités CA4H. Le mode d'action des antidotes a été abondamment étudié, et plusieurs théories ont été proposées. En effet, ces molécules initialement étaient considérées comme responsables de l'élévation d'activité du système glutathion/gluthathion-transférase (Lay et Casida, 1976 ; Leavitt et Penner, 1979 ; Hatzios, 1983). Ce travail fournit une preuve supplémentaire que ces composés peuvent aussi stimuler la dégradation oxydative des herbicides, en agissant comme des inducteurs de monooxygénases à cytochrome P-450.

Les activités des monooxygénases à cytochrome P-450 montrent des stimulations différentes en réponse aux divers traitements. En résumé, l'activité chlortoluron N-déméthylase est l'activité la plus stimulée, l'hydroxylase et la LAH sont moins sensibles, et la CA4H est généralement peu affectée. A ce jour, aucune stimulation du métabolisme du chlortoluron n'a pu être obtenue en utilisant des inducteurs reconnus des cytochromes P-450 végétaux comme le géraniol, l'aminopyrine, le phénobarbital ou le clofibrate. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse suivant laquelle au moins deux monooxygénases à cytochrome P-450 différentes seraient impliquées dans le métabolisme du chlortoluron dans les cellules de blé.





## CHAPITRE 6 : MISE EN ÉVIDENCE DE CORRÉLATIONS STRUCTURE- ACTIVITÉ.

### A.INTRODUCTION

A.1.Généralités et établissement des corrélations

A.2.Paramètres physicochimiques utilisés

A.2.1.Paramètres électroniques

A.2.2.Paramètres lipophiles

A.2.3.Paramètres stériques

### B.RÉSULTATS

B.1.Coefficients de corrélation partiels

B.2.Paramètre électronique

B.3.Paramètre lipophile

B.4.Paramètre stérique

B.5.Recherche de meilleures corrélations avec le programme pas à pas

B.6.Cas des métabolites

### C.CONCLUSION

## A.INTRODUCTION

L'objet de ce chapitre est de rechercher quelles corrélations peuvent exister entre les activités CPUH et CPUDM mesurées dans les microsomes, en présence du chlortoluron et de ses analogues structuraux, et la structure chimique de ces derniers. En d'autres termes, il importe de déterminer quelles caractéristiques des substitutions, affectant le phényle et l'azote des analogues structuraux, sont responsables de l'inhibition de l'hydroxylation de la N-déméthylation du chlortoluron. Les résultats expérimentaux ont été repris de la figure 50, chapitre 4. Les analyses devraient ensuite permettre de déterminer les propriétés physicochimiques que devraient posséder des inhibiteurs potentiels du métabolisme du chlortoluron. Les études de corrélation structure-activité ont été réalisées au laboratoire d'Agrochimie (ENSAT, Toulouse) au moyen de la méthode de Hansch-Fujita.

Nous avons bénéficié pour cette étude des paramètres physicochimiques déterminés par L. Arnaud (1989)(Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire, Université J. Fourier, Grenoble), ainsi que des données abondamment publiées concernant les études QSAR réalisées sur l'inhibition du transfert électronique du PS II (Kakkis *et al.*, 1984 ; Mitsukake *et al.*, 1986 ; Shimizu *et al.*, 1988 ; Shigematsu *et al.*, 1989).

### A.1.Généralités et établissement des corrélations

La recherche de corrélations structure-activité consiste à faire apparaître une relation mathématique traduisant l'effet des modifications de structure chimique sur les variations correspondantes d'activité biologique. Cette démarche, déjà ancienne (Hansch et Fujita, 1964 ; Hansch et Deutsch, 1966), repose sur la description par des paramètres physicochimiques de

séries de molécules différemment substituées. Les molécules à comparer doivent appartenir à une même série chimique homogène.

Dans ce modèle, la variation d'enthalpie libre de l'interaction effecteur-récepteur peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\Delta G^\circ = \Delta E + \Delta P + \Delta S$$

La valeur de  $\Delta G^\circ$  représente ainsi la somme des variations individuelles des différents paramètres structuraux indépendants, qui interviennent en général dans la liaison d'une petite molécule à une macromolécule. Ces paramètres sont d'ordre électronique (E), hydrophobe (P) et stérique (S). Ils ont des valeurs qui dépendent de la nature du substituant et de la position de la substitution.

Pour établir des relations entre la réponse biologique et les paramètres électroniques, lipophiles ou stériques, il faut rechercher les combinaisons qui expliquent au mieux les variations de l'activité biologique. La résolution de ce problème consiste en une succession d'analyses régressives des données. On obtient ainsi les constantes caractéristiques de toutes les corrélations possibles. La forme générale d'une corrélation sera :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n$$

La corrélation retenue est celle qui présente les meilleurs critères fournis par analyse informatique. Le coefficient de détermination  $r^2$  représente la proportion de la variance de Y qui peut être attribuée à sa régression linéaire en X. L'écart type s donne une estimation de la dispersion des points expérimentaux par rapport aux points estimés par la corrélation. Le

test F de Fisher-Snedecor permet de trancher si une corrélation est significative au seuil de confiance P choisi.

## **A.2.Paramètres physicochimiques utilisés**

### **A.2.1.Paramètres électroniques**

Le remplacement d'un substituant par un autre peut conduire à une modification de la réactivité chimique d'une molécule. Il induit un changement de la densité électronique sur la molécule. Le paramètre  $\sigma$  de Hammett est le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet électronique d'un substituant. La valeur de  $\sigma$  a été relevée pour chaque substituant à partir des tables publiées (Hansch et Léo, 1979).

Le paramètre  $\sigma$  peut prendre des valeurs positives ou négatives suivant que les substituants sont respectivement attracteurs ou donneurs d'électrons, l'hydrogène ayant une valeur nulle.

Un grand nombre de paramètres ont également été proposés pour pallier les difficultés rencontrées avec certaines molécules (anilines ou phénols *para*-substitués), à propos du  $\sigma$  de Hammett.

### **A.2.2.Paramètres lipophiles**

Une molécule de structure de base  $A_H$  non substituée se partage entre une phase aqueuse et une phase organique de référence non miscible (octanol-1).

Le logarithme du coefficient de partage P octanol/eau pour un composé  $A_H$  traduit le caractère de lipophilie.

Dans la phase organique de référence, le coefficient de lipophilie  $\pi_X$  défini par Hansch pour une molécule  $A_X$  substituée en X est :

$$\pi_X = \log P_{A_X}/P_{A_H}$$

$\pi_X$  est directement relié à la variation d'enthalpie libre observée sur l'équilibre de répartition entre phase organique et aqueuse lorsque l'on passe de  $A_H$  à  $A_X$ . Les valeurs de  $\pi_X$  rendent bien compte des interactions hydrophobes dues au substituant X.

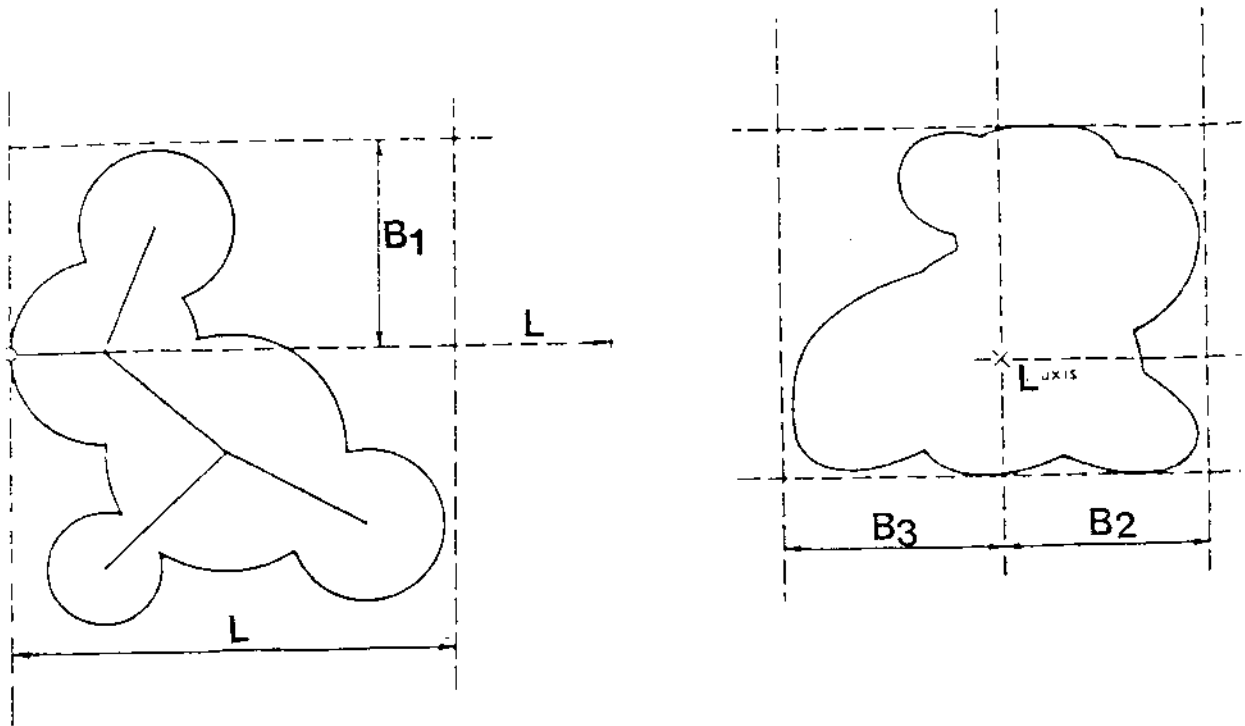
La détermination de  $\log P$  ou de  $\pi$  peut se faire par une mesure expérimentale de coefficient de partage octanol/eau, ou par une méthode indirecte basée sur le caractère additif de  $\log P$  ou de  $\pi$ .

Il existe un troisième paramètre important permettant d'estimer la lipophilie. Le comportement d'un composé en chromatographie d'adsorption ou de partage a un lien étroit avec les propriétés de solubilité ou de lipophilie de la molécule. On utilise le paramètre  $R_M$  obtenu expérimentalement par chromatographie sur couche mince. Le  $R_M$  est calculé à partir d'une mesure de  $R_F$  (Bate-Smith et Westhall, 1950) :

$$R_M = \log (1/R_F - 1)$$

La molécule considérée se partage entre une phase stationnaire apolaire (silice  $C_{18}$ , RP 18, Merck 254) et une phase mobile polaire (méthanol/ $H_2O$ ). Le  $R_M$  est une fonction linéaire du  $\log P$ .

Figure 56 : Représentation des paramètres de Verloop.



### A.2.3. Paramètres stériques

Verloop a envisagé en 1976 une approche multiparamétrique pour caractériser les interactions stériques. Pour chaque substituant, cinq variables  $L$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$  définissent cinq dimensions dans l'espace.  $L$  rend compte de la longueur de l'axe qui relie le substituant à la molécule. Les valeurs de  $B$  traduisent la largeur des substituants ( $B_1$  largeur minimale,  $B_4$  = largeur maximale, Figure 56), perpendiculairement à cet axe. Ces constantes rendent compte du logement de la molécule dans le récepteur. Le programme tient compte de la conformation la plus probable de la molécule.

Un autre paramètre est le coefficient de réfraction moléculaire  $MR$  (Hansch et Léo, 1979). Il est défini par la relation de Lorentz-Lorenz :

$$MR = (n^2 - 1)PM / (n^2 + 1)d$$

avec  $n$  indice de réfraction  
 $PM$  poids moléculaire  
 $d$  densité

Le  $MR$  traduit les forces de reconnaissance entre un substrat et son récepteur et met en jeu des forces de dispersion beaucoup plus faibles que les forces hydrophobes.

## B. RÉSULTATS

### B.1. Coefficients de corrélation partiels

L'examen des coefficients de corrélation partiels entre les principaux paramètres choisis parmi une trentaine et décrivant les aspects



**Tableau 29** : Principaux paramètres et coefficients de corrélation partiels.

Paramètres	log CPUH	log CPUDM
Electroniques		
$\sigma_3$	-0,712	-0,577
$\sigma_4$	-0,574	-0,592
$\Sigma\sigma$	-0,895	-0,777
Hydrophobes		
log P	-0,737	-0,607
$\Pi_3$	-0,703	-0,568
$\Pi_4$	-0,082	-0,079
$\Sigma\Pi$	-0,552	-0,421
$R_M$	-0,786	-0,712
Stériques		
$L_3$	-0,737	-0,618
$B_{1(3)}$	-0,705	-0,581
$B_{4(3)}$	-0,598	-0,472
$L_4$	-0,055	0,033
$B_{1(4)}$	-0,240	-0,204
$B_{4(4)}$	0,265	0,334
$MR_3$	-0,739	-0,608
$MR_4$	0,156	0,230
$\Sigma MR$	-0,455	-0,368

électroniques, lipophiles ou stériques des molécules testées, et les activités hydroxylase et N-déméthylase du chlortoluron montre que (Tableau 29) :

-les deux activités enzymatiques sont sensibles aux mêmes facteurs structuraux

-l'effet électronique des deux substituants sur le phényle est essentiel ; il s'exerce surtout par effet inductif

-l'effet lipophile est important ; le paramètre le plus corrélé est le paramètre expérimental  $R_M$  mesuré par chromatographie sur couche mince

-l'effet stérique est nettement plus marqué pour la substitution en *meta* sur le phényle ; l'exigence stérique en *para* est négligeable.

Nous allons analyser de façon plus détaillée ces résultats en considérant les paramètres pris séparément, puis par la méthode des corrélations pas à pas.

Les paramètres physicochimiques concernant les molécules utilisées sont regroupés dans le tableau 30.

## B.2.Paramètre électronique

Concernant l'hydroxylase, les valeurs des coefficients  $\sigma$  sont reportées dans le Tableau 30. On obtient avec les N-diméthylurées seules une très bonne corrélation :

$$\log \text{CPUH} = -1,726 \sum \sigma^2 + 0,086 \sum \sigma + 2,010$$

$$(-2,842; -0,609) \quad (-0,376; 0,549) \quad (1,937; 2,082)$$

$$n = 6 ; r^2 = 0,967 ; s = 0,038 ; F_{2,3} = 44,15 (1 \%)$$

La parabole passe par un maximum pour un  $\sigma$  proche de 0, c'est à dire pour un phényle non substitué. La parabole descendante devra être confirmée avec des substituants plus donneurs que l'isopropyle, par exemple un *para*-méthoxy ou un amino. Cette corrélation est beaucoup plus satisfaisante que la linéaire pour laquelle  $r^2 = 0,702$ . Elle rend compte de 97 % des variations observées pour la réponse biologique.

Les points expérimentaux concernant les autres phénylurées se placent bien sur la courbe. Il est donc possible de traiter tous les composés ensemble. Dans ce cas, la corrélation obtenue est encore meilleure (équation A) :

$$\log \text{CPUH} = -0,994 \sum \sigma^2 - 0,156 \sum \sigma + 1,972$$

$$(-1,707; -0,281) \quad (-0,521; 0,209) \quad (1,915; 2,030)$$

$$n = 12 ; r^2 = 0,906 ; s = 0,051 ; F_{2,9} = 43,36 (1 \%)$$

Les mêmes observations peuvent être faites sur le maximum de la parabole et sur les substituants plus donneurs que l'isopropyle.

Les résultats obtenus pour l'hydroxylase se retrouvent avec la N-déméthylase. Les paraboles présentent également un maximum pour  $\sigma = 0$ . Pour les N-diméthylurées, la corrélation est :

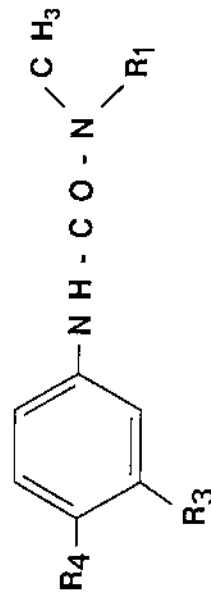
$$\log \text{CPUDM} = -2,492 \sum \sigma^2 - 0,281 \sum \sigma + 2,038$$

$$(-5,743; 0,759) \quad (-1,065; 1,628) \quad (1,826; 2,249)$$

$$n = 6 ; r^2 = 0,843 ; s = 0,112 ; F_{2,3} = 8,03 (10 \%)$$

Pour l'ensemble des phénylurées, elle est (équation B) :

**Tableau 30** : Structures et caractéristiques physicochimiques des analogues structuraux du chlortoluron.



Composés	Substituants		E $\sigma$		Paramètres lipophiles		Paramètres stériques				Activités relatives (%)				
	R4	R3	R1	$\sigma_{3+\sigma 4}$	R <sub>M</sub>	log P*	MR 3+4	L3	B1(3)	B4(3)	L4	B1(4)	B4(4)	CPUH	CPUDM
Chlortoluron	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	0,20	0,026	2,41	11,68	3,52	1,80	1,80	3,00	1,52	2,04	100,0	100,0
+															
Isoproturon	i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	CH <sub>3</sub>	-0,15	0,026	2,87	15,99	2,06	1,00	1,00	4,11	2,04	3,16	94,8	99,1
Fénuron	H	H	CH <sub>3</sub>	0,00	-0,316	0,98	2,06	2,06	1,00	1,00	2,06	1,00	1,00	92,9	85,4
Métoxuron	OCH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	0,10	-0,272	1,98	8,90	3,52	1,80	1,80	3,98	1,35	2,87	86,0	102,0
Monuron	Cl	H	CH <sub>3</sub>	0,23	-0,099	1,95	7,06	2,06	1,00	1,00	3,52	1,80	1,80	85,3	84,4
Monolinuron	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	0,23	-0,053	2,21	7,06	2,06	1,00	1,00	3,52	1,80	1,80	71,9	73,9
Buturon	Cl	H	CH(CH <sub>3</sub> )C CH	0,23	0,072 <sup>\$</sup>	2,71	7,06	2,06	1,00	1,00	3,52	1,80	1,80	69,2	68,0
Monobromuron	Br	H	OCH <sub>3</sub>	0,23	0,026	2,36	9,91	2,06	1,00	1,00	3,83	1,95	1,95	65,8	71,4
Fluométuron	H	CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0,43	-0,086	2,20	6,05	3,30	1,98	2,61	2,06	1,00	1,00	58,2	61,6
Chlorbromuron	Br	Cl	OCH <sub>3</sub>	0,60	0,215	3,28	14,91	3,52	1,80	1,80	3,83	1,95	1,95	47,9	60,8
Linuron	Cl	Cl	OCH <sub>3</sub>	0,60	0,193	3,12	12,06	3,52	1,80	1,80	3,52	1,80	1,80	41,3	41,3
Néburon	Cl	Cl	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,60	0,432	3,97	12,06	3,52	1,80	1,80	3,52	1,80	1,80	39,7	35,4
Diuron	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	0,60	0,106	2,82	12,06	3,52	1,80	1,80	3,52	1,80	1,80	36,6	26,7

\*valeurs moyennes calculées à partir de Kakkis *et al.*, 1984 ; Mitsukake *et al.*, 1986 ; Shigematsu *et al.*, 1989, sauf pour le buturon et le néburon.

log P buturon = log P monuron -  $\Pi(\text{CH}_3)$  +  $\Pi(\text{CH})$  +  $\Pi(\text{CH}_3)$  +  $\Pi(\text{branchements})$  +  $\Pi(\text{C}=\text{CH})$  = 2,01 - 0,50 + 0,50 - 0,20 + 0,40 = 2,71.

log P néburon estimé à partir des R<sub>M</sub> expérimentaux de L. Arnaud et des log P de la littérature par l'équation : log P = 2,457 + 3,507R<sub>M</sub> = 3,97 (n=11 ; r=0,931 ; s=0,244)

<sup>\$</sup> calculé à partir de l'équation précédente.

$$\log \text{CPU DM} = -1,245 \Sigma \sigma^2 - 0,069 \Sigma \sigma + 1,983$$

$$(-2,738; 0,247) \quad (-0,833; 0,696) \quad (1,862; 2,103)$$

$$n = 12 ; r^2 = 0,716 ; s = 0,106 ; F_{2,9} = 11,37 \text{ (5 \%.)}$$

### B.3. Paramètre lipophile

Pour les deux activités, le paramètre le plus significatif est le paramètre expérimental  $R_M$ , mesuré par chromatographie sur couche mince. Les valeurs des  $R_M$  sont données dans le Tableau 30. On n'observe pas de différence significative entre les phénylurées diméthylées et les autres. Les 12 composés seront traités ensemble.

$$\log \text{CPU H} = 1,800 - 0,564 R_M$$

$$(1,731; 1,870) \quad (-0,899; -0,229)$$

$$n = 11 ; r^2 = 0,617 ; s = 0,102 ; F_{1,9} = 14,55 \text{ (5 \%.)}$$

$$\log \text{CPU DM} = 1,806 - 0,618 R_M$$

$$(1,710; 1,902) \quad (-1,078; -0,158)$$

$$n = 11 ; r^2 = 0,507 ; s = 0,140 ; F_{1,9} = 9,26 \text{ (2,5 \%.)}$$

Il peut être intéressant de savoir si une position de substituant sur le phényle agit préférentiellement par sa lipophilie sur la réponse biologique. Pour cela, nous avons retenu le paramètre  $\Pi$  :

$$\log \text{CPUH} = 1,896 - 0,271 \pi\text{-3} \quad n = 12; r^2 = 0,494 ; s = 0,111$$

$$\log \text{CPUH} = 1,813 - 0,028 \pi\text{-4} \quad n = 12 ; r^2 = 0,006 ; s = 0,156$$

$$\log \text{CPUDM} = 1,896 - 0,264 \pi\text{-3} \quad n = 12 ; r^2 = 0,322 ; s = 0,156$$

$$\log \text{CPUDM} = 1,819 - 0,032 \pi\text{-4} \quad n = 12 ; r^2 = 0,079 ; s = 0,189$$

Dans les deux cas, la position privilégiée est la position *méta*.

#### **B.4.Paramètre stérique**

Le paramètre le plus corrélé est le paramètre de réfraction moléculaire. Les valeurs des MR sont contenues dans le Tableau 30. Ce paramètre prend en compte l'encombrement de la molécule mais aussi une part d'effet électronique de polarisation. Cette composante de polarisation peut expliquer la meilleure corrélation obtenue avec ce paramètre. De tous les paramètres stériques testés et pour les deux enzymes, la position *meta* est prédominante dans l'expression de la réponse biologique (Tableau 29).

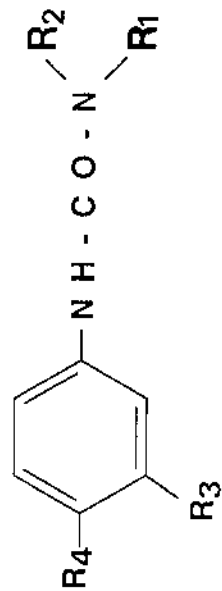
#### **B.5.Recherche de meilleures corrélations avec le programme pas à pas**

La recherche de la meilleure corrélation s'effectue en plusieurs étapes :

- recherche du paramètre le plus corrélé
- recherche parmi les autres paramètres de celui qui conduit à une meilleure corrélation avec le premier
- recherche d'un troisième paramètre, qui, joint aux deux premiers, serait susceptible d'améliorer encore la corrélation

Les F partiels sont calculés pour chaque paramètre et détermine s'ils doivent être retenus.

**Tableau 31** : Structure, caractéristiques physicochimiques et effets des métabolites du chlortoluron sur les activités chlortoluron hydroxylase et diméthylase.



Composés	Substituants			$\Sigma\sigma$	Activités relatives (%)		log observé		log calculé *		observé-calculé		
	R4	R3	R1		R2	$\sigma_{3+\sigma 4}$	CPUH	CPUDM	CPUH	CPUDM	CPUH	CPUDM	
Chlortoluron hydroxylé	CH <sub>2</sub> OH	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0,37	79,3	74,0	1,899	1,868	1,778	1,787	0,121	0,081
Chlortoluron didéméthylé	CH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	H	0,20	63,4	83,4	1,802	1,921	1,883	1,901	-0,082	0,020
Chlortoluron monodéméthylé	CH <sub>3</sub>	Cl	H	H	0,20	45,6	58,5	1,658	1,761	1,883	1,901	-0,226	-0,134

\* calculé à partir des équations A et B pour la CPUH et la CPUDM, respectivement.

Le paramètre le plus corrélé dans le cas de l'hydroxylase est  $\Sigma\sigma$ . Le second paramètre qui conduit à une meilleure corrélation est le  $R_M$ . Il n'y a pas de troisième paramètre à considérer.

$$\log \text{CPUH} = 1,933 - 0,453 \Sigma\sigma - 0,280 R_M$$

$$(-0,661; -0,246) \quad (-0,497; -0,064)$$

$$n = 11 ; r^2 = 0,899 ; s = 0,055 ; F_{2,8} = 35,49 (1 \%)$$

La même procédure utilisée fait ressortir uniquement le paramètre  $\Sigma\sigma$  concernant la N-déméthylase.

### **B.6.Cas des métabolites**

A la suite de cette étude, nous avons administré aux microsomes le chlortoluron et trois de ses métabolites présents dans les plantes, le dérivé hydroxylé et les dérivés N-mono et N-didéméthylés. Leurs propriétés sont résumées dans le Tableau 31. Les métabolites sont aussi inhibiteurs de la CPUH et de la CPUDM, ils rentrent bien dans les paraboles décrites par les équations de degré 2 concernant  $\Sigma\sigma$ .

### **C.CONCLUSION**

Il est possible de dégager des corrélations entre la structure chimique des analogues structuraux du chlortoluron et leurs capacités à inhiber le métabolisme de l'herbicide lors des incubations.



L'effet électronique des deux substituants sur le phényle est le paramètre le plus corrélé. Le fait d'obtenir une bonne corrélation de l'activité biologique avec le paramètre électronique de degré 2 traduit un phénomène complexe. Il pourrait signifier des effets de chélation entre le chlortoluron et son analogue (Cammarata *et al.*, 1970), ou une compétition entre deux sites réactionnels. Nous avons déjà l'hypothèse de la participation de plusieurs isoformes de cytochrome P-450 (cinétiques non Michaéliennes). En outre, deux molécules pourraient être métabolisées en même temps par une enzyme, comme par exemple le chlortoluron et un analogue structural. Pour chaque réaction, le facteur électronique global  $\Sigma\sigma$  des substituants du phényle est primordial. Concernant l'hydroxylase, cet effet est évident puisque le site réactionnel est sur le noyau lui-même. Pour la N-déméthylase, le site réactionnel est séparé du phényle par des atomes qui peuvent transmettre cet effet électronique par des électrons  $\Pi$  et des doublets libres.

Les cytochromes P-450 sont spécialisés dans l'oxydation de substrats lipophiles. Le paramètre global de lipophilie peut, comme le paramètre  $\sigma$ , intervenir sur la fixation de la molécule au niveau du(des) site(s) actif(s). Pour les deux enzymes, le rôle de la lipophilie s'exerce de la même manière, car les coefficients du paramètre  $R_M$  sont très proches dans les deux corrélations. Le paramètre global de lipophilie est plus important que le paramètre partiel  $\Pi$ . Cependant, les corrélations obtenues avec  $\Pi$ -3 et avec  $\Pi$ -4 montrent que pour les deux activités la substitution en *meta* agit préférentiellement par sa lipophilie sur la réponse biologique. Les liaisons hydrophobes mises en jeu lors de la fixation sur le site récepteur proviennent de la molécule entière. La partie lipophile de la molécule ne contribue qu'en partie, et surtout par la position *meta* sur le phényle, à cette fixation.

Les paramètres stériques ont peu d'importance, la position privilégiée est la position en *meta*.

Concernant l'activité hydroxylase, la méthode des corrélations pas à pas confirme ces données. Les signes des coefficients des paramètres  $\Sigma\sigma$  et  $R_M$  sont négatifs, les paramètres agissent dans le même sens. Les valeurs absolues des coefficients de ces paramètres indiquent que l'effet électronique est plus important que l'effet lipophile dans l'explication de la réponse biologique.

En d'autres termes, de bons inhibiteurs du métabolisme du chlortoluron, vraisemblablement compétiteurs, devront avoir sur le noyau phényle des substituants très attracteurs d'électrons. De tels substituants ( $I^+$ ) vont entraîner un déplacement de charges négatives vers le cycle et l'apparition d'une charge positive sur l'azote tertiaire. Une forte lipophilie des molécules renforce le caractère inhibiteur. La nature des substituants sur l'azote tertiaire ne semble pas intervenir de façon importante sur l'efficacité des analogues étudiés à inhiber le métabolisme du chlortoluron.

Le fait d'avoir des équations prenant en compte les mêmes paramètres pour les activités CPUH et CPUDM est compatible avec l'hypothèse de systèmes enzymatiques agissant selon les mêmes mécanismes. De plus, le déplacement des charges, suggéré au paragraphe précédent, entraîne une orientation préférentielle de la molécule dans le site actif, en accord avec deux systèmes enzymatiques distincts. Dans le cas où les effecteurs seraient des inhibiteurs compétitifs métabolisés, il est probable que l'excès de charges négatives sur le cycle augmente l'affinité de la molécule pour la poche catalytique, et favorise la formation du complexe enzyme-effecteur, en diminuant la valeur du  $K_m$  de l'effecteur par rapport à celle du chlortoluron. L'effecteur pourrait

être faiblement métabolisé. Ainsi, dans notre cas, le diuron, meilleur inhibiteur du métabolisme du chlortoluron chez le blé, et inhibiteur compétitif de la chlortoluron N-déméthylase chez le topinambour (Fonné, 1985), n'est que très faiblement N-déalkylé par les microsomes de blé.

Il serait intéressant de reprendre ces études avec d'autres phénylurées, notamment des substituants très donneurs d'électrons (méthoxy, amino,...), dont les effets biologiques seraient exprimés sous forme de I<sub>50</sub>. Enfin, le mode d'inhibition des analogues testés (compétiteurs, ou non) reste à élucider.

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET DISCUSSION

Jusqu'à ces dernières années, il n'existait qu'un nombre réduit de travaux impliquant des monooxygénases à cytochrome P-450 dans le métabolisme des herbicides. Ils concernaient notamment le métabolisme du monuron chez le coton (Frear *et al.*, 1969), du 2,4-D chez le pois (Makeev *et al.*, 1977) et du chlortoluron chez le topinambour (Fonné, 1985). Récemment, plusieurs équipes ont démontré l'implication de monooxygénases à cytochrome P-450 dans le métabolisme du diclofop chez le blé (Mc Fadden *et al.*, 1989 ; Zimmerlin et Durst, 1990 a et b), du bentazon (McFadden *et al.*, 1990), du primisulfuron (Fonné-Pfister *et al.*, 1990 a) et enfin du chlortoluron (Fonné-Pfister *et al.*, 1990 b) chez le maïs. Le métabolisme du métolachlor (Moreland *et al.*, 1989 a) ainsi que celui du chlorsulfuron (Frear et Mardaus, 1990) seraient également sous la dépendance de monooxygénases à cytochrome P-450. Ces résultats sont encore très fragmentaires et soulignent les difficultés rencontrées lors de l'étude des réactions de détoxification des xénobiotiques catalysées par des monooxygénases à cytochrome P-450 végétales, en comparaison de la multitude de travaux effectués sur leurs homologues animaux.

L'étude des enzymes responsables du métabolisme oxydatif du chlortoluron chez le blé, sujet de cette thèse, a été réalisée sur suspensions cellulaires traitées par des agents connus comme stimulateurs du métabolisme de l'herbicide *in vivo* (Canivenc, 1989). Les résultats obtenus suggèrent que dans ce matériel végétal, et dans nos conditions expérimentales, l'hydroxylation du méthyle du cycle aromatique et la première N-déméthylation de l'herbicide, seraient catalysées par des monooxygénases à

cytochrome P-450. Des enzymes distinctes seraient impliquées dans chacune des deux réactions.

Les cultures cellulaires sont depuis de nombreuses années utilisées pour les études métaboliques (Mumma et Davidonis, 1983). En particulier, les suspensions cellulaires de blé confirment leurs capacités à métaboliser les xénobiotiques (2,4-D : Schell et Sandermann, 1981 ; pentachlorophénol : Schell *et al.*, 1984 ; chlortoluron : Owen et Donzel, 1986 et Canivenc *et al.*, 1989 ; triazines : Edwards et Owen, 1989).

L'ensemble des résultats présentés dans les chapitres précédents, comme ceux de la littérature concernant le métabolisme des herbicides *in vitro*, soulèvent un certain nombre de points qui seront développés dans cette discussion.

A. Le matériel expérimental choisi, à savoir des suspensions cellulaires, est-il représentatif des mécanismes présents dans les plantes?

B. L'étude des enzymes responsables du métabolisme du chlortoluron a été réalisée sur suspensions cellulaires traitées par des composés stimulateurs du métabolisme de l'herbicide *in vivo*, sommes nous en présence d'inductions?

C. Les niveaux des activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase mesurées dans les microsomes de blé sont faibles, quelle en est la signification?

D. Des enzymes autres que des monooxygénases à cytochrome P-450 sont-elles susceptibles de métaboliser le chlortoluron *in vivo*?

E. Quelles sont les fonctions physiologiques des monooxygénases à cytochrome P-450 qui métabolisent le chlortoluron?

## A.LA REPRÉSENTATIVITÉ DU MODELE EXPÉRIMENTAL

Le travail réalisé *in vitro* est le prolongement des études menées *in vivo* par M.C. Canivenc sur suspensions cellulaires. Les facilités de traitement liées à leur usage ont contribué à l'obtention de nos résultats. En outre, ce matériel avait été choisi en raison d'autres avantages qu'il procurait sur le plan technique :

-Les suspensions cellulaires permettent l'obtention de grandes quantités de matériel végétal

-Les cellules étant non chlorophylliennes, elles contiennent peu de pigments, ce qui facilite le dosage spectrophotométrique des cytochromes

-Les suspensions cellulaires présentent une grande homogénéité intrinsèque qui permet une bonne reproductibilité expérimentale.

En général, il est admis que les mécanismes qui existent chez les plantes d'une espèce sont conservés dans les cultures cellulaires de la même espèce, et le plus souvent, les schémas métaboliques sont identiques. C'est vrai pour le chlortoluron dans des cultures cellulaires et des feuilles de coton (Owen et Donzel, 1986) et de blé (Canivenc, 1989). En général l'importance relative des métabolites différencie les plantes des cultures cellulaires (Mumma et Davidonis, 1983). C'est encore le cas du chlortoluron majoritairement hydroxylé par les plantes de blé et qui est surtout N-déalkylé dans les suspensions cellulaires (Canivenc, 1989). Les rapports des différents métabolites du bentazon sont également différents entre les plantes et les suspensions cellulaires de soja (Sterling et Balke, 1988). Les plantes et les cultures cellulaires sont souvent sensibles aux mêmes agents. Toujours concernant le chlortoluron, les réactions métaboliques chez le blé présentent des sensibilités identiques à des inhibiteurs comme l'ABT dans les deux matériels (Gaillardon *et al.*, 1985 ; Canivenc, 1989).

Les facteurs généraux qui conditionnent les variations d'activités métaboliques entre les plantes et les cultures cellulaires concernent la structure des cultures cellulaires, leurs protocoles d'initialisation et d'entretien. Ces facteurs sont responsables dans les cultures de la stimulation ou de l'inhibition d'activités enzymatiques qui s'expriment normalement dans les plantes.

-Tous les composés sont administrés aux cultures cellulaires dans le milieu de culture. Ils ne pénètrent pas de la même façon dans les cellules. C'est le cas du chlortoluron dans des cultures de blé et de riz (Owen et Donzel, 1986).

-Les métabolites intermédiaires polaires sont le plus souvent excrétés dans le milieu de culture. De ce fait les taux de conjugaison sont souvent inférieurs dans les cultures cellulaires à ceux observés dans les plantes. Ainsi, le propiconazole est abondamment conjugué à des acides aminés dans les plantes de blé, alors que les métabolites libres s'accumulent dans le milieu de culture des cellules (Owen et Donzel, 1986) et ne sont pas substrats des enzymes de conjugaison. Dans les cultures cellulaires, il n'existe pas les mécanismes de compartimentalisation ni les influences de microorganismes ou abiotiques (hydrolyse, photolyse)(Owen et Donzel, 1986) présents dans les plantes. Les métabolites relargués dans le milieu de culture peuvent aussi servir de substrats à d'autres systèmes enzymatiques et modifier les contributions relatives de chaque activité enzymatique.

-La mise en culture des cellules peut engendrer dans celles-ci des variations génétiques par rapport aux plantes. Certaines cultures cellulaires perdent la capacité à métaboliser un composé, qu'il soit substrat endogène ou xénobiotique. La plupart des cultures cellulaires sont hétérotrophes, ce qui implique que leur métabolisme primaire est différent de celui des plantes. Des plantes régénérées à partir de cultures cellulaires sont connues pour

présenter une grande variabilité par rapport aux plantes originelles. De telles variations contrôlées par des gènes nucléaires seraient dues à des mutations récessives (Brown *et al.*, 1986). A l'inverse, les activités de la laurate  $\omega$ -hydroxylase sont beaucoup plus importantes dans des cultures cellulaires de soja que dans des plantules, c'est aussi le cas pour d'autres activités du métabolisme secondaire comme la CA4H. Dans les cultures cellulaires de topinambour, aucune activité CA4H ne s'exprime (J.P. Salaün, communication personnelle), peut être parce que ces cellules non différenciées n'ont pas besoin de synthétiser de lignine. Il est possible qu'un signal régulateur répresseur agisse directement au niveau de la synthèse d'ARN. Certaines enzymes de la détoxification des xénobiotiques peuvent ne pas s'exprimer dans des cultures de cellules indifférenciées. C'est notamment le cas des enzymes de phase II : ainsi, les cultures cellulaires de maïs ont perdu la capacité des plantes à conjuguer l'atrazine avec le glutathion (Edwards et Owen, 1986, 1988).

-Quelquefois, les potentialités métaboliques des cultures cellulaires évoluent avec le temps. Ceci concerne tout d'abord l'âge des cultures. Ce facteur entraîne des modifications qualitatives du métabolisme du chlortoluron dans des cultures de laitue cultivées depuis plusieurs années (Cole et Owen, 1988). De plus les capacités métaboliques évoluent durant le cycle de croissance des cultures cellulaires. En d'autres termes, l'intervalle de temps qui sépare la mesure des activités enzymatiques du repiquage des cultures module certaines activités. C'est ainsi le cas de la CA4H et des enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes chez le soja (Ebel *et al.*, 1974). C'est également le cas du chlortoluron dans les cultures de blé (Canivenc, 1989) et d'atrazine chez le maïs (Owen et Donzel, 1986). Dans ces deux cultures cellulaires, le métabolisme de l'herbicide décroît au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la date de repiquage.



-Le milieu de culture conditionne aussi les capacités métaboliques des cultures cellulaires. En particulier, les hormones ont une grande influence, de par leur nature et leur concentration. Par exemple, ces facteurs de croissance conditionnent l'activité d'enzymes nucléolytiques chez le blé, en augmentant ou en diminuant leurs niveaux (Udvardy *et al.*, 1976). Dans des cultures de maïs, le métabolisme du chlortoluron est accéléré lorsque le milieu de culture comporte de fortes doses de 2,4-D (Cole et Owen, 1987 a et b). C'était aussi le cas pour le chlortoluron chez le blé *in vivo* (Canivenc *et al.*, 1989) et *in vitro* (cf Chapitres 4 et 5).

En conclusion, il apparaît que les études sur cultures cellulaires de blé reflètent les mécanismes métaboliques présents dans les plantes *in vivo* (Canivenc, 1989). Certaines limites existent, qui se situent au niveau de la régulation des activités enzymatiques. Avant d'effectuer des études sur fractions membranaires, il apparaît nécessaire d'effectuer des études préliminaires *in vivo* qui ont pour but de déterminer les conditions les plus favorables à l'expression des activités recherchées. Dans notre cas, les conditions ont été définies par M.C. Canivenc (1989), et comprenaient en particulier l'utilisation d'agents capables de stimuler le métabolisme de l'herbicide.

## **B.LA STIMULATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES**

Pour l'étude des enzymes responsables du métabolisme du chlortoluron, les cellules sont traitées avec des composés stimulateurs du métabolisme de l'herbicide *in vivo*, comme le cyométriniol, le 2,4-D et le procloraz, dont les effets sont retrouvés *in vitro*. Ces agents stimulent non seulement les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase, mais ils augmentent

aussi les niveaux d'activités d'enzymes du métabolisme endogène des cellules végétales, la CA4H et la LAH, comme les teneurs en cytochromes P-450.

Il est vraisemblable que ces composés agissent en tant qu'inducteurs de monooxygénases à cytochrome P-450. L'induction est un mécanisme particulier qui s'effectue selon une chaîne d'événements (fixation de l'effecteur sur un récepteur membranaire, translocation dans le noyau, activation du génôme (cf Chapitre 1), qui se traduit par une synthèse de protéines. L'induction diffère ainsi d'un simple mécanisme de stimulation des activités enzymatiques, ou d'autres mécanismes de régulation (diminution du turn-over des protéines). Les effets d'inhibiteurs de la synthèse des protéines (cycloheximide) administrés en même temps que les effecteurs n'ont pas été évalués dans notre modèle. L'augmentation des teneurs en cytochrome P-450 dans les microsomes suggère cependant une synthèse de protéines à la suite du traitement des cellules.

Les cultures cellulaires de blé Koga se présentent essentiellement sous la forme d'agrégats. La sensibilité de ces cultures à différents effecteurs (phénobarbital, prochloraz) est bien moindre que dans le cas de cellules isolées comme celles de soja, chez qui des inhibitions de croissance sont très vite observées pour des doses inactives sur le blé. La structure des cultures cellulaires de blé pourrait peut être expliquer en partie l'absence d'effets d'inducteurs reconnus des monooxygénases à cytochrome P-450 des plantes, comme le phénobarbital et l'aminopyrine, qui pénétreraient peu ou pas dans les cellules.

Nous n'avons pas testé les effets d'associations d'inducteurs. Il est rapporté que l'aryl hydroxylase du diclofop chez le blé est stimulée de façon

additive par l'anhydride naphthalique utilisé en enrobage des graines, et le phénobarbital administré aux plantules (Zimmerlin et Durst, 1990 b).

Chez les animaux certaines familles de cytochromes P-450 sont induites spécifiquement par une classe d'inducteurs. C'est le cas des cytochromes P-450 sensibles aux barbituriques, aux composés polycycliques aromatiques, aux alcools et aux composés inducteurs de la prolifération de peroxisomes (clofibrate). On ne sait pas si une telle spécificité existe chez les végétaux. Dans les suspensions cellulaires de blé, le 2,4-D et les antidotes d'herbicides du type éther d'oxime produisent des effets similaires sur les activités enzymatiques.

Les résultats obtenus avec ces dernières molécules confirment les potentialités des antidotes d'herbicides à stimuler l'activité de monooxygénases à cytochrome P-450, et par voie de conséquence le métabolisme oxydatif des herbicides, comme cela est connu depuis quelques années pour le chloresulfuron (Sweetser, 1985). Le mode d'action des antidotes n'est pas encore clairement établi aujourd'hui. Il se situerait principalement au niveau du système GSH/GS-transférase (cf Chapitre 5). Cependant, les antidotes et les synergistes stimulent ou inhibent des monooxygénases. Il convient de noter que les travaux récents démontrant l'implication des monooxygénases à cytochrome P-450 dans le métabolisme des herbicides chez les végétaux *in vitro* ont tous été réalisés après des traitements des plantes ou des cultures cellulaires par des antidotes. Il est clair désormais que les firmes phytosanitaires synthétisent des antidotes modulant le métabolisme oxydatif d'herbicides destinés à être utilisés spécifiquement sur céréales (Adam *et al.*, 1990) alors que ces molécules étaient initialement destinées à un usage sur maïs et sorgho.

Selon les conditions expérimentales, un même composé peut produire plusieurs types d'effets sur les activités enzymatiques. Un tel comportement est observé pour de nombreux agents qualifiés de biphasiques (Rivière, 1984 ; Canivenc, 1989), par exemple le cyométril ou le procloraz. Les résultats obtenus concernant les interactions observées entre le métabolisme du chlortoluron et le procloraz fournissent la preuve à l'échelle de la fraction cellulaire que des composés, sous certaines conditions de traitement exercent un effet indirect sur des enzymes autres que leurs cibles cellulaires, et qu'ils accélèrent ou inhibent le métabolisme des herbicides.

-De tels mécanismes d'action expliquent dans une certaine mesure les dégâts observés au champ sur des cultures à la suite de l'application de pesticides en association, ou de l'application répétée du même pesticide, ou encore dans des conditions particulières d'utilisation. Directement appliqué sur les microsomes, le procloraz est un inhibiteur des activités enzymatiques. Sur suspensions cellulaires *in vivo*, le délai séparant les applications de procloraz et de chlortoluron conditionne le type d'effets, stimulation ou inhibition du métabolisme, aussi noté *in vitro*. Sur plantes entières, le fongicide exerce un effet synergique sur la phytotoxicité de l'herbicide (Canivenc, 1989).

-Il est également probable que des mécanismes similaires se produisent sur les graminées adventices, en augmentant leur tolérance vis-à-vis d'herbicides auxquels elles étaient auparavant sensibles. Dans ce cas, le contrôle efficace de leur développement ne peut être effectué sans nuire à la culture.

La présence d'un facteur limitant dans les cellules ou des mécanismes de régulation enzymatiques différents, comme déjà suggéré au début de ce chapitre, constituent une autre hypothèse pour expliquer le manque d'effets du phénobarbital et de l'aminopyrine. Des phénomènes similaires sont connus

concernant les cytochromes P-450 d'hépatocytes de rat, tissulaires ou mis en culture, qui perdent leur capacité à être induits par le phénobarbital (Nebert et Gonzalez, 1987). Quoi qu'il en soit, les facteurs de stimulation des activités enzymatiques sans les suspensions cellulaires de blé sont toujours faibles, comparés à ceux décrits dans des plantes (Salaün *et al.*, 1986).

### C.LES FAIBLES NIVEAUX DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

Même lorsque les cellules sont traitées par des composés stimulateurs, les activités enzymatiques responsables du métabolisme du chlortoluron présentent des niveaux faibles. Chez les végétaux, ceci semble une règle générale pour tous les herbicides métabolisés *in vitro*, comme signalé dans les publications récentes. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Dans le cas du chlortoluron chez le blé, les faibles activités enzymatiques sont le reflet d'un métabolisme assez lent de l'herbicide aussi bien dans les plantules que dans les suspensions cellulaires *in vivo* (demi-vie 20-30 heures)(Cabanne *et al.*, 1985 ; Canivenc, 1989). En effet, la tolérance du blé résulte plus d'une transformation majoritaire de l'herbicide en métabolite hydroxylé non phytotoxique (Gross *et al.*, 1979), que d'une vitesse de métabolisme élevée, responsable de la tolérance de la Véronique au chlortoluron (Gonneau *et al.*, 1988).

Les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase ont été testées dans des microsomes de foie de rat, de canard et de poisson qui nous ont été fournis par M.C. Canivenc et J.L. Rivière. Dans tous ces matériels, les deux activités décrites dans les microsomes de plantes ont été retrouvées avec des niveaux d'activité 25 fois supérieurs à ceux mesurés dans des microsomes de blé extraits de cellules traitées par le 2,4-D. Ces résultats confirment que les

conditions d'incubation utilisées lors des mesures sont favorables à l'expression des monooxygénases à cytochrome P-450 impliquées dans la détoxification de l'herbicide.

Une autre hypothèse serait la présence dans les cellules végétales d'un inhibiteur endogène libéré lors du broyage des tissus, qui reconnaîtrait le site actif et se complexerait avec les cytochromes P-450 lors de la préparation des microsomes. Plusieurs arguments sont en faveur de l'existence d'inhibiteurs endogènes.

-Des composés naturels des plantes sont connus pour inhiber des monooxygénases à cytochrome P-450. C'est le cas de certains métabolites secondaires (lignanes, phytoalexines) qui possèdent la fonction réactive méthylène dioxobenzène du pipéronyl butoxide, et dont certains sont utilisés à ce titre comme inhibiteurs de monooxygénases à cytochrome P-450 d'insectes (Bernard *et al.*, 1989). Les plantes renferment également de nombreuses molécules azotées pouvant agir selon un mécanisme identique.

-Des microsomes de blé et de maïs passés sur tamis Sephadex G-25 voient leurs activités de type cytochrome P-450 augmentées (McFadden *et al.*, 1989, 1990) par rapport à celles notées sur des microsomes préparés classiquement. Ces résultats penchent pour une inhibition par une(des) molécule(s) de petite taille, pouvant être des polyphénols (Werck-Reichhart, 1985).

-D'autre part, une macromolécule naturelle de nature inconnue inhibe les pyrroloxygénases du germe de blé (Frydman *et al.*, 1972).

La capacité de composés végétaux endogènes susceptibles d'interférer avec des monooxygénases a été testée au laboratoire par N. Polge. Il a mesuré les activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase dans des microsomes de rat, en présence de fractions mitochondriales, microsomales et solubles

isolées de cultures cellulaires de blé. Cependant, aucune inhibition significative n'a pu être décelée dans ces conditions.

Une autre hypothèse pourrait être une inhibition des activités enzymatiques par les métabolites qui en sont issus, comme cela est décrit pour le *para*-coumarate sur la CA4H du pois (Russel, 1971). A forte concentration dans les milieux d'incubation, les trois principaux métabolites du chlortoluron dans les plantes sont inhibiteurs du métabolisme de l'herbicide. Leur faible abondance dans les milieux d'incubation est incompatible avec un tel mécanisme de régulation.

Les faibles activités enzymatiques sont peut-être à relier à une mauvaise affinité des substrats pour les enzymes. Dans nos expériences, une compétition entre le xénobiotique administré et un substrat endogène à forte affinité pour l'enzyme constituerait une hypothèse quant à l'explication des faibles activités enzymatiques, hypothèse qui implique que les monooxygénases impliquées dans les réactions de détoxification aient des fonctions physiologiques. Enfin, les monooxygénases à cytochrome P-450 ne constitueraient qu'une fraction des enzymes cellulaires capables d'oxyder le chlortoluron.

#### **D.PARTICIPATION D'AUTRES OXYGENASES DANS LE METABOLISME DU CHLORTOLURON**

Dans des microsomes isolés de suspensions cellulaires traitées par des agents stimulateurs, l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron semblent catalysées par des monooxygénases à cytochrome P-450.

-L'inhibition totale des activités chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase par des anticorps anti-réductase suggère la participation

obligatoire de cette enzyme comme agent de transfert d'électrons dans le métabolisme de herbicide.

-Dans les suspensions cellulaires, les modulations du métabolisme oxydatif du chlortoluron causées par les effecteurs de monooxygénases à cytochrome P-450 que sont les fongicides et les régulateurs de croissance *in vivo* (Canivenc, 1989) et comme les différentes inhibitions *in vitro* (cf Chapitre 4) montrent que ce type d'enzymes est vraisemblablement seul impliqué dans les réactions microsomales d'hydroxylation et de N-déméthylation. De plus, la sensibilité des réactions à deux inhibiteurs (paclobutrazol et ABT) *in vivo* est comparable à celle observée dans ces fractions *in vitro*, pour les mêmes doses.

Ces conclusions n'excluent pas cependant que d'autres types enzymatiques puissent participer *in vivo* au métabolisme du chlortoluron. Ainsi, les très faibles activités relevées dans les microsomes de cultures cellulaires pourraient traduire le fait que d'autres enzymes soient localisées dans des fractions cellulaires différentes. Cette hypothèse paraît peu probable.

-*In vivo*, les temps de demi-vie du chlortoluron dans les plantes et les suspensions cellulaires sont relativement longs.

-Aucune activité d'oxydation du chlortoluron n'a pu être observée dans d'autres fractions membranaires ou solubles de cellules de blé, même si les protocoles étaient surtout favorables à l'expression des monooxygénases à cytochrome P-450.

Dans nos conditions expérimentales, seules des activités de type cytochrome P-450 sont capables de catalyser l'hydroxylation et la N-déméthylation du chlortoluron. Comme ces activités apparaissent constitutives (mesurables dans des microsomes isolés de suspensions



cellulaires non traitées), il est probable qu'elles fassent intervenir des monooxygénases ayant un rôle physiologique précis.

## **E.LE ROLE PHYSIOLOGIQUE DES ENZYMES RESPONSABLES DU MÉTABOLISME DU CHLORTOLURON**

L'ensemble des résultats obtenus sur l'intervention de monooxygénases à cytochrome P-450 dans le métabolisme des herbicides pose un certain nombre de questions concernant l'identité et la spécificité de substrat des monooxygénases à cytochrome P-450 végétales. A l'heure actuelle, il est difficile de préciser si les cytochromes P-450 impliqués dans le métabolisme du chlortoluron chez le blé, et plus généralement les monooxygénases de la détoxification des xénobiotiques chez les plantes, sont des enzymes spécialisées dans cette fonction à l'instar de leurs homologues hépatiques de mammifères, ou si des monooxygénases impliquées dans des réactions du métabolisme endogène cellulaire pourraient également remplir cette fonction supplémentaire.

Les monooxygénases à cytochrome P-450 sont des enzymes qui présentent des spécificités de substrat variables. Chez les mammifères, il est admis que les cytochromes P-450 hépatiques de détoxification sont le plus souvent peu spécifiques, tandis que les cytochromes P-450 des tissus stéroïdogènes sont très spécifiques. Les cytochromes P-450 végétaux ont longtemps été considérés comme étant très spécifiques. Cette propriété était basée sur le fait que des analogues structuraux de cinnamate et de la laurate n'étaient pas compétiteurs de la CA4H et de la LAH (Benveniste, 1978 ; Salaün *et al.*, 1981 ; Benveniste *et al.*, 1982).

-Les expériences menées avec des inhibiteurs de structures quelquefois éloignées de celle des substrats ne fournissent guère d'éléments de

compréhension sur la spécificité des sites actifs. Ainsi, la CA4H est inhibée de façon compétitive par la quercétine, la vanilline, la naringénine et l'ioxynil, un herbicide (Benveniste, 1978 ; Werck-Reichhart, 1985). La capacité d'un inhibiteur à reconnaître un site actif n'est donc pas toujours liée à des structures chimiques très proches de celles des substrats. A l'inverse d'autres études ont aussi démontré qu'il existe dans les plantes des cytochromes P-450 très spécifiques, voire même stéréospécifiques (par exemples la 6a hydroxylase des ptérocarpanes, Banks et Dewick, 1983 ; Hagmann *et al.*, 1984).

-Dans le cas des analogues structuraux du chlortoluron chez le blé, des niveaux d'inhibition variés du métabolisme de l'herbicide sont observés. L'absence d'inhibition par l'isoproturon est contradictoire avec le fait qu'il soit métabolisé dans le blé. A l'inverse, le diuron est un bon inhibiteur du métabolisme du chlortoluron ; il est toutefois peu métabolisé par des microsomes actifs sur le chlortoluron. Le diuron est également un inhibiteur compétitif du chlortoluron dans les microsomes de tubercules de topinambour (Fonné, 1985).

-L'absence d'interactions avec plusieurs herbicides potentiellement métabolisés par le blé et appartenant à des familles différentes (certaines phénylurées et sulfonurées, acides phénoxypropioniques) avec le métabolisme du chlortoluron suggèrent un système de détoxification relativement spécifique pour chaque substrat. Il est ainsi probable que des isoenzymes différentes métabolisent chlortoluron et isoproturon. A l'appui de ces résultats, des analyses génétiques récentes montrent qu'il n'existe pas de résistance croisée entre chlortoluron et isoproturon chez le blé (Dr. J.W. Snape, communication personnelle).

A. Zimmerlin a montré que le diclofop pouvait être hydroxylé par la laurate  $\omega$ -1 hydroxylase du blé (Zimmerlin et Durst, 1990 b). Cette enzyme semble présenter une spécificité de substrat relativement large, car une

préparation de LAH de foie de rat (P450<sub>ω-1</sub>) est capable de catalyser la N-déméthylation de la benzphétamine (Uno *et al.*, 1990), un xénobiotique présentant certaines analogies de structure avec le chlortoluron. Ces données nous ont conduit à rechercher un effet éventuel du chlortoluron sur la LAH.

-Dans les suspensions cellulaires de blé, il existe une bonne corrélation entre les activités LAH et chlortoluron hydroxylase et N-déméthylase, mesurées après les traitements des cultures par des agents stimulateurs (cf Chapitre 5). Le chlortoluron s'est avéré capable d'inhiber de façon compétitive, mais à forte dose, la LAH du blé. Les fortes valeurs du  $K_i$  (1500  $\mu\text{M}$ ) excluent pourtant la participation de la LAH dans le métabolisme du chlortoluron. Le chlortoluron est cependant sans effets sur la CA4H aux mêmes doses.

-Le diclofop et le chlortoluron sont deux herbicides métabolisés *in vivo* et *in vitro* par des microsomes de blé. Nous avons cherché à dégager des points communs à ces deux systèmes de détoxication, les seuls actuellement actifs dans des microsomes chez le blé. Il est aussitôt apparu que des microsomes de plantules de blé qui hydroxylient le diclofop ne métabolisent pas le chlortoluron (Zimmerlin et Durst, 1990 b) alors que c'est l'inverse pour ceux des suspensions cellulaires. Une explication à cet état de fait est que des isoformes distinctes interviendraient dans des hydroxylations aromatiques et dans les hydroxylations aliphatiques. D.S. Frear (communication personnelle) a observé lui aussi que le diclofop n'est pas un inhibiteur de la chlortoluron N-déméthylase dans des plantules de blé. Ces résultats sont en désaccord avec l'intervention d'un système de détoxication commun au diclofop et au chlortoluron, donc avec la participation de la LAH dans le métabolisme du chlortoluron.

De plus, le diclofop stimule sélectivement la chlortoluron N-déméthylase dans des microsomes isolés de suspensions cellulaires de blé. Cet effet est comparable à ceux observés *in vitro* après l'addition de plusieurs

composés dans les milieux d'incubation de microsomes chez les mammifères. Ainsi des flavonoïdes (Huang, 1981 a et b) et des polyamines (Jellinck et Perry, 1967 ; Chapman, 1976 ; Anderson *et al.*, 1981 ; Dalet *et al.*, 1983) causent l'activation spécifique d'activités d'oxygénation dans des microsomes de foie. Le mode d'action de ces composés est encore incertain.

Il semble aujourd'hui que des monooxygénases à cytochrome P-450 peuvent catalyser des réactions du métabolisme endogène des cellules, et accepter aussi comme substrats alternatifs des xénobiotiques. Etant donné que les microsomes actifs sur le diclofop sont incapables d'hydroxyler des molécules possédant aussi un cycle aromatique, comme le 2,4-D et le chlorsulfuron (Zimmerlin et Durst, 1990 b), on peut penser que l'encombrement stérique des molécules n'est pas un facteur primordial pour la reconnaissance d'un substrat par un cytochrome P-450, ce qui est confirmé par l'exemple du cinnamate et de l'ioxynil mentionné plus haut, comme par les études QSAR abordées avec une série d'analogues du chlortoluron au chapitre 6. Dans ce dernier cas, les potentialités des molécules à inhiber les réactions métaboliques sont étroitement corrélées avec des paramètres électroniques des substituants. Il existe une distorsion entre le nombre de substrats métabolisés dans le blé *in vivo* et le fait que chaque préparation microsomale ne soit active que sur une molécule. Ceci implique un grand nombre d'isoformes de cytochrome P-450 qui sont soumises à des mécanismes de régulation différents. Comme leurs homologues animales, les monooxygénases des plantes pourraient être regroupées en familles distinctes.

Le travail réalisé au cours de cette thèse fournit des éléments indirects préliminaires à une détermination du type des enzymes responsables de deux réactions du métabolisme oxydatif du chlortoluron. Il devra être poursuivi par d'autres études qui permettront une identification précise des enzymes, c'est à dire l'isolement de leurs gènes.

Il existe plusieurs applications de ce type de recherches. Tout d'abord, la création de plantes transgéniques aux capacités de détoxification accrues permettra de rendre plus sélectifs des herbicides déjà existants, peu ou pas sélectifs, mais pouvant aussi présenter de faibles toxicités pour l'animal et l'environnement. De tels herbicides seraient alors bien tolérés par les cultures qui leur étaient auparavant sensibles. Le spectre d'action des molécules déjà anciennes sera augmenté. Une telle démarche a déjà été réalisée (Botterman et Leemans, 1988), mais il n'existe pas actuellement de plantes transgéniques dans lesquelles des gènes de monooxygénases à cytochrome P-450 auraient été implantés. Une meilleure connaissance des caractéristiques des enzymes permettrait le développement d'antidotes, de synergistes ou d'herbicides très sélectifs adaptés à une espèce particulière. Il n'existe pas ou peu d'antidotes propres aux céréales. Les résidus toxiques seront de ce fait diminués dans les plantes et par voie de conséquence dans l'environnement.

Les informations que peuvent apporter les études sur la régulation des enzymes de détoxification du blé, et en particulier des monooxygénases à cytochrome P-450, qui constituent de bons modèles, permettront peut être d'expliquer les phénomènes de résistances croisées qui se développent chez plusieurs espèces d'adventices (Kemp *et al.*, 1987 ; Powles *et al.*, 1988) à l'égard d'herbicides de structures chimiques et de modes d'action différents. Il semblerait en effet que l'origine de ce phénomène soit une détoxification accrue par des systèmes enzymatiques du même type que ceux actifs naturellement

chez les céréales, c'est à dire essentiellement des monooxygénases à cytochrome P-450. Ce type de résistance ferait donc intervenir plusieurs isoformes de cytochromes. La connaissance des mécanismes de régulation liés à l'expression de ces enzymes apparait comme le seul moyen de limiter l'extension de telles résistances, préoccupantes sur le plan agronomique.

Les enjeux d'ordre agronomique, économique ou écologique, mentionnés en introduction de cette thèse, font aujourd'hui qu'un nombre grandissant de laboratoires sont intéressés par ce type de recherches.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACTA (1989). Index phytosanitaire, Paris.
- ADAMS J.D., HEINS M.C. et YOST G.S. (1987). 3-methylindole inhibits lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 73-78.
- ADELE P., REICHHART D., SALAUN J.P., BENVENISTE I., DURST F. (1981). Induction of cytochrome P-450 and monooxygenase activity by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in higher plant tissue. *Plant Sci. Lett.*, 22, 39-46.
- ADESNIK M. et ATCHISON M. (1986). Genes for cytochrome P-450 and their regulation. *Crit. Rev. Biochem.*, 19, 247-305.**
- ANDERSSON K.K., DALET C., BONFILS C. et MAUREL P. (1981). Effect of polyamine on microsomal cytochrome P-450 stimulation of rate and improved coupling of NADPH oxidation to hydroxylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 98, 311-316.
- ARNAUD L. (1989). Corrélations entre la structure de phénylurées herbicides et l'activité sur les chloroplastes et les mitochondries. Rapport DEA, INP Toulouse.
- ASKERLUND P., LARSSON C., WIDELL S. et MOLLER I.M. (1987). NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiol. Plant.*, 71, 9-19.
- ASTROM A. et DePIERRE J.W. (1986). Rat-liver microsomal cytochrome P-450 : purification, characterization, multiplicity and induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 853, 1-27.**
- BAST A. et HAENEN G.R.M.M. (1984). Cytochrome P-450 and glutathione : what is the significance of their interrelationship in lipid peroxidation. *Trends Biochem. Sci.*, december, 510-513.
- BATE-SMITH E.E. et WESTHALL R.G. (1950). Chromatographic behaviour and chemical structure. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochim. Biophys. Acta*, 4, 427-440.
- Ben ABDELKADER A.B., CHERIF A., DEMANDRE C. et MAZLIAK P. (1973). The oleyl-coenzyme-A desaturase of potato tubers. Enzymatic properties, intracellular localization and induction during "aging" of tuber slices. *Eur. J. Biochem.*, 32, 155-165.
- BENVENISTE I. (1978). Mise en évidence d'une monooxygénase végétale à cytochrome P-450, l'acide trans-cinnamique 4-hydroxylase : contribution à l'étude du métabolisme des phénylpropanoïdes chez les végétaux supérieurs. Thèse Doctorat d'Etat, ULP Strasbourg.
- BENVENISTE I. et DURST F. (1974). Mise en évidence dans les tissus de tubercule de topinambour (*Helianthus tuberosus* L, var blanc commun) d'une enzyme à cytochrome P-450, l'acide trans-cinnamique 4-hydroxylase. *C.R. Acad. Sci. PARIS*, 278, 1487-1490.
- BENVENISTE I., GABRIAC B. et DURST F. (1986). Purification and characterization of the NADPH-cytochrome P-450 (cytochrome c) reductase from higher-plant microsomal fraction. *Biochem. J.*, 235, 365-373.



- BENVENISTE I., LESOT A., HASENFRATZ M.P. et DURST F. (1989). Immunochemical characterization of NADPH-cytochrome P-450 reductase from Jerusalem artichoke and other higher plants. *Biochem. J.*, 259, 847-853.
- BENVENISTE I., SALAUN J.P. et DURST F. (1977). Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber. *Phytochemistry*, 16, 69-73.
- BENVENISTE I., SALAUN J.P. et DURST F. (1978). Phytochrome-mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochemistry*, 17, 359-363.
- BENVENISTE I., SALAUN J.P., SIMON A., REICHHART D. et DURST F. (1982). Cytochrome-P450-dependant  $\omega$ -hydroxylation of lauric acid by microsomes of pea seedling. *Plant Physiol.*, 70, 122-126.
- BERNARD C.B., ARNASON J.T., PHILOGENE B.J.R., LAM J. et WADDELL T. (1989). Effect of lignans and other secondary metabolites of the asteraceae on the mono-oxygenase activity of the european corn borer. *Phytochemistry*, 28, 1373-1377.
- BISWAS P.K. et HAMILTON W. Jr. (1969). Metabolism of trifluralin in peanuts and sweet potatoes. *Weed Sci.*, 17, 206-211.
- BLACK S.D. et COON M.J. (1987). P-450 cytochromes : structure and function. *Adv. Enzymol.*, 60, 35-87.**
- BLEE E., CASIDA J.E. et DURST F. (1985). Sulfoxidation of methiocarb in higher plants. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 389-390.
- BLEE E. et DURST F. (1986). Oxidation of an organosulfur xenobiotic by microsomes from soybean cotyledons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135, 922-927.
- BLEE E. et DURST F. (1987). Hydroperoxide-dependent sulfoxidation catalyzed by soybean microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 254, 43-52.
- BLEE E. et SCHUBER F. (1989). Mechanism of S-oxidation reactions catalyzed by a soybean hydroperoxide-dependent oxygenase. *Biochemistry*, 28, 4962-4967.
- BOTTERMAN J. et LEEMANS J. (1988). Engineering herbicide resistance in plants. *Trends Genet.*, 4, 219-222.
- BOURETT T.M., HOWARD R.J. et O'KEEFE D.P. (1989). Immunochemical localization of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.*, Abstract 913.
- BOZAK K.R., YU H., SIREVAG R. et CHRISTOFFERSEN R.E. (1990). Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3904-3908.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- BRISTOL D.W., GHANUNI A.M. et OLESON A.E. (1977). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by wheat cell suspension cultures. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1308-1314.

- BROADHURST N.A., MONTGOMERY M.L. et FREED V.H. (1966). Metabolism of 2-methoxy-3,6-dichloro-benzoic acid (dicamba) by wheat and bluegrass plants. *J. Agric. Food Chem.*, 14, 585-588.
- BROWN C.A. et BLACK S.D. (1989). Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 264, 4442-4449.
- BROWN C., LUCAS J.A., CRUTE I.R., WALKEY D.G.A. et POWER J.B. (1986). An assessment of genetic variability in somatocloned lettuce plants (*Lactuca sativa*) and their offspring. *Ann. Appl. Biol.*, 109, 391-407.
- BROWN M.A., CHIU T.Y. et MILLER P. (1987). Hydrolytic activation versus oxidative degradation of assert herbicide, an imidazolinone aryl-carboxylate, in susceptible wild oat versus tolerant corn and wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 27, 24-29.
- BUCKLAND J.L., COLLINS R.F. et PULLIN E.M. (1973). Metabolism of bromoxynil octanoate in growing wheat. *Pestic. Sci.*, 4, 149-162.
- BURDEN R.S., CLARK T. et HOLLOWAY P.J. (1987). Effects of sterol biosynthesis-inhibiting fungicides and plant growth regulators on the sterol composition of barley plants. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 27, 289-300.
- BURDEN R.S., COOKE D.T. et CARTER G.A. (1989). Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi. *Phytochemistry*, 28, 1791-1804.
- BURT M.E. et CORBIN F.T. (1978). Uptake, translocation, and metabolism of propham by wheat (*Triticum aestivum*), sugarbeet (*Beta vulgaris*), and alfalfa (*Medicago sativa*). *Weed Sci.*, 26, 296-303.
- CABANNE F., GAILLARDON P. et SCALLA R. (1985). Phytotoxicity and metabolism of chlortoluron in two wheat varieties. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 23, 212-220.
- CABANNE F., HUBY D., GAILLARDON P., SCALLA R. et DURST F. (1987 a). Effect of the cytochrome P-450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 28, 371-380.
- CABANNE F., LEFEBVRE A. et SCALLA R. (1987 b). Behaviour of the herbicide EL-107 in wheat and rape under controlled conditions. *Weed Res.*, 27, 135-142.
- CAMMARATA A. et YAU S.J. (1970). Predictability of correlations between *in vitro* tetracycline potencies and substituent indices. *J. Med. Chem.*, 13, 93-97.
- CANIVENC M.C. (1989). Etude du métabolisme du chlorotoluron dans des cultures cellulaires de blé (*Triticum aestivum*). Effets d'inhibiteurs et d'inducteurs potentiels de monooxygénases à cytochrome P-450. Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- CANIVENC M.C., CAGNAC B., CABANNE F. et SCALLA R. (1989). Induced changes of chlorotoluron metabolism in wheat cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.*, 27, 193-201.
- CASELEY J.C., COPPING L. et MASON D. (1989). Control of herbicide resistant black-grass with herbicide mixtures containing tridiphane. *Proceedings of the 11th Long Ashton International Symposium*, 52-53.
- CASISA J.E. (1970). Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *J. Agric. Food Chem.*, 18, 753-772.

- CHAPMAN S.K. (1976). Polyamines and drug oxidations. *Drug Metab. Dispos.*, 4, 417-422.
- CHRESTIN H., BANGRATZ J., D'AUZAC J. et JACOB J.L. (1984). Role of the lutoidic tonoplast in the senescence and degeneration of the laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 114, 261-268.
- COLE D. (1983). Oxidation of xenobiotic in plants. dans "Progress in pesticide biochemistry and toxicology.", vol 3, chap 4, 199-254, HUTSON D.H. et ROBERTS T.R. eds, J. Wiley and sons, New York.
- COLE D.J., EDWARDS R. et OWEN W.J. (1987). The role of metabolism in herbicide selectivity. dans "Progress in pesticide biochemistry and toxicology.", vol 6, chap 2, 57-105, HUTSON D.H. et ROBERTS T.R. eds, J. Wiley and sons, New York.
- COLE D.J. et LOUGHMAN B.C. (1983). The metabolic fate of (4-chloro-2-methylphenoxy) acetic acid in higher plants. 1. General results. 2. Metabolism in liquid cultured callus cells of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.*, 34, 1299-1319.
- COLE D.J. et OWEN W.J. (1987 a). Influence of composition of nutrient medium on the metabolism of chlortoluron in plant-cell suspension cultures. *Pestic. Sci.*, 19, 67-78.
- COLE D.J. et OWEN W.J. (1987 b). Metabolism of metalaxyl in cell suspension cultures of *Lactuca sativa* L. and *Vitis vinifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 28, 354-351.
- COLE D.J. et OWEN W.J. (1988). Metabolism of chlortoluron in cell suspensions of *Lactuca sativa* : a qualitative change with age of culture. *Phytochemistry*, 27, 1709-1711.
- COOLBAUGH R.C. et HAMILTON R. (1976). Inhibition of ent-kaurene oxidation and growth by  $\alpha$ -cyclopropyl- $\alpha$ -(p-methoxyphenyl)-5-pyrimidine methyl alcohol. *Plant Physiol.*, 57, 245-248.
- COOLBAUGH R.C., HIRANO S.S. et WEST C.A. (1978). Studies on the specificity and site of action of  $\alpha$ -cyclopropyl- $\alpha$ -(p-methoxyphenyl)-5-pyrimidine methyl alcohol (ancymidol), a plant growth regulator. *Plant Physiol.*, 62, 571-576.
- CORIO-COSTET M.F., GERST N., BENVENISTE P. et SCHUBER F. (1988). Inhibition by the fungicide fenpropimorph of cholesterol biosynthesis in 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.*, 256, 829-834.
- CROTEAU R., KOLATTUKUDY P.E. (1975). Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers. Enzymatic epoxydation of 18-hydroxyoleic acid to 18-hydroxy-cis-9,10-epoxystearic acid by a particulate preparation from spinach (*Spinacia oleacea*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 61-72.
- DALET C., ANDERSSON K.K., DALET-BELUCHE I., BONFILS C. et MAUREL P. (1983). Polyamines as modulators of drug oxidation reactions catalyzed by cytochrome P-450 from liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 593-601.
- DAWSON J.H. et EBLE K.S. (1986). Cytochromes P-450 : heme iron coordination structure and mechanisms of action. *Adv. Inorg. Bioorg. Mech.*, 4, 1-64.**
- DOHN D.R., KRIEGER R.I. (1984). N-demethylation of p-chloro-N-methylaniline catalyzed by subcellular fractions from the avocado pear (*Persea americana*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 231, 416-423.

- DUFFEL M.W., GRAHAM J.M. et ZIEGLER D.M. (1981). Changes in dimethylaniline N-oxidase activity of mouse liver and kidney induced by steroid sex hormones. *Mol. Pharmacol.*, 19, 134-139.
- EBEL J. et GRISEBACH H. (1988). Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* : a molecular analysis. *Trends Biochem. Sci.*, 13, 23-27.
- EBEL J., SCHALLER-HEKELER B., KNOBLOCH K.H., WELLMAN E., GRISEBACH H. et HAHLBROCK K. (1974). Coordinated changes in enzyme activities of phenylpropanoid metabolism during the growth of soybean cell suspension cultures. *Biochim. Biophys. Acta*, 362, 417-424.
- EDWARDS R. et OWEN W.J. (1986). Comparison of glutathione S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta*, 169, 208-215.
- EDWARDS R. et OWEN W.J. (1988). Regulation of glutathione S-transferases of *Zea mays* il plant and cell cultures. *Planta*, 175, 99-106.
- EDWARDS R. et OWEN W.J. (1989). The comparative metabolism of the S-triazine herbicides atrazine and terbutryne in suspension cultures of potato and wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34, 246-254.
- EDWARDS V.T. et McMINN A.L. (1985). Biotransformation of pesticides and other xenobiotics in plants and soil-recent developments. dans "Progress in pesticide biochemistry and toxicology.", vol 4, chap 4, 103-158, HUTSON D.H. et ROBERTS T.R. eds, J. Wiley and sons, New York.
- EZRA G., DEKKER J.H. et STEPHENSON G.R. (1985). Tridiphane as a synergist for herbicides in corn (*Zea mays*) and Proso millet (*Panicum miliaceum*). *Weed Sci.*, 33, 287-290.
- FONNE R. (1985). Intervention du cytochrome P-450 des végétaux supérieurs dans l'oxydation des composés exogènes: l'aminopyrine et le chlortoluron. Thèse d'établissement, ULP Strasbourg.
- FONNE-PFISTER R., SIMON A., SALAUN J.P. et DURST F. (1988). Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome P-450 in aminopyrine N-demethylation. *Plant Sci.*, 55, 9-20.
- FONNE-PFISTER R., GAUDIN J., KREUZ K., RAMSTEINER K. et EBERT E. (1990 a). Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P450-dependent monooxygenase system from maize. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37, 165-173.
- FONNE-PFISTER R. et KLAUS K. (1990 b). Ring-methyl hydroxylation of chlorotoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. *Phytochemistry*, 29, 2793-2796.
- FRANKLIN M.R. (1977). Inhibition of mixed-function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic-intermediate complexes. *Pharmacol. Ther. A*, 2, 227-245.**
- FREAR D.S. et MARDAUS M.C. (1990). 1,8-naphthalic anhydride-induced microsomal oxidation of diclofop, chlorsulfuron and triasulfuron in wheat. ACS National Meeting, Abstract 18, 22-27 April.

- FREAR D.S., SWANSON H.R., TANAKA F.S. (1969). N-demethylation of substituted 3-(phenyl)1-methyl-ureas : isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry*, 8, 2157-2169.
- FRITSCH R., KOCHS G., HAGMANN M., HELLER W., JUNG J. et GRISEBACH H. (1986). Effect of cytochrome P-450 inhibitors on monooxygenases from higher plants. *dans* "Proceedings of the 6th International Congress of Pesticide Chemistry", IUPAC.
- FRYDMAN R.B., ROSENFELD J., CAMORETTI-MERCADO B. et PEISACH J. (1987). Porphobilinogen oxygenase. Purification and evidence for its hemoprotein structure. *J. Biol. Chem.*, 262, 15118-15126.
- FRYDMAN R.B., TOMARO M.L. et FRYDMAN B. (1972). Pyrrolo-oxygenases : isolation, properties, and products formed. *Biochim. Biophys. Acta*, 284, 63-79.
- FUJITA M. et ASAHI T. (1985). Different intracellular localization of two cytochrome P-450 systems, ipomeamarone 15-hydroxylase and cinnamic acid 4-hydroxylase, in sweet potato root tissue infected with *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Cell Physiol.*, 26, 389-395.
- FUJITA M., OBA K., URITANI I. (1981). Ipomeamarone 15-hydroxylase from cut-injured and *Ceratocystis fimbriata*-infected sweet potato root tissues. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1911-1913.
- FUJITA M., OBA K., URITANI I. (1982). Properties of a mixed function oxygenase catalyzing ipomeamarone 15-hydroxylation in microsomes from cut-injured and *Ceratocystis fimbriata* infected sweet potato root tissues. *Plant Physiol.*, 70, 573-578.
- GABRIAC B., BENVENISTE I. et DURST F. (1985). Isolement et caractérisation de cytochrome P-450 de plantes supérieures (*Helianthus tuberosus*). *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 301, Série III, 753-758.
- GAILLARDON P., CABANNE F., SCALLA R., DURST F. (1985). Effect of mixed function oxidase inhibitors on the toxicity of chlortoluron and isoproturon to wheat. *Weed Res.*, 25, 397-402.
- GALLE A.M., BONNEROT C., JOLLIOT A., KADER J.C. (1984). Purification of a NADH-ferricyanide reductase from plant microsomal membranes with a zwitter ionic detergent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1201-1205.
- GAMBORG O.L. et EVELEIGH D.E. (1968). Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.*, 46, 417-421.
- GANDER J.E. et MANNERING G.J. (1980). Kinetics of hepatic cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase systems. *Pharmac. Ther.*, 10, 191-221.**
- GILBERT E.E. et SORMA G.J. (1956). U.S. Patent 2,729,677 ; january 3 ; assigned to Allied Chemical and Dye Corporation, Agricultural Chemicals Manufacture, 173-176.
- GILEWICZ COTTE-MARTINON M., YAHIEL V., DUCET G. (1974). Induction d'un cytochrome du type P-450 et de peroxydase durant la survie du tubercule de topinambour. *Phytochemistry*, 13, 2085-2090.
- GILLARD D.F. et WALTON D.C. (1976). Abscissic acid metabolism by a cell-free preparation from *Echinocystis lobata* liquid endosperm. *Plant Physiol.*, 58, 790-795.

- GONNEAU M., PASQUETTE B., CABANNE R. et SCALLA R. (1988). Metabolism of chlortoluron in tolerant species : possible role of cytochrome P-450 mono-oxygenase. *Weed Res.*, 28, 19-25.
- GRAB L.A., SWANSON B.A. et ORTIZ de MONTELLANO P.R. (1988). Cytochrome P-450 inactivation by 3-alkylsydnones. Mechanistic implications of N-alkyl and N-alkenyl heme adduct formation. *Biochemistry*, 27, 4805-4814.
- GRAND C. (1984). Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome-P-450-dependant enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Lett.*, 169, 7-11.
- GROSS D., LAANIO T., DUPUIS G. et ESSER H.O. (1979). The behavior of chlorotoluron in wheat and soil. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 10, 49-59.
- GUENGERICH F.P. et LIEBLER D.C. (1985). Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 14, 259-307.**
- GULLNER G. et TYIHAK E. (1987). Hydrogen peroxide dependant N-demethylase activity in the leaves of normal and heat-shocked bean plants. *Plant Sci.*, 52, 21-27.
- HAGMANN M.L., HELLER W., GRISEBACH H. (1983). Induction and characterisation of a microsomal flavonoïd 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. *Eur. J. Biochem.*, 134, 547-554.
- HAGMANN M.L., HELLER W., GRISEBACH H. (1984). Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Stereospecific 3,9-dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase from elicitor-induced soybean cell cultures. *Eur. J. Biochem.*, 142, 127-131.
- HAMERSKI D. et MATERN U. (1988). Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells. *FEBS Lett.*, 239, 263-265.
- HANSCH C. et DEUTSCH E.W. (1966). The structure activity relationship in amides inhibiting photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 112, 381-391.
- HANSCH C. et FUJITA T. (1964). A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1616-1626.
- HANSCH C. et LEO A.J. (1979). Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. J. WILEY and sons eds., New York.
- HATZIOS K.K. (1983). Effects of CGA-43089 on responses of sorghum (*Sorghum bicolor*) to metolachlor combined with ozone or antioxidants. *Weed Sci.*, 31, 280-284.
- HATZIOS K.K., PENNER D. (1982). Metabolism of herbicides in higher plants, Burgess Publishing Company, New York.
- HELLER W. et KUHN T. (1985). Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl)shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.*, 241, 453-460.
- HENDRY G. (1986). Why do plants have cytochrome P-450? Detoxification versus defence. *New Phytol.*, 102, 239-247.**
- HENDRY G.A.F. et JONES O.T.G. (1984). Induction of cytochrome P-450 in intact mung beans. *New Phytol.*, 96, 153-159.

- HIGASHI K., IKEUCHI K., KARASAKI Y. et OBARA M. (1983). Isolation of immunochemically distinct form of cytochrome P-450 from microsomes of tulip bulbs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115, 46-52.
- HIGASHI K., IKEUCHI K., OBARA M., KARASAKI Y., HIRANO H., GOTOH S. et KOGA Y. (1985). Purification of a single major form of microsomal cytochrome P-450 from tulip bulbs (*Tulipa gesneriana* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2399-2405.
- HIGASHI K., NAKASHIMA K., KARASAKI Y. et FUKUNAGA M., MIZUGUCHI Y. (1981). Activation of benzo[a]pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. *Biochem. Int.*, 2, 373-380.
- HILL A.C. et RHODES M.J.C. (1975). The properties of cinnamic acid 4 hydroxylase of aged Swede root disks. *Phytochemistry*, 14, 2387-2391.
- HINDERER W., FLENTJE U. et BARZ W. (1987). Microsomal isoflavone 2'- and 3'-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpan phytoalexin formation. *FEBS Lett.*, 214, 101-106.
- HUANG C.Y. et KAUFMAN S. (1973). Studies on the mechanisms of action of phenylalanine hydroxylase and its protein stimulator. I. Enzyme concentration dependence of the specific activity of phenylalanine hydroxylase due to a nonenzymatic step. *J. Biol. Chem.*, 248, 4242-4251.
- HUANG M.-T., CHANG R.L., FORTNER J.G. et CONNEY A.H. (1981 a). Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[a]pyrene hydroxylation by flavonoids. *J. Biol. Chem.*, 256, 6829-6836.
- HUANG M.-T., JOHNSON E.F., MULLER-EBERHARD U., KOOP D.R., COON M.J. et CONNEY A.H. (1981 b). Specificity in the activation and inhibition by flavonoids of benzo[a]pyrene hydroxylation by cytochrome P-450 isozymes from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 256, 10897-10901.
- HUI BON HOA G., DiPRIMO C., GEZE M., DOUZOU P., KORNBLATT J.A., et SLIGAR S.G. (1990). The formation of cytochrome P-450 from cytochrome P-420 is promoted by spermine. *Biochemistry*, 29, 6810-6815.
- HUTSON D.H. (1987). The bioactivation of herbicides. *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds*, vol 1, part 4B-2, 319-328.
- ISHIMARU A. (1979). Purification and characterization of solubilized peroxygenase from microsomes of pea seeds. *J. Biol. Chem.*, 254, 8427-8433.
- ISHIMARU A. et YAMASAKI I. (1977 a). The carbon monoxide-binding hemoprotein reducible by hydrogen peroxide in microsomal fractions of Pea seeds. *J. Biol. Chem.*, 252, 199-204.
- ISHIMARU A. et YAMAZAKI I. (1977 b). Hydroperoxide-dependent hydroxylation involving "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reducible hemoprotein" in microsomes of Pea seeds. *J. Biol. Chem.*, 252, 6118-6124.
- JACHETTA J.J. et RADOSEVICH S.R. (1981). Enhanced degradation of atrazine by corn (*Zea mays*). *Weed Sci.*, 29, 37-44.
- JELLINCK P.H. et PERRY G. (1967). Effect of polyamine on the metabolism of (16-<sup>14</sup>C)estradiol by rat-liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 137, 367-374.

- JOHNSTON G., COLLETT G., WALKER C., DAWSON A., BOYD I. et OSBORN D. (1989). Enhancement of malathion toxicity to the hybrid red-legged partridge following exposure to procloraz. *Pestic. Biochem. Biophys.*, 35, 107-118.
- JOLLIE D.R., SLIGAR S.G. et SCHULER M. (1987). Purification and characterization of microsomal cytochrome b<sub>5</sub> and NADH cytochrome b<sub>5</sub> reductase from *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 85, 457-462.
- JUNG H.-J.G. et HIMMELSBACH D.S. (1989). Isolation and characterization of wheat straw lignin. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 81-87.
- KAKKIS E., PALMIRE V.C., STRONG C.D., BERTSCH W., HANSCH C. et SCHIRMER U. (1984). Quantitative structure-activity relationships in the inhibition of photosystem II in chloroplasts by phenylureas. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 133-144.
- KEMP M.S., CASELEY J.C. (1987). Synergistic effects of 1-aminobenzotriazole on the phytotoxicity of chlortoluron and isoproturon in a resistant population of black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds*, vol 3, part 8C-5, 895-899.
- KINSLER S., LEVI P.E. et HODGSON E. (1988). Hepatic and extrahepatic microsomal oxidation of phorate by the cytochrome P-450 and FAD-containing monooxygenases systems in the mouse. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 31, 54-60.
- KJELLBOM P., LARSSON C., ASKERLUND P., SCHELIN C. and WIDELL S. (1985). Cytochrome P-450/420 in plant plasma membranes : a possible component of the blue-light-reducible flavoprotein-cytochrome complex. *Photochem. Photobiol.*, 42, 779-783.
- KOCHS G. et GRISEBACH H. (1986). Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.*, 155, 311-318.
- KOCHS G. et GRISEBACH H. (1989). Phytoalexin synthesis in soybean : purification and reconstitution of cytochrome P-450 3,9-dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase and separation from cytochrome P-450 cinnamate 4-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273, 543-553.
- KOCHS G., WELLE R. et GRISEBACH H. (1987). Differential induction of enzyme in soybean cell cultures by elicitor or osmotic stress. *Planta*, 171, 519-524.
- KOLLER W. (1987). Isomer of sterol synthesis inhibitors : fungicidal effects and plant growth regulator activities. *Pestic. Sci.*, 18, 129-147.
- KOMIVES T. et DUTKA F. (1989). Effects of herbicide safeners on levels and activity of cytochrome P-450 and other enzymes in corn, dans "Crop safeners for herbicides", 129-145, K.K. Hatzios et R.E. Hoagland eds, Academic Press, New York.
- KUROSAKI F., KIZAWA Y. et NISHI A. (1989). Derailment product in NADPH-dependent synthesis of a dihydroisocoumarin 6-hydroxymellein by elicitor-treated carrot cell extracts. *Eur. J. Biochem.*, 185, 85-89.
- LAMOUREUX G.L. et FREAR D.S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants : in vitro enzymes studies. dans "Xenobiotic metabolism : in vitro methods.", Chap 3, 77-128, ACS Symposium Series 97, Paulson G.D. et Frear D.S. eds.
- LAMOUREUX G.L. et RUSNESS D.G. (1986). Tridiphane (2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2,2,2-trichloroethyl)oxirane an atrazine synergist : enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 26, 323-342.



- LAMOUREUX G.L. et RUSNESS D.G. (1987). Synergism of diazinon toxicity and inhibition of diazinon metabolism in the house fly by tridiphane : inhibition of glutathione S-transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 27, 318-329.
- LARSON R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.
- LAY M.M. et CASIDA J.E. (1976). Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxication by elevating corn root glutathione content and glutathione-S-transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 6, 442-456.
- LEAVITT J.R.C. et PENNER D. (1979). The *in vitro* conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 533-536.
- LEVIN W., WOOD A., CHANG R., RYAN D., THOMAS P., YAGI H., THAKKER D., VYAS K., BOYD C., CHU S.-Y., CONNEY A., JERINA D. (1982). Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens. *Drug Metab. Rev.*, 13, 555-580.
- McFADDEN J.J., FREAR D.S. et MANSAGER E.R. (1989). Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 dependent monooxygenase from wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34, 92-100.
- McFADDEN J.J., GRONWALD J.W. et EBERLEIN C.V. (1990). *In vitro* hydroxylation of bentazon by microsomes from naphthalic anhydride-treated corn shoots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 206-213.
- McPHERSON F.J., MARKHAM A., BRIDGES J.W., HARTMAN G.C. et PARKE D.V. (1975 a). A comparison of the properties *in vitro* of biphenyl 2- and 4-hydroxylase in the mesocarp from avocado pear (*Persea americana*) and Syrian-hamster hepatic tissue. *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 281-283.
- McPHERSON F.J., MARKHAM A., BRIDGES J.W., HARTMAN G.C. et PARKE D.V. (1975 b). Effects of preincubation *in vitro* with 3,4-benzopyrene and phenobarbital on the drug-metabolism systems present in the microsomal and soluble fractions of the avocado pear (*Persea americana*). *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 283-285.
- MADYASTHA K.M., COSCIA C.J. (1979). Detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (P-450) reductase from the higher plant, *Catharanthus roseus*. purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 254, 2419-2427.
- MAEHLY A.C. et CHANCE B. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *dans* "Methods in biochemical analysis", vol 1, 357-424, Glick D. ed., Interscience Publ. Inc., New York.
- MAKEEV A.M., MAKOVEICHUK A.Y. et CHKANIKOV D.I. (1977). Microsomal hydroxylation of 2,4-D in plants. *Dokl. Bot. Sci.*, 233, 36-38.
- MANSUY D., BATTIONI P. et BATTIONI J.P. (1989). Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases. *Eur. J. Biochem.*, 184, 267-285.
- MARCUS C.B., MURRAY M., WANG C. et WILKINSON C.F. (1986). Methylene dioxyphenyl compounds as inducers of cytochrome P-450 and monooxygenase activity in the southern armyworm (*Spodoptera eridania*) and the rat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 26, 310-322.

- MAULE A.J. et RIDE J.P. (1983). Cinnamate 4-hydroxylase and hydroxycinnamate:CoA ligase in wheat leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 22, 1113-1116.
- MEEHAN T.D. et COSCIA C.J. (1973). Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca rosea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 1043-1048.
- MITSUTAKE K.I., IWAMURA H., SHIMIZU R. et FUJITA T. (1986). Quantitative structure-activity relationship of photosystem II inhibitors in chloroplasts and its link to herbicidal action. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 725-732.
- MIURA Y. et FULCO A.J. (1975).  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 388, 305-317.
- MOLLER I.M. et BERCZI A. (1986). Salicylhydroxamic acid-stimulated NADH oxidation by purified plasmalemma vesicles from wheat roots. *Physiol. Plant.*, 68, 67-74.
- MORELAND D.E., CORBIN F.T. et NOVITZKY W.P. (1989 a). Interactions between cytochrome P-450 monooxygenases and herbicides, synergists, and antagonists. ACS National Meeting.
- MORELAND D.E., NOVITZKY W.P. et LEVI P.E. (1989 b). Selective inhibition of cytochrome P450 isozymes by the herbicide synergist tridiphane. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 35, 42-49.
- MUMMA R.O. et DAVIDONIS G.H. (1983). Plant tissue culture and pesticide metabolism. dans "Progress in pesticide biochemistry and toxicology", vol 3, 255-278, Hutson D.H. et Roberts T.R. eds, J. Wiley and sons.
- MURPHY P.J. et WEST C.A. (1969). The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* greene endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.*, 133, 395-407.
- MURRAY M. (1988). Complexation of cytochrome P-450 isozymes in hepatic microsomes from SKF 525-A-induced rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 262, 381-388.
- MY J. et LORELLE V. (1988). Utilisation des produits phytosanitaires en France. *Phytoma*, 399, 8-10.
- NEBERT D.W., ADESNIK M., COON M.J., ESTABROOK R.W., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F.P., GUNSALUS I.C., JOHNSON E.F., KEMPER B., LEVIN W., PHILLIPS I.R., SATO R. et WATERMAN M.R. (1987). The P450 gene superfamily : recommended nomenclature. *DNA*, 6, 1-11.
- NEBERT D.W. et GONZALEZ F.J. (1985). Cytochrome P-450 gene expression and regulation. *Trends Biochem. Sci.*, April, 160-164.
- NEBERT D.W. et GONZALEZ F.J. (1987). P450 genes : structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 945-993.**
- NEBERT D.W., NELSON D.R., ADESNIK M., COON M.J., ESTABROOK R.W., GONZALEZ F.J., GUENGERICH F.P., GUNSALUS I.C., JOHNSON E.F., KEMPER B., LEVIN W., PHILLIPS I.R., SATO R. et WATERMAN M.R. (1989). The P450 superfamily : updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA*, 8, 1-13.
- NELSON D.R. et STROBEL H.W. (1989). Secondary structure prediction of 52 membrane-bound cytochromes P450 shows a strong structural similarity to P450<sub>cam</sub>. *Biochemistry*, 28, 656-660.

- NIKI Y., KUWATSUKA S. et YOKOMICHI I. (1976). Absorption, translocation and metabolism of chlormethoxy nil (X-52) in plants. *Agric. Biol. Chem.*, 22, 683-690.
- O'KEEFE D.P. et LETO K.J. (1989). Cytochrome P-450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.*, 89, 1141-1149.
- O'KEEFE D.P., ROMESSER J.A. et LETO K.J. (1987). Plant and bacterial cytochromes P-450 : involvement in herbicide metabolism. dans "Recent advances in phytochemistry", vol 21, 151-173, Saunders J.A., Kosak-Channing L. et CONN E.E. eds, Plenum Press, New York.
- OMURA T., HARADA N., YOSHIOKA H. (1983). Comparative biochemistry of animal, plant, and microorganism oxidases. dans Pesticide Chemistry Human Welfare and Environment, vol 3, Mode of action, metabolism and toxicology, S. Matsunaka, D.H. Hutson et S.D. Murphy Eds, Pergamon Press? Oxford.**
- OMURA T. and SATO R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes : I. Evidence for its hemoprotein nature. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2385.
- ORTIZ de MONTELLANO P.R., MATHEWS J.M. et LANGRY K.C. (1984). Autocatalytic inactivation of cytochrome P-450 and chloroperoxidase by 1-aminobenzotriazole and other aryne precursors. *Tetrahedron*, 40, 511-519.
- ORTIZ de MONTELLANO P.R. et MICO B.A. (1981). Destruction of cytochrome P-450 by allylisopropylacetamide is a suicidal process. *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 43-50.
- OWEN W.J. (1987). Herbicide detoxification and selectivity. *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds*, vol 1, part 4B-1, 309-318.
- OWEN W.J. et DONZEL B. (1986). Oxidative degradation of chlortoluron, propiconazole, and metalaxyl in suspension cultures of various crop plants. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 26, 75-89.
- PARKINSON A. et SAFE S. (1981). Aryl hydrocarbon hydroxylase induction and its relationship to the toxicity of halogenated aryl hydrocarbons. *Toxicol. Environ. Chem. Rew.*, 4, 1-46.**
- PERSHING L.K. et FRANKLIN M.R. (1982). Cytochrome P-450 metabolic-intermediate complex formation and induction by macrolide antibiotics ; a new class of agents. *Xenobiotica*, 12, 687-699.
- PESTICIDE MANUAL (1987). British Crop Protection Council, 8th edition, Worthing C.R. et Walker S.B. eds, Great Britain.
- PETERSEN M. et SEITZ H.U. (1988). Reconstitution of cytochrome P-450-dependent digitoxin 12 $\beta$ -hydroxylase from cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.). *Biochem. J.*, 252, 537-543.
- POTTS M.J.R., WEKLYCH R., COON E.E. (1974). The 4-hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 249, 5019-5026.
- POULOS T.L., FINZEL B.C., GUNSALUS I.C., WAGNER G.C. et KRAUT J. (1985). The 2.6 Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 260, 16122-16130.

- POWLES S.B., HOLTUM J.A.M., MATTHEWS J.M. et LILJEGREN D.R. (1988). Multiple herbicide resistance in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) : the search for a mechanism. dans "ACS Meeting, Los Angeles.
- REICHHART D., SALAUN J.P., BENVENISTE I., DURST F. (1979). Induction by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissues. Arch. Biochem. Biophys., 196, 301-303.
- REICHHART D., SALAUN J.P., BENVENISTE I., DURST F. (1980). Time course of induction of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome c reductase, and cinnamic acid hydroxylase by phenobarbital, ethanol, herbicides, and manganese in higher plant microsomes. Plant Physiol., 66, 600-604.
- REICHHART D., SIMON A., DURST F., MATHEWS J.M., ORTIZ de MONTELLANO P.R. (1982). Autocatalytic inactivation of plant cytochrome P-450 enzymes : selective inactivation of cinnamic acid 4-hydroxylase from *Helianthus tuberosus* by 1-aminobenzotriazole. Arch. Biochem. Biophys., 216, 522-529.
- RETZLAFF G. et HAMM R. (1976). The relationship between CO<sub>2</sub> assimilation and the metabolism of bentazone in wheat plants. Weed Res., 16, 263-266.
- RIVIERE J.-L. (1983). Prochloraz, a potent inducer of the microsomal cytochrome P-450 system. Pestic. Biochem. Physiol., 19, 44-52.
- RIVIERE J.-L. (1984). Les monooxygénases hépatiques et duodénales de la caille japonaise : mise en évidence, induction et inhibition. Thèse de doctorat d'état, n° 2959, Université de Paris-Sud Orsay.
- RIVIERE J.-L. et CABANNE F. (1987). Animal and plant cytochrome P-450 systems. Biochimie, 69, 743-752.**
- RIVIERE J.-L., LEROUX P., BACH J. et GREDT M. (1984). Effect of some ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides on sterols and cytochrome P-450 from the japanese quail *Coturnix coturnix*. Pestic. Sci., 15, 317-323.
- RUSSEL D.W. (1971). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. J. Biol. Chem., 246, 3870-3878.
- RYAN P.J., GROSS D., OWEN W.J. et LAANIO T.L. (1981). The metabolism of chlortoluron, diuron and GCA 43057 in tolerant and susceptible plants. Pestic. Biochem. Phys., 16, 213-221.
- SABOURIN P.J. et HODGSON E. (1984). Characterization of the purified microsomal FAD-containing monooxygenases from mouse and pig liver. Chem. Biol. Inter., 51, 125-139.
- SALAUN J.P. (1979). Mise en évidence d'une nouvelle enzyme à cytochrome P-450 dans les végétaux supérieurs : la laurate monooxygénase. Thèse d'établissement, ULP Strasbourg.
- SALAUN J.P., BENVENISTE I., FONNE R., GABRIAC B., REICHHART D., SIMON A., DURST F. (1982). Hydroxylations microsomales de l'acide laurique catalysées par le cytochrome-P-450 chez les plantes supérieures. Physiol. Veg., 20, 613-621.
- SALAUN J.P., BENVENISTE I., REICHHART D. et DURST F. (1978). A microsomal (cytochrome-P-450)-linked lauric acid monooxygenase from aged Jerusalem artichoke tuber tissue. Eur. J. Biochem., 90, 155-159.

- SALAUN J.P., BENVENISTE I., REICHHART D. et DURST F. (1981). Induction and specificity of a (cytochrome-P-450-dependent) laurate in-chain-hydroxylase from higher plant microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 119, 651-655.
- SALAUN J.P., REICHHART D., SIMON A., DURST F., REICH N.O. et ORTIZ de MONTELLANO P.R. (1984). Autocatalytic inactivation of plant cytochrome P-450 enzymes : selective inactivation of the lauric acid in-chain hydroxylase from *Helianthus tuberosus* L. by unsaturated substrate analogs. *Arch. Biochem. Biophys.*, 232, 1-7.
- SALAUN J.P., SIMON A. et DURST F. (1986). Specific induction of lauric acid  $\omega$ -hydroxylase by clofibrate, diethylhexyl-phthalate and 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid in higher plants. *Lipids*, 21, 776-779.
- SALAUN J.P., WEISSBART D., DURST F., PFLIEGER P. et MIOKOWSKI C. (1989). Epoxidation of *cis* and *trans*  $\Delta^9$ -unsaturated lauric acids by a cytochrome P-450-dependent system from higher plant microsomes. *FEBS Lett.*, 246, 120-126.
- SANGLARD D., KAPPELI O. et FIECHTER A. (1984). Metabolic conditions determining the composition and catalytic activity of cytochrome P-450 monooxygenases in *Candida tropicalis*. *J. Bacteriol.*, 157, 297-302.
- SCHEEL D. et SANDERMANN H.Jr. (1981). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, 152, 248-252.
- SCHEEL D., SCHAFER W. et SANDERMANN H.Jr. (1984). Metabolism of pentachlorophenol in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1237-1241.
- SCHENKMAN J.B., SLIGAR S.G. et CINTI D.L. (1981). Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmac. Ther.*, 12, 43-71.**
- SHIGEMATSU Y., SATO F. et YAMADA Y. (1989). A binding model for phenylurea herbicides based on analysis of a Thr264 mutation in the D-1 protein of tobacco. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 35, 33-41.
- SHIMABUKURO R.H. (1967). Atrazine metabolism and herbicidal selectivity. *Plant Physiol.*, 42, 1269-1276.
- SHIMABUKURO R.H. (1985). Detoxication of herbicides. dans "Weed physiology : herbicide physiology.", Vol 2, Chap 9, 216-239, Duke S.O. ed, CRC press, Boca Raton.
- SHIMABUKURO R.H., LAMOUREUX G.L. et FREAR D.S. (1982). Pesticide metabolism in plants : reactions and mechanisms. dans "Biodegradation of pesticides.", Chap 2, 21-66, Matsumura F. et Murti Krishna C.R. eds, Plenum press, New York.
- SHIMABUKURO R.H., WALSH W.C. et HOERAUF R.A. (1979). Metabolism and selectivity of diclofop-methyl in wild oat and wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 615-623.
- SHIMIZU R., IWAMURA H. et FIJITA T. (1988). Quantitative structure-activity relationships of photosystem II inhibitory anilides and triazines. Topological aspects of their binding to the active site. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1276-1283.
- SHOUN H., SUDO Y. et BEPPU T. (1985). Subterminal hydroxylation of fatty acids by a cytochrome P-450-dependent enzyme system from a fungus, *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.*, 97, 755-763.

- SHOUN H., SUDO Y., SATO K.I. et BEPPU T. (1989). Components of the cytochrome P-450 monooxygenase system of the fungus, *Fusarium oxysporum* : conditions for induction and isolation of cytochrome b<sub>5</sub>. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2153-2161.
- SIMPSON A.P. et KELLY S.L. (1989). Cytochrome P-450 inducer/inhibitor effects on cell cultures of *Cataranthus roseus*. *Plant Sci.*, 60, 231-236.
- SOLIDAY C.L. et KOLATTUKUDY P.E. (1977). Biosynthesis of cutin :  $\omega$ -hydroxylation of fatty acid by a microsomal preparation from germinating *Vicia faba*. *Plant Physiol.*, 59, 1116-1121.
- SOLIDAY C.L., KOLATTUKUDY P.E. (1978). Midchain hydroxylation of the 16-hydroxypalmitic acid by the endoplasmic reticulum fraction from germinating *Vicia faba*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 188, 338-347.
- STERLING T.M. et BALKE N.E. (1988). Use of soybean (*Glycine max*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) suspension-cultured cells to study bentazon metabolism. *Weed Sci.*, 36, 558-565.
- STEWART C.B. et SCHULER M.A. (1989). Antigenic crossreactivity between bacterial and plant cytochrome P-450 monooxygenases. *Plant Physiol.*, 90, 534-541.
- STRANG R.H. et ROGERS R.L. (1974). Behavior and fate of two phenylpyridazinone herbicides in cotton, corn, and soybean. *J. Agric. Food Chem.*, 22, 1119-1125.
- SWEETSER P.B. (1985). Safening of sulfonylurea herbicides to cereal crop : mode of herbicide antidote action. *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds*, vol 3, part 9 B-1, 1147-1154.
- TESTA B. et JENNER P. (1981). **Inhibitors of cytochrome P-450s and their mechanism of action.** *Drug Metab. Rev.*, 12, 1-117.
- UDVARDY J., SIVOK B. et NEMET G. (1976). Effect of naphthylacetic acid, 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 3,6-dichloro-o-anisic acid on nucleolytic enzymes in callus cultures from wheat root. *Z. Pflanzenphysiol.*, 78, 33-40.
- ULLAH A.J.H., MURRAY R.I., BHATTACHARYYA P.K., WAGNER G.C. et GUNSALUS I.C. (1990). Protein components of a cytochrome P-450 linalool 8-methyl hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 265, 1345-1351.
- UNO T., YOKOTA H. et IMAI Y. (1990). Replacing the carboxy-terminal 28 residues of rabbit liver P-450 (laurate (w-1)-hydroxylase) with those of P-450 (testosterone 16 $\alpha$ -hydroxylase) produces a new stereospecific hydroxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167, 498-503.
- VANDEN BOSSCHE H., MARICHAL P., GORRENS J., BELLENS D., VERHOEVEN H., COENE M.C., LAUWERS W. et JANSSEN P.A.J. (1987). Interaction of azole derivatives with cytochrome P-450 isoenzymes in yeast, fungi, plants and mammalian cells. *Pestic. Sci.*, 21, 289-306.
- VERLOOP A. (1983). The sterimol approach : further development of the method and new applications. *dans "Pesticide chemistry : human welfare and the environment."*, vol 1, 339-344, Migamoto and Kearney eds, Pergamon Press, Oxford.
- WALSH C. (1982). **Suicide substrates : mechanism-based enzyme inactivators.** *Tetrahedron*, 38, 871-902.

WATANABE K., NARIMATSU S., YAMAMOTO I. et YOSHIMURA H. (1990). Hepatic microsomal oxygenation of aldehydes to carboxylic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 1308-1312.

WERK-REICHHART D. (1985). Régulation des monooxygénases à cytochrome P-450 chez les végétaux supérieurs. Thèse de doctorat d'état, Strasbourg.

WERCK-REICHHART D., GABRIAC B., TEUTSCH H. et DURST F. (1990). Two cytochrome P-450 isoforms catalysing O-de-ethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresorufin in higher plants. *Biochem. J.*, 271, sous presse.

**WEST C.A. (1980). Hydroxylases, monooxygenases and cytochrome P-450. dans "Biochemistry of plants", vol. 2, 317-364, Stumpf et Coon eds, Academic Press.**

WHARTON D.C. et TZAGOLOFF A. (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.*, 10, 245-250.

**WHITE R.E. et COON M.J. (1980). Oxygen activation by cytochrome P-450. Ann. Rev. Biochem.**, 49, 315-356.

YAMADA H., BABA T., HIRATA Y., OGURI K. et YOSHIMURA H. (1983). The mechanism of N-demethylation of meth-amphetamine by liver microsomes : the role of flavin containing monooxygenase and cytochrome P-450 systems. *J. Pharm. Dyn.*, 6, 84.

YOUNG O. et BEEVERS H. (1976). Mixed function oxidases from germinating castor Bean endosperm. *Phytochemistry*, 15, 379-385.

ZIMMERLIN A. et DURST F. (1990 a). Xenobiotic metabolism in higher plants : aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat microsomes. *Phytochemistry*, 29, 1729-1732.

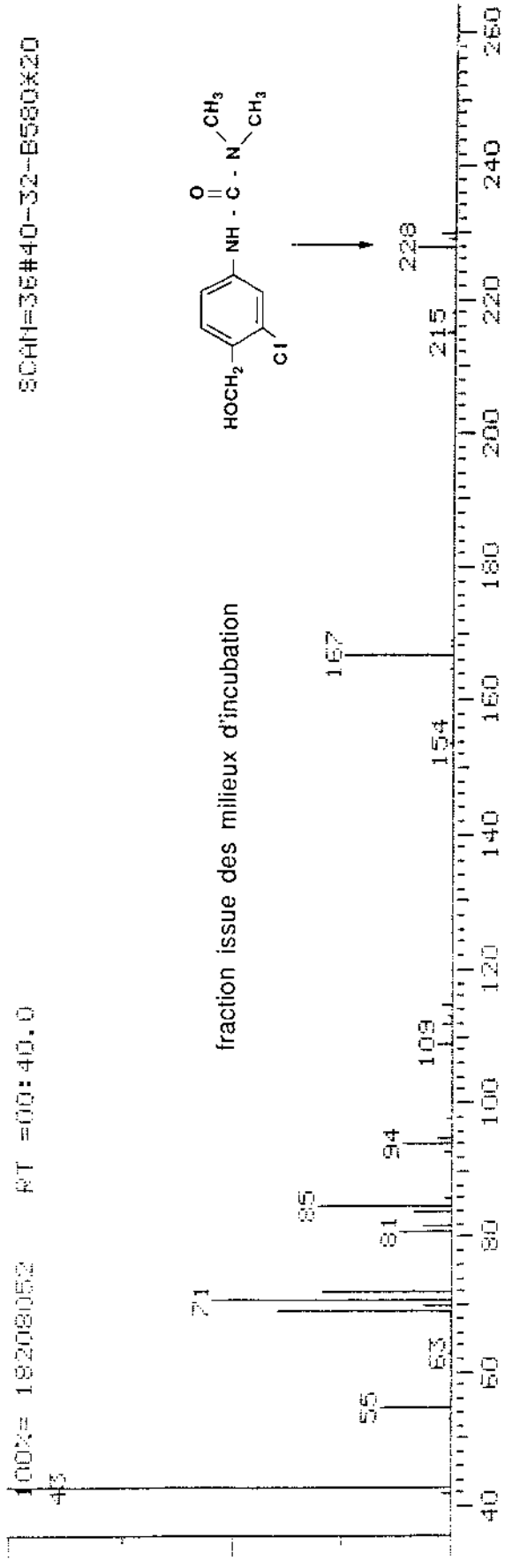
ZIMMERLIN A. et DURST F. (1990 b). Xenobiotic metabolism in higher plants : aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat. Proceedings of the seventh international congress of pesticide chemistry, August 5-10, 06E-14.

Annexe 1 : Spectre de masse du chlortoluron hydroxylé.

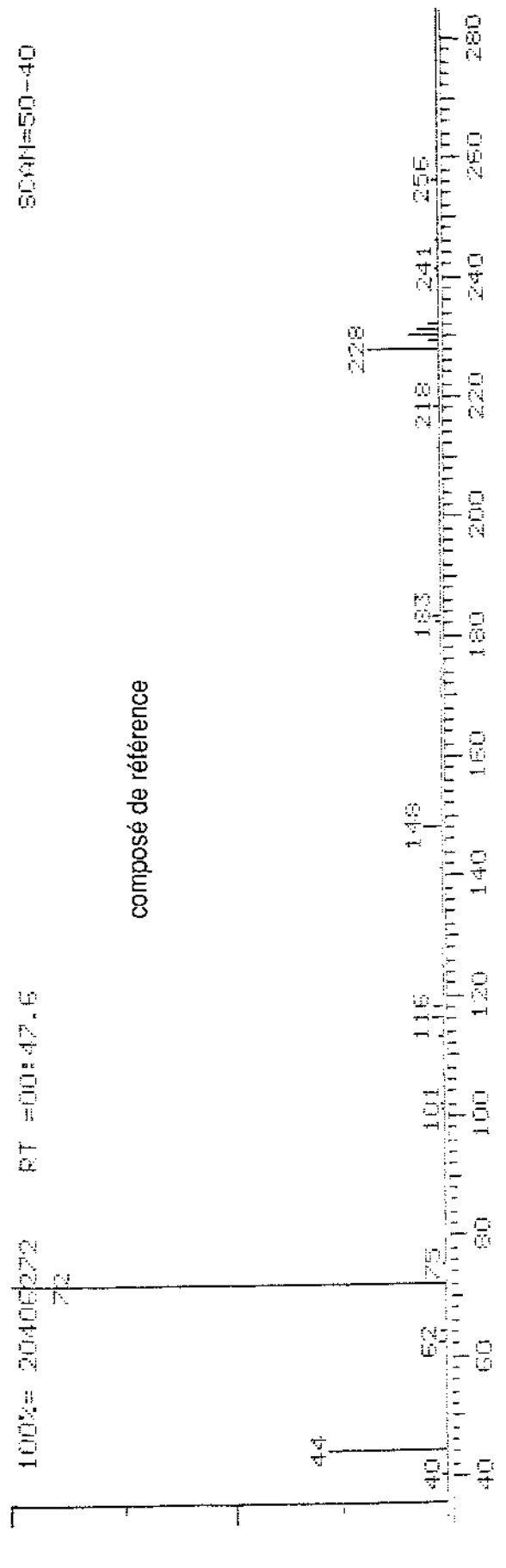
25-JUN-90 12:30  
25-JUN-90 11:54

[ 64, 8 ]

MERNAG/SIDAR U 3.1  
FILE A: DIJON06  
\* METABOLITE 2 2\* DCI \*



31-AUG-90 16:15



CHLORTOLURON HYDROXYLE INTROD. %  
FILE B: DIJON10



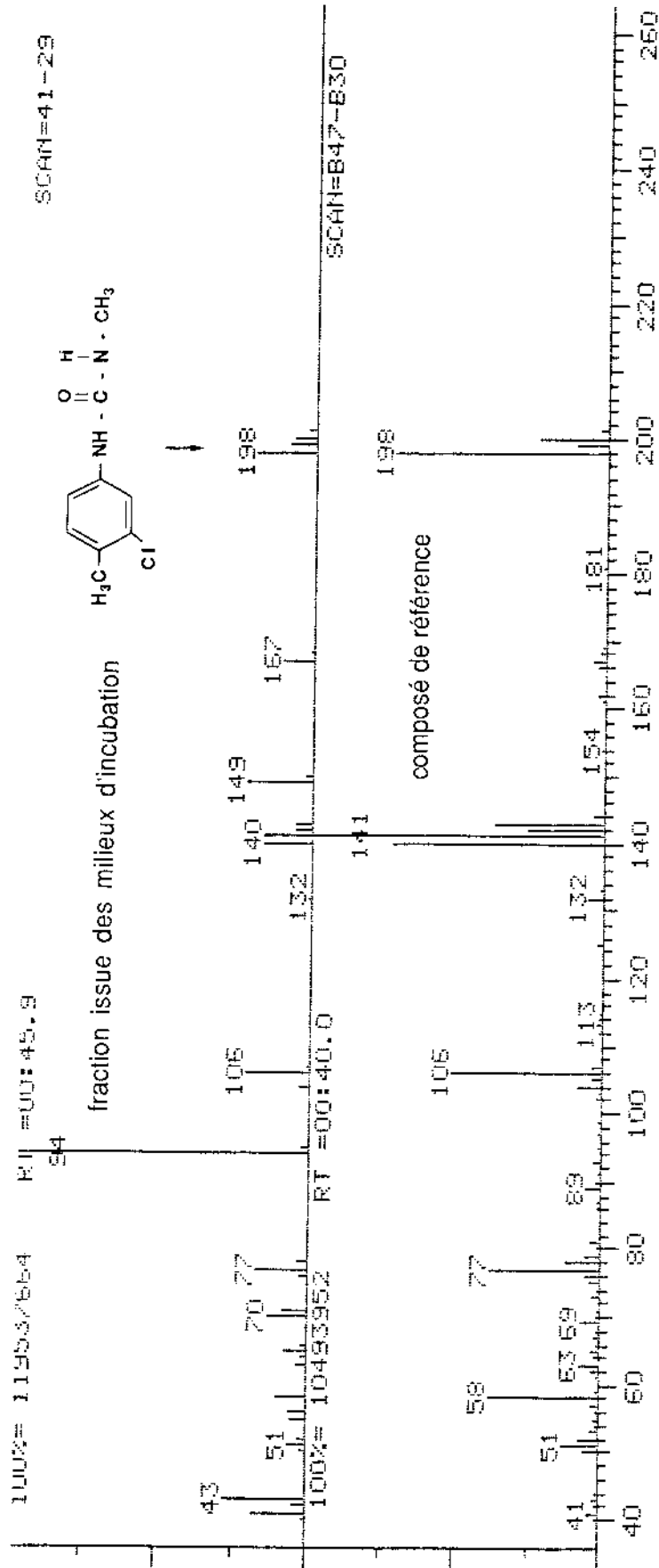
Annexe 2 : Spectre de masse du chlortoluron N-monodéméthylé.

HERMAG/SIDAR V 3.1  
 FILE A: DIJON04  
 METABOLITE 1 DCI \*  
 FILE B: DIJON03  
 METABOLITE 1 DCI \*

L 54, 81

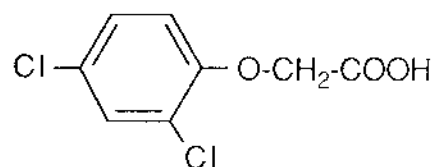
26-JUN-90 10:48

26-JUN-90 10:43

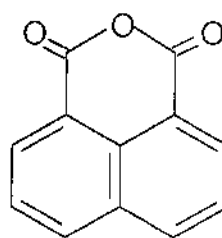


**Annexe 3** : Structure chimique des molécules utilisées aux chapitres 4 et 5.

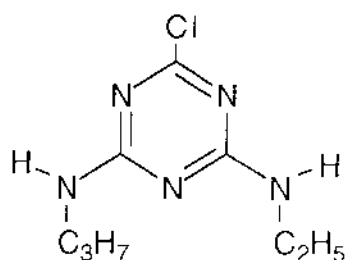
2,4-D



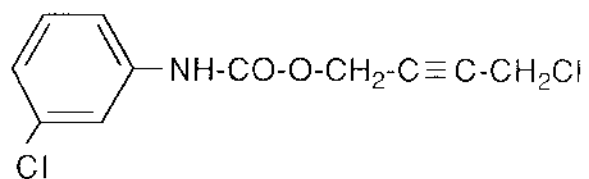
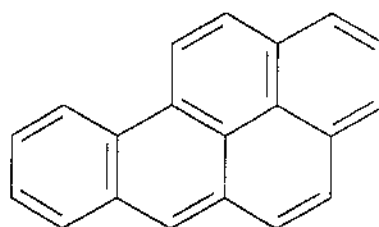
Anhydride naphthalique



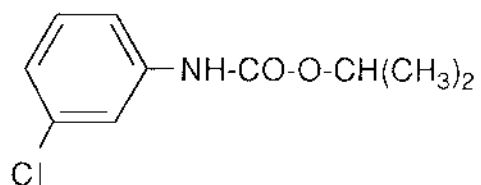
Atrazine

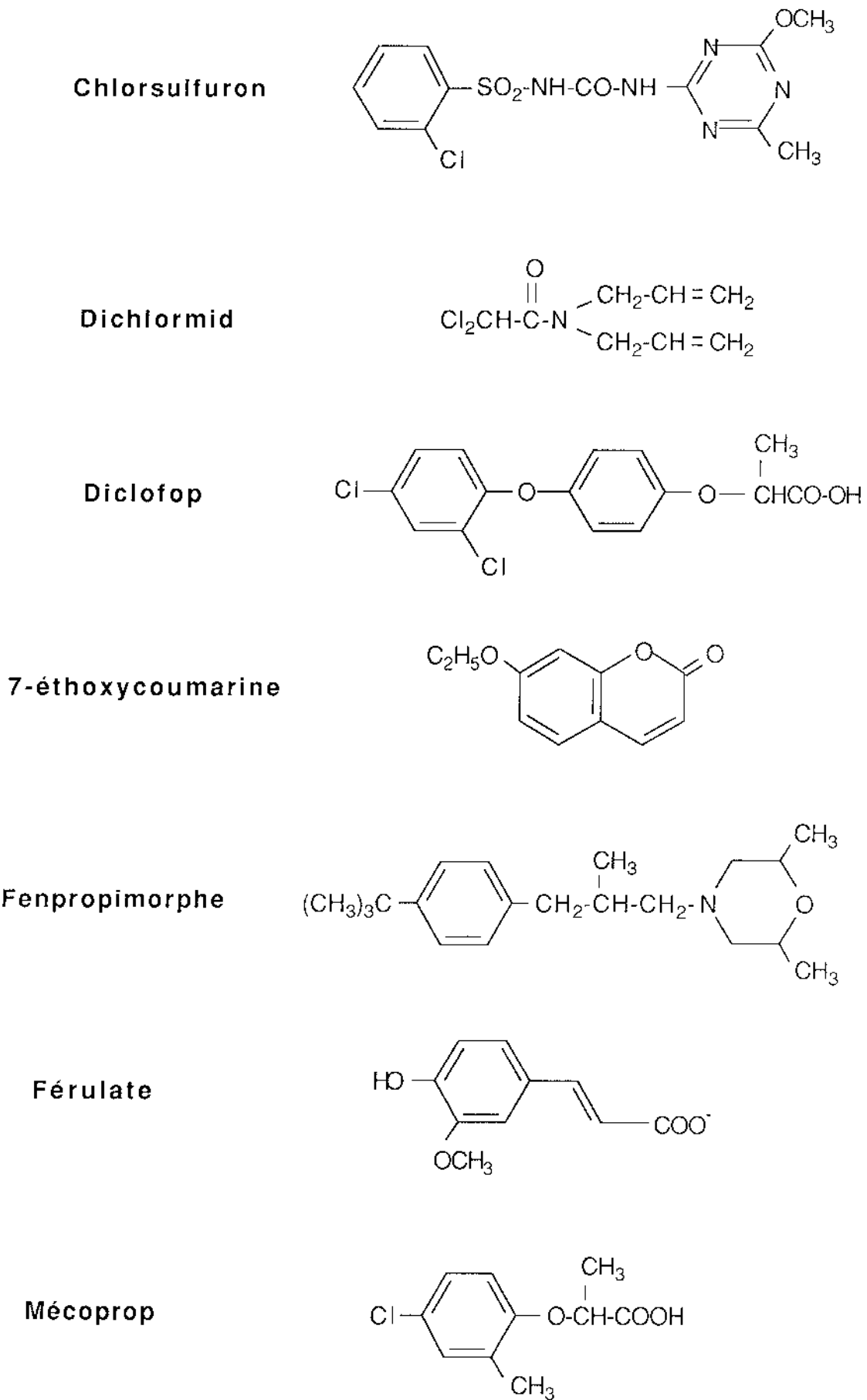


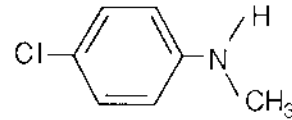
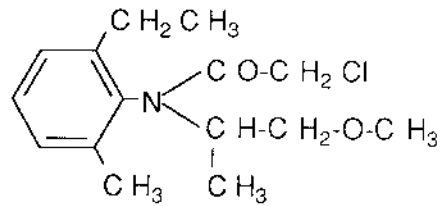
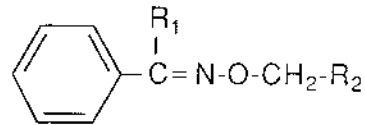
Barban

Benzo[*a*]pyrène

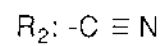
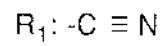
Chlorpropham



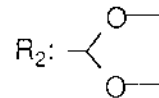
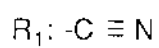


**Para-chloro N-méthylaniline****Métolachlor****Oxyme éthers**

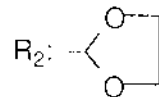
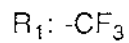
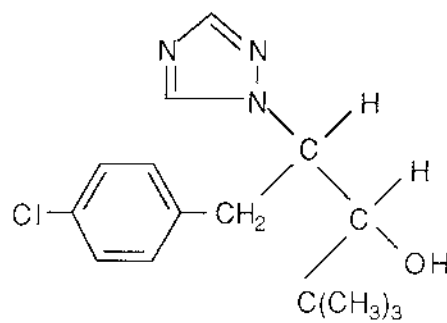
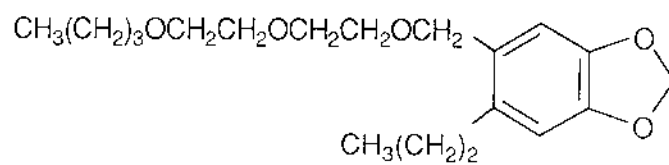
Cyométrinil



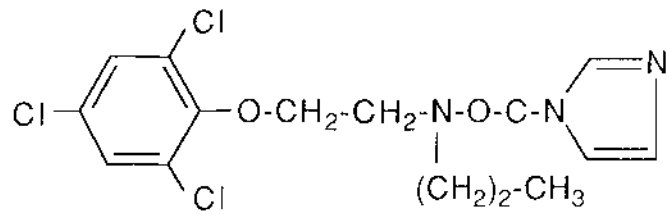
Oxabétrinil



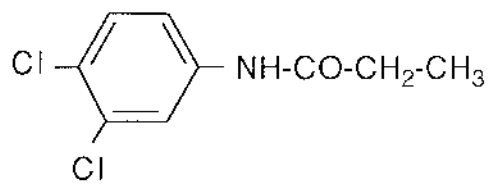
CGA 133 205

**Paclobutrazol****Pipéronyl butoxyde**

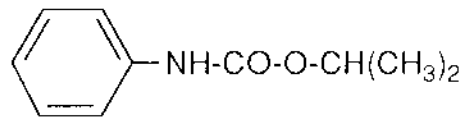
Prochloraz



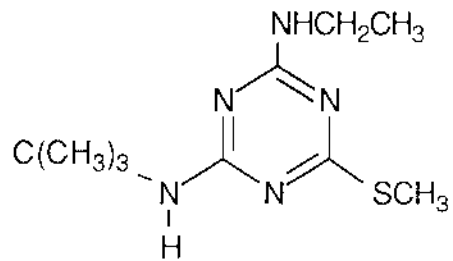
Propanil



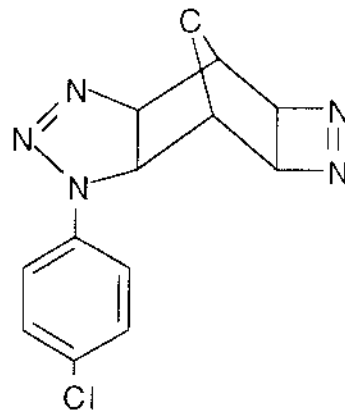
Propham



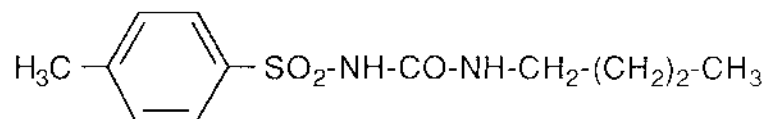
Terbutryne

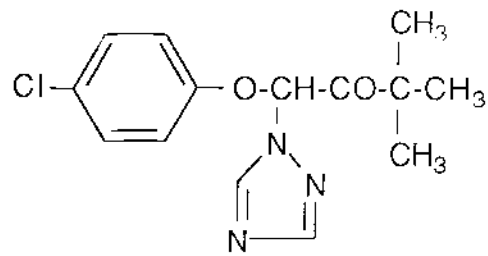
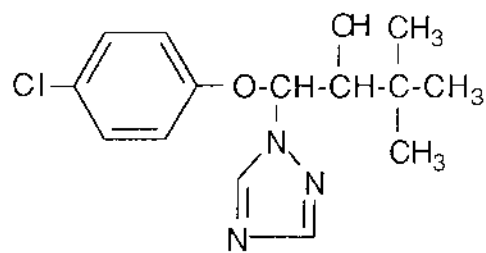
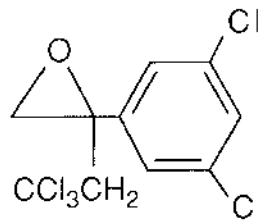


Tetcyclacis



Tolbutamide



**Triadiméfon****Triadiménol****Tridiphane**

**Annexe 4** : Publications et communications à des congrès.

**Mougin C.**, Cabanne F., Canivenc M.-C. and Scalla R. (1990). Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat microsomal enzymes. *Plant Sci.*, **66**, 195-203.

**Mougin C.**, Polge N., Scalla R. and Cabanne F. (1990). Interactions of various agrochemicals with cytochrome P-450-dependent monooxygenases of wheat cells. Soumis pour publication à *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

**Mougin C.**, Cabanne F. and Scalla R. (septembre 1989). Métabolisme du chlorotoluron dans des microsomes de blé. 2<sup>nd</sup> Forum des jeunes Chercheurs en Physiologie Végétale, Strasbourg, France.

**Mougin C.**, Scalla R. and Cabanne F. (septembre 1989). Occurrence of cytochrome P450 mono-oxygenases in the metabolism of chlorotoluron by wheat microsomes. 11th Long Ashton International Symposium, Bristol, Angleterre.

**Mougin C.**, Scalla R. and Cabanne F. (avril 1990). Monooxygenases responsible for the metabolism of chlorotoluron in wheat microsomes. Rencontres Interdisciplinaires de Biochimie N°6, La Londe Les Maures, France.

Cabanne F., **Mougin C.** and Canivenc M.-C. (mai 1990). Monooxygénases du blé et de *Veronica persica* responsables du métabolisme du chlorotoluron. XX Congrès du Groupe Français des Pesticides, Aiguebellette le Lac, France.

**Mougin C.**, Scalla R. and Cabanne F. (août 1990). Monooxygenases responsible for the metabolism of chlorotoluron in wheat microsomes. Seventh IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, Hambourg, RFA.

## Annexe 5

*Plant Science*, 66 (1990) 195–203  
Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

195

## HYDROXYLATION AND *N*-DEMETHYLATION OF CHLOROTOLURON BY WHEAT MICROSOMAL ENZYMES

CHRISTIAN MOUGIN, FERDINAND CABANNE\*, MARIE-CHANTAL CANIVENC and RENE SCALLA

*Laboratoire des herbicides, I.N.R.A., BV 1540, 21034 Dijon (France)*

(Received June 21st, 1989)

(Revision received September 29th, 1989)

(Accepted September 29th, 1989)

*In vitro* metabolism of the herbicide chlorotoluron was studied in various subcellular fractions from suspension-cultured cells of wheat (*Triticum aestivum*) treated with cyometrinil. The highest rates of degradation of herbicide were found in microsomal fractions exhibiting a NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase activity. Membrane fractions supported the ring-methyl hydroxylation and the first *N*-demethylation of chlorotoluron in the presence of molecular oxygen and NADPH. Cell treatment by cyometrinil increased the rates of these two reactions, the activity of lauric acid in-chain hydroxylase and the levels of cytochromes *P*-450. Ring-methyl hydroxylation and *N*-demethylation of chlorotoluron were drastically reduced by *para*-chloromercuribenzoate and by compounds draining electrons from NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase. Ring-methyl hydroxylase was also strongly inhibited by CO, with partial reversion by light. Combination of these data allow to postulate that ring-methyl hydroxylase of wheat belongs to the family of cytochrome *P*-450 monooxygenases. In contrast, the *N*-monodemethylated metabolite could also be formed in the presence of cumene hydroperoxide, and the *N*-demethylase activity was not affected by CO. These distinctive properties still raise some questions about the nature of the monooxygenase(s) involved in the first *N*-demethylation of chlorotoluron in wheat cells.

**Key words:** cytochrome *P*-450; chlorotoluron; hydroxylase; *N*-demethylase; cyometrinil; *Triticum aestivum*

### Introduction

Hydroxylation and *N*-dealkylation reactions are frequently involved in the primary metabolism of pesticides in plants. As they usually lead to less or non-toxic metabolites, they contribute to the tolerance of plants towards herbicides and often play a determining role in selectivity between crops and weeds [1,2].

Several reports suggest that hydroxylation and *N*-demethylation of herbicides are mediated by monooxygenases, but until now, direct experimental evidence for the involvement of cyto-

chromes *P*-450 is scanty. There are indications from *in vitro* studies that *N*-demethylation of monuron (1-[4-chlorophenyl]-3,3-dimethylurea) in cotton [3], and chlorotoluron (1-[3-chloro-*P*-tolyl]-3,3-dimethylurea) in Jerusalem artichoke tubers [4] are supported by NAD(P)H dependent cytochrome *P*-450 monooxygenases. Aryl hydroxylation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and of diclofop (2-[4-(2, 4-dichlorophenoxy)phenoxy]propanoate) were also reported in cucumber, and wheat microsome preparations, respectively [5,6].

Moreover, the role of microsomal monooxygenases is suggested by the demonstration that oxidative metabolism of chlorotoluron in wheat plants and cell cultures is sensitive to various cytochrome *P*-450 inhibitors such as paclobutrazol, tetcyclacis and 1-aminobenzotriazole (ABT) [7,8], although ABT has been reported to also inhibit other types of monooxygenases [9]. Conversely, herbicide catabolism can be stimulated in cell cultures by treat-

\*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IC-LAH, lauric acid in-chain hydroxylase (9-, 10- and 11-hydroxylating) (EC 1.14.14.-); CA4H, *trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase (EC 1.14.14.-); ABT, 1-aminobenzotriazole; DMSO, dimethyl sulfoxide; *P*-CMB, *para*-chloromercuribenzoate; DCP, 2',5'-dichlorophenolindophenol.



## Annexe

196

ments with compounds such as cyometrinil ( $\alpha$ -[(cyanomethoxy)imino]benzeneacetonitrile), dichlorimid-(2,2-dichloro-*N,N*-di-2-propenylacetamide) and 2,4-D [8,10], although this is usually considered to be due to elevated levels of another detoxification system, glutathione-glutathione transferase [11].

This paper reports an *in vitro* study of monooxygenases implicated in the metabolism of chlorotoluron in wheat cell cultures treated with cyometrinil. The results indicate that the enzyme responsible for the ring-methyl hydroxylation of the herbicide probably belongs to the group of cytochrome *P*-450 monooxygenases. The *N*-demethylase activity appears to be catalyzed, at least in part, by another *P*-450 monooxygenase system.

### Materials and Methods

#### *Cell cultures and treatments*

Achlorophyllous wheat cells (*Triticum aestivum* L., var. 'Koga II') were routinely cultivated as previously described [8]. Before the experiments, 4–8-day-old suspensions were subcultured at an inoculum density of 4 mg dry wt./ml. After 4 days of growth, the cells were put in fresh culture medium containing 400  $\mu$ M cyometrinil (60 nmol/mg dry wt), except for one series of experiments (Table II). Microsomal fractions were isolated 3 days later.

#### *Preparation of microsomes*

All experiments were carried out at 4°C. The cultures were filtered through a stainless steel filter and 50–60 g (fresh wt.) of cells were ground without sand in a mortar for 1 min in 200 ml of grinding buffer containing 0.1 M, potassium phosphate (pH 7.5), 20% (w/v) glycerol, 20 mM ascorbic acid, 1 mM KCN, 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride and 10% (w/w) insoluble Polyclar AT. The crude extract was filtered through two layers of cheesecloth and centrifuged at 10 000  $\times g$  (rotor Beckman JA14) for 25 min. After centrifuging the supernatant at 100 000  $\times g$  (Beckman 45Ti) for 45 min, the pellets were resuspended in 50 ml of 0.1 M phosphate buffer containing 20% (w/v) glycerol, and sedimented again. The washed pellets, resuspended in 3 or 4 ml of 0.1 M phosphate buffer containing 30% (w/v) glycerol, were referred to as the microsomal

fraction. The protein concentration in that fraction was 2–4 mg/ml. Microsomes were stored at –80°C until use, without apparent loss of activity over several weeks.

#### *Preparation of subcellular fractions*

After grinding the cells in buffer without KCN, the filtered homogenate was submitted to three centrifugation steps: 5 min at 1000  $\times g$ , 25 min at 10 000  $\times g$  and 45 min at 100 000  $\times g$ . The resulting pellets were resuspended in 0.1 M potassium phosphate buffer containing 30% (w/v) glycerol, and referred to as  $C_1$ ,  $C_{10}$  and  $C_{100}$  pellets.

#### *Enzymatic assays*

Lauric acid in-chain-hydroxylase (IC-LAH) activity was assayed as described by Salaün et al. [12]. Activities were estimated from the sum of the 9-, 10- and 11-hydroxy laurate metabolites formed (Salaün, pers. comm.). The concentration of lauric acid in incubation medium was 100  $\mu$ M.

Cinnamic acid 4-hydroxylase (CA4H) was determined according to Salaün et al. [12], with a cinnamic acid concentration of 200  $\mu$ M in the assay medium. Reaction products were analyzed by reversed phase-HPLC (Waters) with a Guard-Pack precolumn module and a  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  column (8 mm  $\times$  10 cm, 4  $\mu$ m). *para*-Coumaric and *trans*-cinnamic acids were separated in acetonitrile/water/acetic acid (40:60:0.2, by vol) (flow rate 1 ml/min). Radioactivities associated with the peaks were detected with a solid scintillation counter (Ramona D, Isomess), collected in 10 ml of Dynagel (Baker) and estimated by liquid scintillation counting (Beckman LS 7500).

Formation of ring-methyl hydroxylated chlorotoluron and of *N*-monodemethylated chlorotoluron, were followed at 25°C. The reaction mixture, adjusted to a final volume of 200  $\mu$ l with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) usually contained 16.6 kBq of [carbonyl- $^{14}$ C]chlorotoluron (440 kBq/mmol) with nonlabelled herbicide to a final concentration of 500  $\mu$ M, 1 mM NADPH, 6.7 mM glucose 6-phosphate, 2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 0.25–0.40 mg microsomal proteins. The labelled herbicide was synthesized according to Gilbert and Sorma [13], then purified by TLC and HPLC. After a 2 min preincubation at

## Annexe

197

25°C, the enzymatic reaction was initiated by adding NADPH. It was stopped after 30 min with 20  $\mu$ l of 4N HCl, then diluted with 5 ml water and loaded on a C<sub>18</sub> cartridge (Sep-pak, Waters). After washing the cartridge with 5 ml water, approximately 70% of the remaining chlorotoluron was eluted with 15 ml *n*-hexane/chloroform (9:1, v/v). The residual herbicide and its metabolites were then eluted with 8 ml methanol. Extracts were evaporated to about 100  $\mu$ l and analyzed on TLC silica plates as described [8]. After scraping the spots, radioactivity was quantified by liquid scintillation counting. Alternatively, 100- $\mu$ l fractions were directly injected in reversed phase-HPLC in conditions indicated above. Controls containing the incubation medium without microsomal proteins were also analyzed.

For assay of NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase activity, the mixture contained 50  $\mu$ M oxidized cytochrome *c*, 600  $\mu$ M NADPH, 2.6 mM glucose 6-phosphate, 3 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1 mM KCN and 0.15–0.20 mg proteins. It was adjusted to a final volume of 0.6 ml with 0.1 M (pH 7.5) potassium phosphate buffer. Enzymatic activity was monitored from the increase of absorbance at 550 nm at 25°C for 2 min, using a molar extinction coefficient of 18.5/mM/cm at 550 nm for horse heart cytochrome *c*. Controls were not supplemented with NADPH and the regenerating system.

The assay mixture for cytochrome *c* oxydase contained 50  $\mu$ M cytochrome *c* reduced with dithionite, 0.15–0.20 mg proteins and 0.1 M potassium phosphate buffer to a final volume of 0.7 ml. Controls were supplemented with 1 mM KCN. Reaction rates were estimated from the decrease of absorbance at 550 nm at 25°C for 5 min.

### *Inhibition studies*

In order to examine the role of oxygen, reaction media were degassed under vacuum at 4°C for 15 min. The controls and assays media were then bubbled with air or nitrogen for 5 min. NADPH was added and the mixtures incubated at 25°C for a further 30 min period.

Inhibition by carbon monoxide was followed by bubbling assay media without NADPH at 4°C for 15 min in darkness with air or a CO/air (50:50, v/v) mixture. After adding NADPH, the mixtures were

incubated in closed vessels for an additional 15 min period, either in darkness or under illumination with white light from a 150 W lamp at a distance of 15 cm in a water bath set at 25°C.

Effect of *para*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB) was evaluated by incubating microsomes with the inhibitor and chlorotoluron at 4°C for 5 min. Enzymatic reactions were initiated by addition of NADPH, and the mixtures incubated for 30 min at 25°C.

A different protocol was used to study enzyme inactivation by ABT. Microsomal preparations were incubated at 25°C for 10 min with NADPH or NADPH plus ABT, in the absence of chlorotoluron. Then, the enzymatic reactions were started by addition of the herbicide, and the mixtures incubated for a further 15 min period.

### *Other methods*

Hemoprotein spectra were recorded at 15°C with an Uvikon 860 spectrophotometer. Quantitative determinations were done by the method of Omura and Sato [14], using extinction coefficients of 91/mM/cm and 185/mM/cm for cytochromes *P*-450 and *b*<sub>5</sub>, respectively. Microsomal proteins were estimated according to Bradford [15] with bovine serum albumin as a standard. Cyometrinil, ABT, *p*-CMB and cumene hydroperoxide were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Final solvent concentrations were < 0.1 or 1% in culture and incubation media, respectively. Results are means of at least two experiments  $\pm$  S.D. All enzymatic activities are expressed in pmol/min/mg of microsomal protein.

## Results

### *Chlorotoluron metabolism and subcellular distribution of enzymatic activities*

Aerobic incubation of microsomes with [<sup>14</sup>C]chlorotoluron and NADPH led to the formation of two labelled metabolites more polar than the herbicide. They were identified as the ring-methyl hydroxylated and the *N*-monodemethylated derivatives by TLC co-chromatography with authentic references (Fig. 1) and by reversed phase-HPLC.

The formation of these metabolites was examined in the fractions resulting from differential centrifugation of cell homogenates. As activities found in the

## Annexe

198

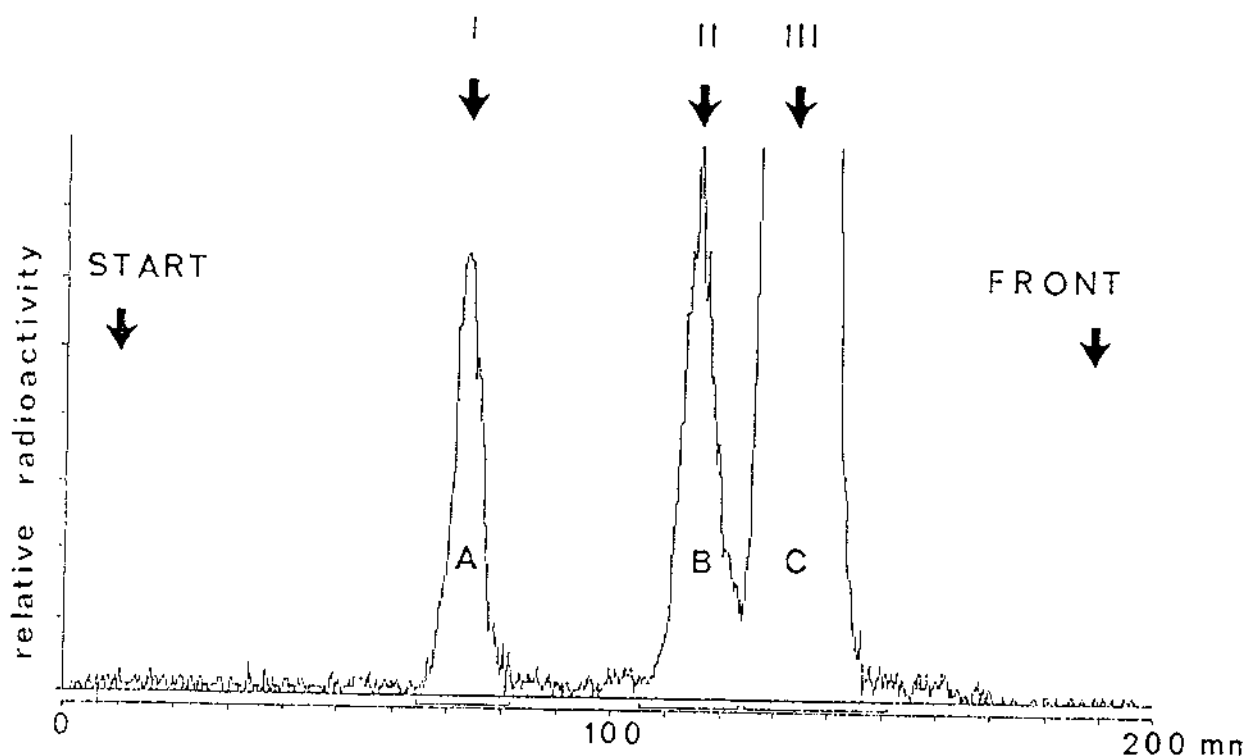


Fig. 1. Thin-layer radiochromatogram of metabolites (A,B) formed after 1-h incubation of wheat microsomes plus chlorotoluron (C). Experimental conditions are described in Materials and Methods. Arrows refer to the chromatographic mobility of standards: I, ring-methyl hydroxylated chlorotoluron; II, *N*-monodemethylated chlorotoluron; III, chlorotoluron.

soluble fractions were very low, even in extracts from cyometrinil treated cells, the study was done only with the  $C_1$ ,  $C_{10}$  and  $C_{100}$  pellets, corresponding to cell walls and nuclear debris ( $C_1$ ), mitochondrial and etioplast fraction ( $C_{10}$ ), and microsomal fraction ( $C_{100}$ )

Both the highest relative and specific activities of

chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase were associated with the microsomal pellet (Table I). However, these activities were also present in the  $C_{10}$  pellet (Table I), probably as a result of some aggregation between mitochondria and microsomes [16]. NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase activity was also associated with

Table I. Subcellular distributions of chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase, NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase and cytochrome *c* oxidase. Relative activities are expressed as % of total activities found in pellets  $C_1 + C_{10} + C_{100}$ . Specific activities are given in pmol/min/mg for ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase of chlorotoluron and nmol/min/mg for NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase and cytochrome *c* oxidase.

	Relative activities			Specific activities		
	$C_1$	$C_{10}$	$C_{100}$	$C_1$	$C_{10}$	$C_{100}$
Ring-methyl hydroxylase	2.9 ± 0.2	20.2 ± 0.5	76.9 ± 1.1	2.4 ± 0.3	2.0 ± 0.1	23.9 ± 0.6
<i>N</i> -Demethylase	0.1 ± 0.1	30.5 ± 1.4	69.4 ± 1.3	0.1 ± 0.1	4.4 ± 0.4	30.6 ± 0.6
NADPH-cyt. <i>c</i> reductase	1.6 ± 0.1	32.8 ± 1.9	65.6 ± 1.9	5.8 ± 0.3	14.7 ± 1.2	90.0 ± 0.7
Cytochrome <i>c</i> oxidase	7.2 ± 1.1	91.9 ± 1.4	0.9 ± 0.2	88.0 ± 20.1	138.6 ± 1.3	4.0 ± 1.3

## Annexe

199

**Table II.** Effects of a cyometrinil treatment on enzymatic NADPH-dependent activities and cytochrome contents of wheat cell microsomes. CPUH, chlorotoluron ring-methyl hydroxylase; CPUDM, chlorotoluron *N*-demethylase.

	Enzymatic activities (pmol/min/mg)				Cytochromes (pmol/mg)	
	CPUH	CPUDM	IC-IAH	CA4H	<i>b</i> <sub>5</sub>	<i>P</i> -450
Controls	22.0 ± 0.7 (100)	6.6 ± 0.9 (100)	382.0 ± 22.0 (100)	1540.0 ± 41.0 (100)	377.0 ± 12.5 (100)	184.0 ± 37.5 (100)
Cyometrinil	33.8 ± 1.8 (155)	22.2 ± 0.6 (329)	545.0 ± 13.0 (143)	1460.0 ± 98.0 (95)	388.0 ± 10.5 (103)	329.0 ± 11.0 (179)

the microsomal pellet, and in that case too, a proportion of this enzyme was detected in the C<sub>10</sub> pellet. Cytochrome *c* oxidase, a typical marker of mitochondria, was essentially found in the C<sub>10</sub> pellet.

#### Effects of cyometrinil on the metabolism of chlorotoluron

Microsomes isolated from cells 3 days after subculturing catalyzed the ring-methyl hydroxylation and *N*-demethylation of chlorotoluron at rates ranging from 21 to 23 pmol/min/mg, and from 6 to 8 pmol/min/mg, respectively. When cells were grown for the same time in the presence of 400 μM cyometrinil, hydroxylase and *N*-demethylase activities were stimulated 1.6- and 3.3-fold, respectively (Table II). Cyometrinil differentially affected IC-LAH and CA4H, both known as cytochrome *P*-450

monooxygenases. Activity of IC-LAH was stimulated 1.4-fold, while that of CA4H was not affected (Table II). Microsomes from untreated cells contained 377 and 184 pmol/mg protein of cytochrome *b*<sub>5</sub> and cytochromes *P*-450, respectively (Table II). These levels are comparable to those already found by others in microsomes of various plant species [17]. Cytochrome *P*-450 content of microsomes was increased 1.8-fold by cyometrinil treatment, whereas that of cytochrome *b*<sub>5</sub> was not affected.

#### Cofactors and oxygen requirements

Ring-methyl hydroxylation and *N*-monodemethylation of chlorotoluron in microsomes required NADPH as a cofactor (Table III). No oxidations were detected in assays treated with 2% TCA just before incubation (not shown). The highest activities

**Table III.** Cofactors and oxidant forms requirements for chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase activities. Activities are expressed as % of maximal activities of controls. The control values were: \*32.8, \*\*28.1, †30.8, ‡36.3, §25.2, ¶27.9 pmol/min/mg.

Incubation conditions	Conc.	% of maximal activities	
		Hydroxylase	<i>N</i> -Demethylase
Complete medium (NADPH 1.0 mM)		100.0 <sup>*</sup> ± 0.5	100.0 <sup>**</sup> = 0.5
NADPH	1.0 mM <sup>a</sup>	60.7 ± 0.1	77.1 ± 0.0
NADPH	0.5 mM	62.6 ± 0.3	54.4 ± 0.1
NADPH	0.1 mM	44.2 ± 0.1	48.8 ± 1.2
no NADPH		12.8 ± 0.1	11.5 ± 0.1
NADH	0.5 mM <sup>a</sup>	7.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Dithionite	1.0 mM	9.7 ± 0.5	13.0 ± 0.7
Ascorbate	1.0 mM	11.1 ± 0.3	22.2 ± 1.7
Complete medium (NADPH 1.0 mM)		100.0 <sup>†</sup> ± 2.9	100.0 <sup>‡</sup> = 3.6
Cumene hydroperoxide	1.0 mM	30.7 ± 2.9	110.2 ± 1.1
Hydrogen peroxide	1.0 mM	34.9 ± 1.4	0.0
Complete medium (NADPH 1.0 mM)		100.0 <sup>§</sup> ± 11.8	100.0 <sup>¶</sup> ± 8.7
N <sub>2</sub>		24.1 ± 2.2	16.3 ± 0.1

<sup>a</sup>Without cofactor regenerating system.

## Annexe

200

were obtained when the incubation media were supplemented with a NADPH-regenerating system. NADH was ineffective when given alone, as were other reductants such as sodium dithionite or ascorbic acid. Incubation in an atmosphere of nitrogen showed that molecular oxygen was necessary for the NADPH dependent activities (Table III). Conversely, cumene hydroperoxide, but not hydrogen peroxide, was also able to support a significant *N*-demethylase activity. Some residual metabolism could be detected in the absence of any external cofactor or under  $N_2$  conditions (Table III).

*Properties of chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and N-demethylase*

The rates of microsomal ring-methyl hydroxylation and *N*-demethylation of chlorotoluron were almost linear up to 40 min for protein concentrations between 1.15 and 2.55 mg/ml, at pH 7.5, 25°C, and at a chlorotoluron concentration of 500  $\mu$ M (not shown).

The hydroxylase activity did not follow Michaelis-Menten kinetics (not shown) in respect to chlorotoluron concentration, and a non-linear relation was obtained in Eadie-Hoffstee plots (Fig. 2). Two apparent  $K_m$  values were calculated equal to 50 and 400  $\mu$ M. These estimates are comparable to those

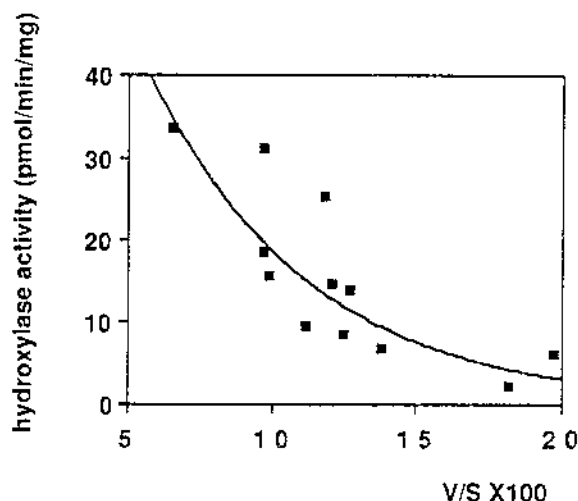


Fig. 2. Eadie-Hoffstee plot of chlorotoluron ring-methyl hydroxylase activity. Chlorotoluron concentrations ranged from 12 to 1000  $\mu$ M.

previously found in the cases of aminopyrine and chlorotoluron *N*-demethylases in Jerusalem artichoke microsomes [4,16]. Numerical values of the *N*-demethylase activities were too variable to allow a meaningful analysis.

*Effects of carbon monoxide on chlorotoluron metabolism*

Activities of ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase were higher in the light than in the dark, and exhibited different sensitivities towards CO (Table IV). CO affected hydroxylase activity, its inhibition amounting to 55% in the dark and 43% in the light. The calculated partition coefficients between CO and oxygen were  $K_{light} = 5.91$  and  $K_{dark} = 3.68$ . They were in the range of values found in Jerusalem artichoke tubers for  $\Delta^9$ -unsaturated lauric acid epoxidase, another cytochrome *P*-450 activity [18]. The rate of light reversion was 35% for hydroxylase activity. In contrast, *N*-demethylase activity was not inhibited by CO.

*Effects of various inhibitors on chlorotoluron hydroxylase and N-demethylase*

ABT, a suicide substrate of cytochrome *P*-450s [19] and of methiocarb sulfoxidase, a peroxygenase-like enzyme [9], strongly inhibited chlorotoluron ring-methyl hydroxylation and *N*-Demethylation (Table V). *N*-Demethylation was less affected than hydroxylation, as previously observed in vivo in plants [7,20] and cell cultures [8]. Both activities were strongly inhibited by *p*-CMB (Table V), an inhibitor of the NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase [21,22].

Menadione, dichlorophenolindophenol (DCPIP)

Table IV. Effects of light and carbon monoxide on chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase activities.

	Enzymatic activities (pmol/min/mg)	
	Hydroxylase	<i>N</i> -Demethylase
Dark	21.5 $\pm$ 1.2	20.2 $\pm$ 1.4
Dark + CO(% inhibition)	9.6 $\pm$ 0.9(55.2)	26.3 $\pm$ 2.1
Light	29.0 $\pm$ 0.2	25.2 $\pm$ 0.5
Light + CO(% inhibition)	16.4 $\pm$ 0.1(43.1)	26.0 $\pm$ 2.4
Reversion (%)	(35.1)	

## Annexe

201

**Table V.** Effects of inhibitors on chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase activities. % of inhibition are expressed with respect to control values which were: \*20.9 ± 2.4, \*\*15.4 ± 0.4, †31.5 ± 2.6, \*33.1 ± 2.0 pmol/min/mg.

Inhibitors	Conc.	% of inhibition	
		Hydroxylase	<i>N</i> -Demethylase
ABT	100 μM	73.8 ± 4.6*	56.6 ± 2.0**
<i>p</i> -CMB	500 μM	91.3 ± 1.3†	66.0 ± 5.0*
Menadione	100 μM	99.6 ± 0.1	100.0 ± 0.0
DCPIP	100 μM	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Cytochrome <i>c</i>	20 μM	86.6 ± 3.4	93.7 ± 1.3

and cytochrome *c*, which behave as electron drains from the reductase, drastically inhibited chlorotoluron ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase, in accordance to the postulated involvement of the NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase in both oxidative reactions (Table V).

### Discussion

We previously showed that treatments of wheat cells with cyometrinil were followed by a stimulated degradation of chlorotoluron [8]. Stimulating effects of cyometrinil could also be obtained *in vivo* as reported above. Until recently, it was assumed that herbicide protectants such as dichlorimid and cyometrinil, and herbicide synergists such as tridiphane act by stimulating [23] or inhibiting [24] glutathione-transferase, respectively. There is recent evidence, besides the evidence provided above, that these compounds might also stimulate oxidative degradation of herbicides [10,25,26].

Our results provide the first demonstration of the *in vitro* oxidative metabolism of chlorotoluron by wheat microsomes. The subcellular fraction catalyzes two concurrent reactions, leading to the formation of the ring-methyl hydroxylated and the *N*-monodemethylated herbicide. These derivatives are thus identical to the primary metabolites formed in whole plants. Ring-methyl hydroxylation and *N*-demethylation proceed at comparable rates *in vitro*, while ring-methyl hydroxylation is the major metabolic pathway in plants.

The reactions responsible for the production of the two metabolites are enzymatic. In wheat microsomal fractions, they were associated with sizeable levels of cytochrome *P*-450s, and with various en-

zymes known as markers of endoplasmic reticulum, such as NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase, CA4H and IC-LAH. These last two are cytochrome *P*-450 monooxygenases. The 10000 × *g* pellets, essentially enriched in mitochondria and etioplasts, exhibited low rates of ring-methyl hydroxylase and *N*-demethylase activities, probably originating from contaminating microsomal membranes.

The activity of the ring-methyl hydroxylase exclusively required molecular oxygen and NADPH. It was clearly inhibited by CO and this inhibition was partly reverted by light. It is also very sensitive to *p*-CMB, which blocks thiol groups of the NADPH-cytochrome *P*-450 (cytochrome *c*) reductase, and to alternate electron acceptors such as menadione, DCPIP and cytochrome *c*. Taken together, these data strongly suggest (but do not prove) that ring-methyl hydroxylase belongs to the family of cytochrome *P*-450 monooxygenases. At that point, it would be important to also demonstrate type I binding difference spectra in wheat microsome preparations incubated with chlorotoluron. However, until now, the spectra we have obtained were not fully typical, as reported by others concerning several substrates of plant cytochrome *P*-450 monooxygenases, such as lauric acid incubated with microsomes of Jerusalem artichoke [21], or diclofop acid with microsomes of wheat (Zimmerlin and Durst, pers. comm.)

It is likely that the *N*-demethylase activity of wheat microsomes supplemented with chlorotoluron is also of cytochrome *P*-450 type. Supportive evidence for this hypothesis is provided by the requirement of the reaction for oxygen and NADPH, and the inhibitory effects of *p*-CMB, menadione, DCPIP

## Annexe

202

and cytochrome *c*. Although inhibition of *N*-demethylase by ABT does not provide a totally definitive argument, it is worthy to observe that the level of inhibition is of the same range as that found for CA4H, i.e., much higher than that reported for the sulfoxidase of methiocarb [9]. Insensitivity of chlorotoluron *N*-demethylase to CO does not inevitably disprove the *P*-450 hypothesis, because cytochrome *P*-450s of plants have various degrees of sensitivity to CO, as reported about  $\omega$ - and midchain hydroxylation of palmitic acid by bean microsomes [27]. Moreover, a complete insensitivity of a cytochrome *P*-450 to CO has been given in the case of aromatization of androstenedione [28]. The fact that cumene hydroperoxide is able to replace molecular oxygen may indicate that a part of the *N*-demethylase activity could depend on a peroxygenase-type enzyme, similar to that described from pea [29]. Further studies are needed to examine this possibility. However, it has been shown that cytochrome *P*-450 monooxygenases such as *p*-chloro-*N*-methylaniline demethylase from castor bean [30] and avocado [31] can use a hydroperoxide as oxygen donor, so that the question remains open.

In brief, it appears that two microsomal monooxygenases of wheat, exhibiting a drastic difference to CO, are involved in ring-methyl hydroxylation and *N*-demethylation of chlorotoluron. It will be of interest to establish if other herbicides can also be substrates of similar enzymatic systems.

## Acknowledgments

The authors thank Drs. F. Durst and J.P. Salaün for helpful discussions and identification of metabolites of laurate hydroxylase. They are also grateful to Dr. E. Ebert (Ciba-Geigy, Basle) for the generous gift of cyometrinil and metabolite standards.

## References

- 1 R.H. Shimabukuro, Detoxication of herbicides, in: S.O. Duke (Ed), Weed Physiology, Vol. II, CRC Press, 1985, pp. 215-240.
- 2 W.J. Owen, Herbicide detoxification and selectivity, Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds, 1987, pp. 309-318.
- 3 D.S. Frear, H.R. Swanson and F.S. Tanaka, *N*-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: Isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry*, 8 (1969) 2157-2169.
- 4 R. Fonné, Intervention du cytochrome P-450 des végétaux supérieurs dans l'oxydation de composés exogènes: l'aminopyrine et le chlortoluron. Thesis Université Louis Pasteur, Strasbourg 1985
- 5 A.M. Makeev, A.Y. Makoveichuk and D.I. Chkanikov, Microsomal hydroxylation of 2,4- D in plants. *Dokl. Bot. Sci.*, 233 (1977) 36-38.
- 6 J.J. McFadden, D.S. Frear and E.R. Mansager, Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome *P*-450 dependent monooxygenase from wheat, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34 (1989) 92-100.
- 7 F. Cabanne, D. Huby, P. Gaillardon, R. Scalla and F. Durst, Effect of the cytochrome *P*-450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 28 (1987) 371-380.
- 8 M.C. Canivenc, B. Cagnac, F. Cabanne and R. Scalla, Induced changes of chlorotoluron metabolism in wheat cell suspension cultures, *Plant Physiol. Biochem.*, 27 (1989) 193-201.
- 9 E. Blee and F. Durst, Hydroperoxide-dependent sulfoxidation catalyzed by soybean microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 254 (1987) 43-52.
- 10 P.B. Sweetser, Safening of sulphonylurea herbicides to cereal crops: Mode of herbicide antidote action, *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds*, 1985, pp. 1147-1154.
- 11 M.M. Lay and J.E. Casida, Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxication by elevating corn root glutathione content and glutathione-S-transferase activity, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 6 (1976) 442-456.
- 12 J.P. Salaün, A. Simon and F. Durst, Specific induction of lauric acid hydroxylase by clofibrate, diethylhexyl-phthalate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in higher plants. *Lipids*, 21 (1986) 776-779.
- 13 E.E. Gilbert and G.J. Sorma, U.S. Patent 2,729,677; January 3; assigned to Allied Chemical and Dye Corporation, Agricultural Chemicals Manufacture, 52 (1956) 173-176.
- 14 T. Omura and R. Sato, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2370-2385.
- 15 M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- 16 R. Fonné-Pfister, A. Simon, J.P. Salaün and F. Durst, Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome *P*-450 in aminopyrine *N*-demethylation. *Plant Sci.*, 55 (1988) 9-20.
- 17 J.P. Salaün, I. Benveniste, R. Fonné, B. Gabriac, D. Reichhart, A. Simon and F. Durst, Hydroxylation microsomales de l'acide laurique catalysées par le cytochrome *P*-450 chez les plantes supérieures. *Physiol. Veg.*, 20 (1982) 613-621.
- 18 J.P. Salaün, D. Weissbart, F. Durst, P. Pflieger and C. Mioskowski, Epoxidation of *cis* and *trans*  $\Delta^6$ -unsaturated lauric acids by a cytochrome *P*-450-dependent system from higher plant microsomes. *FEBS Lett.*, 246 (1989) 120-126.

## Annexe

- 19 P.R. Ortiz de Montellano and B.A. Mico, Destruction of cytochrome *P*-450 by allylisopropylacetamide is a suicidal process. *Arch. Biochem. Biophys.*, 206 (1981) 43-50 .
- 20 M. Gonneau, B. Pasquette, F. Cabanne and R. Scalla, Metabolism of chlortoluron in tolerant species: possible role of cytochrome *P*-450 mono-oxygenase. *Weed Res.*, 28 (1988) 19-25.
- 21 J.P. Salaün, I. Benveniste, D. Reichhart and F. Durst, A microsomal (cytochrome *P*-450)-linked lauric acid monooxygenase from Jerusalem artichoke tuber tissues. *Eur. J. Biochem.*, 90 (1978) 155-159.
- 22 K.M. Madyastha and C.J. Coscia, Detergent-solubilized NADPH-cytochrome *c* (*P*-450) reductase from the higher plant, *Catharanthus roseus*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 2419-2427.
- 23 J.R.C. Leavitt and D. Penner, The in vitro conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (1979) 533-536.
- 24 G.L. Lamoureux and D.G. Rusness, Tridiphane [2-(3,5-Dichlorophenyl)-2-(2,2-trichloroethyl)oxirane] an atrazine synergist: enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 26 (1986) 323-342.
- 25 K.K. Hatzios, Effects of CGA-43089 on response of sorghum (*Sorghum bicolor*) to metolachlor combined with ozone or antioxidants. *Weed Sci.*, 31 (1983) 280-284.
- 26 J.C. Caseley, L. Copping and D. Mason, Control of herbicide resistant black-grass with herbicide mixture containing tridiphane. 11th Long Ashton International Symposium (1989) 563.
- 27 C.L. Soliday and P.E. Kolattukudy, Midchain hydroxylation of 16-hydroxypalmitic acid by the endoplasmic reticulum fraction from germinating *Vicia faba*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 188 (1978) 338-347.
- 28 E.A. Thompson Jr. and P.K. Siiteri, The involvement of human placental microsomal cytochrome *P*-450 in aromatization. *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 5373-5378.
- 29 A. Ishimaru and I. Yamasaki, Hydroperoxide-dependent hydroxylation involving "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reducible hemoprotein" in microsomes of pea seeds. *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 6118-6124.
- 30 O. Young and H. Beevers, Mixed function oxidases from germinating Castor bean endosperm. *Phytochemistry*, 15 (1976) 379-385.
- 31 D.P. O'Keefe and K.J. Leto, Cytochrome *P*-450 from the mesocarp of Avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.*, 89 (1989) 1141-1149.