

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Evaluation pharmacologique de modulateurs de la cascade de l'acide arachidonique

Vastersaegher, Caroline

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

I. INTRODUCTION

I.1. Biosynthèse des eicosanoïdes

Le terme eicosanoïde (du grec εικοσα, vingt) définit une vaste famille de médiateurs lipidiques biologiquement actifs issus du métabolisme d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone comme l'acide arachidonique. Les principaux représentants de cette famille sont les leucotriènes et les prostanoïdes dont font partie les prostaglandines et les thromboxanes. Les eicosanoïdes sont très répandus et possèdent une large gamme d'effets biologiques tant au niveau physiologique que physiopathologique. Leur biosynthèse, étroitement régulée, est déclenchée en réponse à de nombreux stimuli qui peuvent être de nature physique, chimique ou hormonale.

I.1.1. Les acides gras précurseurs

Les eicosanoïdes sont formés à partir d'acides gras essentiels trouvés dans l'alimentation. Une fois ingérés et digérés, ces acides gras sont stockés dans les membranes cellulaires sous la forme de glycérophospholipides. Ceux-ci sont dits amphiphatiques car ils possèdent deux zones de polarité opposée. Les acides gras liés au glycérol en positions 1 et 2 par une liaison ester constituent la partie hydrophobe du glycérophospholipide. La tête hydrophile est quant à elle formée par le groupement phosphate en position 3 du glycérol et le groupement polaire qui y est greffé (principalement la choline, l'éthanolamine, la sérine ou l'inositol, donnant respectivement les phosphatidylcholines, les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylsérines et les phosphatidylinositols) (Figure I-1). La capacité des glycérophospholipides à former des membranes est liée à cette structure moléculaire unique. En effet, ils s'organisent spontanément en bicouche ; leur tête polaire étant orientée vers l'extérieur en contact avec le milieu aqueux, leur queue hydrophobe étant située à l'intérieur de la bicouche.

Les trois principaux acides gras précurseurs de la synthèse des eicosanoïdes sont l'acide eicosatriénoïque (acide dihomo- γ -linoléique), l'acide eicosatétraénoïque (acide arachidonique) et l'acide eicosapentaénoïque. Ces acides gras estérifiant le glycérol en position 2 possèdent, tous trois, 20 atomes de carbone mais diffèrent quant au nombre et à la position des doubles liaisons. Ils génèrent respectivement les prostaglandines et thromboxanes des séries 1, 2 et 3 (Figure I-2).

Chez les mammifères, en raison de son abondance au sein des membranes biologiques, l'acide arachidonique est le substrat majeur de la biosynthèse des eicosanoïdes. Cet acide gras précurseur provient directement des apports alimentaires ou résulte de modifications de l'acide linoléique, un autre acide gras essentiel à 18 atomes de carbone nommé vitamine F (Figure I-3).

I.1.2. Libération de l'acide arachidonique

Comme cela a été signalé précédemment l'acide arachidonique est stocké au niveau des membranes cellulaires sous forme de glycérophospholipides. Ce précurseur doit donc être

libéré de sa liaison au glycérol afin de pouvoir servir de substrat à la biosynthèse des eicosanoïdes. Cette première étape est réalisée par des enzymes, les phospholipases, en réponse à toute une série de stimuli.

Il existe différentes familles de phospholipases : les phospholipases A₁, les phospholipases A₂, les phospholipases C et les phospholipases D. Les phospholipases A₁ et A₂ libèrent les acides gras estérifiant l'hydroxyle du glycérol situé en positions 1 et 2, respectivement. Les phospholipases C et D hydrolysent quant à elles les liaisons esters phosphoriques (Figure I-4).

En raison de la présence de l'acide arachidonique en position 2 du glycérol, les phospholipases A₂ (PLA₂) sont majoritairement impliquées dans la biosynthèse des eicosanoïdes. Avant 1986, on pensait qu'il existait une seule PLA₂ présente abondamment dans le liquide pancréatique. Par la suite, plusieurs familles de PLA₂ ont été découvertes. Parmi celles-ci, on retrouve les PLA₂ dites sécrétoires (sPLA₂), les PLA₂ indépendantes du calcium (iPLA₂) et les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) (Murakami et Kudo, 2004).

L'isoenzyme α de la cPLA₂ (cPLA₂ α) est essentiellement responsable de la libération de l'acide arachidonique. En effet, elle hydrolyse de manière préférentielle les glycérophospholipides estérifiant l'acide arachidonique en position 2. Cette enzyme est présente sous forme inactive dans la plupart des cellules et tissus. Son activation et sa translocation du cytosol vers les membranes du réticulum endoplasmique et du noyau sont médiées par une augmentation de calcium intracellulaire et par des phosphorylations déclenchées par divers stimuli (Hirabayashi et Shimizu, 2000).

En raison de leur rôle clé dans la biosynthèse des eicosanoïdes, les phospholipases A₂ sont impliquées dans les nombreux processus physiologiques et physiopathologiques régulés par ces médiateurs lipidiques. L'inhibition de ces enzymes présente dès lors un réel intérêt puisqu'elle engendre une diminution de la libération des acides gras précurseurs, avec pour conséquence une réduction de la synthèse des eicosanoïdes. Parmi les molécules capables de réduire l'activité des phospholipases A₂, se trouvent les glucocorticoïdes tels la cortisone et la dexaméthasone. Ces molécules exercent leurs effets anti-inflammatoires indirectement en stimulant la synthèse de lipocortines qui sont des protéines capables d'inhiber les phospholipases A₂.

I.1.3. Métabolisme de l'acide arachidonique par voies enzymatiques

Une fois libéré des phospholipides membranaires sous l'action catalytique des phospholipases, l'acide arachidonique peut être le substrat d'enzymes impliquées dans trois voies métaboliques différentes : les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les époxygénases (Figure I-5). La voie des cyclooxygénases aboutit à la formation des prostaglandines et du thromboxane A₂ (Hamberg et al., 1975 ; Vane, 1971). La voie des lipoxygénases mène aux leucotriènes (Samuelsson, 1983) et aux lipoxines (Serhan et al., 1984). La voie des époxygénases ou enzymes à cytochrome P₄₅₀ génère quant à elle des époxydes (Fitzpatrick et Murphy, 1988). Nous détaillerons ici la voie des cyclooxygénases qui nous intéresse plus particulièrement.

I.1.3.1. La voie des cyclooxygénases

Le métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (COXs), également dénommées endoperoxyde H synthétases, aboutit à la formation des prostaglandines et du thromboxane A_2 . Il existe au moins deux isoformes de COXs dont les propriétés seront détaillées ultérieurement (voir I.2.1 à I.2.3).

Dans un premier temps, l'activité cyclooxygénase des COXs catalyse l'oxydation et la cyclisation de l'acide arachidonique, générant ainsi la prostaglandine G_2 (PGG_2). Cet endoperoxyde instable est alors rapidement converti par l'activité peroxydase des COXs en prostaglandine H_2 (PGH_2). Dans un second temps, la PGH_2 ainsi formée servira de substrat à diverses enzymes spécifiques pour former le thromboxane A_2 et les prostaglandines D_2 , E_2 , I_2 (prostacycline) et $F_{2\alpha}$ (Figure I-6).

Si les intermédiaires PGG_2 et PGH_2 peuvent être synthétisés dans la plupart des cellules, leur devenir est fonction de la présence et de l'abondance relative des réductases, synthétases et isomérases spécifiques au sein de ces cellules. Ceci permet d'expliquer la spécificité cellulaire pour la biosynthèse de certains prostanoides. Ainsi par exemple, les cellules endothéliales, riches en prostacycline synthétase, produisent principalement la prostacycline tandis que les plaquettes sanguines riches en thromboxane synthétase sont majoritairement le siège de la synthèse de thromboxane A_2 .

I.1.3.2. Les prostanoides

Les prostaglandines et thromboxanes sont regroupés sous le terme « prostanoides » en raison de leur structure chimique apparentée à l'acide prostanoidique, une structure théorique composée d'un noyau cyclopentane et de deux chaînes hydrocarbonées (Figure I-7).

Si les prostanoides possèdent des structures chimiques proches, ils médient des effets biologiques extrêmement variés. Une fois synthétisés, ils sont libérés à l'extérieur des cellules et agissent par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, exprimés soit par la cellule émettrice (action autocrine), soit par les cellules voisines (action paracrine) (Figure I-8). Ils exercent généralement leurs effets à proximité de leur site de production, ce qui leur doit le nom d'« hormones » locales (autacoïdes).

En raison de leur prédominance et de leurs rôles tant physiologiques que physiopathologiques variés, nous nous intéresserons aux prostanoides dérivés de l'acide arachidonique ou prostanoides de la série 2.

Le *thromboxane* A_2 (TXA_2) est produit essentiellement au niveau des plaquettes, des macrophages, du parenchyme pulmonaire et des reins. Ses principales activités biologiques sont l'agrégation plaquettaire, la constriction des muscles lisses vasculaires et bronchiques ainsi que la diminution du taux de filtration glomérulaire (Halushka, 2000).

La *prostaglandine* D_2 (PGD_2) est synthétisée majoritairement par les mastocytes, le cerveau et les cellules présentatrices d'antigènes. Elle est capable d'induire une augmentation de la sécrétion de mucus gastrique, une bronchoconstriction, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et une inhibition de la croissance cellulaire.

La *prostaglandine* E_2 (PGE_2) est principalement synthétisée au niveau des reins, de la muqueuse gastrique, du tractus génital et des cellules inflammatoires. C'est le métabolite

majeur de l'acide arachidonique produit lors de la réponse inflammatoire. Elle présente des propriétés bronchodilatatrices, vasodilatatrices et immunorégulatrices. Elle joue également un rôle dans la contraction utérine. Si cette prostaglandine inhibe la sécrétion gastrique, elle augmente la diurèse et l'excrétion de sodium.

La **prostaglandine $F_{2\alpha}$** ($PGF_{2\alpha}$) possède des propriétés vasoconstrictrices et bronchoconstrictrices. Au même titre que la PGE_2 , elle provoque des contractions de la musculature lisse utérine.

La **prostaglandine I_2** (PGI_2 ou prostacycline) est principalement synthétisée par les cellules endothéliales et musculaires lisses. C'est l'antagoniste physiologique du TXA_2 puisqu'elle possède des propriétés biologiques opposées à ce dernier. Elle est, en effet, anti-agrégante et vasodilatatrice. La PGI_2 inhibe la sécrétion d'acide gastrique et protège la muqueuse gastro-intestinale (Ullrich et al., 2001).

Les lieux de formation privilégiés et les activités biologiques principales des prostanoïdes de la série 2 sont résumés dans le tableau ci-contre (Tableau I-1).

I.1.4. Métabolisme de l'acide arachidonique par voie non enzymatique

En 1990, Morrow et ses collaborateurs découvraient l'existence d'une voie de conversion non enzymatique de l'acide arachidonique *in vivo*, capable de générer les isoprostanes, des isomères des prostaglandines (Morrow et al., 1990).

I.1.4.1. Genèse des isoprostanes

Les isoprostanes sont issus de la peroxydation radicalaire de l'acide arachidonique par un mécanisme majoritairement indépendant des COXs.

Les ROS (*Reactive Oxygen Species*) peuvent en effet réagir avec les liaisons insaturées de l'acide arachidonique, aboutissant à la formation de trois radicaux arachidonyles différents. Par la suite les radicaux formés réagissent avec l'oxygène (O_2), donnant lieu à la formation de radicaux peroxydes. Ceux-ci subissent une endocyclisation et une addition d' O_2 pour former des endoperoxydes bicycliques de type PGH_2 . La réduction de ces intermédiaires aboutit à la formation des D_2 -, des E_2 -, des F_2 -isoprostanes ou des isothromboxanes, en fonction de la nature du cycle produit. Selon la position du radical peroxyde, quatre régioisomères des F_2 -isoprostanes peuvent être générés (type III, IV, V et VI). Chacun de ceux-ci peut théoriquement comporter 8 diastéréoisomères racémiques. Parmi les F_2 -isoprostanes de type III, on trouve le 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ ou isoprostane-8 (Rokach et al., 1997) (Figure I-9).

Les isoprostanes diffèrent structurellement des prostaglandines par l'orientation des deux chaînes latérales hydrocarbonées fixées sur le noyau cyclopentane. En effet, elles sont positionnées en *cis* l'une par rapport à l'autre dans le cas des isoprostanes et en *trans* dans le cas des prostaglandines. De plus, à l'inverse des prostaglandines générées à partir d'acide arachidonique libre, les isoprostanes peuvent être formés *in situ* au sein des membranes biologiques par l'action directe des ROS sur l'acide arachidonique estérifiant le glycérol et s'accumuler ainsi dans les tissus cibles. Par la suite, les isoprostanes sont libérés préformés en réponse à une activation cellulaire et probablement via un mécanisme dépendant d'une phospholipase A_2 . Ils circulent ensuite dans le sang pour finalement être excrétés dans les urines (Janssen, 2001).

Parmi les divers isoprostanes, nous nous intéresserons aux F₂-isoprostanes, isomères de la PGF_{2α} largement décrits dans la littérature pour leur rôle de marqueur du stress oxydatif mais aussi, pour leurs actions biologiques variées et leur rôle potentiel dans certaines pathologies associées à un stress oxydatif comme l'athérosclérose.

I.1.4.2. Propriétés des F₂-isoprostanes

Si les taux plasmatiques et urinaires de F₂-isoprostanes sont très faibles chez les individus sains, ils peuvent augmenter dans des pathologies associées à un stress oxydatif telles que l'asthme, l'athérosclérose, les maladies pulmonaires chroniques, le diabète sucré et les lésions d'ischémie-reperfusion. Par conséquent, la quantification de ces isoprostanes dans les tissus et liquides biologiques est une approche fiable et non invasive pour estimer la peroxydation lipidique *in vivo*, permettant ainsi d'explorer la sévérité du stress oxydatif en pathologie humaine (Cracowski et al., 2002).

Outre ce rôle de marqueur, de nombreuses études ont mis en évidence diverses activités biologiques des isoprostanes, et plus particulièrement du 8-iso-PGF_{2α}, sur différents types cellulaires. Il a été montré que le 8-iso-PGF_{2α} est un constricteur de la musculature lisse vasculaire (Cracowski et al., 2001). Le 8-iso-PGF_{2α} est également capable de moduler la fonction plaquettaire. Ces effets semblent médiés par l'intermédiaire du récepteur du TXA₂ (Kinsella et al., 1997). Toutefois, l'existence d'un récepteur spécifique aux isoprostanes n'est pas exclue (Fukunaga et al., 1993).

Les activités biologiques du 8-iso-PGF_{2α} et sa présence au sein des plaques athérosclérotiques (Pratico et al., 1997) impliquent vraisemblablement cet isoprostane dans le processus d'athérogenèse. De plus, plusieurs études ont rapporté l'existence d'une corrélation entre l'augmentation de la concentration en F₂-isoprostanes et plusieurs facteurs de risque pouvant mener au développement de l'athérosclérose. Il s'agit notamment du tabagisme, de l'hypercholestérolémie et du diabète sucré (Patrono et FitzGerald, 1997).

L'athérosclérose est définie comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides et de tissus fibreux ; le tout s'accompagnant de modifications de la média et aboutissant à la formation de lésions caractéristiques nommées athéromes. Le développement de ces lésions sera exposé plus en détail lorsque nous aborderons l'implication du TXA₂ dans les troubles cardiovasculaires (voir point I.3.3.1).

Etant donné la distribution ubiquitaire de l'acide arachidonique au sein des membranes biologiques, la biosynthèse des isoprostanes peut avoir lieu dans la plupart des types cellulaires de la plaque athérosclérotique (monocytes, cellules endothéliales,...). Les isoprostanes peuvent également être générés à partir de l'acide arachidonique estérifié dans les lipoprotéines de faible densité (LDL). L'accumulation d'isoprostanes au sein des membranes endothéliales contribue à l'altération de l'intégrité et de la perméabilité de celles-ci, favorisant ainsi la pénétration des LDL et des monocytes au sein de l'intima. Une fois libéré des membranes cellulaires par hydrolyse, le 8-iso-PGF_{2α} peut modifier les fonctions de divers constituants de la plaque. Ainsi, il peut agir sur les cellules musculaires lisses et modifier le tonus vasomoteur. Cet isoprostane est également capable de stimuler la prolifération et la mitogenèse des cellules musculaires lisses (Cracowski et al., 2001) et de moduler divers aspects de la fonction plaquettaire (Patrono et FitzGerald, 1997) (Figure I-10).

I.2. Les cyclooxygénases

I.2.1. Les isoformes de la cyclooxygénase

En 1971, Vane démontra que les AINS exercent leurs effets anti-inflammatoires en inhibant la cyclooxygénase (Vane, 1971). Depuis cette découverte et jusque dans les années nonantes, une seule cyclooxygénase était connue. Celle-ci était considérée comme responsable aussi bien de la production basale de prostanoides que de leur génération massive au cours du processus inflammatoire. Cependant, au début des années nonantes, une seconde isoforme de la cyclooxygénase, soit une isoforme inductible, a été identifiée et nommée cyclooxygénase-2 (COX-2). La première isoforme découverte en 1971 fut quant à elle rebaptisée cyclooxygénase-1 (COX-1) (Herschman, 1996).

La COX-1 et la COX-2 sont hautement similaires quant à leur structure et leurs fonctions catalytiques. En effet, chez une même espèce, ces glycoprotéines membranaires présentent environ 60 % d'homologie du point de vue de leur structure primaire. De plus, elles catalysent toutes deux la biosynthèse des mêmes prostanoides. Ces isoenzymes existent sous forme d'homodimères. Chaque monomère est constitué de trois domaines structuraux : un domaine N-terminal de type *EGF-like* (*epidermal growth factor-like*), un domaine de liaison à la membrane (MBD) et un domaine catalytique globulaire comportant le site actif cyclooxygénase (COX), responsable de la conversion de l'acide arachidonique en PGG₂, et le site actif peroxydase (POX) qui catalyse la transformation de la PGG₂ en PGH₂ (Smith et al., 2000) (Figure I-11).

Malgré ces ressemblances catalytiques et structurales, les deux isoformes diffèrent fortement quant à leur expression, leur régulation, leur localisation et leurs fonctions biologiques (Tableau I-2). Ces différences sont discutées dans les points suivants.

I.2.1.1. La cyclooxygénase-1

La COX-1 est exprimée de façon constante en condition d'homéostasie dans la plupart des cellules et tissus. Néanmoins des taux élevés de COX-1 sont détectables dans les plaquettes, les cellules endothéliales, la muqueuse gastrique et les tubules collecteurs rénaux. La COX-1 y est responsable du maintien d'un taux basal de prostagandines impliquées dans la régulation physiologique du flux sanguin rénal et de la filtration glomérulaire. La COX-1 est aussi responsable du contrôle de la fonction plaquettaire ainsi que du maintien du tonus vasculaire et de l'intégrité de la muqueuse gastrique (Vane et al., 1998).

Le gène de la COX-1, localisé sur le chromosome 9, contient plusieurs éléments de régulation transcriptionnels dans sa région promotrice. Toutefois le promoteur de ce gène, riche en nucléotides G et C est dépourvu de boîte TATA ; ce qui caractérise les gènes à niveau d'expression constant (*house-keeping genes*) (Tanabe et Tohnai, 2002).

I.2.1.2. La cyclooxygénase-2

La COX-2 est quant à elle indétectable chez le sujet sain dans la plupart des tissus. Toutefois son expression est rapidement induite dans divers types cellulaires, en réponse à un large éventail de stimuli comme des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α), des facteurs de croissance (PDGF, EGF), des endotoxines bactériennes dont le lipopolysaccharide

(LPS), des gonadotrophines et des oncogènes (Tanabe et Tohnai, 2002). Ceci explique le rôle joué par la COX-2 dans l'inflammation et dans certains processus cancéreux.

Signalons cependant qu'une expression constitutive de la COX-2 a pu être mise en évidence dans certaines régions du rein, du cerveau (Hoffmann, 2000), de la muqueuse gastrique et du système reproducteur. En plus de son rôle pathologique largement décrit, la COX-2 est ainsi impliquée dans certains processus physiologiques comme la grossesse, l'activité neuronale, rénale et la cicatrisation de la muqueuse gastrique après un ulcère (Claria, 2003).

Le gène de la COX-2, situé sur le chromosome 1, contient dans sa région promotrice une boîte TATA ainsi que de nombreuses séquences régulatrices qui expliquent son caractère inductible (*immediate early gene*). Parmi ceux-ci, on retrouve deux sites de liaison pour le facteur de transcription NF- κ B. L'expression de la COX-2 est également sujette à des régulations négatives par des cytokines anti-inflammatoires telles l'IL-4 et l'IL-10 ainsi que par les glucocorticoïdes (Tanabe et Tohnai, 2002).

Bien que la COX-1 et la COX-2 soient très proches au point de vue de leur séquence en acides aminés, des études cristallographiques ont permis de mettre en évidence la présence d'une cavité secondaire dans le site actif de la COX-2. Celle-ci est attribuée majoritairement au remplacement de l'isoleucine en position 523 chez la COX-1 par une valine chez la COX-2 (Flower, 2003) (Figure I-12). Cette poche latérale supplémentaire permet d'expliquer la gamme plus large de substrats utilisable par la COX-2 et est à la base du développement d'inhibiteurs sélectifs de cette isoforme.

I.2.2. Implications pathologiques principales de la COX-2

I.2.2.1. COX-2 et inflammation

L'inflammation est un phénomène réactionnel mis en œuvre par l'organisme pour lutter contre une agression tissulaire qui peut être d'origine infectieuse, physique ou chimique. Elle est associée à l'apparition de symptômes caractéristiques tels l'œdème, la fièvre, la rougeur et la douleur. Ces signes cardinaux sont médiés par une vaste série de médiateurs locaux. Parmi ceux-ci, on retrouve la bradykinine, le *platelet activating factor* (PAF), l'histamine, la sérotonine, diverses cytokines ainsi que les leucotriènes et les prostanoides.

Une surproduction de prostanoides a pu être mesurée dans différents modèles d'inflammation chronique ou aiguë chez l'animal. Ainsi, ces modèles ont permis de montrer que la production accrue de prostanoides est associée à une surexpression de la COX-2 au site de l'inflammation ; le taux basal de COX-1 étant non affecté. Cette induction de la COX-2 est corrélée avec l'apparition des symptômes inflammatoires. De plus, dans ces mêmes modèles, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibiteurs des COXs, présentent des propriétés antalgiques et anti-inflammatoires, soutenant le rôle majeur de la COX-2 dans la genèse de ces symptômes (Pinheiro et Calixto, 2002 ; Seibert et al., 1994 ; Zhang et al., 1997).

La PGE₂ est la prostaglandine majoritairement produite au cours du processus inflammatoire. Elle est capable d'induire une vasodilatation et, ainsi, de potentialiser l'action d'autres agents qui augmentent la perméabilité vasculaire tels la bradykinine et l'histamine.

Les prostaglandines, abondamment synthétisées par la COX-2 au site inflammatoire, potentialisent également la douleur. En effet, elles sensibilisent les terminaisons nociceptives périphériques et produisent une hypersensibilité locale. Ces médiateurs facilitent aussi la transmission de la douleur au niveau du système nerveux central. En effet, si une expression basale de la COX-2 est mesurée dans le cerveau et la corde spinale, celle-ci est augmentée lors d'une réponse inflammatoire. Ceci suggère un rôle important des prostanoïdes générées par la COX-2 dans la perception de la douleur au niveau central (Hoffmann, 2000).

Enfin, la PGE₂, dont la concentration cérébrale augmente suite à une induction de la COX-2 par divers stimuli pro-inflammatoires, est capable d'activer le centre de thermorégulation du cerveau et est dès lors impliquée dans la réponse fébrile (Hoffmann, 2000).

1.2.2.2. COX-2 et cancers

Outre son rôle dans l'inflammation, la COX-2 semble impliquée dans le développement et la progression cancéreuse. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses études expérimentales, épidémiologiques et cliniques.

Ainsi, une expression accrue de la COX-2 a été mise en évidence dans bon nombre de cancers tels les cancers de l'œsophage, du colon, de l'estomac, du foie, de la vessie et du poumon. De plus, plusieurs études épidémiologiques ont montré que la prise régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) était associée à une diminution de l'incidence de certains cancers, spécialement le cancer du colon mais également du pancréas, de l'œsophage, de l'estomac et de la vessie. Différents modèles animaux de développement tumoral ont également permis de fournir de nombreuses données relatives aux effets bénéfiques des AINS. Ainsi à titre d'exemple, des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 ont démontré un effet préventif et thérapeutique dans des modèles animaux de cancer du sein et du colon (Herschman et al., 2003). Enfin, des études cliniques chez l'homme ont démontré l'effet bénéfique de certains inhibiteurs sélectifs de la COX-2 dans la thérapie de certaines formes de cancer. Ainsi, le célécoxib réduit fortement le nombre et la taille des tumeurs coliques chez les patients souffrant de la forme familiale de polypose adénomateuse (Phillips et al., 2002).

Le mode d'action exact par lequel la COX-2 participe à la carcinogenèse n'est pas entièrement élucidé. Néanmoins, il est bien établi que cette enzyme est capable d'affecter de nombreux processus qui sont essentiels au développement tumoral. Ceux-ci incluent l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la dissémination métastatique ainsi que le métabolisme de xénobiotiques.

Le processus cancéreux est caractérisé par un déséquilibre de la balance existant entre la prolifération cellulaire et l'apoptose ou mort cellulaire programmée. La surexpression de la COX-2 est associée à une inhibition des mécanismes apoptotiques, ce qui favorise la prolifération tumorale. Des études *in vitro* suggèrent que la COX-2 est capable d'induire l'expression de bcl-2, une protéine anti-apoptotique, augmentant ainsi la durée de vie des cellules tumorales (Castelao et al., 2003 ; Dannenberg et al., 2001).

La COX-2 semble également capable de stimuler le processus d'angiogenèse, défini comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui alimentent les néoplasmes en nutriments et en oxygène et permettent ainsi la croissance tumorale ainsi que la dissémination des métastases via la circulation systémique. Au site de la tumeur, survient une production de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) par les cellules tumorales, les fibroblastes et les

cellules endothéliales. Ce puissant stimulateur de l'angiogenèse est capable d'induire l'expression de la COX-2 et d'augmenter ainsi la production de prostanoides. Ces prostanoides peuvent à leur tour stimuler la production de VEGF de manière autocrine ou paracrine. Ceci a pour conséquence une induction d'enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Castelao et al., 2003 ; Iniguez et al., 2003) (Figure I-13).

Diverses études ont montré que la COX-2 pouvait également contribuer au développement du cancer en favorisant la dissémination des métastases. La capacité métastatique est définie par la capacité des cellules tumorales à se détacher de leur propre tissu pour envahir des sites distants de la tumeur d'origine via la circulation systémique (Castelao et al., 2003).

Enfin, la COX-2 est capable d'influencer la carcinogenèse via la métabolisation de xénobiotiques. Ainsi, le site peroxydasique de la COX-2 peut catalyser la conversion de procarcinogènes tels le benzo[a]pyrène, un hydrocarbure polycyclique abondant dans les goudrons de tabac et les viandes grillées, en carcinogènes capables d'interagir avec l'ADN et d'y créer des mutations (Dannenberget al., 2001).

Toutes ces données soutiennent donc l'implication de la COX-2 dans la progression et le développement tumoral, faisant de cette enzyme une cible thérapeutique potentielle pour la prévention et le traitement du cancer.

I.2.3. Les inhibiteurs des cyclooxygénases

Les inhibiteurs des COXs sont largement utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques et sont regroupés, quelle que soit leur nature chimique, sous la dénomination d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

L'aspirine, premier représentant de la classe des AINS possède un mode d'action unique. En effet, elle acétyle de manière irréversible la sérine 530 du site actif des deux isoformes de la COX (Figure I-14). A faible dose (75-160 mg/jour), ce composé réduit la fréquence des récurrences d'accidents cardiovasculaires en inhibant la COX-1 plaquettaire, avec pour conséquence une diminution de la production de TXA₂, puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire. Les autres AINS tels l'ibuprofène, le naproxène et le flurbiprofène inhibent les deux isoformes des COXs de manière réversible, en entrant en compétition avec l'acide arachidonique pour le site actif. L'utilisation à long terme de ces AINS dits « classiques » est cependant limitée par la survenue d'effets indésirables principalement digestifs (ulcères gastroduodénaux, hémorragies digestives, voire perforation gastrique) et à moindre degré rénaux. Ces effets secondaires peuvent s'expliquer par le manque de sélectivité de ces AINS vis-à-vis des deux isoformes de la COX. En effet aux doses où ils inhibent la COX-2 et manifestent leurs effets thérapeutiques, ils inhibent également la COX-1, générant probablement ainsi leurs effets délétères (Dannhardt et Kiefer, 2001).

L'inhibition sélective de la COX-2 présente dès lors un réel intérêt. En effet, elle préserve la synthèse par la COX-1 des prostanoides physiologiques et présente donc théoriquement une tolérance digestive et rénale accrue. L'élaboration d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 exploite les différences structurales existant entre les sites catalytiques des deux enzymes. La poche latérale supplémentaire au niveau du site actif de cette isoforme permet

d'accommoder les groupements encombrants caractéristiques des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (Flower, 2003) (Figure I-15).

Si le meloxicam (Mobic[®]) et le nimésulide (Nesulid[®]) sont classés parmi les inhibiteurs préférentiels de la COX-2, les « coxibs » sont des inhibiteurs plus spécifiques de cette enzyme. A l'heure actuelle cinq coxibs ont été mis sur le marché : le célécoxib (Celebrex[®]), le rofécoxib (Vioxx[®]), l'étoricoxib (Arcoxia[®]), le valdécoxib (Bextra[®]) et le parécoxib (Dynastat[®]). D'un point de vue chimique, ces coxibs sont des hétérocycles portant un ou deux noyaux phényles (Figure I-16).

Le célécoxib (Celebrex[®]) et le rofécoxib (Vioxx[®]) sont les premiers représentants de la classe des coxibs approuvés pour le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde et pour le soulagement de la douleur aiguë. Les études VIGOR (*Vioxx Gastrointestinal Outcome Research*) (Bombardier et al., 2000) et CLASS (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*) (Silverstein et al., 2000) ont mis en évidence une meilleure tolérance gastrique du rofécoxib et du célécoxib par rapport aux AINS classiques. Le célécoxib a également été approuvé cliniquement pour le traitement des patients atteints de la forme familiale de polypose adénomateuse.

Plus récemment développés, l'étoricoxib (Arcoxia[®]), le valdécoxib (Bextra[®]) et le parécoxib (Dynastat[®]), une prodrogue injectable du valdécoxib, présentent une sélectivité accrue pour la COX-2. Ils sont indiqués dans le traitement de l'arthrose, de la polyarthrite rhumatoïde et de la douleur aiguë. Le lumiracoxib dont la structure est représentée à la figure I-16 est actuellement en phase III de développement clinique (Tacconelli et al., 2004).

Si les résultats concernant l'efficacité clinique et la tolérance gastrique des coxibs sont très encourageants, quelques réserves sont cependant à émettre quant à l'utilisation à long terme de ces molécules. En effet, la COX-2 intervient dans différents processus physiologiques dont l'activité neuronale, la grossesse, la cicatrisation de la muqueuse gastrique après un ulcère ainsi que dans l'activité rénale. Son inhibition pourrait dès lors avoir des répercussions sur ces fonctions biologiques.

I.3. Le thromboxane A₂

I.3.1. Présentation et rôle du thromboxane A₂

En 1975, Hamberg et ses collaborateurs découvrent une substance vasoconstrictrice labile, principalement détectée dans les poumons, les plaquettes et les reins. Ce composé est alors nommé thromboxane A₂ (Hamberg et al., 1975).

I.3.1.1. Métabolisme du thromboxane A₂

En raison de l'instabilité de son hétérocycle oxygéné, le TXA₂ possède un temps de demi-vie très court (quelques secondes). En effet aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, le TXA₂ est rapidement hydrolysé de manière non enzymatique en son produit d'hydratation, le thromboxane B₂ (TXB₂), chimiquement stable mais biologiquement inactif (Figure I-17). Néanmoins, *in vivo*, la liaison du TXA₂ aux protéines plasmatiques, essentiellement l'albumine, le protège en partie de son hydrolyse instantanée en TXB₂.

Le catabolisme du TXA₂ conduit donc à la formation de TXB₂ qui sera, à son tour, transformé en une vingtaine de métabolites différents. Au niveau plasmatique, outre le TXB₂, le principal métabolite retrouvé est le 11-déhydro-TXB₂, son produit de déshydrogénation. Les métabolites urinaires majeurs sont le TXB₂, le 2,3-dinor-TXB₂ et le 11-déhydro-TXB₂ (Figure I-18).

I.3.1.2. Propriétés biologiques du thromboxane A₂

Malgré un temps de demi-vie très court, le TXA₂ exerce des effets biologiques très variés. Ce médiateur lipidique local est un puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire (Arita et al., 1989). Au niveau vasculaire, le TXA₂ induit une vasoconstriction et entraîne la prolifération des cellules musculaires lisses (Sachinidis et al., 1995). Le TXA₂ provoque également une constriction de la musculature lisse bronchique et gastro-intestinale. Au niveau rénal, il diminue le taux de filtration glomérulaire.

En raison de ses propriétés biologiques opposées, la prostacycline (PGI₂) est souvent considérée comme l'antagoniste physiologique du TXA₂. L'équilibre dynamique existant entre ces deux médiateurs régule dès lors l'hémostase primaire et participe au maintien du tonus vasculaire. Un déséquilibre de la balance TXA₂/PGI₂ serait responsable de divers troubles thrombotiques (Ullrich et al., 2001).

I.3.2. Le récepteur du thromboxane A₂

I.3.2.1. Historique et controverses

Le TXA₂ exerce ses activités biologiques par l'intermédiaire d'un récepteur qui lui est propre, le récepteur TP. Celui-ci appartient à la superfamille des récepteurs de type rhodopsine à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G de transduction du signal (GPCR) (Hirata et al., 1991) (Figure I-19).

La caractérisation du récepteur TP fut à l'origine de nombreuses controverses quant à l'existence de sous-types de ce récepteur ainsi que d'une hétérogénéité inter-espèce et inter-tissulaire (Halushka, 2000). L'existence potentielle de récepteurs TP pharmacologiquement distincts, au niveau de la musculature lisse vasculaire et des plaquettes, fut suggérée pour la première fois par LeDuc et ses collaborateurs (LeDuc et al., 1981). Par la suite, d'autres études pharmacologiques supportèrent cette hypothèse. Ces études mirent en effet en évidence un comportement différent de certains analogues du TXA₂ vis-à-vis des récepteurs TP plaquettaires et vasculaires (Masuda et al., 1991). Cependant, en 1989, suite à des études pharmacologiques chez le porc, Mihara concluait que les récepteurs TP vasculaires et plaquettaires étaient semblables (Mihara et al., 1989). Si l'équipe de Swayne prônait aussi une homogénéité inter-tissulaire pour ce récepteur (Swayne et al., 1988), d'autres études ont mis en évidence des différences inter-espèces pour le récepteur TP de la musculature lisse de rat et de cobaye (Ogletree et Allen, 1992 ; Zhang et al., 1996).

C'est le clonage du gène du récepteur du TXA₂ qui mit fin à l'hypothèse de l'existence de sous-types (Hirata et al., 1991). En effet, cette équipe a pu obtenir un clone d'ADN complémentaire (ADNc) codant pour le récepteur TP de cellules placentaires humaines, en utilisant une sonde nucléotidique correspondant à sa séquence partielle en acides aminés. Ils obtinrent également un clone partiel d'ADNc du récepteur TP à partir de mégacaryocytes

humains. Ces deux récepteurs ne présentaient aucune différence du point de vue de leur séquence nucléotidique, soutenant l'existence d'un seul type de récepteur. Par ailleurs, bien que le récepteur TP soit codé par un seul gène localisé sur le chromosome 19p13.3 deux isoformes distinctes de ce récepteur ont été identifiées. Elles résultent d'un processus d'épissage alternatif au niveau de l'exon codant pour le septième domaine transmembranaire du récepteur. Si ces deux isoformes partagent les 328 premiers acides aminés, elles se distinguent quant à la partie C-terminale cytoplasmique. Le récepteur TP, initialement cloné à partir du placenta fut rebaptisé TP α (343 aa) tandis que la seconde isoforme clonée à partir de cellules endothéliales fut nommée TP β (407 aa) (Raychowdhury et al., 1994).

La problématique de l'hétérogénéité des récepteurs TP est donc très complexe et reste encore fortement controversée à l'heure actuelle.

I.3.2.2. Distribution du récepteur TP

Les récepteurs du TXA₂ sont exprimés dans un grand nombre de tissus dont les poumons, le cerveau, le rein, le thymus, la rate, l'utérus et le placenta ainsi que dans bon nombre de cellules telles les plaquettes, les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires et bronchiques (Halushka, 2000). Notons que l'expression des isoformes α et β est variable en fonction du type cellulaire. Ainsi, par exemple, l'isoforme TP α est majoritairement exprimée au sein des plaquettes.

I.3.2.3. Transduction du signal

De nombreuses études ont permis de décrypter les voies de transduction du signal à l'origine de la diversité des effets biologiques médiés par la liaison du TXA₂ à son récepteur.

Les récepteurs TP sont classiquement caractérisés par leur couplage à une protéine G_q hétérotrimérique de transduction du signal, première protéine G à avoir été identifiée fonctionnellement associée au récepteur TP. Suite à la liaison du TXA₂, le récepteur TP adopte une conformation compatible à l'interaction avec la protéine G_q. Celle-ci échange alors le GDP associé à sa sous-unité α contre une molécule de GTP. Il s'ensuit une dissociation de la sous-unité α qui peut alors interagir avec la phospholipase C (PLC). La PLC, activée, hydrolyse le PIP₂ (phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate) en IP₃ (inositol 1,4,5-triphosphate) et en DAG (diacylglycérol). L'IP₃ se lie ensuite à son récepteur présent sur la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui provoque la libération de calcium dans le cytosol (Figure I-20). Cette augmentation de calcium induit la translocation de la protéine kinase C (PKC) vers la membrane cytoplasmique et son activation, en présence du DAG resté ancré dans la membrane. Une fois activée, la PKC phosphoryle toute une série de protéines. Au niveau des plaquettes, ces événements aboutissent entre autre à la sécrétion du contenu des granules denses et des granules α .

Il a cependant été démontré que les récepteurs TP étaient également capables de se coupler à d'autres protéines G dont les protéines G_i, G_{12/13} et G_s. Ceci a pour conséquence l'activation d'une multitude de voies de transduction du signal et l'induction subséquente de réponses biologiques très variées (Huang et al., 2004).

La liaison du TXA₂ à son récepteur est théoriquement capable d'activer toutes ces voies de transduction du signal. Cependant le couplage du récepteur à l'une ou l'autre protéine G et, en aval, l'activation préférentielle de l'une ou l'autre voie de transduction du

signal, semble varier d'un type cellulaire à l'autre. Les voies de transduction du signal des isoformes α et β ont été étudiées. Si elles sont toutes deux couplées à l'activation de la PLC, elles ont des effets opposés sur l'adénylate cyclase. En effet, l'isoforme α active cette enzyme, tandis que l'isoforme β l'inhibe (Hirata et al., 1996).

L'existence d'isoformes TP α et TP β et la capacité de celles-ci à se coupler à différentes protéines G contribuent à l'activation d'une multitude de voies de transduction cellulaires et à la diversité importante des réponses biologiques déclenchées par l'interaction ligand-récepteur.

I.3.2.4. Ligands du récepteur TP

I.3.2.4.1. Relations structure-activité

En 1993, Yamamoto et ses collaborateurs proposèrent un modèle d'interaction entre le récepteur TP du placenta humain et le TXA₂ (Yamamoto et al., 1993). Selon ce modèle, le groupement carboxylique sous sa forme ionisée interagirait, par une liaison de type électrostatique, avec l'arginine en position 295 appartenant au septième domaine transmembranaire, tandis que la fonction hydroxyle formerait un pont hydrogène avec la sérine 201 située au niveau du cinquième domaine transmembranaire. Enfin, le bicycle et la chaîne ω du TXA₂ s'incorporeraient dans une large poche hydrophobe localisée entre la sérine 201 et l'arginine 295.

I.3.2.4.2. Quelques agonistes du récepteur TP

Un agoniste est défini comme une molécule qui, une fois liée au récepteur, mime l'action du ligand naturel. En raison de son instabilité et de son temps de demi-vie biologique très court, le TXA₂ s'avère très difficile à manipuler lors d'expérimentations pharmacologiques. Par conséquent, les agonistes du TXA₂, bien que dépourvus d'intérêt thérapeutique, constituent des outils pharmacologiques très intéressants en raison de leur plus grande stabilité. Parmi ceux-ci, on retrouve le TXA₂ carbocyclique, le U-46619 et le I-BOP (Figure I-21).

I.3.2.4.3. Quelques antagonistes du récepteur TP

En se fixant sur son récepteur, l'antagoniste empêche l'action biologique du ligand endogène. De nombreux antagonistes du récepteur TP ont été synthétisés. Parmi les antagonistes de type prostanoloïde, se trouvent le SQ-29548, l'ifetroban, le pinane thromboxane A₂ et le vapiprost (Figure I-22). Le sulotroban, le daltroban et le sétratodast sont quant à eux des antagonistes de type non prostanoloïde (Dogné et al., 2000) (Figure I-23). Ces molécules constituent des outils pharmacologiques intéressants, au même titre que les agonistes du récepteur TP. Ces antagonistes ont un grand intérêt thérapeutique, et certains d'entre eux ont montré un potentiel thérapeutique important dans des études cliniques (voir point I.3.4.2).

I.3.3. Implications pathologiques du TXA₂

De par ses propriétés biologiques variées, le TXA₂ est impliqué dans les pathologies cardiovasculaires et asthmatiques.

I.3.3.1. Les troubles cardiovasculaires

L'athérosclérose, est le principal processus pathologique qui aboutit aux maladies cardiovasculaires et représente dès lors la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Ses manifestations cliniques sont le plus souvent l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'angor instable, l'embolie athéromateuse voire même la mort subite.

Les lésions athéromateuses se développent principalement au niveau de l'intima des artères de gros et de moyen calibre (Figure I-24). Trois stades majeurs peuvent être reconnus dans l'évolution de ces lésions.

La strie lipidique est une lésion réversible caractérisée par une surélévation jaunâtre de l'intima faisant légèrement saillie dans la lumière artérielle. Elle résulte d'un dysfonctionnement endothélial provoqué par des facteurs hémodynamiques ou des facteurs de risque tels l'hypertension, le tabagisme ou encore des infections microbiennes. Ce dysfonctionnement a pour conséquence une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui permet la pénétration des monocytes et des LDL (*low density lipoprotein*) au sein de l'intima. Les monocytes différenciés en macrophages se chargent progressivement de LDL oxydés pour devenir des cellules spumeuses. Certaines stries lipidiques évoluent en lésion fibro-lipidiques, alors que d'autres disparaissent ou se stabilisent.

La lésion fibro-lipidique est caractérisée par la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Celles-ci peuvent à leur tour se charger de LDL oxydés pour devenir des cellules spumeuses ou sécréter une matrice extracellulaire abondante, contenant du collagène, des protéoglycanes et des fibres élastiques. Ces différents processus cellulaires provoquent un soulèvement de l'endothélium, réduisant d'avantage la lumière du vaisseau.

A un stade plus avancé, la lésion porte le nom de plaque athéromateuse. Elle est formée d'un cœur nécrotique, constitué de débris cellulaires, de cristaux de cholestérol et de lipides extracellulaires, et est coiffée d'une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses. L'occlusion de la lumière du vaisseau sanguin devient de plus en plus importante. A ce stade, la plaque peut devenir instable, se fissurer ou se rompre, avec pour conséquence l'apparition d'un thrombus mural riche en plaquettes et en fibrine (Ross, 1993).

En condition physiologique, il existe un équilibre subtil entre la PGI₂ endothéliale et le TXA₂ plaquettaire. Cette balance hémostatique penche en faveur du TXA₂ dans des circonstances pathologiques comme les troubles cardiovasculaires. Ainsi, des taux plasmatiques élevés de TXB₂ ont été détectés chez des patients atteints d'un infarctus du myocarde (Gurbel et al., 1999).

Le TXA₂ est synthétisé en quantité importante par les plaquettes circulantes et les monocytes infiltrés au niveau de la plaque athérosclérotique. De par ses propriétés biologiques, il est capable d'influencer le processus d'athérogenèse. Comme déjà signalé précédemment, il induit une vasoconstriction au niveau de la musculature lisse vasculaire. Néanmoins, il est également capable de stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses, évènement essentiel au développement de la plaque athérosclérotique. De plus, le TXA₂ est un puissant activateur des plaquettes et est dès lors impliqué dans la formation du thrombus fibrinoplaquettaire qui fait suite à la fissuration voire à la rupture de la plaque (Belton et Fitzgerald, 2003).

L'augmentation des taux de TXA₂ d'une part, et les propriétés biologiques uniques de celui-ci d'autre part, suggèrent une contribution de ce médiateur au processus d'athérosclérose et à ses manifestations cliniques.

I.3.3.2. L'asthme bronchique

L'asthme est défini comme une maladie inflammatoire chronique de l'arbre bronchique caractérisée par une hyperréactivité des voies aériennes faisant suite à divers stimuli. C'est une des affections chroniques les plus fréquentes, avec une prévalence moyenne de 4 à 8 % dans le monde.

Sur le plan physiopathologique, il se caractérise par un rétrécissement de la lumière des voies aériennes qui fait suite à une contraction excessive de la musculature lisse bronchique, par un œdème de la muqueuse, par une desquamation des cellules épithéliales et par une hypersécrétion de mucus suite à une stimulation des cellules caliciformes et des glandes séromuqueuses. Ces manifestations sont le résultat d'une interaction complexe entre les cellules de la paroi des voies aériennes, les cellules de l'infiltrat inflammatoire (éosinophiles, mastocytes, macrophages et lymphocytes T), les médiateurs de l'inflammation (PAF, histamine, bradykinine, leucotriènes, prostaglandines et TXA₂). Tous ces acteurs contribuent à l'obstruction de la lumière bronchique en induisant un spasme musculaire, une hypersécrétion bronchique et un œdème de la muqueuse (Busse et Lemanske, 2001).

Des études ont démontré une nette augmentation des taux de TXB₂ dans le plasma de patients atteints d'asthme bronchique en comparaison avec des sujets sains (Kurosawa et al., 1990). Le TXA₂ est considéré pour plusieurs raisons comme un médiateur actif dans l'étiologie de cette pathologie inflammatoire.

En effet, le TXA₂ est un puissant constricteur de la musculature lisse bronchique. Par ailleurs, divers modèles animaux ont également mis en évidence un rôle du TXA₂ dans l'hyperréactivité des voies aériennes. Enfin, plusieurs modèles animaux ont montré que le U-46619 était capable de potentialiser la neurotransmission cholinergique. Ces données indiquent que le TXA₂ pourrait faciliter les effets de l'acétylcholine sur les voies aériennes (Dogné et al., 2002).

Le rôle du TXA₂ dans la physiopathologie des troubles cardiovasculaires et de l'asthme bronchique est donc bien établi. Par conséquent, de nombreuses stratégies ont été développées dans le but de prévenir les effets délétères du TXA₂ et de réduire la sévérité de ces pathologies. Ces stratégies incluent l'inhibition de la cPLA₂ et des COXs ainsi que l'inhibition de la thromboxane synthétase et le blocage du récepteur TP (Figure I-25).

I.3.4. Modulation de la voie du thromboxane A₂

Le potentiel pathogène important du TXA₂ a initié de nombreuses recherches dans le but de développer des inhibiteurs de la thromboxane synthétase, des antagonistes du récepteur du TXA₂ et des molécules qui combinent ces deux types d'activité.

I.3.4.1. Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase

Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase (TXSIs) empêchent la conversion de l'endoperoxyde PGH₂ en TXA₂ et bloquent ainsi la dernière étape de la synthèse du TXA₂.

Ces molécules possèdent deux avantages théoriques par rapport aux inhibiteurs des COXs. D'une part, l'inhibition sélective de la thromboxane synthétase ne bloque pas la synthèse d'autres prostanoides favorables tels la PGI₂. D'autre part, cette inhibition a pour conséquence une accumulation de PGH₂ et permet un transfert partiel de cet endoperoxyde vers l'endothélium vasculaire où il sera transformé en PGI₂ par la PGI₂ synthétase.

Plusieurs TXSIs ont été développés : des dérivés pyridiniques comme le furegrelate et l'isbogrel et des dérivés de l'imidazole dont le dazoxiben, le dazmagrel, l'ozagrel et le pirmagrel (Dogné et al., 2000) (Figure I-26). Malgré les avantages théoriques de ces molécules, les résultats d'études cliniques ont été très décevants. Ceci s'explique par l'activité agoniste de la PGH₂ vis-à-vis du récepteur TP, d'où l'intérêt de synthétiser des antagonistes de ce récepteur.

I.3.4.2. Les antagonistes du récepteur du thromboxane A₂

A la différence des TXSIs, les antagonistes du récepteur du TXA₂ n'affectent pas la biosynthèse des prostanoides. Néanmoins, en se liant au récepteur TP, ces molécules bloquent l'action du TXA₂ et également celle de la PGH₂, son agoniste endogène.

Le SQ-29548, largement étudié tant *in vitro* qu'*in vivo*, est décrit comme l'antagoniste le plus puissant du récepteur TP. Cependant, son développement clinique a dû être arrêté en raison d'une toxicité hépatique. Le SQ-29548 reste toutefois un outil pharmacologique de choix, notamment sous forme tritiée, [5,6³H]SQ-29548, pour des études de liaison spécifique au récepteur TP (Monshizadegan et al., 1992).

Le sulotroban est le premier antagoniste du récepteur TP à avoir été étudié chez l'homme. Si cette molécule a montré des effets encourageants dans la prévention de l'occlusion coronarienne suite à un pontage, son développement a dû être suspendu en raison d'une activité agoniste partielle (Fiddler et Lumley, 1990).

Le seratrodist (Bronica[®]) est le seul antagoniste du récepteur TP commercialisé. Il est disponible uniquement au Japon et est préconisé dans le traitement de l'asthme bronchique (Samara et al., 1997).

Les antagonistes du récepteur TP possèdent un profil thérapeutique supérieur à celui des TXSIs et font dès lors l'objet d'études cliniques dans des domaines variés.

I.3.4.3. Les agents à activité mixte

Afin d'optimiser d'avantage ce profil thérapeutique, il a été suggéré de combiner au sein d'une même molécule l'activité inhibitrice de la thromboxane synthétase et l'activité antagoniste du récepteur TP. En effet, les composés à double action ainsi obtenus entraînent d'une part l'inhibition de la thromboxane synthétase avec l'augmentation simultanée de la synthèse de PGI₂ par redirection des endoperoxydes et, d'autre part, la neutralisation des effets du TXA₂ et de la PGH₂ en bloquant le récepteur TP.

Le ridogrel est le premier composé à activité mixte étudié chez l'homme en essais cliniques (Figure I-27). Il a été montré que cette substance possède une activité inhibitrice de la thromboxane synthétase supérieure à son activité antagoniste du récepteur TP. Par ailleurs, une étude clinique chez des patients atteints de troubles cardiovasculaires a montré que cette molécule était plus efficace que l'aspirine dans la prévention secondaire de pathologies

ischémiques comme l'angor et l'infarctus du myocarde (RAPT *study* : *Ridogrel versus Aspirin Potency Trial*) (The RAPT study, 1994).

Le terbogrel possède une double activité mieux équilibrée que le ridogrel et est un bon inhibiteur de la fonction plaquettaire (Figure I-27). Les propriétés de ce composé ont été investiguées chez des patients atteints d'hypertension pulmonaire. D'un point de vue biochimique et pharmacologique, l'activité inhibitrice de la thromboxane synthétase de cette molécule a été clairement mise en évidence par la réduction de métabolites sériques et urinaires du thromboxane. Cependant d'un point de vue thérapeutique, le terbogrel s'est montré peu efficace. De plus, son étude a dû être suspendue car il provoquait de violentes douleurs aux jambes chez certains patients (Langleben et al., 2002).

Les résultats des études cliniques réalisées avec les composés à activité mixte ont permis de confirmer leur potentiel thérapeutique supérieur par rapport aux inhibiteurs de la thromboxane synthétase et aux antagonistes du récepteur TP utilisés seuls. La mise au point de ce type de composés est dès lors d'un grand intérêt thérapeutique et fait l'objet de nombreuses recherches.

1.4. Motivations et objectifs

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation pharmacologique de modulateurs de la cascade de l'acide arachidonique. Deux approches distinctes de la modulation du métabolisme de l'acide arachidonique ont été envisagées. Nous nous sommes intéressés d'une part à la caractérisation d'un antagoniste potentiel du récepteur du TXA₂ et d'autre part, à l'évaluation de molécules originales potentiellement inhibitrices des COXs et en particulier de la COX-2.

La COX-2 et le récepteur du TXA₂ constituent en effet des cibles pharmacologiques attractives dans la mesure où elles sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques.

Ainsi, comme nous l'avons signalé dans l'introduction, la COX-2 est une isoforme inductible responsable de la production accrue de prostanoïdes dans des situations pathologiques telles l'inflammation et la prolifération cancéreuse (Claria et al., 2003). La COX-1 est quant à elle une isoforme constitutive majoritairement responsable de la production physiologique de prostanoïdes. L'inhibition de la COX-1 par les AINS est dès lors considérée comme responsable des effets secondaires liés à leur utilisation prolongée. Les travaux actuels de recherche de nouveaux AINS se sont donc naturellement orientés vers la mise au point d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Les inhibiteurs sélectifs de cette isoforme (coxibs) déjà commercialisés ont prouvé leur intérêt thérapeutique.

Nous avons également vu que le TXA₂ est un médiateur cellulaire aux propriétés pro-agrégantes plaquettaires, vaso- et bronchoconstrictrices. De par ses propriétés biologiques, il est notamment impliqué dans des pathologies telles l'athérosclérose (Belton et Fitzgerald, 2003) et l'asthme bronchique (Dogné et al., 2002). Dans le but de remédier à ces propriétés défavorables, des inhibiteurs de la thromboxane synthétase, des antagonistes du récepteur TP et des composés mixtes ont été développés (Dogné et al., 2000).

Pour cibler la voie du TXA₂ et, suite à des travaux antérieurs, nous avons évalué l'activité potentiellement antagoniste d'une sulfonylurée originale (BM-520) dérivée du torasémide vis-à-vis des récepteurs TP de différents types cellulaires. Le torasémide a été synthétisé au début des années septantes par le professeur Delarge du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège (Delarge et Lapière, 1978) (Figure I-28). Par la suite, ce puissant diurétique de la branche ascendante de l'anse de Henlé a été commercialisé comme antihypertenseur sous le nom de Torrem[®]. L'intérêt des dérivés du torasémide en tant que modulateurs de la voie du TXA₂ est lié à la découverte d'Uchida. En effet, en 1992, il montra que le torasémide était capable de relâcher une artère coronaire de chien contractée au préalable par le TXA₂ carbocyclique, un agoniste stable du TXA₂ (Uchida et al., 1992).

A la suite de cette découverte, l'activité de nombreuses molécules chimiquement apparentées au torasémide a été investiguée par le professeur Masereel dans le but de découvrir des ligands plus affins du récepteur du TXA₂ et des antagonistes plus puissants que le torasémide, leur composé parent. L'affinité de ces molécules a été étudiée au cours d'un test de liaison spécifique au récepteur du TXA₂ de plaquettes humaines. Lors de ce test, la capacité des drogues à déplacer un ligand radiomarqué, le [5,6³H]SQ-29548, des récepteurs TP plaquettaires a été mesurée. Pour chaque drogue, des courbes doses-réponses ont permis le calcul de la concentration (IC₅₀) nécessaire pour déplacer 50 % du ligand tritié lié spécifiquement au récepteur TP. Lors de ce premier criblage, deux molécules se sont avérées très affines pour ce récepteur : le BM-144, une sulfonylecyanoguanidine pyridinique (IC₅₀ : 281 ± 21 nM) et le BM-500 qui est l'analogue nitrobenzénique du torasémide (IC₅₀ : 80 ± 7,9

nM) (Masereel et al., 1999). La molécule hybride de ces deux composés, le BM-519, présente une affinité encore supérieure (IC_{50} : $22 \pm 2,0$ nM) (Figure I-29). Ces résultats ont relancé la synthèse d'autres molécules apparentées au torasémide dont l'affinité pour le récepteur TP a été caractérisée.

Parmi celles-ci, le BM-520 a montré une haute affinité pour le récepteur du TXA_2 (IC_{50} : $3,96 \pm 0,40$ nM), supérieure à celle du torasémide (IC_{50} : 2700 ± 70 nM) et du SQ-29548, un antagoniste de référence (IC_{50} : $21 \pm 2,0$ nM). De plus, quelques expériences préliminaires ont montré que ce composé était capable d'inhiber l'agrégation de plaquettes humaines induite par différents agonistes. Soulignons que d'un point de vue chimique, cette sulfonyleurée nitrobenzénique est un isomère de position du BM-573 (Figure I-30). Ce dernier présente également une haute affinité pour le récepteur du TXA_2 (IC_{50} : $1,3 \pm 0,1$ nM) et possède une double activité à la fois sur la thromboxane synthétase et sur le récepteur TP. Son activité antagoniste vis-à-vis de ce récepteur a été largement caractérisée dans divers modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Ainsi, il a été démontré que le BM-573 était capable de prévenir l'agrégation de plaquettes humaines induite par l'acide arachidonique (EC_{100} : $0,125 \pm 0,015$ μ M) et de relâcher l'aorte de rat préalablement contractée au U-46619, un antagoniste de référence du récepteur TP (EC_{50} : $28,4 \pm 4,5$ nM) (Rolin et al., 2001). Un effet cardioprotecteur du BM-573 a également été mis en évidence dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le porc (Rolin et al., 2003).

En raison de sa haute affinité pour le récepteur du TXA_2 et des propriétés inhibitrices de la thromboxane synthétase, anti-agrégantes, myorelâchantes et cardioprotectrices de son isomère, le BM-520 s'avérait être un modulateur potentiel de la voie du TXA_2 . En vue de confirmer cette hypothèse, nous avons caractérisé l'activité du BM-520. Ainsi, dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel anti-agrégant *in vitro* de ce composé sur des plaquettes stimulées par différents inducteurs de l'agrégation et son pouvoir myorelâchant *ex vivo* sur des organes isolés préalablement contractés par un agoniste du TXA_2 . Dans un second temps, nous avons évalué dans ces mêmes modèles pharmacologiques l'intérêt d'une administration préventive de BM-520 à l'animal.

Si avec le BM-520 nous avons pour cible le récepteur du TXA_2 , nous nous sommes également intéressés à des enzymes agissant en amont dans la cascade de l'acide arachidonique : les COXs et en particulier la COX-2. En effet nous avons à notre disposition une série de molécules originales potentiellement inhibitrices de la COX-2, synthétisées au sein du Département de Pharmacie. D'un point de vue chimique, ces molécules sont caractérisées par un noyau central 2-thiohydantoïne sur lequel différentes pharmacomodulations ont été effectuées en position 3 et 5 (Figure I-31). Certaines d'entre elles présentent une structure ayant des fonctions chimiques voisines de celles des coxibs. Pour cette raison, il paraissait séduisant d'évaluer le potentiel inhibiteur de ces composés vis-à-vis des COXs. A cette fin, nous avons testé ces molécules *in vitro* dans un modèle utilisant comme substrat le sang humain. En parallèle, un modèle d'inflammation aiguë (œdème à la carragénine) a été mis au point chez le rat.

II. RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

II.1. Résultats et discussion

II.1.1. Etude chez le cobaye d'une sulfonylurée nitrobenzénique originale modulatrice de la voie du thromboxane A₂

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, le thromboxane A₂, un prostanoloïde issu du métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases, est un puissant agrégant plaquettaire et un constricteur de la musculature lisse vasculaire et bronchique. De par ses propriétés biologiques, il est impliqué entre autre dans l'étiopathologie de l'asthme bronchique et de troubles cardiovasculaires. Pour cette raison, les agents qui modulent la voie du TXA₂ en inhibant la thromboxane synthétase et/ou en bloquant l'action du TXA₂ au niveau de son récepteur (TP) présentent un intérêt thérapeutique certain.

Au cours de cette étude pharmacologique réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège, nous avons caractérisé le comportement d'un composé original dérivé du torasémide, le BM-520, vis-à-vis des récepteurs TP présents dans différents types cellulaires appartenant à une même espèce animale, le cobaye.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité antagoniste du BM-520 *in vitro* sur l'agrégation plaquettaire induite par le U-46619, un agoniste stable du récepteur TP, et par l'acide arachidonique, précurseur du TXA₂ et inducteur de l'agrégation. L'effet de cet antagoniste original a aussi été étudié *ex vivo* sur la contraction de la musculature lisse d'organes isolés déclenchée par le U-46619 ou par le 8-iso-PGF_{2α}.

Dans un second temps, en raison du potentiel important des antagonistes du récepteur TP sur le plan thérapeutique, nous avons également investigué l'intérêt d'un pré-traitement des cobayes avec le BM-520 dans ces mêmes modèles pharmacologiques (agrégation plaquettaire et contraction d'organes isolés).

Les résultats de cette étude pharmacologique sont présentés et discutés dans ce chapitre.

II.1.1.1. Choix de la molécule

Comme nous l'avons souligné précédemment, le BM-520 a été retenu pour cette étude en raison de sa haute affinité pour le récepteur du TXA₂ (IC₅₀ : 3,96 ± 0,40 nM) et de sa structure chimique proche de celle du BM-573 (isomère de position) aux propriétés anti-agrégantes, myorelâchantes et cardioprotectrices (Figure II-1).

II.1.1.2. Choix de l'espèce

Nous avons caractérisé l'activité du BM-520 sur différents types cellulaires (plaquettes, musculature lisse de l'aorte et de la trachée) appartenant à une même espèce animale, le cobaye. Le choix de cette espèce s'est opéré sur base de deux critères majeurs. D'une part, l'étude en agrégométrie est beaucoup plus aisée avec les plaquettes isolées (plasma riche en plaquettes) de cobaye qu'avec les plaquettes de rat. D'autre part, ayant observé que la trachée de rat répondait peu (Martin et al., 2000 ; Van de Voorde et Joos,

1998) voire pas du tout au U-46619, il nous était impossible de réaliser une étude complète du BM-520 chez cette espèce animale, alors que nous avons choisi cet agoniste de référence pour induire la contraction des organes isolés.

II.1.1.3. Choix des modèles d'expérience

Deux modèles pharmacologiques ont été retenus afin de caractériser l'activité pharmacologique du BM-520. Ainsi, les plaquettes de cobaye ont été utilisées dans des expériences d'agrégation plaquettaire. La trachée et l'aorte ont été exploitées dans un modèle de contraction d'organes isolés.

II.1.1.3.1. Les plaquettes

Les plaquettes, et plus précisément le plasma riche en plaquettes (PRP) a été choisi pour plusieurs raisons. Premièrement, les plaquettes constituent la source principale de TXA₂ et sont riches en récepteurs de ce médiateur. Par ailleurs, le phénomène d'agrégation plaquettaire est facilement quantifiable par une méthode turbidimétrique classique dont les valeurs obtenues sont reproductibles. Enfin, l'obtention du PRP est relativement aisée.

II.1.1.3.2. La musculature lisse d'organes isolés

Une élévation du taux de TXB₂, reflet de la production de TXA₂, est mesurable entre autre dans des pathologies pulmonaires comme l'asthme bronchique et cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde. Cette surproduction est associée respectivement à une bronchoconstriction et à une vasoconstriction. Il était donc intéressant d'investiguer le comportement du BM-520 sur la musculature lisse de la trachée et de l'aorte de cobaye, des tissus riches en récepteurs du TXA₂ (Halushka, 2000).

II.1.1.4. Etude chez des cobayes non traités au BM-520

II.1.1.4.1. Prévention de l'agrégation plaquettaire in vitro

Avant de présenter et de discuter les résultats obtenus en agrégométrie, il nous paraissait intéressant de définir l'agrégation plaquettaire ainsi que le processus physiologique dans lequel elle est impliquée : l'hémostase.

II.1.1.4.1.1. Les plaquettes et l'hémostase

Les plaquettes sont des fragments cellulaires anucléés issus des mégacaryocytes et impliqués dans le processus d'hémostase. Celle-ci est définie comme l'ensemble des mécanismes qui permettent la cessation de l'écoulement de sang lors d'une atteinte à l'intégrité vasculaire. Les différentes étapes de l'hémostase sont le spasme vasculaire, la formation du clou plaquettaire ou thrombus, et la formation du caillot qui piège le clou plaquettaire.

La formation du clou plaquettaire résulte de la succession de trois phases : l'adhésion, l'activation et l'agrégation.

Les plaquettes circulantes restent habituellement dans un état inactif sous l'effet de la prostacycline et du monoxyde d'azote libérés par les cellules endothéliales. Lors d'une lésion

vasculaire, les plaquettes entrent en contact avec les constituants sous-endothéliaux, principalement le collagène, le facteur de von Willebrand (vWf) et la fibronectine par l'intermédiaire de récepteurs de surface tels l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, la glycoprotéine Ib-IX et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, respectivement.

L'adhésion aux structures sous-endothéliales et des facteurs solubles tels l'ADP, le TXA₂ et le PAF (*platelet activating factor*) ont pour conséquence l'activation des plaquettes. Initialement discoïdes, les plaquettes activées deviennent sphériques et forment des pseudopodes. Ce changement de forme s'accompagne d'une libération d'ADP, de sérotonine et de calcium contenus dans les granules denses ainsi que du fibrinogène, du vWf et d'autres protéines stockées dans les granules α . Cette sécrétion s'accompagne de la biosynthèse de TXA₂ suite à l'activation de la phospholipase A₂.

L'ADP et le TXA₂ induisent le changement de forme et l'activation des plaquettes circulantes. Les glycoprotéines IIB-IIIa, exprimées en surface des plaquettes activées, lient le fibrinogène, conduisant ainsi à la formation de ponts de fibrinogène entre les plaquettes et donc à l'agrégation plaquettaire.

II.1.1.4.1.2. Principe

Le principe consiste à mesurer l'effet préventif de la drogue étudiée vis-à-vis de l'agrégation des plaquettes provoquée par deux inducteurs différents : le U-46619 et l'acide arachidonique selon la méthode turbidimétrique de Born et Cross (Born et Cross, 1963).

L'agrégation plaquettaire est réalisée sur du plasma enrichi en plaquettes (PRP) obtenu par centrifugation du sang prélevé au niveau de la veine cave inférieure des cobayes. Le PRP est incubé trois minutes avec le BM-520 à une concentration définie avant d'être stimulé par le U-46619 ou l'acide arachidonique. Si la drogue prévient l'agrégation plaquettaire, il est vraisemblable que celle-ci agit comme un antagoniste en occupant les sites de fixation du récepteur TP. Différentes concentrations en drogue ont été examinées et ont permis de réaliser des courbes doses-réponses représentant l'évolution du pourcentage d'agrégation plaquettaire en fonction du logarithme de la concentration en BM-520. A partir de celles-ci, la concentration en drogue (EC₅₀) requise pour prévenir 50 % de l'agrégation plaquettaire a été calculée.

II.1.1.4.1.3. Effet du BM-520 sur l'agrégation plaquettaire *in vitro*

L'acide arachidonique et le U-46619 sont utilisés à des concentrations finales respectives de 600 μ M et de 1 μ M. A ces concentrations, ils induisent une agrégation plaquettaire complète, monophasique et irréversible (Figure II-2).

Cette agrégation est prévenue de manière dose-dépendante par le BM-520. La figure II-3 représente les courbes doses-réponses réalisées avec le BM-520 lorsque l'agrégation est induite par le U-46619 (1 μ M) ou par l'acide arachidonique (600 μ M). Si le U-46619 est utilisé comme inducteur, la concentration en BM-520 nécessaire pour inhiber 50 % de l'agrégation plaquettaire (EC₅₀) est de $5,7 \pm 0,8$ μ M. Elle est de $6,7 \pm 1,5$ μ M lorsque l'agrégation est déclenchée par l'acide arachidonique.

II.1.1.4.2. Contraction d'organes isolés

II.1.1.4.2.1. Principe

La trachée et l'aorte, prélevées sur des cobayes Dunkin-Hartley, sont nettoyées de tout tissu adhérent et coupées en segments d'environ 5 mm. Ceux-ci sont ensuite suspendus dans un bain thermostaté à 37°C contenant la solution d'incubation (tampon Krebs-Henseleit) et soumis à l'action du carbogène amenant le pH à 7,4.

Après stabilisation de la tension à 1 gramme, une contraction est déclenchée par l'ajout de l'agoniste. Quand la tension maximale est atteinte et stable, les tissus sont relâchés par paliers au moyen de concentrations croissantes en BM-520. Signalons que durant la période de stabilisation, des lavages sont réalisés tous les quarts d'heure.

A partir des tracés obtenus, des courbes doses-réponses sont réalisées. Elles représentent l'évolution de la tension (%) de l'aorte ou de la trachée en fonction du logarithme de la concentration en drogue. Sur base de ces courbes, la concentration (EC_{50}) en BM-520 nécessaire pour réduire de 50 % le tonus musculaire induit par un agoniste est calculée.

II.1.1.4.2.2. Effet du BM-520 ex vivo sur la contraction de l'aorte et de la trachée de cobaye

Afin de déterminer la concentration optimale en U-46619 à utiliser pour contracter l'aorte et la trachée, des courbes doses-réponses ont été réalisées. Ainsi, l'ajout de concentrations croissantes en agoniste (de 0,15 nM à 13,3 μ M) permet de contracter les tissus par paliers. La figure II-4 représente l'évolution de la tension de l'aorte de cobaye en fonction du temps suite à l'ajout de concentrations croissantes en U-46619. Des tracés similaires ont été obtenus sur la trachée de cobaye.

Les courbes doses-réponses réalisées à partir de ces tracés sont représentées à la figure II-5. Elles nous ont permis de déterminer la concentration en U-46619 requise pour obtenir une tension équivalant à 50 % du tonus maximal (EC_{50}). Les EC_{50} calculés pour l'aorte et la trachée sont de $15,0 \pm 1,1$ nM et de $30,0 \pm 6,2$ nM, respectivement. Sur base de ces courbes, il a été décidé de contracter la trachée et l'aorte de cobaye par une concentration en U-46619 de 20 nM. En effet, cette concentration en agoniste permet d'induire une contraction optimale des tissus.

Après avoir déterminé la concentration optimale en U-46619, la trachée et l'aorte de cobaye préalablement contractées ont été relâchées par des concentrations croissantes en BM-520 (de 0,05 nM à 6,3 μ M). La figure II-6 montre la relaxation de la trachée en fonction du temps au moyen de concentrations croissantes en BM-520. Signalons que des tracés semblables ont été obtenus sur l'aorte.

Les courbes doses-réponses obtenues à partir de ces tracés sont représentées à la figure II-7. Les EC_{50} déterminés sur base de ces courbes sont de $84,9 \pm 7,0$ nM pour l'aorte et de $41,3 \pm 5,0$ nM pour la trachée.

Il était également intéressant d'investiguer l'effet du BM-520 sur la contraction de l'aorte et de la trachée induite par le 8-iso-PGF_{2α}. En effet, comme nous l'avons signalé précédemment (voir point I.1.4.2), cet isoprostane, est capable d'accroître le tonus musculaire en se liant au récepteur TP et est vraisemblablement impliqué dans diverses pathologies associées à un stress oxydatif telles l'athérosclérose et l'asthme bronchique. Ayant observé que la trachée et l'aorte de cobaye ne répondaient pas au 8-iso-PGF_{2α}, nous avons décidé d'investiguer l'activité de cet isoprostane chez le rat.

Nous avons montré que l'ajout successif de concentrations croissantes en 8-iso-PGF_{2α} (de 1,0 nM à 10,3 μM) permet de contracter l'aorte de rat de manière dose-dépendante (Figure II-8 a). La concentration nécessaire pour induire une tension équivalant à 50 % du tonus musculaire a été évaluée sur base de courbes doses-réponses (EC₅₀ : 1,0 ± 0,1 μM) (Figure II-8 b). Ceci nous a permis de déterminer la concentration optimale en 8-iso-PGF_{2α} nécessaire pour contracter l'aorte de rat, soit 1 μM. Si l'aorte de rat répondait de manière dose-dépendante au 8-iso-PGF_{2α}, la trachée était quant à elle insensible à cet agoniste. (Figure II-9). Nous n'avons donc pu investiguer l'effet de cet isoprostane au niveau de ce tissu.

Par ailleurs, le BM-520 s'est avéré capable de relâcher de manière dose-dépendante l'aorte de rat préalablement contractée au 8-iso-PGF_{2α} (1 μM) avec un EC₅₀ de 99,1 ± 7,8 nM (Figure II-10).

L'aorte de rat contractée au 8-iso-PGF_{2α} (1 μM) a également été relâchée par deux autres antagonistes de référence du récepteur TP, le BM-573 et le SQ-29548. Comme pour le BM-520, des courbes doses-réponses ont été réalisées et les EC₅₀ ont été calculés. Ainsi, le BM-573, comme le BM-520, s'avère être un antagoniste moins puissant sur l'aorte (EC₅₀ : 91,7 ± 6,5 nM) que le SQ-29548 (EC₅₀ : 1,8 ± 0,23 nM).

II.1.1.5. Etude chez des cobayes pré-traités au BM-520

II.1.1.5.1. Prévention de l'agrégation plaquettaire in vivo

II.1.1.5.1.1. Principe

En fonction du poids des animaux, un volume adéquat d'une solution de BM-520 à 10 mg.mL⁻¹ est injecté dans la veine cave inférieure en vue d'atteindre une dose de 10 mg.kg⁻¹. Trois minutes après l'injection, le sang est prélevé de la même manière que pour les animaux non traités. La centrifugation du sang permet ensuite d'obtenir le PRP.

L'agrégation, se traduisant par une augmentation de la transmission, est suivie au cours du temps, suite à des ajouts successifs (de minute en minute) de U-46619 (1 μM) et d'acide arachidonique (600 μM). A partir des tracés obtenus, une dose cumulative moyenne en inducteur nécessaire à une agrégation complète est déterminée.

II.1.1.5.1.2. Effet de l'injection intraveineuse de BM-520 sur l'agrégation plaquettaire

Pour rappel, chez les cobayes non traités, le U-46619 et l'acide arachidonique induisent une agrégation plaquettaire complète à des concentrations finales de 1 μM et de 600 μM, respectivement (Figures II-2 a et b).

Lorsque le BM-520 a été administré à l'animal, plusieurs ajouts en agent inducteur à ces concentrations sont nécessaires pour déclencher une agrégation plaquettaire complète (Figure II-11). La dose cumulative moyenne requise pour observer cette agrégation est de $12,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ pour le U-46619 et de $3250 \pm 250 \mu\text{M}$ pour l'acide arachidonique. Ainsi, lorsque les animaux ont été pré-traités, les concentrations en U-46619 et en acide arachidonique doivent être multipliées par 12 et par 5, respectivement.

Remarquons que l'allure des courbes est différente en fonction de l'agent inducteur utilisé. Ainsi, pour le U-46619, la diminution de transmission associée aux premières injections peut vraisemblablement être attribuée à un changement de forme des plaquettes.

II.1.1.5.2. Contraction d'organes isolés

II.1.1.5.2.1. Principe

Après le prélèvement de sang pour l'étude en agrégométrie décrite ci-dessus, la trachée et l'aorte sont disséquées et extraites. Elles sont ensuite nettoyées de tout tissu adhérent et découpées en fragments qui seront étudiés *ex vivo*, comme décrit précédemment.

Afin de confirmer l'activité antagoniste du BM-520 *in vivo*, l'aorte et la trachée ont été contractées par des concentrations croissantes en U-46619. Comme pour les cobayes non traités, des courbes doses-réponses ont été réalisées et la concentration (EC_{50}) en agoniste nécessaire pour induire une tension équivalant à 50 % du tonus maximal a été calculée. Soulignons cependant qu'aucun lavage n'a été réalisé durant la période de stabilisation des tissus.

Si une augmentation de l' EC_{50} est observée, cela signifie que le BM-520, administré *in vivo*, est capable de prévenir l'effet du U-46619 sur la contraction de la musculature lisse de l'aorte et de la trachée.

II.1.1.5.2.2. Effet de l'injection intraveineuse de BM-520 sur la contraction de l'aorte et de la trachée

Des injections successives de concentrations croissantes en U-46619 nous ont permis de contracter l'aorte de cobaye par paliers. Sur base de courbes doses-réponses, nous avons calculé un EC_{50} équivalant à $123 \pm 15,6 \text{ nM}$. Pour rappel, l' EC_{50} est de $15,0 \pm 1,1 \text{ nM}$ lorsque les cobayes n'ont pas été traités au BM-520. La figure II-12 représente l'évolution de la tension (%) de l'aorte de cobaye en fonction du logarithme de la concentration en U-46619 selon que les cobayes aient été pré-traités ou non avec le BM-520. On observe clairement un déplacement de la courbe vers des concentrations plus élevées lorsque les animaux ont été pré-traités.

En ce qui concerne la trachée, aucun déplacement de la courbe vers des concentrations plus élevées n'a pu être mis en évidence suite à l'administration préventive du BM-520.

II.1.1.6. Discussion

Précédemment, des études de *binding* avaient permis de déterminer l'affinité du BM-520 pour le récepteur TP de plaquettes humaines lavées. Celle-ci est exprimée en terme de concentration (IC_{50}) en drogue requise pour déplacer 50 % de ligand radiomarqué [5,6³H]SQ-29548 lié aux récepteurs TP. Dans ces expériences, cette sulfonyleurée nitrobenzénique a montré une haute affinité pour le récepteur TP (IC_{50} : 3,96 nM), supérieure à celle du torasémide, son composé parent (IC_{50} : 2700 nM) et proche de celle du BM-573, un isomère de position du BM-520 (IC_{50} : 1,3 nM). Signalons que ces deux isomères originaux sont plus affins vis-à-vis du récepteur TP que le SQ-29548 (IC_{50} : 21 nM) et le sulotroban (IC_{50} : 931 nM), deux antagonistes de référence. Notons aussi que, malgré leur structure chimique proche de celle du torasémide, il a été démontré chez le rat que le BM-520 et le BM-573 ont perdu toute activité diurétique (Rolin et al., 2001). D'autres expériences préliminaires réalisées sur plaquettes humaines ont montré que le BM-520 était capable de prévenir l'agrégation plaquettaire induite par différents agonistes.

Au cours de ce mémoire, nous avons investigué plus en détail l'activité antagoniste du BM-520. Avant d'évaluer l'effet d'un pré-traitement *in vivo* des cobayes avec ce composé, nous avons caractérisé son activité antagoniste *in vitro* sur les plaquettes et *ex vivo* sur la trachée et l'aorte.

Les résultats de l'étude agrégométrique indiquent que le BM-520 agit bien en tant qu'antagoniste du récepteur du TXA_2 . En effet, ce dérivé du torasémide est capable d'empêcher de manière dose-dépendante l'agrégation plaquettaire induite par le U-46619 (EC_{50} : 5,7 μ M), un agoniste de référence et par l'acide arachidonique (EC_{50} : 6,7 μ M), le précurseur du TXA_2 . Bien que les mécanismes par lesquels ces composés déclenchent l'agrégation des plaquettes soient différents, le BM-520 prévient l'effet de ces deux inducteurs avec des puissances (EC_{50}) comparables. Signalons, en effet, que les antagonistes du récepteur TP préviennent l'agrégation des plaquettes induite par le U-46619 par compétition directe au niveau des récepteurs du TXA_2 plaquettaires. L'inhibition de l'agrégation induite par l'acide arachidonique est quant à elle consécutive à l'effet antagoniste du TXA_2 produit *in situ*.

Si l'activité du BM-520 vis-à-vis des COXs n'a pas été explorée au cours de ce mémoire, il a été montré antérieurement que les sulfonyleurées nitrobenzéniques, à une concentration de 10 μ M, ne présentaient pas d'activité inhibitrice de la COX-1 et de la COX-2 ovines incubées séparément avec l'acide arachidonique (Dogné et al., 2003). Par ailleurs, diverses expériences préliminaires sur plaquettes humaines ont révélé qu'à cette concentration, le BM-520 inhibait la thromboxane synthétase plaquettaire à plus de 80 %. Par conséquent, l'activité inhibitrice de ce composé vis-à-vis de l'agrégation plaquettaire n'est pas exclusivement attribuable à son caractère antagoniste du récepteur du TXA_2 . Il apparaît donc que le BM-520 présenterait une double activité à la fois inhibitrice de la thromboxane synthétase et antagoniste du récepteur TP.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, ce type de molécule présente plusieurs intérêts. D'une part, l'activité inhibitrice de la thromboxane synthétase prévient la synthèse de TXA_2 et entraîne une accumulation de PGH_2 . Cet endoperoxyde peut dès lors servir de substrat à la prostacycline synthétase, présente abondamment au niveau de l'endothélium vasculaire, pour produire des quantités plus élevées de prostacycline (PGI_2), un puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. D'autre part, l'effet du TXA_2

résiduel et de son agoniste physiologique, la PGH_2 est bloqué par l'activité antagoniste de ces molécules.

Le caractère antagoniste du BM-520 vis-à-vis du récepteur du TXA_2 a également été confirmé *ex vivo* sur la musculature lisse de l'aorte et de la trachée de cobaye. En effet, cette molécule s'est avérée capable de relâcher de manière dose-dépendante l'aorte et la trachée préalablement contractées au U-46619. Ces expériences ont permis de définir un EC_{50} , soit la concentration en drogue nécessaire pour réduire de 50 % le tonus musculaire. Ainsi, le BM-520 s'avère deux fois plus actif sur la trachée (EC_{50} : 41,3 nM) que sur l'aorte de cobaye (EC_{50} : 84,9 nM). Cette différence d'activité n'est toutefois pas significative et ne nous permet pas de nous prononcer quant à l'existence de différences inter-tissulaires décrites dans d'autres études. Si le U-46619 n'induit aucune contraction de la trachée de rat, il est toutefois capable de contracter la trachée de cobaye de manière dose-dépendante. Cette différence de réponse à l'agoniste d'un même tissu, issu de deux espèces différentes, supporte l'hypothèse selon laquelle il existe des différences inter-espèces au niveau des récepteurs TP de la musculature lisse (Ogletree et Allen., 1992 ; Zhang et al., 1996).

En raison de son implication potentielle dans des pathologies telles l'athérosclérose et l'asthme, nous avons également investigué l'effet du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ sur les cellules musculaires lisses. Si cet isoprostane n'entraîne pas de contraction de l'aorte et de la trachée de cobaye, il induit cependant la contraction de l'aorte de rat de manière dose-dépendante avec un EC_{50} de 1,0 μM . Cette valeur d' EC_{50} est similaire à celles obtenues dans d'autres études (Cracowski et al., 2001). Signalons que la valeur d' EC_{50} pour le U-46619 est de $12,2 \pm 2,0$ nM sur l'aorte de rat. En terme d' EC_{50} , le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ apparaît donc 80 fois moins puissant que le U-46619 sur l'aorte. Néanmoins, ces deux agonistes engendrent des tensions maximales similaires de l'aorte de rat. Ils sont dès lors comparables en terme d'efficacité.

Le BM-520 s'est également avéré capable de relâcher l'aorte de rat contractée au préalable au 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ (EC_{50} : 99,1 nM). Il possède une activité analogue à celle de son isomère, le BM-573 (EC_{50} : 91,7 nM) mais inférieure à celle du SQ-29548 (EC_{50} : 1,8 nM) qui reste le composé le plus actif.

Ainsi, ces trois antagonistes du récepteur TP réduisent de manière dose-dépendante la tension induite par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ jusqu'à ce qu'elle atteigne la tension basale. Ces observations confirment l'hypothèse selon laquelle cet isoprostane interagit avec le récepteur du TXA_2 . L'existence d'une telle interaction fonctionnelle a été démontrée par Kinsella et ses collaborateurs (Kinsella et al., 1997). En effet, ceux-ci mirent en évidence la capacité de ce ligand à induire une augmentation de calcium intracellulaire au niveau des plaquettes et de cellules embryonnaires humaines de reins co-transfectées avec une protéine G de transduction du signal et avec l'isoforme TP α . Ils montrèrent également que cette augmentation de calcium intracellulaire était inhibée par le SQ-29548, soutenant l'hypothèse selon laquelle le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ représente un ligand alternatif endogène du récepteur du TXA_2 . Néanmoins, l'existence de récepteurs spécifiques aux isoprostanes, distincts mais structurellement similaires aux récepteurs du TXA_2 , a été suggérée par Fukunaga (Fukunaga et al., 1993) et est encore aujourd'hui controversée.

Il est important de souligner que les concentrations physiologiques plasmatiques en F $_2$ -isoprostanes sont approximativement de l'ordre de 0,5 nM à 1 nM. Il est donc peu probable que ces concentrations induisent une constriction systémique, étant donné les valeurs d' EC_{50} observées *ex vivo*. Cependant, une augmentation significative des taux d'isoprostanes a été mise en évidence dans les liquides biologiques de patients souffrant d'athérosclérose.

Cette augmentation est corrélée à certains facteurs de risque comme le tabagisme et l'hypercholestérolémie (Patrono et FitzGerald, 1997). Par ailleurs, cet isoprostane est synthétisé abondamment au site du stress oxydatif et s'accumule dès lors au sein des membranes biologiques des divers types cellulaires de la plaque athéromateuse. Il est ensuite libéré de sa liaison au glycérol probablement suite à l'action de phospholipases. Ainsi, il se produit localement une augmentation de la concentration en isoprostanes. Celle-ci pourrait dès lors être suffisamment élevée pour induire une vasoconstriction locale (Cracowski et al., 2002).

Outre cette capacité à induire une vasoconstriction, le 8-iso-PGF_{2α} stimule également la prolifération et la mitogenèse des cellules musculaires lisses et modifie la fonction plaquettaire. Ces activités biologiques et l'augmentation des taux plasmatiques chez des patients souffrant d'athérosclérose font du 8-iso-PGF_{2α} une molécule potentiellement pro-athérogène.

L'aspirine est actuellement le composé le plus fréquemment utilisé dans la prévention des complications associées à cette pathologie. En effet, en inhibant de manière irréversible la COX-1 plaquettaire, elle réduit la production de TXA₂, médiateur lipidique clairement impliqué dans le développement et l'aggravation des lésions athéromateuses. Toutefois, étant donné leur mécanisme de formation indépendant des COXs, l'aspirine ne prévient pas la genèse des isoprostanes. La production de ces isoprostanes pourrait dès lors expliquer en partie les échecs de l'aspirine dans la prévention des accidents cardiovasculaires chez certains patients (Cayatte et al., 2000). Ceci renforce l'intérêt de l'utilisation clinique d'antagonistes du récepteur TP tels le BM-520 dans la mesure où ces composés bloquent à la fois l'action du TXA₂ et du 8-iso-PGF_{2α}.

Il ressort de cette première partie de notre étude que le BM-520 pourrait trouver un intérêt dans le traitement de pathologies cardiovasculaires puisqu'il possède une activité anti-agrégante plaquettaire et myorelâchante de l'aorte. Par ailleurs, cette molécule est capable de relâcher l'aorte de rat préalablement contractée au 8-iso-PGF_{2α}, ce qui renforce son intérêt dans le traitement de ces pathologies. Enfin, les propriétés myorelâchantes du BM-520 sur la trachée suggèrent un potentiel important dans la réduction de la sévérité des symptômes de l'asthme bronchique. Pour rappel, le sératrodast, le seul antagoniste du récepteur TP commercialisé, est indiqué dans le traitement de cette pathologie.

Afin de confirmer le potentiel thérapeutique du BM-520, nous avons étudié l'effet d'une administration intraveineuse de cette molécule sur l'agrégation plaquettaire et la contraction de la trachée et de l'aorte.

Ainsi, lorsqu'il est injecté préventivement à l'animal, le BM-520 prévient toute agrégation plaquettaire induite par le U-46619 (1 μM) et l'acide arachidonique (600 μM) qui, à ces doses, induisent une agrégation complète chez les animaux non traités. Nous avons montré que suite à l'administration de BM-520, les concentrations en U-46619 et en acide arachidonique devaient respectivement être multipliées par 12 et par 5 pour observer une agrégation complète.

Nous avons également confirmé le caractère antagoniste *in vivo* du BM-520 sur la contraction de l'aorte de cobaye induite par le U-46619. Ainsi, l'administration préventive de BM-520 (10 mg.kg⁻¹, i.v.) entraîne une augmentation significative de l'EC₅₀ (EC₅₀ : 123 nM) par rapport aux animaux non traités (EC₅₀ : 15 nM). L'EC₅₀ est donc multiplié par 8 lorsque les animaux ont été pré-traités avec la drogue.

Etant donné que le BM-520 a montré une activité *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* dans divers modèles pharmacologiques, il est intéressant de comprendre l'interaction de ce type de structure chimique avec le récepteur TP. Ainsi, sur base du modèle d'interaction proposé par Yamamoto au début des années nonantes, plusieurs hypothèses quant à l'interaction des sulfonylurées nitrobenzéniques avec le récepteur du TXA₂ ont été énoncées. Rappelons que selon ce modèle, la fonction carboxylique du TXA₂ interagirait avec l'arginine 295 du septième domaine transmembranaire, tandis que sa fonction hydroxyle formerait un pont hydrogène avec la sérine 201 du cinquième domaine transmembranaire. Enfin, le bicycle ainsi que la chaîne ω s'incorporeraient dans une poche hydrophobe (Yamamoto et al., 1993).

Suivant ce modèle, la fonction nitro du BM-520 est supposée former un pont hydrogène avec la sérine 201 tandis que le groupement *m*-toluyle occupe probablement une poche hydrophobe du récepteur TP. La présence d'un *tert*-butyle au niveau de la chaîne latérale augmenterait l'affinité du BM-520 pour le récepteur TP en occupant une seconde poche latérale (Michaux et al., 2003). Bien que ce composé ne possède pas de groupement carboxylique, la fonction sulfonylurée étant chargée négativement à pH physiologique pourrait dès lors interagir avec l'arginine 295 par une liaison de type électrostatique (Michaux et al., 2003). Soulignons que le remplacement de la fonction sulfonylurée par un nitroéthène entraîne une perte d'activité importante. Ainsi, nous avons montré que des dérivés pyridiniques possédant une fonction nitroéthène sont beaucoup moins actifs pour relâcher l'aorte de rat contractée préalablement avec le U-46619 (EC₅₀ : \simeq μ M). Cette constatation expérimentale renforce l'importance de la fonction sulfonylurée pour l'interaction du BM-520 avec le récepteur du TXA₂.

II.1.2. Evaluation pharmacologique *in vitro* de thiohydantoïnes originales et mise au point d'un modèle d'inflammation aiguë chez le rat

La découverte de deux isoformes de cyclooxygénases (COXs) et la démonstration de leur implication différente dans la régulation de processus physiologiques et physiopathologiques ont stimulé la synthèse et l'évaluation d'inhibiteurs de COXs.

En effet, si la COX-1, exprimée constitutivement, est responsable majoritairement de la synthèse de prostanoïdes régulant divers processus physiologiques, la COX-2, rapidement induite par divers stimuli, est quant à elle responsable d'une production accrue de prostanoïdes impliqués dans des processus pathologiques comme l'inflammation.

Cette découverte a conduit l'industrie pharmaceutique à synthétiser des molécules inhibant sélectivement la COX-2 dans le but de conserver l'action anti-inflammatoire des AINS classiques tout en réduisant les effets secondaires associés à leur prise régulière. L'intérêt de telles molécules est d'autant plus important qu'il a été découvert récemment que la COX-2 était impliquée dans le processus cancéreux.

*Au cours de ce mémoire, nous avons évalué le potentiel inhibiteur vis-à-vis des COXs de thiohydantoïnes originales synthétisées au sein du Département de Pharmacie dans un modèle *in vitro* utilisant comme substrat du sang humain. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège.*

*Dans le cadre de l'évaluation d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 *in vivo*, nous avons également mis au point un modèle d'inflammation aiguë chez le rat.*

II.1.2.1. Evaluation pharmacologique *in vitro* de thiohydantoïnes originales

II.1.2.1.1. Présentation des molécules originales

Comme nous l'avons signalé précédemment, nous avons à notre disposition une série de thiohydantoïnes originales. Celles-ci ont été synthétisées au sein du Département de Pharmacie dans l'espoir d'obtenir des composés inhibant sélectivement la COX-2. Ces molécules sont caractérisées par un noyau central 2-thiohydantoïne sur lequel différentes pharmacomodulations ont été réalisées en position 3 et 5. Elles présentent pour la plupart une structure ayant des fonctions chimiques voisines de celles des coxibs (Figure II-13).

II.1.2.1.2. Choix du modèle d'expérience

Depuis la découverte, au début des années nonantes, de deux isoformes de COXs (COX-1 et COX-2), divers modèles ont été développés dans le but de déterminer le potentiel inhibiteur de drogues vis-à-vis de la COX-1 et de la COX-2 *in vitro*. Ces modèles peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils mettent en œuvre des enzymes isolées ou des cellules intactes.

Les modèles exploitant des enzymes isolées, purifiées ou recombinantes, constituent une approche intéressante pour l'étude spécifique d'une interaction drogue-enzyme. Néanmoins, ces modèles ne tiennent pas compte d'autres interactions qui existent *in vivo* et qui peuvent modifier le potentiel inhibiteur des composés testés. Il s'agit notamment de la

liaison des drogues aux protéines plasmatiques, de la dégradation enzymatique de celles-ci, voire du franchissement de la membrane cellulaire. Par ailleurs, les COXs étant des enzymes membranaires, il nous paraissait plus adéquat d'évaluer le potentiel inhibiteur des composés originaux dans un système cellulaire.

Il existe une grande variété de modèles pharmacologiques permettant d'évaluer le potentiel inhibiteur de composés à une échelle cellulaire. L'espèce, le type cellulaire, les temps d'incubation, la présence ou l'absence de protéines plasmatiques, l'apport éventuel d'acide arachidonique exogène sont autant de facteurs qui peuvent influencer le pouvoir inhibiteur des composés testés. Ainsi pour un même composé, les potentiels inhibiteurs obtenus peuvent différer fortement selon le modèle utilisé. Dès lors, des comparaisons valides ne peuvent être réalisées entre les résultats d'études utilisant des systèmes différents.

Face à cette diversité importante de modèles, nous avons retenu le test sur sang total humain pour l'évaluation des composés originaux. En effet, celui-ci présente plusieurs intérêts majeurs (Brooks et al., 1999). Tout d'abord, il utilise des enzymes humaines dans un milieu physiologique complexe proche des conditions rencontrées *in vivo*. En effet ce système permet de prendre en compte la fixation des composés aux protéines plasmatiques, leur métabolisation ou encore leur passage à travers les membranes cellulaires. De plus, ce test fait intervenir des cibles cellulaires d'un intérêt clinique certain qui sont impliquées dans la réponse inflammatoire. En outre, dans ce modèle, l'expression de la COX-2 est induite, ce qui mime le processus inflammatoire. Par ailleurs, les prostanoïdes dosés, le TXB₂ pour la COX-1 et la PGE₂ pour la COX-2, sont synthétisés à partir des stocks cellulaires en acide arachidonique. Ceci permet de supprimer la variabilité pouvant résulter d'un apport exogène de substrat. Enfin, ce modèle est relativement aisé à mettre en œuvre et les résultats obtenus sont reproductibles.

II.1.2.1.3. Principe du test sur sang total humain

Afin de pouvoir évaluer séparément le potentiel inhibiteur des composés vis-à-vis des deux isoformes de COXs, ce test s'effectue en deux manipulations distinctes.

L'évaluation de l'activité de la COX-1 est basée sur la mesure des taux de TXB₂, métabolite du TXA₂. Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, le TXA₂ est le principal prostanoïde dérivé des plaquettes. Etant donné que les plaquettes ne possèdent pas de noyau, elles ne peuvent être le siège d'une induction de l'expression de la COX-2. Lors de l'agrégation des plaquettes, la production de TXB₂ est dès lors le reflet de l'activité de la COX-1 plaquettaire.

Brièvement, le sang est prélevé dans des tubes héparinés pour éviter la coagulation spontanée. Il est ensuite transféré dans des tubes siliconés préchargés avec la drogue et incubé pendant 15 minutes à 37°C, sous agitation constante. A la suite de cette incubation, l'agrégation plaquettaire est induite par ajout de calcium ionophore. L'incubation, sous agitation constante, est ensuite prolongée durant 15 minutes. Enfin, la teneur en TXB₂ est évaluée par un dosage EIA.

L'évaluation de l'activité de la COX-2 est basée sur la mesure de la production de PGE₂, suite à l'induction de l'expression de cette isoforme au moyen de lipopolysaccharide (LPS). En effet, en condition basale, la COX-2 n'est pas détectable au niveau sanguin.

Pratiquement, le sang est prélevé dans des tubes héparinés afin de prévenir le phénomène de coagulation. Il est alors incubé avec la drogue testée pendant 15 minutes à 37°C avant d'être additionné de LPS. L'incubation est ensuite prolongée pendant 24 heures à 37°C sous agitation constante. La concentration plasmatique en PGE₂ est finalement évaluée par un dosage EIA.

II.1.2.1.4. Résultats et discussion de l'évaluation *in vitro* sur sang total humain

Etant donné que les composés ont été testés à deux concentrations (50 µM et 5 µM), il ne nous est pas possible de calculer une valeur d'IC₅₀. Les résultats sont donc exprimés en terme de production (%) de TXB₂ ou de PGE₂, reflet de l'activité de la COX-1 et de la COX-2, respectivement. Ainsi, plus le pourcentage de production est faible, plus le potentiel inhibiteur du composé vis-à-vis de l'une ou l'autre isoforme est élevé.

Les résultats obtenus pour les deux drogues de référence (célécoxib et indométhacine) sont repris dans le tableau II-1. Le célécoxib, à une concentration finale de 50 µM, entraîne une inhibition totale de la production de TXB₂. A 5 µM, ce composé réduit de 43 % la production de TXB₂. Aux deux concentrations testées, l'indométhacine inhibe quant à elle totalement la production de ce métabolite par la COX-1. Quelle que soit la concentration finale investiguée, les composés de référence entraînent une inhibition quasi totale de la production de PGE₂, reflet de l'activité de la COX-2. Signalons que ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études (de Leval et al., 2001).

La structure des composés originaux testés ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux II-2 à II-5. De manière à pouvoir discuter plus aisément des résultats, les composés ont été regroupés sur base de leur structure chimique.

Les composés MPG 018, MPG 025 et MPG 101 (Tableau II-2) sont caractérisés par différentes pharmacomodulations en position 3 de l'hétérocycle central, le groupement phényle en position 5 étant maintenu constant. Ces composés peuvent être classés dans l'ordre suivant en fonction de leur capacité à réduire (%) la production de PGE₂ à 50 µM : MPG 018 (7 %), MPG 025 (40 %) et MPG 101 (54 %). Ils possèdent respectivement un phényle, un méthyle et un hydrogène en position 3. Ainsi la présence d'un groupement encombrant à cette position semble défavorable à l'inhibition de la COX-2. A 5 µM, ces composés ont perdu toute activité inhibitrice de la COX-2. Ces résultats sont relativement surprenants dans la mesure où le composé MPG 101 possède la structure la plus simple et la plus éloignée de celle des coxibs.

L'introduction d'un chlore (MPG 077), d'un brome (MPG 078) ou d'un trifluorométhyle (MPG 057) en *méta* du phényle en position 3 permet d'augmenter légèrement le potentiel inhibiteur vis-à-vis de la COX-1 et de la COX-2 par rapport au composé MPG 018 (Tableau II-3). Toutefois, à une concentration de 5 µM, ces composés ont perdu toute activité vis-à-vis de ces deux isoformes. La présence d'un groupement sulfonamide (MPG 119) ou méthylsulfone (MPG 097) en position 3 du phényle ne permet pas d'obtenir des composés actifs.

Les composés dont le phényle est substitué en position *para* ne présentent pour la plupart aucune activité inhibitrice de la COX-2 et ce, quelle que soit la nature du substituant (Tableau II-4). Ainsi, par exemple, l'introduction d'un groupement sulfonamide (MPG 109)

ou méthylsulfone (MPG 046) génère des composés inactifs vis-à-vis de la COX-2. Ces groupements étant caractéristiques de la majorité des coxibs, on aurait pu s'attendre à ce que ces composés présentent un potentiel inhibiteur vis-à-vis de cette isoforme. En effet, il a été montré par des études de pharmacomodulation que ces groupements *en para* sont indispensables à l'activité et à la sélectivité des coxibs pour la COX-2 (Dannhardt et Laufer, 2000). Le composé possédant un groupement trifluorométhyle (MPG 080) présente un pouvoir inhibiteur de la COX-1 significatif, avec une réduction de 72 % de la production de TXB₂, à une concentration de 50 µM. Toutefois à 5 µM, ce composé ne montre plus d'activité. La présence d'un groupement méthylsulfanyl (MPG 040) en *para* se traduit par un faible potentiel inhibiteur vis-à-vis de la COX-1, avec une inhibition de la production de TXB₂ de 37 %, à une concentration de 50 µM. A nouveau, à 5 µM, ce composé est tout à fait inactif.

Les composés MPG 058, MPG 060, MPG 061 et MPG 112 possèdent un benzyle en position 5 de l'hétérocycle central (Tableau II-5). Ces composés s'avèrent tous inactifs vis-à-vis de la COX-2. Le composé possédant un brome en *para* (MPG 112) s'avère être le plus actif vis-à-vis de la COX-1, avec une réduction de la production de TXB₂ de 89 % et de 39 %, à des concentrations de 50 µM et de 5 µM, respectivement.

En conclusion, la majorité des thiohydantoïnes originales évaluées s'avèrent inactives à l'exception des composés MPG 080, MPG 112, et MPG 101. Les deux premiers possèdent un potentiel inhibiteur significatif vis-à-vis de la COX-1 (> 70 %) à une concentration de 50 µM. A cette même concentration ils n'entraînent pas de réduction de la production de PGE₂. Le composé MPG 101 réduit significativement de 54 % la production de PGE₂ à une concentration de 50 µM. Toutefois il est important de signaler qu'à 5 µM, ces trois composés montrent une activité faible voire nulle.

II.1.2.2. Mise au point d'un modèle d'inflammation aiguë chez le rat

Parallèlement à l'évaluation *in vitro* de thiohydantoïnes originales, nous avons mis au point un modèle d'inflammation aiguë avec des drogues de référence dans l'espoir de tester ultérieurement *in vivo* les composés qui s'avèreraient les plus actifs dans le test sur sang total humain. Malheureusement, en raison de la faible activité *in vitro* des composés testés, leur évaluation *in vivo* ne se justifiait aucunement. Toutefois, étant donné le potentiel des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 en tant qu'agents anti-inflammatoires et l'intérêt porté par le Département de Pharmacie pour la synthèse et l'évaluation de telles molécules, il nous paraissait important de présenter la mise au point réalisée et les résultats obtenus avec les drogues de référence.

II.1.2.2.1. Généralités

Dans ce modèle d'inflammation aiguë, l'augmentation du volume de la patte suite à l'injection de carragénine λ permet d'évaluer l'état du processus inflammatoire. Ainsi, le potentiel anti-inflammatoire des drogues étudiées est évalué par leur capacité à réduire cette augmentation de volume.

Les carragénines sont des polysaccharides extraits d'algues marines. Il en existe trois types : la carragénine ι, la carragénine κ et la carragénine λ. Cette dernière est le plus fréquemment utilisée pour déclencher une réaction inflammatoire chez l'animal.

L'inflammation induite par la carragénine est aiguë, locale, reproductible et est associée à l'apparition de signes cardinaux tels l'œdème, l'érythème et l'hyperalgésie.

Le rôle de la COX-2 dans ce modèle d'inflammation aiguë a été clairement démontré (Seibert et al., 1994). Ainsi, il a été montré que la COX-2 était exprimée localement suite à l'injection de carragénine et que l'induction de l'ARNm de cette isoforme, maximale trois heures après l'injection, coïncidait avec la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoires et avec le développement de l'œdème et de l'hyperalgésie. L'implication de la COX-2 étant démontrée dans ce modèle, ce dernier s'avère être une approche intéressante pour évaluer *in vivo* le potentiel anti-inflammatoire de composés potentiellement inhibiteurs des COXs. Celui-ci est évalué par la capacité des drogues à réduire le gonflement de la patte induit par l'injection de carragénine.

II.1.2.2.2. Mise au point du test

Dans un premier temps, nous avons modifié différents paramètres expérimentaux afin d'obtenir un gonflement maximal dans un délai raisonnable.

Lors des premiers essais, la carragénine λ (100 μ L, 1 %) était injectée par voie sous-cutanée au niveau de la voûte plantaire de la patte arrière gauche de rats d'environ 250 grammes, anesthésiés au préalable avec du pentobarbital sodique. Un volume identique de liquide physiologique (NaCl, 0,9 %) était injecté dans la patte arrière droite des rats (patte contrôle). De cette manière, un gonflement significatif de la patte gauche par rapport à la patte droite était observé 18 heures après l'injection de carragénine. Toutefois, n'ayant aucune donnée sur la pharmacocinétique des thiohydanthoïnes originales *in vivo*, ce délai nous semblait trop long.

Nous avons donc essayé de raccourcir ce délai en injectant la carragénine, non plus en sous-cutané, mais en intradermique. Ainsi, quatre heures après l'injection de carragénine, nous observions un léger gonflement de la patte gauche par rapport à la patte droite. L'injection intradermique nous a donc permis de raccourcir le délai pour observer un faible gonflement. Toutefois, ce gonflement inférieur à 20 % dans tous les cas était insuffisant.

Afin d'obtenir un gonflement plus important de la patte gauche, nous avons décidé d'injecter la carragénine en intradermique chez des rats non anesthésiés de plus petite taille (environ 150 grammes). Ainsi nous avons pu obtenir des gonflements significatifs quatre heures trente après l'injection.

Après avoir optimisé le gonflement de la patte, nous avons testé, dans un second temps, le potentiel anti-inflammatoire de deux drogues de référence : le célécoxib, un inhibiteur sélectif de la COX-2, et l'indométacine, un AINS classique. Pratiquement, des rats d'environ 150 grammes sont pesés et un volume adéquat de la solution d'indométacine ou de célécoxib est injecté en intra-péritonéale (i.p.) en vue d'atteindre une dose de 10 mg.kg⁻¹. Parallèlement à ce traitement, des rats témoins (groupe contrôle) sont pesés et un volume adéquat de propylène-glycol (*vehicle*) est injecté (i.p.). Une heure trente après l'injection, 100 μ L de carragénine λ (1 %) sont injectés dans la voûte plantaire de la patte arrière gauche des animaux. Un volume identique de liquide physiologique (NaCl, 0,9 %) est injecté dans la voûte plantaire de la patte arrière droite (patte contrôle). Quatre heures trente après, les rats sont euthanasiés. Leurs pattes arrière sont ensuite sectionnées et pesées.

L'injection de carragénine entraîne une augmentation significative du poids de la patte ($35,8 \pm 6,5$ %) lorsque les rats ont reçu le propylène-glycol (groupe contrôle) (Figure II-14). Le traitement des animaux avec les deux drogues de référence testées permet de réduire significativement l'œdème observé. Ainsi, le gonflement de la patte est de $7,3 \pm 2,4$ % lorsque l'indométacine a été administrée en prévention (Figure II-15). Il est de $18,2 \pm 3,1$ %, si les rats ont été traités avec le célécoxib. Les pourcentages d'inhibition obtenus sont donc respectivement de 80 % et de 49 % (Figure II-16).

En conclusion, nous avons mis au point un modèle d'inflammation aiguë chez le rat (œdème à la carragénine) au sein du Département. Malheureusement, étant donné la faible activité *in vitro* des thiohydantoïnes originales testées, nous n'avons pas pu les évaluer dans ce modèle. Toutefois il pourra servir ultérieurement à l'évaluation de nouveaux composés.

II-2. Conclusions et perspectives

Les prostanoïdes de la série 2, médiateurs lipidiques issus du métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (COXs), sont impliqués dans une variété importante de processus physiologiques et physiopathologiques. De nombreuses études ont permis de développer des agents pharmacologiques capables de moduler la cascade de l'acide arachidonique à différents niveaux.

En raison de leurs nombreuses implications dans diverses pathologies, le TXA₂ et la COX-2 constituent des cibles pharmacologiques de choix dans cette cascade. En effet, nous avons vu d'une part que le TXA₂ est un médiateur cellulaire aux propriétés pro-agrégantes, bronchonconstrictrices et vasoconstrictrices. De par ses propriétés, il participe activement à la physiopathologie de l'athérosclérose et de l'asthme bronchique entre autre. Nous avons d'autre part souligné que la COX-2 est une enzyme responsable de la production accrue de prostanoïdes dans des situations pathologiques telles l'inflammation et la prolifération cancéreuse. De nombreux travaux de recherche se sont donc naturellement orientés vers la mise au point d'inhibiteurs de la COX-2 et d'agents capables de contrer les effets délétères du TXA₂ (antagonistes du récepteur TP et/ou inhibiteurs de la thromboxane synthétase). Notre travail s'inscrivait donc aussi dans ce cadre.

Afin de cibler la voie du TXA₂, nous avons caractérisé l'activité d'une sulfonyleurée nitrobenzénique originale dérivée du torasémide (BM-520) vis-à-vis des récepteurs TP de différents types cellulaires. L'intérêt de l'étude de dérivés du torasémide en tant que modulateurs de la voie du TXA₂ est lié à la découverte d'Uchida en 1992. En effet, celui-ci mit en évidence une faible activité antagoniste du torasémide vis-à-vis des récepteurs TP d'une artère coronaire de chien. Suite à cette découverte pour le moins surprenante, de nombreux dérivés du torasémide furent évalués dans différents modèles pharmacologiques. Certains d'entre eux se sont avérés être des ligands hautement affins pour le récepteur TP et ont montré une activité « anti-thromboxane » dans différents modèles. Parmi ces dérivés, nous avons retenu pour notre étude le BM-520. Ce choix s'est opéré sur base de plusieurs critères. D'une part, dans des études préliminaires, ce composé a montré une haute affinité pour le récepteur TP (IC₅₀: 3,96 nM) et s'est avéré capable de prévenir l'agrégation de plaquettes humaines induite par différents agonistes. D'autre part, le BM-573, un isomère de position du BM-520, possède une double activité particulièrement élevée à la fois sur la thromboxane synthétase et vis-à-vis du récepteur TP. Le BM-520 s'avérait dès lors être un modulateur potentiel de la voie du TXA₂. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons caractérisé l'activité de ce composé chez le cobaye.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité antagoniste du BM-520 *in vitro* sur l'agrégation plaquettaire induite par le U-46619, un agoniste stable du TXA₂, et par l'acide arachidonique, précurseur du TXA₂ et inducteur de l'agrégation plaquettaire. L'effet de cet antagoniste original a aussi été étudié *ex vivo* sur la contraction de la musculature lisse de la trachée et de l'aorte déclenchée par le U-46619. Enfin, nous avons également investigué le potentiel myorelâchant du BM-520 sur l'aorte de rat contractée au 8-iso-PGF_{2α}.

Dans un second temps, en raison du potentiel important des antagonistes du récepteur TP sur le plan thérapeutique, nous avons également évalué l'intérêt d'une administration préventive de BM-520 aux cobayes dans ces mêmes modèles pharmacologiques (agrégation plaquettaire et contraction de l'aorte et de la trachée).

Grâce aux études agrégométriques réalisées chez les cobayes non traités, nous avons mis en évidence un potentiel anti-agrégant du BM-520. En effet, lorsqu'il est incubé avec du PRP, ce composé s'est avéré capable de prévenir l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique (EC_{50} : 6,7 μ M) et le U-46619 (EC_{50} : 5,7 μ M). Remarquons qu'il existe une différence significative entre les activités obtenues en *binding* sur plaquettes humaines (IC_{50} : 3,96 nM) et celles observées au cours des tests d'agrégation plaquettaire chez le cobaye (EC_{50} : 5,7 μ M et 6,7 μ M avec le U-46619 et l'acide arachidonique, respectivement). Cette différence pourrait vraisemblablement être attribuée à une haute affinité des sulfonyles pour les protéines plasmatiques présentes dans le PRP ; les expériences de *binding* se déroulant avec des plaquettes lavées (Balant, 1981).

Le caractère antagoniste du BM-520 a également été confirmé par sa capacité à relâcher la trachée (EC_{50} : 41,3 nM) et l'aorte (EC_{50} : 84,9 nM) de cobaye préalablement contractées avec le U-46619.

En raison des propriétés constrictrices largement décrites dans la littérature du 8-iso-PGF_{2 α} et de son implication potentielle dans des pathologies associées à un stress oxydatif, nous avons également investigué l'activité de cet isoprostane sur la musculature lisse. Si nous n'avons pas mis en évidence d'activité constrictrice du 8-iso-PGF_{2 α} sur la trachée et l'aorte de cobaye, nous avons cependant montré qu'il était capable de contracter l'aorte de rat de manière dose-dépendante (EC_{50} : 1,0 μ M). Il est toutefois moins actif que le U-46619 (EC_{50} : 12,2 nM) qui reste l'agoniste le plus puissant.

Après avoir démontré une activité constrictrice du 8-iso-PGF_{2 α} sur l'aorte de rat, nous avons logiquement investigué l'effet du BM-520 sur la contraction de ce tissu au 8-iso-PGF_{2 α} . Ainsi, nous avons mis en évidence un pouvoir myorelâchant du BM-520 sur l'aorte de rat préalablement contractée avec cet isoprostane (EC_{50} : 99,1 nM).

Nous avons ainsi démontré que le BM-520 est capable d'empêcher à la fois l'action vasoconstrictrice du U-46619, un agoniste de référence du récepteur TP, et du 8-iso-PGF_{2 α} . Si le TXA₂ est issu du métabolisme de l'acide arachidonique par les COXs, les isoprostanes sont générés quant à eux par auto-oxydation de cet acide gras et donc indépendamment des COXs. Bien que ces médiateurs soient produits par des mécanismes différents, ils semblent tous deux capables de contribuer au développement de l'athérosclérose de par leurs propriétés biologiques (vasoconstriction, prolifération des cellules musculaires lisses et modulation de la fonction plaquettaire). Dès lors, une molécule capable d'empêcher les effets de ces deux médiateurs telle le BM-520 pourrait avoir toute son importance sur le plan thérapeutique.

En effet, il ressort de cette première partie de notre étude que le BM-520 pourrait trouver un intérêt certain dans le traitement de pathologies cardiovasculaires puisqu'il possède des propriétés anti-agrégante et myorelâchantes de l'aorte. Par ailleurs, sa capacité à relâcher l'aorte de rat contractée au 8-iso-PGF_{2 α} renforce l'intérêt de ce composé original dans la réduction de la sévérité de ces pathologies. Enfin, ses propriétés myorelâchantes sur la trachée suggèrent un potentiel de cette drogue dans l'amélioration d'une des manifestations caractéristiques de l'asthme bronchique : la constriction des voies aériennes.

La deuxième partie de notre étude chez le cobaye nous a permis de mettre en évidence les bénéfices d'une administration préventive du BM-520 (10 mg.kg⁻¹, i.v.) sur l'agrégation plaquettaire d'une part et sur la contraction d'organes isolés d'autre part. Ainsi, chez les cobayes pré-traités, les concentrations en inducteurs de l'agrégation doivent être augmentées significativement pour induire une agrégation complète par rapport aux animaux non traités

(d'un facteur 5 et 12 pour l'acide arachidonique et pour le U-46619, respectivement). Nous avons également confirmé le caractère antagoniste *in vivo* du BM-520 sur la contraction de l'aorte de cobaye induite par le U-46619. En effet, le traitement des animaux avec cet antagoniste a pour conséquence une augmentation significative de l'EC₅₀ du U-46619 sur l'aorte.

En conclusion, nous avons mis en évidence une activité antagoniste du BM-520, une sulfonylurée originale dérivée du torasémide, vis-à-vis du récepteur TP *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Cette molécule ouvre donc la voie à une nouvelle classe de drogues chimiquement différente des modulateurs de la voie du TXA₂ décrits dans la littérature et pourrait ainsi trouver un intérêt dans le traitement de pathologies où le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} sont impliqués.

Au vu de ces résultats encourageants, il serait intéressant d'investiguer les propriétés du BM-520 dans des modèles plus complexes. En raison de ses propriétés anti-agrégantes plaquettaire, nous pourrions envisager d'étudier l'activité de ce composé sur l'hémostase primaire au moyen du PFA-100[®] (*Platelet Function Analyser*). Dans ce système, un échantillon de sang passe dans une fine ouverture (147 μm) d'une membrane imbibée de collagène et d'épinéphrine. Le temps requis pour l'occlusion totale de l'ouverture par formation du clou plaquettaire rend compte de la fonction plaquettaire de l'échantillon. Ainsi, il a été montré au moyen de cette technique originale qu'une autre sulfonylurée dérivée du torasémide (BM-567) était capable d'augmenter le temps d'occlusion (Dogné et al., 2003). Etant donné les propriétés anti-agrégantes et les effets bénéfiques *in vivo* de ce composé sur la contraction de l'aorte, il semblerait pertinent d'évaluer cette molécule dans un modèle de thrombose induite par le chlorure ferrique chez le rat. Dans ce modèle, le thrombus est provoqué au niveau de l'aorte abdominale par lésion de la paroi vasculaire suite au contact de cette dernière avec l'agent chimique. Ainsi, dans ce modèle, il a notamment été démontré que l'administration d'antagonistes du récepteur TP permet d'empêcher le développement d'un thrombus occlusif au sein de l'artère (Dogné et al., 2004 ; Tanaka et al., 2000).

Lors d'expériences préliminaires, le BM-520 s'est avéré capable d'inhiber la thromboxane synthétase plaquettaire à plus de 80 % à une concentration de 10 μM. Le BM-520 pourrait donc posséder une double activité sur le récepteur TP et sur la thromboxane synthétase. Etant donné l'intérêt thérapeutique manifesté pour les composés à activité mixte, une de nos perspectives est de confirmer l'activité inhibitrice du BM-520 vis-à-vis de la thromboxane synthétase.

Si par l'étude du BM-520 nous avons pour cible le récepteur du TXA₂, nous nous sommes également intéressés à des enzymes agissant plus en haut dans la cascade de l'acide arachidonique : les COXs et en particulier la COX-2. A cette fin nous avons évalué l'activité potentiellement inhibitrice vis-à-vis de cette isoforme d'une série de thiohydantoïnes originales dans un modèle utilisant le sang humain. Cette approche semblait séduisante dans la mesure où la majorité de ces composés présentent une structure ayant des fonctions chimiques voisines de celles des coxibs, inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Toutefois les résultats de cette étude ont été fort décevants. En effet, seuls trois composés ont montré un potentiel inhibiteur significatif des COXs à une concentration finale élevée de 50 μM. Ainsi les composés MPG 080 et MPG 112 présentent un potentiel inhibiteur significatif de la COX-1, avec une réduction de la production de TXB₂ de 72 % et de 89 %. En ce qui concerne l'inhibition de la COX-2, seul le composé MPG 101 engendre une réduction significative de la production de PGE₂ (54 %). De plus, à 5 μM, ces composés montrent une activité faible, voire nulle. Signalons que les résultats obtenus avec le composé MPG 101 sont pour le moins

surprenants puisque d'un point de vue chimique celui-ci est le plus éloigné de la structure des coxibs.

Au vu de ces résultats, il semblerait intéressant de confirmer l'activité inhibitrice vis-à-vis de la COX-1 des composés MPG 080 et MPG 112 sur l'agrégation plaquettaire.

Etant donné la faible activité des thiohydantoïnes originales testées, il ne paraissait pas utile d'évaluer ces composés dans le modèle d'œdème à la carragénine que nous avons mis au point parallèlement à l'étude sur sang humain. En effet, nous avons pour but de tester *in vivo* les composés qui s'avèreraient les plus actifs *in vitro*. Toutefois, étant donné le potentiel thérapeutique des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 et l'intérêt porté par le Département de Pharmacie au développement et à l'évaluation de tels composés, ce modèle pourra servir ultérieurement à l'évaluation de futurs composés originaux.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Agrégation plaquettaire

III.1.1. Préparation de la solution injectable de BM-520 et traitement des cobayes

Le BM-520 est dissout dans un mélange propylène glycol-H₂O (30-70 v/v), NaOH (1 équivalent) en vue d'obtenir une solution à 10 mg.mL⁻¹.

Des cobayes Dunkin-Hartley de 250 à 500 g (Charles River Belgium Co., Bruxelles, Belgique) subissent une préanesthésie à l'Ethrane[®] (enflurane, Abott, Campoverde, Italie) avant d'être anesthésiés au Nembutal[®] (pentobarbital sodique, Ceva Santé Animale, Bruxelles, Belgique) 30 mg.kg⁻¹, i.p.. En fonction du poids des animaux, un volume adéquat de la solution de BM-520 est ensuite injecté, au moyen d'un *butterfly* (MICRO-FLO[®] 25GA, Milan, Italie), au niveau de la veine cave inférieure en vue d'atteindre une dose de 10 mg.kg⁻¹. Le prélèvement de sang pour l'étude en agrégométrie est réalisé trois minutes après l'injection de la drogue.

III.1.2. Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) et des inducteurs de l'agrégation

Le sang est prélevé au moyen d'un *butterfly* dans des tubes citratés de 4,5 mL (1 : 9) au niveau de la veine cave inférieure chez des cobayes pré-traités ou non avec le BM-520 à 10 mg.kg⁻¹.

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est préparé par centrifugation du sang total à 180 g durant 10 minutes et à 15°C. Une centrifugation supplémentaire du sang restant, à 2500 g pendant 10 minutes à 15°C, permet d'obtenir le plasma pauvre en plaquette (PPP) qui servira à l'étalonnage de l'agrégomètre.

L'arachidonate sodique (Calbiochem[®], San Diego, California, U.S.A) est dissout dans du NaCl 0,9 % pour obtenir une concentration de 15 mM.

La solution de U-46619 (Cayman Chemical[®], Michigan, U.S.A.) est préparée dans du PBS dépourvu de Ca⁺⁺ et de Mg⁺⁺ à une concentration finale de 100 µM.

III.1.3. Préparation du BM-520 pour l'agrégation plaquettaire chez les animaux non traités

Le BM-520 est mis en solution à une concentration de 1 µM dans un mélange DMSO-tampon PBS dépourvu de Ca⁺⁺ et de Mg⁺⁺ (30-70 v/v). Cette solution-mère est ensuite diluée aux concentrations voulues par du tampon PBS.

III.1.4. Essai

La détermination de l'agrégation plaquettaire est basée sur la méthode turbidimétrique de Born et Cross (Born et Cross, 1963) et utilise un agrégomètre à double faisceau (Chronolog Corporation[®], Pennsylvanie, U.S.A.).

Le PPP est utilisé comme blanc pour ajuster la densité optique à zéro.

Le PRP (240 µL) est introduit dans la cuvette de mesure et additionné d'un volume adéquat BM-520 en vue d'obtenir la concentration à tester, lorsque celui-ci n'a pas été administré chez l'animal.

Après incubation 3 minutes à 37°C sous agitation, l'agrégation est induite par l'ajout de 10 µL d'arachidonate à 15 mM ou de 2,5 µL de U-46619 à 100 µM, soit des concentrations finales respectivement de 600 µM et de 1 µM. La variation de densité optique est mesurée à 600 nm. Ainsi, une diminution de la densité optique traduit un phénomène d'agrégation plaquettaire.

III.1.5. Expression des résultats

Lorsque les cobayes n'ont pas été traités avec le BM-520 et que ce dernier est incubé avec le PRP, des courbes doses-réponses sont réalisées et des EC₅₀ sont déterminés. Ceux-ci représentent la concentration en drogue requise pour inhiber 50 % de l'agrégation plaquettaire. Les valeurs d'EC₅₀ sont calculées par régression non linéaire (GraphPad Prism software[®], version 3.0) et représentent la moyenne suivie de l'erreur standard (moyenne ± S.E.M. ; n = 3).

Si les animaux ont subi un pré-traitement avec le BM-520, les résultats sont exprimés en terme de dose cumulative moyenne de U-46619 ou d'acide arachidonique nécessaire pour induire une agrégation complète. Cette dose cumulative moyenne est calculée sur base de huit courbes et est suivie de l'erreur standard (moyenne ± S.E.M. ; n = 8).

III.2. Contraction d'organes isolés

III.2.1. Description du système

Le système est constitué de trois baignoires de 20 mL (EMKA TECHNOLOGIE[®], Paris, France) et est destiné à l'étude d'organes isolés (Figure III-1).

Ce système est composé ♦ d'un portique en aluminium équipé de :

- 3 baignoires à double paroi de 20 mL en polyméta-acrylate
- 3 crémaillères de précision
- 3 capteurs de force isométrique
- 3 robinets de bullage

♦ d'un ensemble de thermorégulation comprenant :

- une pompe de circulation et de thermorégulation
- un réservoir pour liquide de chauffage

- un bidon de liquide d'incubation
- un amplificateur 3 voies

Pour fonctionner, ce montage nécessite :

- une source de carbogène (95 % O₂-5 % CO₂) régulée entre 0,3 et 0,4 bar
- une source de vide régulée entre -0,6 et -0,8 bar
- un récipient pour les liquides usagés
- un thermorégulateur

Ce système est connecté à un PC équipé d'un logiciel d'acquisition de données IOX (version 1.445) (EMKA TECHNOLOGIE[®], Paris, France).

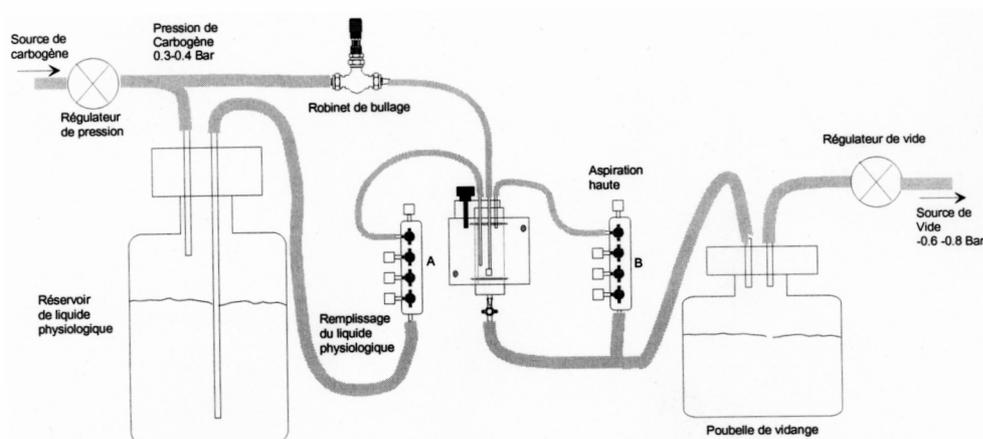


Figure III-1. Schéma descriptif du système destiné à l'étude d'organes isolés

III.2.2. Préparation de la solution injectable de BM-520 et traitement des cobayes

La préparation de la solution injectable de BM-520 ainsi que le traitement des animaux sont réalisés de la même manière que pour l'expérience d'agrégation plaquettaire (voir point III.1.1).

III.2.3. Relaxation de la trachée et de l'aorte de cobaye contractées

III.2.3.1. Préparation de la trachée et de l'aorte de cobaye

La trachée et l'aorte abdominale sont prélevées sur des cobayes Dunkin-Hartley de 250 à 500 g (Charles River Belgium Co., Bruxelles, Belgique) anesthésiés au pentobarbital sodique (80 mg.kg⁻¹, i.p.).

Lorsque les animaux ont été prétraités avec le BM-520, les tissus sont disséqués et extraits après les prélèvements sanguins. La trachée et l'aorte sont ensuite nettoyées de tout tissu adhérent. Afin de prévenir la libération de prostaglandines et plus particulièrement de la prostacycline (PGI₂) aux propriétés vasodilatatrices, l'aorte est privée de son endothélium par simple curetage. Les tissus sont ensuite coupés en segments d'environ 5 mm qui sont

suspendus horizontalement dans un bain contenant 20 mL de solution d'incubation thermostatée à 37°C et soumis à l'action du carbogène amenant le pH à 7,4.

Les segments ainsi obtenus sont équilibrés durant une heure à 1 gramme de tension avant de recevoir l'agent contractant, le U-46619. Durant cette période, le milieu d'incubation est renouvelé tous les quarts d'heure si la drogue n'a pas été administrée *in vivo*. Lorsque les animaux ont été pré-traités, aucun lavage n'est réalisé durant cette période de stabilisation.

III.2.3.2. Préparation des milieux, drogues et réactifs

La solution aqueuse d'incubation ou tampon Krebs-Henseleit contient : NaCl 118 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂·2H₂O 2,5 mM, MgCl₂·6H₂O 1,5 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄·H₂O 1,2 mM, glucose 10 mM.

L'agent contractant utilisé est un agoniste du récepteur du TXA₂, le U-46619 (Cayman Chemical[®], Michigan, U.S.A.). Celui-ci est fourni en solution dans l'acétate de méthyle (10 mg.mL⁻¹). Après évaporation de ce dernier sous N₂, le U-46619 est alors remis en solution dans 951 µL de DMSO purgé au N₂, soit une concentration de 30 mM. Cette solution-mère est alors diluée 10000 fois par le liquide d'incubation. La contraction des organes est déclenchée par ajout de 132 µL de cette solution dans le bain, soit une concentration finale en U-46619 de 20 nM.

Pour chaque drogue, une solution-mère à 2 mM est préparée dans du DMSO. Cette solution mère est diluée aux concentrations souhaitées avec du tampon d'incubation. Le DMSO (0,5 % maximum) n'interfère pas sur les paramètres mesurés.

III.2.3.3. Essai

La concentration optimale en U-46619, un agoniste du récepteur TP, a été déterminée à partir de courbes doses-réponses. Ainsi, l'ajout de concentrations croissantes en agoniste permet de contracter l'aorte et la trachée par paliers. Sur base de ces courbes, il a été décidé d'induire la contraction des tissus avec une concentration de 20 nM en U-46619.

Après équilibrage de la trachée ou de l'aorte, et lorsque la tension est stable (T_{\min}), une contraction est déclenchée par ajout de 132 µL de la solution de U-46619 à 3 µM, soit une concentration finale de 20 nM. Quand la tension maximale de la préparation est atteinte (T_{\max}), la drogue est ajoutée. Une fois la relaxation observée, la nouvelle tension stabilisée est enregistrée (T). Des concentrations croissantes en drogue sont ajoutées afin de relâcher la trachée ou l'aorte par paliers jusqu'à l'obtention de T_{\min} .

III.2.3.4. Expression des résultats

Pour une concentration en drogue donnée, la tension de la trachée ou de l'aorte est exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$tension(\%) = \frac{T - T_{\min}}{T_{\max} - T_{\min}} \times 100$$

Pour chaque molécule étudiée, un minimum de 5 courbes doses-réponses ont été réalisées sur des préparations provenant d'animaux différents. Elles ont permis de déterminer

la concentration en drogue (EC_{50}) réduisant de 50 % la tension induite par le U-46619. Les valeurs d' EC_{50} sont calculées par régression non linéaire (GraphPad Prism software[®], version 3.0) et représentent la moyenne suivie de l'erreur standard (moyenne \pm S.E.M. ; $n \geq 5$).

III.2.4. Relaxation de l'aorte de rat contractée

III.2.4.1. Préparation de l'aorte de rat

Après thoracotomie, l'aorte abdominale est prélevée sur des rats de race Wistar de 200 à 350 g (Charles River Belgium Co., Bruxelles, Belgique) anesthésiés au pentobarbital sodique (80 mg.kg⁻¹, i.p.). L'aorte est nettoyée de tout tissu adhérent et l'endothélium est éliminé délicatement par simple curetage. Des segments d'aorte d'environ 5 mm sont suspendus horizontalement dans un bain contenant 20 mL de solution d'incubation thermostatée à 37°C et soumis à l'action du carbogène amenant le pH à 7,4. L'aorte est équilibrée durant une heure à 1 gramme de tension avant de recevoir l'agent contractant. Durant cette période, le milieu d'incubation est renouvelé tous les quarts d'heure.

III.2.4.2. Préparation des milieux, drogues et réactifs

La préparation du tampon d'incubation, la mise en solution des drogues et du U-46619, ainsi que l'induction de la contraction au U-46619, sont similaires à celles décrites pour la trachée et l'aorte de cobaye (voir III.2.3.2).

Toutefois, la contraction de l'aorte de rat est également déclenchée par le 8-iso-PGF_{2 α} (Cayman Chemical[®], Michigan, U.S.A.). Cet isoprostane est fourni sous forme cristalline (5 mg). Il est remis en solution dans 705 μ L de DMSO, soit une concentration finale de 20 mM. Cette solution-mère est ensuite diluée 100 fois par du liquide d'incubation en vue d'obtenir une solution à 200 μ M. La contraction de l'aorte de rat est induite par injection de 100 μ L de cette solution dans le bain, ce qui équivaut à une concentration finale de 1 μ M.

III.2.4.3. Essai

Des courbes doses-réponses au U-46619 et au 8-iso-PGF_{2 α} ont permis de déterminer les concentrations optimales pour ces deux agonistes. Ainsi, il a été décidé de déclencher la contraction de l'aorte de rat avec une concentration de 20 nM en U-46619 et de 1 μ M en 8-iso-PGF_{2 α} .

Après équilibrage et stabilisation de la tension de l'aorte (T_{\min}), une contraction est déclenchée par ajout de 132 μ L de U-46619 à 3 μ M, soit une concentration finale de 20 nM ou par ajout de 100 μ L de 8-iso-PGF_{2 α} à 200 μ M, soit une concentration finale de 1 μ M. Lorsque la tension maximale de la contraction est atteinte et est stable (T_{\max}), la drogue est ajoutée. Une fois la relaxation observée, la nouvelle tension stabilisée est enregistrée (T). Des concentrations croissantes en drogue sont ensuite ajoutées afin de relâcher l'aorte par paliers.

III.2.4.4. Expression des résultats

Pour une concentration en drogue donnée, la tension de l'aorte de rat est exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$tension(\%) = \frac{T - T_{\min}}{T_{\max} - T_{\min}} \times 100$$

Pour chaque molécule étudiée, un minimum de 5 courbes doses-réponses ont été réalisées sur des préparations provenant d'animaux différents. Elles ont permis de déterminer la concentration en drogue (EC₅₀) réduisant de 50 % la tension induite par le 8-iso-PGF_{2α} ou le U-46619. Les valeurs d'EC₅₀ sont calculées par régression non linéaire (GraphPad Prism software[®], version 3.0) et représentent la moyenne suivie de l'erreur standard (moyenne ± S.E.M. ; n ≥ 5)

III.3. Evaluation du potentiel inhibiteur de cyclooxygénases sur sang total humain

III.3.1. Evaluation de l'activité COX-1

III.3.1.1. Préparation du sang

Le sang total est prélevé dans des tubes héparinés par ponction veineuse au pli du coude de donneurs ne présentant aucun signe inflammatoire apparent et n'ayant absorbé aucun médicament durant les 10 jours précédant le prélèvement. Le sang est ensuite dilué quatre fois par du RPMI.

III.3.1.2. Préparation des drogues

Chaque composé original évalué est mis en solution dans du DMSO (100 %) en vue d'atteindre une concentration de 13,05 mM. Cette solution est ensuite diluée 10 fois par du DMSO (100 %) pour obtenir une solution à 1,305 mM.

III.3.1.3. Réalisation des incubations COX-1

250 µL du mélange sang-RPMI (1 : 4) sont transférés dans des tubes siliconés pré-chargés avec 1 µL de DMSO ou 1 µL de la solution de la drogue testée à des concentrations finales de 5 µM et de 50 µM. Les tubes sont ensuite homogénéisés (vortex) et incubés pendant 15 minutes à 37°C, sous agitation constante. Dix µL d'une solution aqueuse de calcium ionophore A-23187 (Aldrich, Belgique) à une concentration finale de 20 µM, sont ajoutés dans tous les tubes exceptés dans les blancs. Les tubes sont homogénéisés et l'incubation est prolongée durant 15 minutes, sous agitation constante. A la fin de cette incubation, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 10000 g.

Les surnageants sont prélevés et congelés à -20°C pour le dosage ultérieur de thromboxane B₂ (TXB₂).

III.3.1.4. Evaluation de la teneur en TXB₂

La teneur en TXB₂ de chacun des échantillons est évaluée au moyen d'un kit de dosage immuno-enzymatique (kit EIA) (Cayman Chemical Company[®], Michigan, U.S.A.) selon le protocole décrit par la firme.

Ce dosage est basé sur la compétition entre le TXB₂ libre présent dans l'échantillon et le TXB₂ couplé à l'acétylcholinestérase pour un nombre limité de sites de liaison d'un anticorps de lapin. Cet anticorps de lapin est lui-même couplé à un anticorps de souris anti-sérum de lapin fixé au fond d'un puits (Figure III-2).

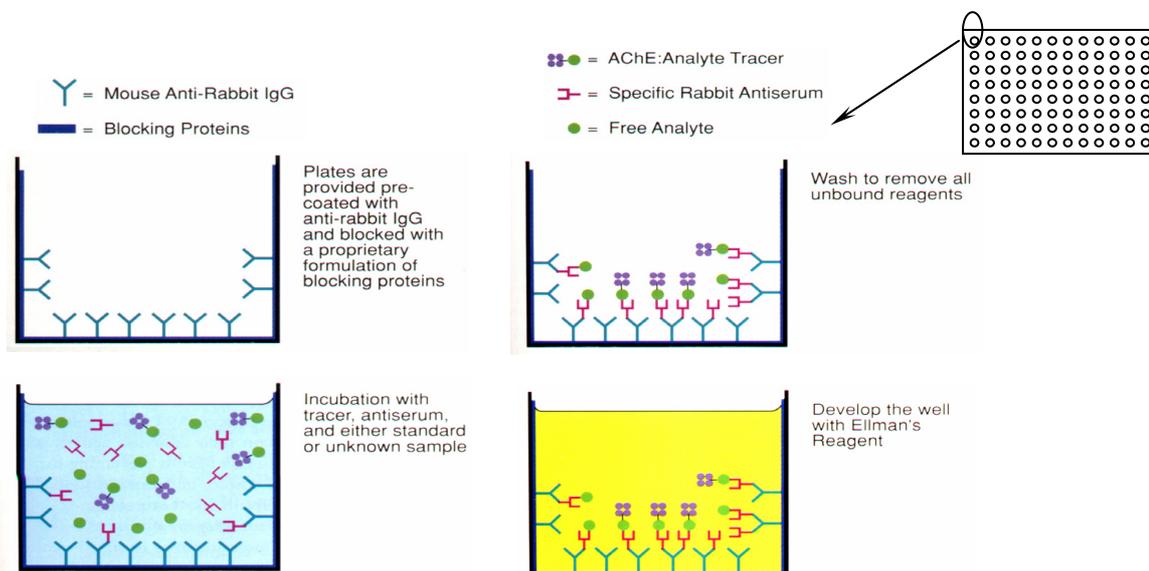


Figure III-2. Schéma explicatif du principe de l'EIA

Une molécule de TXB₂ fixée à une molécule d'acétylcholinestérase sert de traceur. La quantification du traceur se fait par mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase au moyen du réactif d'Ellman. Celui-ci est composé d'acide 5-5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) et d'acétylcholine. L'hydrolyse de cette dernière par l'acétylcholinestérase entraîne la formation de thiocholine. Une réaction non enzymatique de la thiocholine avec l'acide 5-5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) génère l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque, un produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm (Figure III-3). L'intensité de cette coloration, déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre, est donc directement proportionnelle à la quantité de traceur et inversement proportionnelle à la quantité de TXB₂ dans le puits.

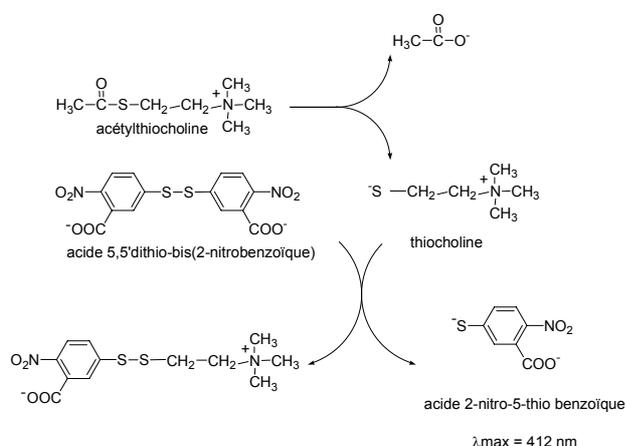


Figure III-3. Réaction catalysée par l'acétylcholinestérase

III.3.1.5. Expression des résultats

Le pourcentage de production de TXB₂ est calculé selon la relation suivante :

$$production(\%) = \left[\frac{P - P_0}{P_{\max} - P_0} \right] \times 100$$

Dans cette relation, P₀ représente la production basale de TXB₂. Cette dernière correspond à la production de TXB₂ en absence de calcium ionophore A-23187. P_{max} équivaut à la quantité maximale de TXB₂ produite. Elle est mesurée en présence de calcium ionophore A-23187, mais en absence de drogue. P représente la concentration en TXB₂ présent dans l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de production de TXB₂ suivi de l'écart-type (moyenne ± S.D. ; n = 3).

III.3.2. Evaluation de l'activité COX-2

III.3.2.1. Préparation du sang

Le sang total est prélevé dans des tubes héparinés par ponction veineuse au pli du coude de donneurs ne présentant aucun signe inflammatoire apparent et n'ayant absorbé aucun médicament durant les 10 derniers jours.

III.3.2.2. Préparation des drogues

Chaque composé original évalué est mis en solution dans du DMSO (100 %) afin d'obtenir une concentration de 12,8 mM. Cette solution est ensuite diluée 10 fois dans du DMSO (100 %) pour atteindre une solution de 1,28 mM.

III.3.2.3. Réalisation des incubations COX-2

Un volume de 500 µL de sang est transféré dans des tubes citratés (1 : 9) pré-chargés avec 2 µL de DMSO ou 2 µL de solution de la drogue testée à des concentrations finales de 5 µM et de 50 µM. Les tubes sont homogénéisés et incubés pendant 15 minutes à 37°C sous agitation constante. A la suite à cette première incubation, 10 µL de lipopolysaccharide (LPS, concentration finale de 100 µg.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, Belgique) sont ajoutés dans tous les tubes exceptés les blancs. L'incubation est ensuite prolongée durant 24 heures en vue d'induire l'expression de la COX-2. A la fin de l'incubation les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 10000 g.

Les surnageants sont ensuite prélevés et congelés à -20°C pour le dosage ultérieur de la prostaglandine E₂ (PGE₂).

III.3.2.4. Dosage de la PGE₂

La teneur en PGE₂ de chacun des échantillons est évaluée par kit de dosage immuno-enzymatique (kit E.I.A.) (Cayman Chemical Company, Michigan, U.S.A.) suivant le

protocole décrit par la firme. Le principe de ce dosage est similaire à celui décrit pour le TXB₂ (III.3.1.4).

III.3.2.5. Expression des résultats

Le pourcentage de production de PGE₂ est calculé selon la relation suivante :

$$production(\%) = \left[\frac{P - P_0}{P_{max} - P_0} \right] \times 100$$

Dans cette relation, P₀ représente la production basale de PGE₂. Celle-ci équivaut à la quantité de PGE₂ produite en l'absence de LPS. P_{max} représente la quantité maximale de PGE₂ produite et est mesurée en présence de LPS et en absence de drogue. P équivaut à la production de PGE₂ dans l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de production de PGE₂ suivi de l'écart-type (moyenne ± S.D. ; n = 3).

III.4. Evaluation du potentiel anti-inflammatoire in vivo : oedème à la carragénine chez le rat

III.4.1. Préparation des drogues et de la carragénine

Le célécoxib et l'indométhacine sont mis en solution dans du propylène glycol (100 %) à raison de 10 mg.2mL⁻¹.

La carragénine λ (Sigma, Belgique) est dissoute à une concentration de 10 mg.mL⁻¹ dans du liquide physiologique (NaCl 0,9 %).

III.4.2. Traitement des rats

Des rats de race Wistar entre 140 et 175 g (Charles River Belgium Co., Bruxelles, Belgique) sont pesés et un volume adéquat de la solution en drogue (10 mg.2mL⁻¹) est injecté par voie intra-péritonéale (i.p.) en vue d'atteindre une dose de 10 mg.kg⁻¹. Parallèlement à ce traitement, des rats témoins sont pesés et un volume équivalent de propylène-glycol leur est injecté (i.p.).

Une heure trente après l'injection, 100 µL de carragénine λ sont injectés dans la voûte plantaire de la patte arrière gauche de tous les rats, y compris les témoins. Un volume identique de liquide physiologique est injecté dans la voûte plantaire de la patte arrière droite des animaux, cette patte servira de contrôle.

Quatre heures trente après l'injection de carragénine λ, les rats sont euthanasiés à l'Ethrane[®] (enflurane, Abott, Campoverde, Italie). Leurs pattes arrières sont ensuite coupées au niveau de l'articulation tibio-tarsienne et pesées.

III.4.3. Expression des résultats

Le pourcentage de gonflement de la patte gauche par rapport à la patte droite est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de gonflement} = \frac{\text{patte gauche (g)} - \text{patte droite (g)}}{\text{patte droite (g)}} \times 100$$

Ces pourcentages représentent la moyenne suivie de l'erreur standard (moyenne \pm S.E.M. ; $n \geq 6$).

Le pourcentage d'inhibition des drogues est calculé selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times \left[1 - \left[\frac{\% \text{ gonflement expérimental}}{\% \text{ gonflement maximal}} \right] \right]$$

Dans cette relation, le pourcentage de gonflement expérimental représente le gonflement (%) observé pour les rats traités avec la drogue. Le pourcentage de gonflement maximal équivaut au gonflement (%) observé chez les rats témoins.

IV. BIBLIOGRAPHIE

- Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A₂ synthase inhibitor and thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. The Ridogrel Versus Aspirin Patency Trial (RAPT). *Circulation* **89**, 588-95 (1994).
- Arita, H., Nakano, T. & Hanasaki, K. Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res* **28**, 273-301 (1989).
- Balant, L. Clinical pharmacokinetics of sulphonylurea hypoglycaemic drugs. *Clin Pharmacokinet* **6**, 215-41 (1981).
- Belton, O. & Fitzgerald, D. J. Cyclooxygenase isoforms and atherosclerosis. *Expert Rev Mol Med* **2003**, 1-18 (2003).
- Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M. B., Hawkey, C. J., Hochberg, M. C., Kvien, T. K. & Schnitzer, T. J. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* **343**, 1520-8, 2 p following 1528 (2000).
- Born, G. V. & Cross, M. J. The Aggregation of Blood Platelets. *J Physiol* **168**, 178-95 (1963).
- Brooks, P., Emery, P., Evans, J. F., Fenner, H., Hawkey, C. J., Patrono, C., Smolen, J., Breedveld, F., Day, R., Dougados, M., Ehrich, E. W., Gijon-Banos, J., Kvien, T. K., Van Rijswijk, M. H., Warner, T. & Zeidler, H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 779-88 (1999).
- Busse, W. W. & Lemanske, R. F., Jr. Asthma. *N Engl J Med* **344**, 350-62 (2001).
- Castelao, J. E., Bart, R. D., 3rd, DiPerna, C. A., Sievers, E. M. & Bremner, R. M. Lung cancer and cyclooxygenase-2. *Ann Thorac Surg* **76**, 1327-35 (2003).
- Cayatte, A. J., Du, Y., Oliver-Krasinski, J., Lavielle, G., Verbeuren, T. J. & Cohen, R. A. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1724-8 (2000).
- Claria, J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* **9**, 2177-90 (2003).
- Cracowski, J. L., Devillier, P., Durand, T., Stanke-Labesque, F. & Bessard, G. Vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res* **38**, 93-103 (2001).
- Cracowski, J. L., Durand, T. & Bessard, G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 360-6 (2002).
- Dannenber, A. J., Altorki, N. K., Boyle, J. O., Dang, C., Howe, L. R., Weksler, B. B. & Subbaramaiah, K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* **2**, 544-51 (2001).
- Dannhardt, G. & Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem* **36**, 109-26 (2001).

- Dannhardt, G. & Laufer, S. Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: is there a common pharmacophore? *Curr Med Chem* **7**, 1101-12 (2000).
- de Leval, X., Delarge, J., Devel, P., Neven, P., Michaux, C., Masereel, B., Pirotte, B., David, J. L., Henrotin, Y. & Dogné, J. M. Evaluation of classical NSAIDs and COX-2 selective inhibitors on purified ovine enzymes and human whole blood. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **64**, 211-6 (2001).
- Delarge, J. & Lapière, C. L. [A new class of high ceiling diuretics : derivatives of 1-alkyl-3-(4-phenylaminopyridin-3-yl)sulfonylurea (author's transl)]. *Ann Pharm Fr* **36**, 369-79 (1978).
- Dogné, J. M., de Leval, X., Benoit, P., Rolin, S., Pirotte, B. & Masereel, B. Therapeutic potential of thromboxane inhibitors in asthma. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 275-81 (2002).
- Dogné, J. M., de Leval, X., Delarge, J., David, J. L. & Masereel, B. New trends in thromboxane and prostacyclin modulators. *Curr Med Chem* **7**, 609-28 (2000).
- Dogné, J. M., de Leval, X., Kolh, P., Sanna, V., Rolin, S., Michaux, C., Mauer, M., David, J. L., Masereel, B. & Pirotte, B. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (I/II). Effects of BM-567 on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**, 49-54 (2003).
- Dogné, J. M., Hanson, J., de Leval, X., Kolh, P., Tchana-Sato, V., de Leval, L., Rolin, S., Ghuysen, A., Segers, P., Lambermont, B., Masereel, B. & Pirotte, B. Pharmacological characterization of N-tert-butyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-573), a novel thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 498-505 (2004).
- Fiddler, G. I. & Lumley, P. Preliminary clinical studies with thromboxane synthase inhibitors and thromboxane receptor blockers. A review. *Circulation* **81**, I69-78; discussion I79-80 (1990).
- Fitzpatrick, F. A. & Murphy, R. C. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. *Pharmacol Rev* **40**, 229-41 (1988).
- Flower, R. J. The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 179-91 (2003).
- Fukunaga, M., Makita, N., Roberts, L. J., 2nd, Morrow, J. D., Takahashi, K. & Badr, K. F. Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **264**, C1619-24 (1993).
- Gurbel, P. A., Murugesan, S. R., Lowry, D. R. & Serebruany, V. L. Plasma thromboxane and prostacyclin are linear related and increased in patients presenting with acute myocardial infarction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**, 7-11 (1999).
- Halushka, P. V. Thromboxane A₂ receptors: where have you gone? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **60**, 175-89 (2000).
- Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2994-8 (1975).
- Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* **1299**, 125-40 (1996).

- Herschman, H. R., Talley, J. J. & DuBois, R. Cyclooxygenase 2 (COX-2) as a target for therapy and noninvasive imaging. *Mol Imaging Biol* **5**, 286-303 (2003).
- Hirabayashi, T. & Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **1488**, 124-38 (2000).
- Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S. & Narumiya, S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature* **349**, 617-20 (1991).
- Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M. & Narumiya, S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* **97**, 949-56 (1996).
- Hoffmann, C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. *Curr Med Chem* **7**, 1113-20 (2000).
- Huang, J. S., Ramamurthy, S. K., Lin, X. & Le Breton, G. C. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal* **16**, 521-33 (2004).
- Iniguez, M. A., Rodriguez, A., Volpert, O. V., Fresno, M. & Redondo, J. M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* **9**, 73-8 (2003).
- Janssen, L. J. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L1067-82 (2001).
- Karp, G. *Biologie cellulaire et moléculaire - Concepts et expériences*. Ed. De Boeck Université-Bruxelles. Chap 15, p 662-664 (1998).
- Kinsella, B. T., O'Mahony, D. J. & Fitzgerald, G. A. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 957-64 (1997).
- Kurosawa, M., Igarashi, Y., Kobayashi, H., Kobayashi, S. & Abe, S. Procedures for plasma prostaglandins assay from bronchial asthmatic patients using 9-anthryldiazomethane-HPLC method. *Ann Allergy* **64**, 464-70 (1990).
- Langleben, D., Christman, B. W., Barst, R. J., Dias, V. C., Galie, N., Higenbottam, T. W., Kneussl, M., Korducki, L., Naeije, R., Riedel, A., Simonneau, G., Hirsch, A. M., Rich, S., Robbins, I. M., Oudiz, R., McGoon, M. D., Badesch, D. B., Levy, R. D., Mehta, S., Seeger, W. & Soler, M. Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension. *Am Heart J* **143**, E4 (2002).
- LeDuc, L. E., Wyche, A. A., Sprecher, H., Sankarappa, S. K. & Needleman, P. Analogues of arachidonic acid used to evaluate structural determinants of prostaglandin receptor and enzyme specificities. *Mol Pharmacol* **19**, 242-7 (1981).
- Martin, C., Ullrich, V. & Uhlig, S. Effects of the thromboxane receptor agonist U46619 and endothelin-1 on large and small airways. *Eur Respir J* **16**, 316-23 (2000).
- Masereel, B., Damas, J., Fontaine, J., Lembege, M., Lacan, F., Nuhrich, A., Delarge, J., Pochet, L. & Dogné, J. M. Thromboxane A2 receptor antagonism in man and rat by a sulphonylcyano guanidine (BM-144) and a sulphonylurea (BM-500). *J Pharm Pharmacol* **51**, 695-701 (1999).

- Masuda, A., Mais, D. E., Oatis, J. E., Jr. & Halushka, P. V. Platelet and vascular thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors. Evidence for different subclasses in the rat. *Biochem Pharmacol* **42**, 537-44 (1991).
- Michaux, C., Dogné, J. M., Rolin, S., Masereel, B., Wouters, J. & Durant, F. A pharmacophore model for sulphonyl-urea (-cyanoguanidine) compounds with dual action, thromboxane receptor antagonists and thromboxane synthase inhibitors. *Eur J Med Chem* **38**, 703-10 (2003).
- Mihara, S., Hara, S., Ueda, M., Ide, M. & Fujimoto, M. Comparison of vascular and platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in the pig. *Eur J Pharmacol* **160**, 313-21 (1989).
- Monshizadegan, H., Hedberg, A. & Webb, M. L. Characterization of binding of a specific antagonist, [3H]-SQ 29,548, to soluble thromboxane A₂/prostaglandin H₂ (TP) receptors in human platelet membranes. *Life Sci* **51**, 431-7 (1992).
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F. & Roberts, L. J., 2nd. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9383-7 (1990).
- Murakami, M. & Kudo, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43**, 3-35 (2004).
- Ogletree, M. L. & Allen, G. T. Interspecies differences in thromboxane receptors: studies with thromboxane receptor antagonists in rat and guinea pig smooth muscles. *J Pharmacol Exp Ther* **260**, 789-94 (1992).
- Patrono, C. & FitzGerald, G. A. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2309-15 (1997).
- Phillips, R. K., Wallace, M. H., Lynch, P. M., Hawk, E., Gordon, G. B., Saunders, B. P., Wakabayashi, N., Shen, Y., Zimmerman, S., Godio, L., Rodrigues-Bigas, M., Su, L. K., Sherman, J., Kelloff, G., Levin, B. & Steinbach, G. A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut* **50**, 857-60 (2002).
- Pinheiro, R. M. & Calixto, J. B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm Res* **51**, 603-10 (2002).
- Pratico, D., Iuliano, L., Mauriello, A., Spagnoli, L., Lawson, J. A., Rokach, J., Maclouf, J., Violi, F. & FitzGerald, G. A. Localization of distinct F₂-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **100**, 2028-34 (1997).
- Raychowdhury, M. K., Yukawa, M., Collins, L. J., McGrail, S. H., Kent, K. C. & Ware, J. A. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A₂ receptor. *J Biol Chem* **269**, 19256-61 (1994).
- Rokach, J., Khanapure, S. P., Hwang, S. W., Adiyaman, M., Lawson, J. A. & FitzGerald, G. A. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* **54**, 853-73 (1997).
- Rolin, S., Dogné, J. M., Michaux, C., Delarge, J. & Masereel, B. Activity of a novel dual thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **65**, 67-72 (2001).

- Rolin, S., Péteïn, M., Tchana-Sato, V., Dogné, J. M., Benoit, P., Lambermont, B., Ghuysen, A., Kolh, P. & Masereel, B. BM-573, a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, prevents pig myocardial infarction induced by coronary thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 59-65 (2003).
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-9 (1993).
- Sachinidis, A., Flesch, M., Ko, Y., Schror, K., Bohm, M., Dusing, R. & Vetter, H. Thromboxane A₂ and vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* **26**, 771-80 (1995).
- Samara, E., Cao, G., Locke, C., Granneman, G. R., Dean, R. & Killian, A. Population analysis of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of seratrodist in patients with mild to moderate asthma. *Clin Pharmacol Ther* **62**, 426-35 (1997).
- Samuelsson, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568-75 (1983).
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. & Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12013-7 (1994).
- Serhan, C. N., Hamberg, M. & Samuelsson, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5335-9 (1984).
- Silverstein, F. E., Faich, G., Goldstein, J. L., Simon, L. S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N. M., Stenson, W. F., Burr, A. M., Zhao, W. W., Kent, J. D., Lefkowitz, J. B., Verburg, K. M. & Geis, G. S. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* **284**, 1247-55 (2000).
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. & Garavito, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-82 (2000).
- Swayne, G. T., Maguire, J., Dolan, J., Raval, P., Dane, G., Greener, M. & Owen, D. A. Evidence for homogeneity of thromboxane A₂ receptor using structurally different antagonists. *Eur J Pharmacol* **152**, 311-9 (1988).
- Tacconelli, S., Capone, M. L. & Patrignani, P. Clinical pharmacology of novel selective COX-2 inhibitors. *Curr Pharm Des* **10**, 589-601 (2004).
- Tanabe, T. & Tohnai, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 95-114 (2002).
- Tanaka, T., Sato, R. & Kurimoto, T. Z-335, a new thromboxane A₂ receptor antagonist, prevents arterial thrombosis induced by ferric chloride in rats. *Eur J Pharmacol* **401**, 413-8 (2000).
- Uchida, T., Kido, H., Yamanaga, K., Okita, M. & Watanabe, M. A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A₂-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **45**, 121-4 (1992).

- Ullrich, V., Zou, M. H. & Bachschmid, M. New physiological and pathophysiological aspects on the thromboxane A₂-prostacyclin regulatory system. *Biochim Biophys Acta* **1532**, 1-14 (2001).
- Van de Voorde, J. & Joos, G. Regionally different influence of contractile agonists on isolated rat airway segments. *Respir Physiol* **112**, 185-94 (1998).
- Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**, 232-5 (1971).
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S. & Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120 (1998).
- Yamamoto, Y., Kamiya, K. & Terao, S. Modeling of human thromboxane A₂ receptor and analysis of the receptor-ligand interaction. *J Med Chem* **36**, 820-5 (1993).
- Zhang, R., Ogletree, M. L. & Moreland, S. Characterization of thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptors in aorta. *Eur J Pharmacol* **317**, 91-6 (1996).
- Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K. & Isakson, P. C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E₂ production. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 1069-75 (1997).

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
I.1. BIOSYNTHESE DES EICOSANOÏDES.....	1
I.1.1. Les acides gras précurseurs.....	1
I.1.2. Libération de l'acide arachidonique.....	1
I.1.3. Métabolisme de l'acide arachidonique par voies enzymatiques.....	2
I.1.3.1. La voie des cyclooxygénases.....	3
I.1.3.2. Les prostanoïdes.....	3
I.1.4. Métabolisme de l'acide arachidonique par voie non enzymatique.....	4
I.1.4.1. Genèse des isoprostanes.....	4
I.1.4.2. Propriétés des F ₂ -isoprostanes.....	5
I.2. LES CYCLOOXYGENASES.....	6
I.2.1. Les isoformes de la cyclooxygénase.....	6
I.2.1.1. La cyclooxygénase-1.....	6
I.2.1.2. La cyclooxygénase-2.....	6
I.2.2. Implications pathologiques principales de la COX-2.....	7
I.2.2.1. COX-2 et inflammation.....	7
I.2.2.2. COX-2 et cancers.....	8
I.2.3. Les inhibiteurs des cyclooxygénases.....	9
I.3. LE THROMBOXANE A ₂	10
I.3.1. Présentation et rôle du thromboxane A ₂	10
I.3.1.1. Métabolisme du thromboxane A ₂	10
I.3.1.2. Propriétés biologiques du thromboxane A ₂	11
I.3.2. Le récepteur du thromboxane A ₂	11
I.3.2.1. Historique et controverses.....	11
I.3.2.2. Distribution du récepteur TP.....	12
I.3.2.3. Transduction du signal.....	12
I.3.2.4. Ligands du récepteur TP.....	13
I.3.2.4.1. Relations structure-activité.....	13
I.3.2.4.2. Quelques agonistes du récepteur TP.....	13
I.3.2.4.3. Quelques antagonistes du récepteur TP.....	13
I.3.3. Implications pathologiques du TXA ₂	13
I.3.3.1. Les troubles cardiovasculaires.....	14
I.3.3.2. L'asthme bronchique.....	15
I.3.4. Modulation de la voie du thromboxane A ₂	15
I.3.4.1. Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase.....	15
I.3.4.2. Les antagonistes du récepteur du thromboxane A ₂	16
I.3.4.3. Les agents à activité mixte.....	16
I.4. MOTIVATIONS ET OBJECTIFS.....	18
II. RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	20
II.1. RESULTATS ET DISCUSSION.....	20
II.1.1. Etude chez le cobaye d'une sulfonylurée nitrobenzénique originale modulatrice de la voie du thromboxane A ₂	20
II.1.1.1. Choix de la molécule.....	20
II.1.1.2. Choix de l'espèce.....	20
II.1.1.3. Choix des modèles d'expérience.....	21
II.1.1.3.1. Les plaquettes.....	21
II.1.1.3.2. La musculature lisse d'organes isolés.....	21
II.1.1.4. Etude chez des cobayes non traités au BM-520.....	21
II.1.1.4.1. Prévention de l'agrégation plaquettaire <i>in vitro</i>	21
II.1.1.4.1.1. Les plaquettes et l'hémostase.....	21
II.1.1.4.1.2. Principe.....	22
II.1.1.4.1.3. Effet du BM-520 sur l'agrégation plaquettaire <i>in vitro</i>	22
II.1.1.4.2. Contraction d'organes isolés.....	23
II.1.1.4.2.1. Principe.....	23
II.1.1.4.2.2. Effet du BM-520 <i>ex vivo</i> sur la contraction de l'aorte et de la trachée de cobaye.....	23
II.1.1.5. Etude chez des cobayes pré-traités au BM-520.....	24
II.1.1.5.1. Prévention de l'agrégation plaquettaire <i>in vivo</i>	24
II.1.1.5.1.1. Principe.....	24
II.1.1.5.1.2. Effet de l'injection intraveineuse de BM-520 sur l'agrégation plaquettaire.....	24

II.1.1.5.2. Contraction d'organes isolés.....	25
II.1.1.5.2.1. Principe.....	25
II.1.1.5.2.2. Effet de l'injection intraveineuse de BM-520 sur la contraction de l'aorte et de la trachée.....	25
II.1.1.6. Discussion.....	26
II.1.2. <i>Evaluation pharmacologique in vitro de thiohydantoïnes originales et mise au point d'un modèle d'inflammation aiguë chez le rat</i>	30
II.1.2.1. Evaluation pharmacologique <i>in vitro</i> de thiohydantoïnes originales.....	30
II.1.2.1.1. Présentation des molécules originales.....	30
II.1.2.1.2. Choix du modèle d'expérience.....	30
II.1.2.1.3. Principe du test sur sang total humain.....	31
II.1.2.1.4. Résultats et discussion de l'évaluation <i>in vitro</i> sur sang total humain.....	32
II.1.2.2. Mise au point d'un modèle d'inflammation aiguë chez le rat.....	33
II.1.2.2.1. Généralités.....	33
II.1.2.2.2. Mise au point du test.....	34
II-2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	36
III. MATERIELS ET METHODES.....	40
III.1. AGREGATION PLAQUETTAIRE.....	40
III.1.1. <i>Préparation de la solution injectable de BM-520 et traitement des cobayes</i>	40
III.1.2. <i>Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) et des inducteurs de l'agrégation</i>	40
III.1.3. <i>Préparation du BM-520 pour l'agrégation plaquettaire chez les animaux non traités</i>	40
III.1.4. <i>Essai</i>	41
III.1.5. <i>Expression des résultats</i>	41
III.2. CONTRACTION D'ORGANES ISOLEES.....	41
III.2.1. <i>Description du système</i>	41
III.2.2. <i>Préparation de la solution injectable de BM-520 et traitement des cobayes</i>	42
III.2.3. <i>Relaxation de la trachée et de l'aorte de cobaye contractées</i>	42
III.2.3.1. Préparation de la trachée et de l'aorte de cobaye.....	42
III.2.3.2. Préparation des milieux, drogues et réactifs.....	43
III.2.3.3. Essai.....	43
III.2.3.4. Expression des résultats.....	43
III.2.4. <i>Relaxation de l'aorte de rat contractée</i>	44
III.2.4.1. Préparation de l'aorte de rat.....	44
III.2.4.2. Préparation des milieux, drogues et réactifs.....	44
III.2.4.3. Essai.....	44
III.2.4.4. Expression des résultats.....	44
III.3. EVALUATION DU POTENTIEL INHIBITEUR DE CYCLOOXYGENASES SUR SANG TOTAL HUMAIN.....	45
III.3.1. <i>Evaluation de l'activité COX-1</i>	45
III.3.1.1. Préparation du sang.....	45
III.3.1.2. Préparation des drogues.....	45
III.3.1.3. Réalisation des incubations COX-1.....	45
III.3.1.4. Evaluation de la teneur en TXB ₂	45
III.3.1.5. Expression des résultats.....	47
III.3.2. <i>Evaluation de l'activité COX-2</i>	47
III.3.2.1. Préparation du sang.....	47
III.3.2.2. Préparation des drogues.....	47
III.3.2.3. Réalisation des incubations COX-2.....	47
III.3.2.4. Dosage de la PGE ₂	47
III.3.2.5. Expression des résultats.....	48
III.4. EVALUATION DU POTENTIEL ANTI-INFLAMMATOIRE <i>IN VIVO</i> : OEDEME A LA CARRAGENINE CHEZ LE RAT.....	48
III.4.1. <i>Préparation des drogues et de la carragénine</i>	48
III.4.2. <i>Traitement des rats</i>	48
III.4.3. <i>Expression des résultats</i>	49
IV. BIBLIOGRAPHIE.....	50