

U N I V E R S I T E D E L I M O G E S
F A C U L T E D E P H A R M A C I E

Année 1992

Thèse N° 313.

ACTIVITE ANTI-LIPOXYGENASIQUE
DE CERTAINS CINNAMATES :
APPLICATIONS



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le : 13 Mai 1992

PAR

Viviane PASCAL

Née le 25 Octobre 1968 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur BENEYTOUT - Professeur	- Président
Monsieur BONNETBLANC - Professeur	- Juge
Madame DESMAISON - Maître de conférences	- Juge
Monsieur DUMAS - Pharmacien	- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

Je remercie chaleureusement Monsieur Beneytout, Professeur des Universités de Biochimie, pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de biochimie, me permettant ainsi d'effectuer les manipulations nécessaires à la réalisation de ce travail. Travail qui n'aurait pu aboutir sans sa grande disponibilité, ses conseils et son soutien de tous les instants.

Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon jury de thèse.

C'est également à Mademoiselle Tixier, Professeur des Universités de Biochimie, que va toute ma reconnaissance pour m'avoir, par la qualité de son enseignement, donné le goût de la biochimie.

Je tiens à adresser un remerciement tout particulier à Monsieur Andrianarison, Chercheur post-doctoral, pour ses conseils et son aide précieuse dans la réalisation de mes expériences ; ainsi que pour la patience qu'il a su montrer à mon égard.

C'est avec une profonde sympathie que je remercie tout le personnel du laboratoire de biochimie pour son accueil charmant et son aide permanente.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Desmaison, Maître de Conférences de Biochimie, pour l'enseignement théorique et pratique qu'elle m'a prodigué au cours de ces six années d'études ; et pour avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

Je remercie Monsieur Bonnetblanc, Professeur des Universités de Dermatologie, Médecin des hôpitaux, Chef de service, pour m'avoir accueillie dans le service de dermatologie au cours de mon stage hospitalo-universitaire, et de l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger mon travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur Dumas, Pharmacien, pour m'avoir acceptée dans son officine pour mon stage de sixième année, et pour le plaisir qu'il me fait en étant présent parmi les membres du jury.

A MES PARENTS ,

A FRANCK ,

A SES PARENTS ,

A MA FAMILLE ,

A MES AMIS .

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : LES LIPOXYGENASES VEGETALES ET ANIMALES. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

I. DEFINITION :

II. PROPRIETES DE LA REACTION LIPOXYGENASIQUE :

A-Site d'oxygénation.

B-Stéréospécificité de la réaction lipoxygénasique.

C-Abstraction stéréospécifique d'un hydrogène.

D-Spécificité du substrat.

E-Cofacteurs des lipoxygénases.

III. LES LIPOXYGENASES VEGETALES :

A-Dégradation de l'acide linoléique.

B-Dégradation de l'acide linoléique.

C-Dégradation de l'acide arachidonique.

D-Rôle physiologique des lipoxygénases végétales.

IV. LES LIPOXYGENASES ANIMALES :

A-Substrats des lipoxygénases animales.

B-Voie de la cyclooxygénase.

C-Voie des lipoxygénases.

V. INHIBITEURS DES LIPOXYGENASES :

A-Inhibiteurs des lipoxygénases végétales.

B-Inhibiteurs des lipoxygénases animales.

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION.

I. MATERIEL :

A-Spectrophotomètre.

B-Oxymètre.

C-Enzyme.

D-Substrat.

E-Tampon.

F-Effecteurs.

II. METHODES :

A-Travaux préliminaires.

B-Conditions opératoires.

C-Méthode spectrophotométrique.

D-Méthode polarographique.

III. RESULTATS :

A-Méthode spectrophotométrique.

B-Méthode polarographique.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.

I. INTERPRETATION DES RESULTATS :

A-Problèmes rencontrés au cours des manipulations.

B-Relation structure-activité.

C-Comparaison avec d'autres études.

II. EXTRAPOLATION DE NOTRE ETUDE :

III. UTILISATION DES CINNAMATES EN PHARMACIE :

A-Nécessite d'une photoprotection.

B-Les différents moyens de photoprotection.

C-Les cinnamates.

IV. CONSEQUENCES EVENTUELLES DE L'UTILISATION AU LONG COURS DE PRODUITS SOLAIRES CONTENANT DES CINNAMATES :

A-Rappels sur l'absorption cutanée.

B-Conséquences d'une éventuelle absorption percutanée des cinnamates.

CONCLUSION.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION

Les lipoxygénases sont des enzymes très répandues aussi bien dans le règne animal que végétal. Elles interviennent dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés et permettent la transformation de ces derniers en hydroperoxydes.

Chez les animaux, les produits de cette lipoxygénation vont donner naissance, grâce à l'intervention d'autres enzymes, à des molécules qui jouent un rôle majeur dans les réactions inflammatoires : les leucotriènes. Malgré cela, le rôle physiologique de ces lipoxygénases est encore inconnu.

Chez les végétaux, le rôle physiologique de ces produits est mieux connu. Il semblerait qu'ils interviennent dans différents processus de la vie des plantes : la défense contre les agressions extérieures ou le contrôle de certaines activités enzymatiques au sein de la cellule végétale.

Actuellement, la mise en évidence de molécules ayant une action inhibitrice sur l'activité lipoxygénasique fait l'objet de nombreuses publications. Ces recherches sont réalisées dans l'optique d'une meilleure compréhension de l'activité des lipoxygénases. Très souvent, ces études sont effectuées sur les lipoxygénases végétales (soja) qui sont un bon modèle d'étude de ces réactions enzymatiques.

La première partie de ce travail est une étude bibliographique, portant d'une part sur :

- les lipoxygénases végétales et animales, la réaction enzymatique et ses propriétés, le métabolisme des acides gras polyinsaturés par la voie des lipoxygénases et le rôle physiologique des produits formés ;

et d'autre part sur :

- les inhibiteurs des lipoxygénases.

La seconde partie est consacrée à l'étude de l'activité enzymatique de la lipoxygénase de soja en présence d'acide cafféique, d'acide ferrulique, d'acide cinnamique et de quatre de ses dérivés : l'acide 2-hydroxy cinnamique, l'acide 3-hydroxy cinnamique, l'acide 4-hydroxy cinnamique et l'acide 3,4-dihydroxy hydrocinnamique.

Les mesures de l'activité lipoxygénasique sont réalisées grâce à deux méthodes : la méthode spectrophotométrique et la méthode polarographique.

Les résultats obtenus nous permettent d'en déduire que, mis à part l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique, toutes les autres molécules testées inhibent la lipoxygénase de soja.

Puis dans la troisième partie, en s'appuyant sur d'autres travaux portant sur les lipoxygénases végétales et animales, nous établissons une relation structure-activité entre la structure chimique de l'inhibiteur et son degré d'inhibition vis à vis de l'activité lipoxygénasique.

Notre étude est ensuite extrapolée aux cinnamates utilisés comme filtres UV dans les produits solaires et aux lipoxygénases

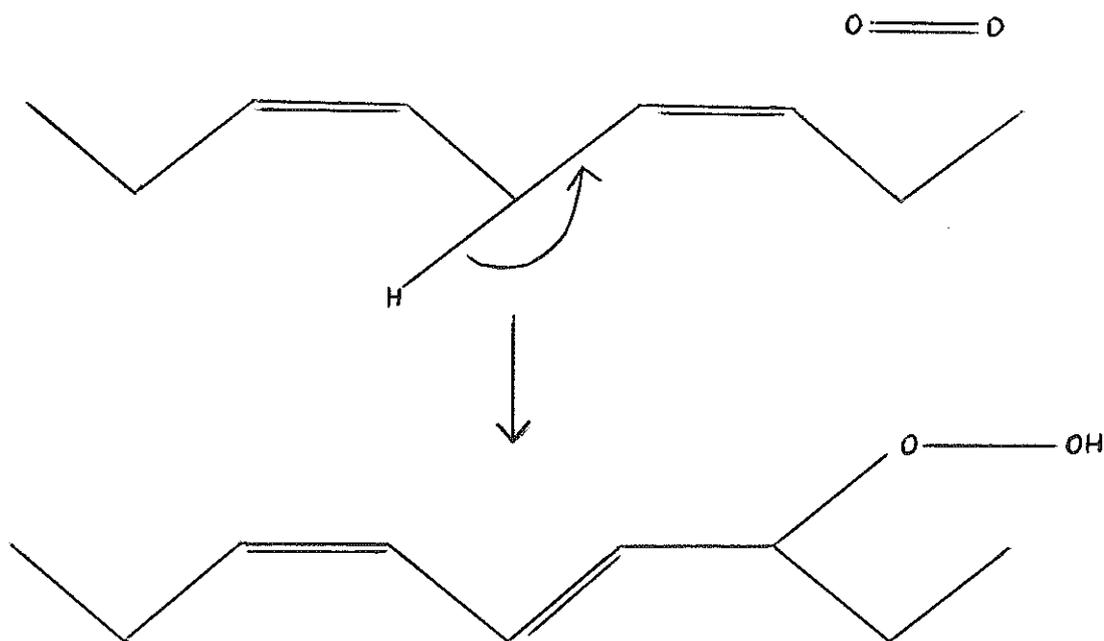
animales. Ainsi, nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'utilisation au long cours de ces produits chez l'homme pourrait, après absorption percutanée, induire une modification du métabolisme des acides gras polyinsaturés au niveau de la peau.

PREMIERE PARTIE :

**LES LIPOXYGENASES VEGETALES ET ANIMALES.
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.**

I-DEFINITION :

Encore appelées lipoxydases, les lipoxygénases sont des enzymes à fer non hémique, catalysant la dioxygénation des acides gras polyinsaturés contenant un système cis,cis-1,4 pentadiène.



Ces lipoxygénases ont été mises en évidence chez les végétaux dès 1932 (ANDRE et HOU, 1932) et ce n'est qu'en 1974 qu'a été découverte la première lipoxygénase animale. (HAMBERG et SAMUELSON, 1974)

II-PROPRIETES DE LA REACTION LIPOXYGENASIQUE :

A-SITE D'OXYGENATION :

Il est spécifique de chaque lipoxygénase. La nomenclature des lipoxygénases est basée sur le site d'insertion de l'oxygène

moléculaire dans la molécule d'acide gras (REDDANA et Coll., 1988). L'acide gras concerné est souvent l'acide arachidonique, et donc on parle d'arachidonate x lipoxygénase, x correspond au numéro du carbone oxygéné en comptant à partir de l'extrémité carboxyle.

On répertorie six lipoxygénases : 5-, 8-, 9-, 11-, 12- et 15-lipoxygénase. La 15-lipoxygénase catalyse l'oxygénation du carbone 15 de l'acide arachidonique et l'oxygénation du carbone 13 de l'acide linoléique. On remarque que les deux carbones oxygénés sont situés à n-6 à partir de l'extrémité méthyl.

B-STEREOSPECIFICITE DE L'OXYGENATION :

L'insertion de l'oxygène moléculaire se fait toujours au niveau d'un carbone asymétrique. Le produit de la réaction est optiquement actif, et prédomine soit en configuration R soit en configuration S.

En utilisant l'acide arachidonique comme substrat, la lipoxygénase de soja catalyse la synthèse du 15-HPETE (acide-15 hydroperoxyeicosatétraénoïque) avec 99,7% de cet hydroperoxyde en configuration S. Inversement, la lipoxygénase d'une espèce de corail Pseudoplexaura porosa, catalyse la formation du 8-HPETE (acide 8-hydroperoxyeicosatétraénoïque) avec 99,4% de ce produit en configuration R (BUNDY et Coll., 1986).

Une comparaison a été réalisée entre la lipoxygénase de soja et la lipoxygénase de pomme de terre, en utilisant l'acide linoléique comme substrat (NIKOLAEV et Coll., 1990). Cette étude a montré que les deux enzymes catalysent la synthèse du 9-HPOD (acide 9-hydroperoxyoctadécadiénoïque) et du 13-HPOD (acide 13-

hydropéroxyoctadécadiénoïque). Mais, avec la lipoxygénase de pomme de terre, le 9-HPOD constitue le produit majoritaire et se présente en configuration S. Le 13-HPOD se retrouve en petite quantité, et sous forme d'un mélange : 39% en configuration S et 61% en configuration R. Avec la lipoxygénase de soja, c'est le 13-HPOD en configuration S qui constitue le produit majoritaire ; le 9-HPOD en petite quantité se présente sous la forme d'un mélange : 73% en configuration S et 27% en configuration R (Tableau I et figure 1).

GARDNER (1989) a démontré que la proportion de 9(S)-HPOD et de 13(S)-HPOD, dont la synthèse est catalysée par la lipoxygénase de type 1 de soja, varie en fonction du pH (Tableau II et figure 2).

Toutes ces études ont été réalisées grâce à la chromatographie liquide haute pression avec l'apport de phases chirales. Ces phases permettent une très bonne séparation des dérivés R ou S. De plus, elles évitent les procédures de dérivation classiques utilisant des molécules plus ou moins purifiées (BRASH et HAWKINS, 1990).

C-ABSTRACTION STEREOSPECIFIQUE D'UN HYDROGENE :

Dans la molécule d'acide gras, les deux doubles liaisons du système cis,cis-1,4 pentadiène sont séparées par un groupement méthylène. Lors de l'oxygénation du carbone, on a libération des deux hydrogènes de ce groupement méthylène.

La libération stéréosélective d'un hydrogène a pu être étudiée grâce à l'utilisation d'un traceur isotopique, le tritium, sur la lipoxygénase de soja (HAMBERG et SAMUELSSON, 1967). Seul le

TABLEAU I. Compositions des isomères de position, géométriques et optiques des H(P)ODEs résultant de l'action sur l'acide linoléique de la lipoxigénase-1 de soja ou de la lipoxigénase de pomme de terre.
D'après Nikolaev et Coll. (1990).

Enzyme	Conversion ratios [%]	Positional isomers	Geometrical isomers		Optical isomers			
		HODEs	13-HODEs	9-HODEs	13-HODE (ZE)	13-HODE (EE)	9-HODE (EZ)	9-HODE (EE)
		13:9	(ZE):(EE)	(EZ):(EE)	S:R	S:R	S:R	S:R
Control	0.3	51:49	77:23	82:18	49:51	50:50	49:51	50:50
Potato LO	75	9:91	40:60	96:4	39:61	48:52	100:0	92:8
% of non-enzymic products		(2) (0)	(4) (1)	(0) (1)	(5) (3)	(1) (1)	(0)	(1) (7)
Soybean LO	70	95:5	98:2	67:33	100:0	93:7	73:27	53:47
% of non-enzymic products		(0) (4)	(0) (3)	(5) (3)	(0)	(2) (22)	(3) (9)	(2) (3)

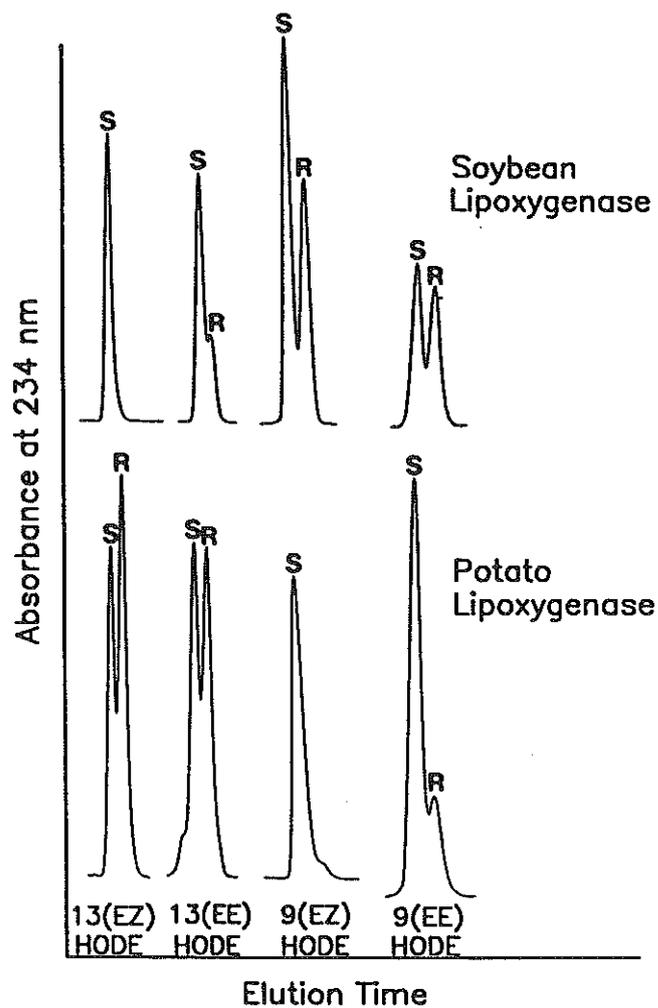


FIGURE 1. profil en phase chiral HPLC des HODEs méthyls obtenus à partir des HPODES résultants de l'action des lipoxygénases de pomme de terre et de soja sur l'acide linoléique.

D'après Nikolaev et Coll. (1990).

TABLEAU II. Analyse structurale des diisomères (E,E) des hydroperoxydes de l'acide linoléique isolés à partir d'un mélange des produits de la réaction de l'acide linoléique avec l'oxygène en présence de la lipoxygénase-1 de soja à différentes valeurs de pH. D'après Gardner (1989).

pH	Buffer	Activity (Relative rate)	LOX-1(µg)	Percent of total hydroperoxides	Percent regio- specificity (13:9)	Percent stereospecificity	
						13S:13R	9S:9R
4.5	Acetate	0	1 100	29.4	50:50	50:50	51:49
5.0	Acetate	0	1 100	30.3	50:50	51:49	51:49
5.5	Acetate	0	1 100	28.2	49:51	51:49	49:51
6.06	Acetate	0.04	1 100	21.5	49:51	50:50	51:49
6.49	Acetate	0.05	920	9.5	44:56	-	-
6.55	Phosphate	-	1 100	7.4	43:57	-	-
6.75	Acetate	-	920	5.6	41:59	51:49	54:46
6.75	Phosphate	-	1 100	6.5	40:60	-	-
6.99	Phosphate	0.15	330	5.9	44:56	-	-
7.37	Phosphate	-	210	4.2	46:54	53:47	54:46
7.5	Hepes	0.55	92	4.4	43:57	-	-
7.76	Hepes	-	82	4.2	41:59	51:49	55:45
8.06	Borate	0.73	67	3.4	44:56	51:49	53:47
8.25	Borate	-	60	3.4	47:53	52:48	53:47
8.5	Borate	0.94	53	2.9	45:55	52:48	52:48
9.0	Borate	1.0	51	3.4	29:71	52:48	54:46
9.5	Borate	-	51	2.1	48:52	53:47	53:47
10.0	Borate	1.0	51	2.0	45:55	56:46	54:46
10.5	Borate	1.0	51	1.9	47:53	-	-

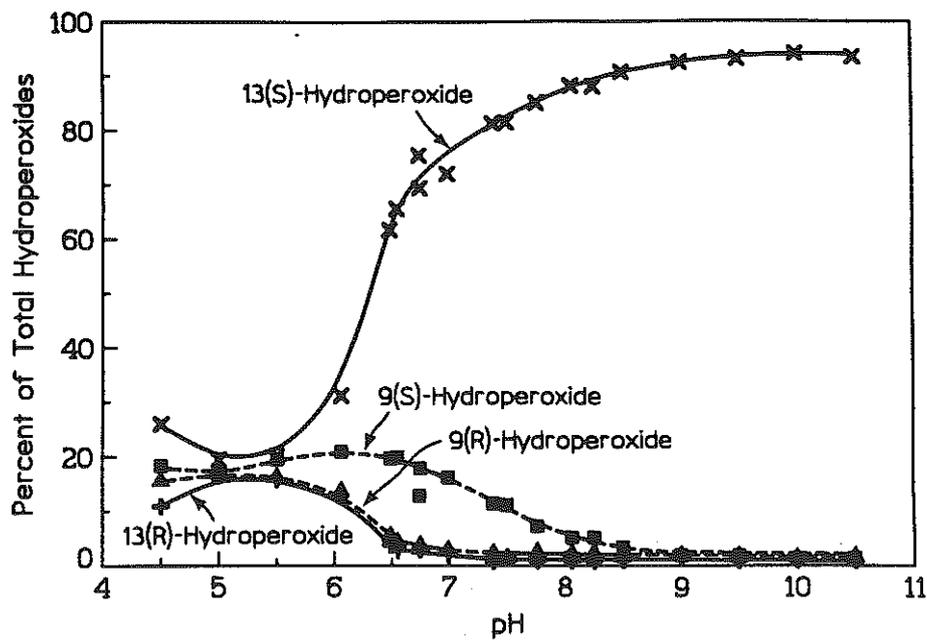


FIGURE 2. Analyse structurale des diisomères (Z,E) hydroperoxydes produits de l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase-1 de soja en fonction du pH.

D'après Gardner (1989).

tritium en configuration L est éliminé, l'autre en configuration D reste en place .

Mais en fait, pour chaque lipoxygénase on aura une abstraction spécifique. Ainsi, la 5-lipoxygénase de leucocytes humains provoquera l'élimination de l'hydrogène en position D (COREY et LANSBURY, 1983). La 12-lipoxygénase issue des plaquettes catalyse l'élimination de l'hydrogène en position L (HAMBERG et HAMBERG, 1980).

D-SPECIFICITE DU SUBSTRAT :

Seuls les acides gras polyinsaturés à longue chaîne avec un système cis,cis-1,4 pentadiène peuvent être des substrats des lipoxygénases. Mais, une lipoxygénase donnée n'est pas obligatoirement active sur tous les substrats remplissant cette condition.

De nombreux substrats ont été testés avec une préparation purifiée de lipoxygénase de soja (HOLMAN et Coll., 1969). Les substrats qui présentent le meilleur pourcentage de réaction, ont tous des doubles liaisons sur le sixième et le neuvième carbone à partir de l'extrémité méthyle. Pour que la réaction enzymatique puisse avoir lieu, le groupe carboxyle ne doit pas être encombré stériquement et le sixième carbone à partir du groupement méthyl doit posséder une double liaison (Tableau III).

D'autres lipoxygénases ont été testées (YAMAMOTO, 1991). (Tableau IV).

TABLEAU III. Pourcentage d'oxydation des acides gras polyinsaturés par la lipoxygénase de soja en présence de calcium. D'après Holman et Coll. (1969).

Oxidation rate	Substance (Geneva numbering)	Positions of double bonds counting from terminal methyl group
100	9,12-18:2	6 9
93.6	4,7,10,13,16,19-22:6	3 6 9 12 15 18
91.4	5,8,11,14,17-20:5	3 6 9 12 15
86.9	11,14-20:2	6 9
83.3	10,13,16-19:3	3 6 9
79.0	9,12,15-18:3	3 6 9
76.8	5,8,11,14-20:4	6 9 12 15
55.7	11,14,17-20:3	3 6 9
44.6	6,9,12,15-21:4	6 9 12 15
39.3	6,9,12-18:3	6 9 12
39.1	5,8,11-18:3	7 10 13
32.6	9,15-18:2	3 9
27.6	6,9,12,15-18:4	3 6 9 12
25.6	5,8,11-17:3	6 9 12
19.3	9,12-17:2	5 8
9.7	6,9,12-16:3	4 7 10
3.5	10,13-19:2	6 9
3.8	Crepenynic acid	6 9
0	2-Methylarachidonic acid	6 9 12 15

TABLEAU IV. Spécificité des substrats des lipoxygénases.

Les valeurs des Vmax sont comparées à celle de l'acide arachidonique égale à 100%.

D'après Yamamoto (1991).

Carbon Number	Substrates Double Bond	5-Lipoxygenase			12-Lipoxygenase				15-Lipoxygenase		
		RBL Cell	Guinea Pig Leukocyte	Porcine Leukocyte	Bovine Leukocyte	Bovine Platelet	Bovine Trachea	Soybean	Rabbit Reticulocyte		
18	9,12	8	13	208	69	11	5	2	51	130	310
	6,9,12	—	—	172	100	32	14	2	72	51	280
	9,12,15	7	11	109	56	17	5	2	46	103	200
20	8,11	—	—	125	—	—	26	—	—	—	—
	11,14	—	—	92	44	15	5	2	29	113	380
	5,8,11	82	—	130	—	—	81	—	—	—	60
	7,10,13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	590
	8,11,14	11	43	144	55	78	60	7	98	—	300
	11,14,17	—	—	—	36	28	—	2	32	73	220
	5,8,11,14	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5,8,11,14,17	177	116	36	67	73	60	94	57	119	—
22	4,7,10,13,16,19	2	—	—	56	92	14	7	91	122	80
20	5-HETE	—	—	87	50	15	—	2	—	—	—
	5-HPETE	—	—	—	127	—	—	—	—	—	—
	12-HETE	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
	12-HPETE	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
	15-HETE	—	—	—	2	—	—	—	—	—	7
	15-HPETE	—	—	—	58	18	—	6	—	—	—

E-COFACTEURS DES LIPOXYGENASES :

E.1-Fer :

Les lipoxygénases sont des enzymes à fer non hémérique. La lipoxygénase de soja contient un atome de fer par molécule d'enzyme (CHAN, 1973). De même pour la 15-lipoxygénase des réticulocytes de lapin (SCHEWE, 1986).

La 12-lipoxygénase de leucocytes de porc ne contient que 0,45 atomes de fer par molécule (YOKOYAMA et Coll., 1986).

Quoi qu'il en soit, ce fer apparaît comme étant essentiel à l'activité enzymatique. Dans l'enzyme native, il se trouve à l'état ferreux (CHEESBROUGH et Coll., 1983) ; mais il peut très vite s'oxyder à l'état ferrique.

E.2-Calcium :

La présence de calcium est nécessaire à l'activité lipoxygénasique. Ceci a été d'abord démontré dans une préparation de basophiles de rat mise à incuber avec de l'acide arachidonique (JACKSCHIK et Coll., 1980). La transformation de l'acide arachidonique augmente lorsque l'on ajoute du chlorure de calcium. La confirmation a été apportée plus tard avec des études menées sur des 5-lipoxygénases de sources diverses [(OCHI et Coll., 1983) (FURUKAWA et Coll., 1984)].

E.3-ATP :

Une étude réalisée sur des leucocytes péritonéaux de cobaye à noyau polymorphe a prouvé que non seulement le calcium est nécessaire à l'activité 5-lipoxygénasique, mais qu'en plus la présence d'ATP multiplie par quatre cette activité enzymatique (OCHI et Coll., 1983).

L'ATP est donc un autre stimulant de la 5-lipoxygénase. Mais cet effet n'est pas spécifique de l'ATP car d'autres nucléosides triphosphates ainsi que l'AMP et l'ADP stimulent la 5-lipoxygénase. En fait, la présence d'ATP augmente la sensibilité de la lipoxygénase au calcium, d'où une activité plus importante.

III-LES LIPOXYGENASES VEGETALES :

Ces enzymes existent de façon très abondante dans le règne végétal. Ainsi, elles ont pu être décrites à la fois chez des végétaux supérieurs et inférieurs.

De nombreux travaux ont été réalisés, et ont permis de mettre en évidence une activité lipoxygénasique dans les graines de Lupinus albus (NAJID et Coll., 1988) ; dans les bulbes de tulipes (REDDANNA et Coll., 1988) ; dans les tubercules de pomme de terre (MULLIEZ et Coll., 1987) ; dans le caryope des céréales (KUHN et Coll., 1985) et dans les feuilles de Ghlechoma hederacea.L et autres labiées (KUHN et Coll., 1989).

Certains végétaux inférieurs ont également fait l'objet d'études sur les lipoxygénases. Ce sont les champignons tels que Ligumia subrostrata (HAGAR et Coll., 1989) et Saprolegnia parasitica (BORTHAKUR, 1988) ; et les algues telles que Chlorella

pyrenoidosa (ZIMMERMAN et VICK, 1973) et plus récemment dans le laboratoire de biochimie de la faculté de pharmacie de Limoges : Oscillotaria sp : algue bleu-vert (BENEYTOUT et Coll., 1989).

Successivement, vont être envisagées, les dégradations de l'acide linoléique, de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique.

A-DEGRADATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE :

L'acide linoléique est un très bon substrat des lipoxygénases végétales. Ainsi, il est transformé en deux hydroperoxydes :

- l'acide 13-hydroperoxylinoléique ou 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque (13-LOOH ou 13-HPOD).
- l'acide 9-hydroperoxylinoléique ou 9-hydroperoxyoctadécadiénoïque (9-LOOH ou 9-HPOD).

La proportion de ces deux hydroperoxydes est variable selon la lipoxygénase envisagée. Par exemple, avec la lipoxygénase de soja on obtiendra essentiellement du 13-LOOH ; alors qu'avec la lipoxygénase de pomme de terre on obtiendra surtout du 9-LOOH (NIKOLAEV et Coll., 1990).

Ces produits subissent ensuite de nombreuses transformations catalysées par différentes enzymes :

-Hydroperoxyde isomérase : C'est en 1966 que Zimmerman a découvert la première hydroperoxyde isomérase dans les graines de lin. Cette enzyme catalyse la formation d' α -cétol à partir du 13-LOOH. Depuis, d'autres travaux ont été réalisés et ont prouvé que les hydroperoxydes isomérases permettent la transformation des

hydropéroxydes de l'acide linoléique soit en α -cétols, soit en γ -cétols (GARDNER, 1975).

Une telle enzyme a été mise en évidence chez Chlorella pyrenoidosa (VICK et ZIMMERMAN, 1989). Elle catalyse la transformation du 13-LOOH ou 13-HPOD en acide 12,13-époxy-9-oxo-trans 10-,cis-15-octadécénoïque.

Les farines de céréales contiennent également des isomérases capables de transformer le 13-LOOH (ou 13-HPOD) en acide 12,13-époxy-,9-hydroxy-,trans-10-octadécénoïque (12,13-EHA) et le 9-LOOH (ou 9-HPOD) en acide 9,10-époxy-,13-hydroxy-,trans-11-octadécénoïque (9,10-EHA) (MANN et MORRISSON, 1975).

Hydropéroxyde lyase : Cette enzyme a été mise en évidence chez l'algue bleu-vert : Oscillatoria sp (ANDRIANARISON et Coll., 1989). Cette hydroperoxyde lyase catalyse la transformation du 13-LOOH en acide 13-oxo-tridéca-9,11-diénoïque et en pentanol. Par contre, le 9-LOOH n'est pas un substrat de cette enzyme.

L'existence d'une telle enzyme a également été démontrée dans l'algue verte Chlorella pyrenoidosa (VICK et ZIMMERMAN, 1989). Comme pour l'hydroperoxyde lyase d'Oscillatoria sp, on aura dégradation du 13-LOOH en acide 13-oxo-tridéca-9,11-diénoïque et aucune action sur le 9-LOOH.

Formation d'acide colnéléique : Il a été découvert, dans la pomme de terre, un système enzymatique capable d'engendrer la formation de dérivé divinyl étheroxyde : l'acide colnéléique, à partir du 9-LOOH (GALLIARD et Coll., 1973). Par contre, ce système enzymatique serait inactif sur le 13-LOOH.

B-DEGRADATION DE L'ACIDE LINOLENIQUE :

Elle ressemble en de nombreux points à celle de l'acide linoléique. En effet, l'acide linoléique est lui aussi, en général, un bon substrat des lipoxygénases végétales. Ainsi, il est dégradé comme l'acide linoléique, soit en 13-LnOOH (acide 13-hydroperoxylinoléique), soit en 9-LnOOH (acide 9-hydroperoxylinoléique) par oxygénation sur le carbone 13 ou sur le carbone 9 (GARDNER, 1988).

De même, ces hydroperoxydes pourront servir de substrat à des hydroperoxydes lyases ou à des hydroperoxydes isomérases.

Le 9-LnOOH peut également être transformé en dérivé divinyl étheroxyde, l'acide colnoléique par un système enzymatique de la pomme de terre (GALLIARD et Coll., 1973).

Vick et Zimmerman (1970) ont cependant mis en évidence une hydroperoxyde cyclase dans les graines de lin. Cette enzyme catalyse la transformation du 13-LnOOH en dérivé carbonylé cyclique : l'acide 8-[-2-(cis-2'-pentényl)-3-oxo-cis-4-cyclopentényl] octanoïque ou acide 12-oxo-10,15(Z)-phytodiénoïque (12-oxo-PDA). Le 9-LnOOH n'est pas un substrat de cette enzyme.

C-DEGRADATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE :

Dans les cellules végétales, la dégradation de l'acide arachidonique, catalysée par les lipoxygénases, conduit à la formation de six hydroperoxydes :

- 15-HPETE : acide 15-hydroperoxyeicosatétraénoïque (NAJID et Coll., 1988)

- 5-HPETE : acide 5-hydropéroxyeicosatétraénoïque (HAGAR et Coll., 1989)
- 12-HPETE : acide 12-hydropéroxyeicosatétraénoïque (HAGAR et Coll., 1989)
- 8-HPETE : acide 8-hydropéroxyeicosatétraénoïque (NAJID et Coll., 1988)
- 11-HPETE : acide 11-hydropéroxyeicosatétraénoïque (BILD et Coll., 1977)
- 9-HPETE : acide 9-hydropéroxyeicosatétraénoïque (REDDANA et Coll., 1990).

La lipoxigénase de pomme de terre peut catalyser la formation de ces six hydropéroxydes (REDDANA et Coll., 1990).

L'acide 15-hydropéroxyeicosatétraénoïque peut subir de nombreuses transformations. Ainsi, Borthakur et ses collaborateurs ont décrit en 1988, chez Saprolegnia parasitica, l'oxydation du 15-HPETE en dérivés triénoïques trihydroxylés :

- acide 11,12,15-trihydroxy-5,8,13 eicosatriénoïque
- acide 11,14,15-trihydroxy-5,8,12 eicosatriénoïque
- acide 13,14,15-trihydroxy-5,8,11 eicosatriénoïque.

La lipoxigénase de soja peut dégrader le 15-HPETE en dérivés 15-oxo-pentadécatétraénoïque ou l'isomériser en 15-céto-eicosatétraénoïque (FRUTEAU DE LACLOS et BORGEAT, 1988). Enfin, le 15-HPETE peut être oxygéné en acide triénoïque conjugué (ANDRIANARISON et Coll., 1990) ou en époxy alcool (HAMBERG et Coll., 1986).

D-ROLE PHYSIOLOGIQUE DES LIPOXYGENASES VEGETALES :

Si la présence de lipoxygénases chez de nombreux végétaux est indéniable, on ne sait pas encore de façon précise quel est le rôle joué par ces enzymes.

De nombreux travaux (VICK et ZIMMERMAN, 1987) permettent de supposer que les lipoxygénases contrôlent certains processus physiologiques chez les plantes. Parmi ceux-ci, on retrouve :

Sénescence des plantes : il a été envisagé, chez les labiées, la mise en jeu des produits de la voie des lipoxygénases dans la sénescence naturelle des feuilles (KUHN et Coll., 1989). Il a également été prouvé que les lipoxygénases catalysent la dernière étape de la synthèse de l'éthylène : hormone végétale participant au mûrissement des fruits et au vieillissement de certains organes végétaux (GARDNER et NEWTON, 1987).

Réponse aux lésions mécaniques subies par les plantes : la traumatine est une hormone capable de provoquer la cicatrisation des blessures mécaniques au sein des plantes. Zimmerman et Coudron ont démontré que la partie active de cette hormone était constituée par l'acide 12-oxo-trans-10-dodécénoïque obtenu grâce à l'action d'une hydroperoxyde lyase.

Germination des graines : Beneytout et Coll. (1988) ont démontré que l'activité lipoxygénasique varie au cours de la germination des graines de Lupinus albus.

Défense des plantes contre les éléments pathogènes : il a été démontré chez la pomme de terre (AVDYUSHKO et Coll., 1987) et chez certains fruits d'avocats (MARCUS et Coll., 1988) que les produits des lipoxygénases possédaient des propriétés antifongiques leur permettant de lutter contre l'infection par Phytophthora infestans pour la pomme de terre, et par Colletotrichum gloeosporioides pour les avocats.

Contrôle des activités enzymatiques dans les cellules végétales : selon certains auteurs, la lipoxygénase contrôlerait certaines étapes du cycle de Calvin et de la glycolyse et agirait sur les chaînes respiratoires mitochondriales par l'oxydation de l'ubiquinone par les hydroperoxy-acides (RUSTIN, 1983).

IV—LES LIPOXYGENASES ANIMALES :

Ce n'est qu'en 1974 qu'a été mise en évidence la première lipoxygénase animale dans les plaquettes humaines (HAMBERG et SAMUELSSON, 1974). Puis en 1975 dans les plaquettes de bovins (NUGTEREN, 1975). Avant, comme le décrivait Tappel en 1966, on croyait qu'il n'y avait pas de lipoxygénases dans les tissus animaux. Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés et ont permis de prouver la large distribution des lipoxygénases dans la majorité des cellules du règne animal.

A-SUBSTRATS DES LIPOXYGENASES ANIMALES :

On retrouve bien évidemment les substrats décrits pour les lipoxygénases végétales. Mais au niveau de la cellule animale,

c'est l'acide arachidonique qui constitue le substrat essentiel des lipoxygénases.

La concentration intra-cellulaire en acide arachidonique étant très faible, il y aura libération de celui-ci à partir des phospholipides membranaires. En effet, cet acide gras est un constituant habituel des phospholipides membranaires. Cette libération d'acide arachidonique se fait grâce à une phospholipase. La phospholipase la plus souvent mise en jeu est la phospholipase A₂ (PLA₂) (NEEDLEMAN, 1978). Mais il y a possibilité de remplacement par la phospholipase C (PLC) (MAJERUS et Coll., 1980).

Le signal qui provoque la libération d'acide arachidonique dans la cellule n'est pas totalement élucidé. Cependant, il semblerait qu'il existe une variété de récepteurs situés sur la membrane cellulaire et couplés à une série de seconds messagers par l'intermédiaire de protéines G et d'enzymes cellulaires. La stimulation de ces récepteurs entraînerait la mobilisation du calcium et l'activation des phospholipases (DENNIS, 1989). Les phospholipases sont inhibées par les AIS (BLACKWELL, 1980).

Ainsi libéré, l'acide arachidonique pourra être oxydé par différentes voies (Figure 3). Chez l'homme, il existe deux voies principales :

- Voie des lipoxygénases,
- Voie de la cyclooxygénase : considérée par certains auteurs comme une lipoxygénase atypique (YAMAMOTO, 1991). En effet, la cyclooxygénase catalyse l'incorporation de deux molécules d'oxygène, alors que les lipoxygénases catalysent l'incorporation d'une seule molécule d'oxygène.

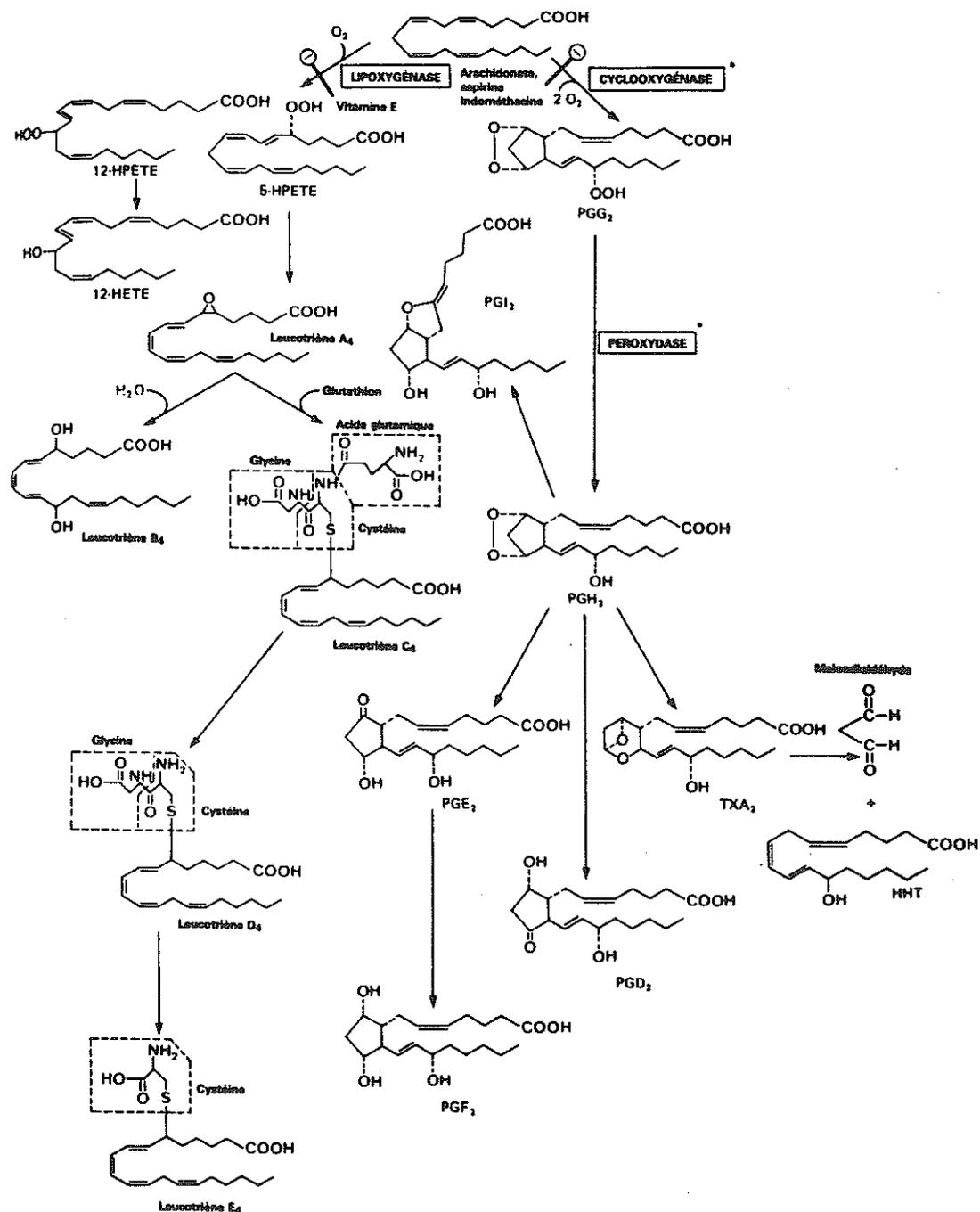


FIGURE 3. Métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase et des lipoxygénases.

PG : prostaglandine ; TX : thromboxane ;
 H(P)ETE : acide hydro (péroxy) éicosatétraénoïque ;
 HHT : acide hydroxyheptadécatriénoïque.

Le point commun essentiel à ces deux voies est qu'elles donnent toutes les deux naissance à des médiateurs de la réaction inflammatoire (BHATTACHERJEE, 1989).

B-VOIE DE LA CYCLOOXYGENASE :

Cette voie conduit à la formation :

- de prostaglandines : PGG₂, PGH₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂
- de thromboxanes : TXA₂
- de prostacyclines.

Les actions biologiques de ces produits sont répertoriées dans le tableau V.

C-VOIE DES LIPOXYGENASES :

Cette voie conduit à la biosynthèse de nombreux composés :

- Acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HETEs) ; ce sont des acides gras monohydroxylés.
- Acides dihydroxyeicosatétraénoïques (di-HETEs) ; ce sont des acides gras dihydroxylés.
- Leucotriènes (LT) (SAMUELSSON, 1983).
- Lipoxines A et B.

Il existe plusieurs types de lipoxygénases en fonction de la position du groupement hydroperoxy dans la molécule obtenue. Les voies les mieux connues, car les plus décrites, sont celles des 5-, 12- et 15- lipoxygénases. Cependant, quelques travaux ont été effectués sur la 8-lipoxygénase (SHIMIZU et Coll., 1985).

C.1-Voie de la 5-lipoxygénase :

La dégradation de l'acide arachidonique par la voie de la 5-lipoxygénase conduit, dans un premier temps, à la formation d'un hydroperoxyde instable : l'acide 5-hydroperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE). Cet hydroperoxyde est aussitôt transformé soit en acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque (5-HETE) grâce à une hydroperoxydase ; soit en leucotriène A₄ (LTA₄) grâce à une leucotriène A₄ synthétase.

Les leucotriènes : (Figure 4) ils constituent une famille de triènes conjugués, formés à partir de l'acide arachidonique dans les leucocytes par la voie des lipoxygénases. D'où leur nom "leuco" (car décrits dans les leucocytes) et "triènes" (car ils contiennent trois doubles liaisons conjuguées).

Il existe différents groupes de leucotriènes qui sont désignés par des lettres : A, B, C, D et E. Ces lettres sont accompagnées d'un chiffre correspondant au nombre de doubles liaisons. Par exemple, le leucotriène A₄ appartient au groupe A et contient 4 doubles liaisons.

Depuis quelques années, ces leucotriènes font l'objet de nombreux travaux [(NAGAI et Coll., 1989) (MALTBY et Coll., 1990)]. Récemment, Czarnetzki et ses collaborateurs ont démontré la présence de leucotriènes dans le venin d'insectes : guêpe et abeille.

Les leucotriènes sont présents dans de nombreuses cellules du corps humain, notamment sur le lieu de leur synthèse : neutrophiles, macrophages, mastocytes (DAYER et Coll., 1988).

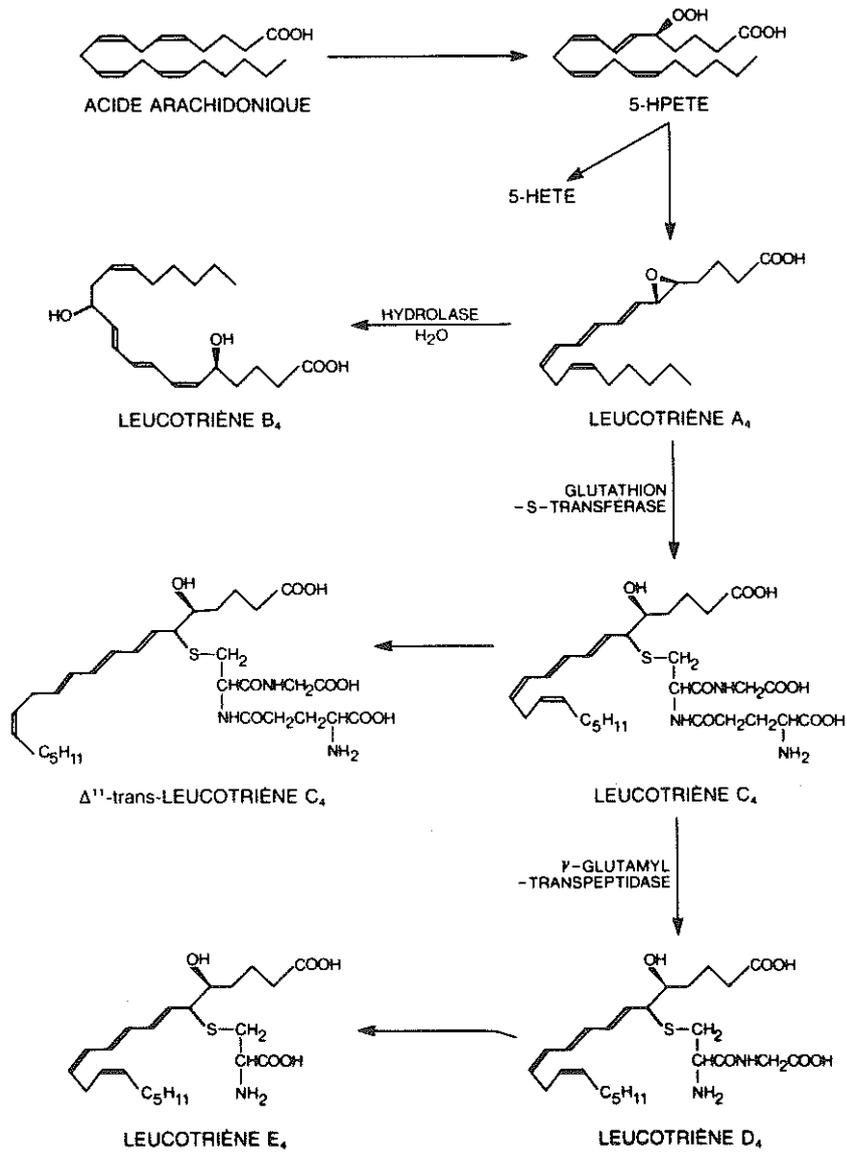


FIGURE 4. Filiation des leucotriènes.

A partir du leucotriène A₄, premier synthétisé de la série des leucotriènes, deux voies sont possibles :

- La première permet, grâce à une leucotriène A₄ hydrolase, la biosynthèse du leucotriène B₄ (RADMARK et Coll., 1984) . Des travaux ont démontré que cette enzyme est détectable dans tous les tissus avec les plus fortes concentrations dans les leucocytes, puis dans les poumons et le foie (JI YI FU et Coll., 1989).
- La seconde conduit à un mélange de trois leucotriènes : LTC₄, LTD₄ et LTE₄, appelé "slow reacting substance of anaphylaxis" (SRS-A) (MURPHY et Coll., 1979). Différentes enzymes participent à cette synthèse, avec en particulier la leucotriène C₄ synthétase qui appartient à la famille des glutathion-S-transférases (SOBERMAN et Coll., 1990).

Tous les leucotriènes sont des agents contracturants et stimulent la libération de prostaglandines et de thromboxanes par le poumon. Ils sont considérés comme des médiateurs de l'inflammation dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) n'inhibent pas la synthèse. Par contre, les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), en s'opposant à la libération d'acide arachidonique dans la cellule, inhibent leur formation (DAYER et Coll., 1988). Chaque leucotriène est à l'origine d'actions pharmacologiques particulières répertoriées dans le tableau V.

Activation de la 5-lipoxygénase : hypothèse proposée par Elliot Sigal. La 5-lipoxygénase existe sous forme libre dans le cytosol. Au niveau de la membrane cellulaire, a été mise en évidence une "5-lipoxygénase activating protéin" (FLAP) avec un site de fixation pour la 5-lipoxygénase (MILLER et Coll., 1990).

TABEAU V. Activités biologiques majeures des produits de la voie des lipoxygénases et de la voie de la cyclooxygénase.

LO : lipoxygénase ; CO : cyclooxygénase ;
 LT : leucotriène ; PG : prostaglandine ;
 HETEs : acides hydroxyeicosatétraénoïques.
 * essentiellement molécules pro-inflammatoires.

Métabolites.	Enzymes intervenants dans la synthèse.	Activités biologiques majeures.
PGD ₂	CO. PGD synthétase	Bronchoconstriction.
PGE ₂	CO. PGE synthétase	Bronchodilatation. Vasodilatation. Augmentation de la sécrétion chlorée.
PGF _{2α}	CO. PGE synthétase	Bronchoconstriction. Vasoconstriction. Augmentation de la sécrétion chlorée.
Thromboxane A ₂	CO. Thromboxane A ₂ synthétase	Bronchoconstriction. Vasoconstriction. Aggrégation plaquettaire.
Prostacycline	CO. PGI synthétase	Vasodilatation. Augmentation de la perméabilité vasculaire. Inhibition de l'aggrégation plaquettaire.
Leucotriène B ₄	5-LO. LTA ₄ hydrolase	Migration, adhésion et activation des leucocytes.
Leucotriènes C ₄ , D ₄ , E ₄ . (SRS-A)	5-LO. LTC synthétase (plus peptidases)	Bronchoconstriction. Vasoconstriction. Augmentation de la perméabilité vasculaire.
HETEs	5-LO. 12-LO. 15-LO	*
Lipoxines	15-LO et 5-LO	*

L'action d'un stimulus provoque simultanément la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires, et la mobilisation du calcium intra-cellulaire. Ce calcium va provoquer la migration de la 5-lipoxygénase à travers le cytosol, et celle-ci vient se fixer sur le site de liaison de la FLAP. La 5-lipoxygénase, sous forme liée, est alors active et peut catalyser la biosynthèse des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique.

Cette "5-lipoxygénase activating protéin" a été mise en évidence et isolée grâce à l'utilisation d'un puissant inhibiteur de la synthèse des leucotriènes : le MK886 (GILLARD et Coll., 1989). En effet, le MK886 possède la propriété de se fixer sur le récepteur de la "FLAP", l'activation de la 5-lipoxygénase devenant ainsi impossible, et la propriété de déplacer la 5-lipoxygénase de son site de liaison (ROUZER et Coll., 1990).

C.2-Voie de la 15-lipoxygénase :

Dans un premier temps, on a synthèse de l'acide 15-hydropéroxyeicosatétraénoïque (15-HPETE) qui est un hydropéroxyde instable. A partir de cet hydropéroxyde, pourront être synthétisés différents composés :

- L'acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) mis en évidence dans les cellules bronchiques humaines (KUMLIN et Coll., 1990).
- Les acides dihydroxyeicosatétraénoïques : 14,15 di-HETE et 8,15 di-HETE.
- Les acides trihydroxyeicosatétraénoïques appelés lipoxines. Ces lipoxines ont été décrites comme étant le principal

produit de la voie des lipoxygénases dans les macrophages des truites arc-en-ciel (PETTITT et Coll., 1989). Les lipoxines sont obtenues grâce à l'action conjuguée de la 15-lipoxygénase et de la 5-lipoxygénase (Figure 5) (SERHAN et Coll., 1986).

De multiples activités biologiques ont été décrites en ce qui concerne les lipoxines et les acides dihydroxyeicosatétraénoïques, mais aucun rôle physiologique précis n'a encore été démontré [(SAMUELSSON et Coll., 1987) (SPECTOR et Coll., 1988)]. Par contre, il a été prouvé que le 15-HETE inhibe la 5-lipoxygénase (VANDERHOEK et Coll., 1980b) et la 12-lipoxygénase (VANDERHOEK et Coll., 1980a).

C.3-Voie de la 12-lipoxygénase :

C'est la première lipoxygénase animale qui a été mise en évidence dans les plaquettes humaines où elle est présente à un taux très élevé (HAMBERG et SAMUELSSON, 1974). Le premier produit obtenu est là encore un hydroperoxyde : le 12-HPETE. Cet acide 12-hydroperoxyeicosatétraénoïque est capable d'activer la synthèse des leucotriènes (MACLOUF et Coll., 1982). La 12-lipoxygénase pourrait intervenir dans la synthèse des lipoxines par un mécanisme de triple oxygénation (UEDA et Coll., 1987).

V-INHIBITEURS DES LIPOXYGENASES :

La mise en évidence d'inhibiteurs des lipoxygénases, qu'elles soient végétales ou animales, fait l'objet de nombreux travaux. Ceux-ci sont réalisés dans le but d'avoir une meilleure compréhension de l'activité des lipoxygénases.

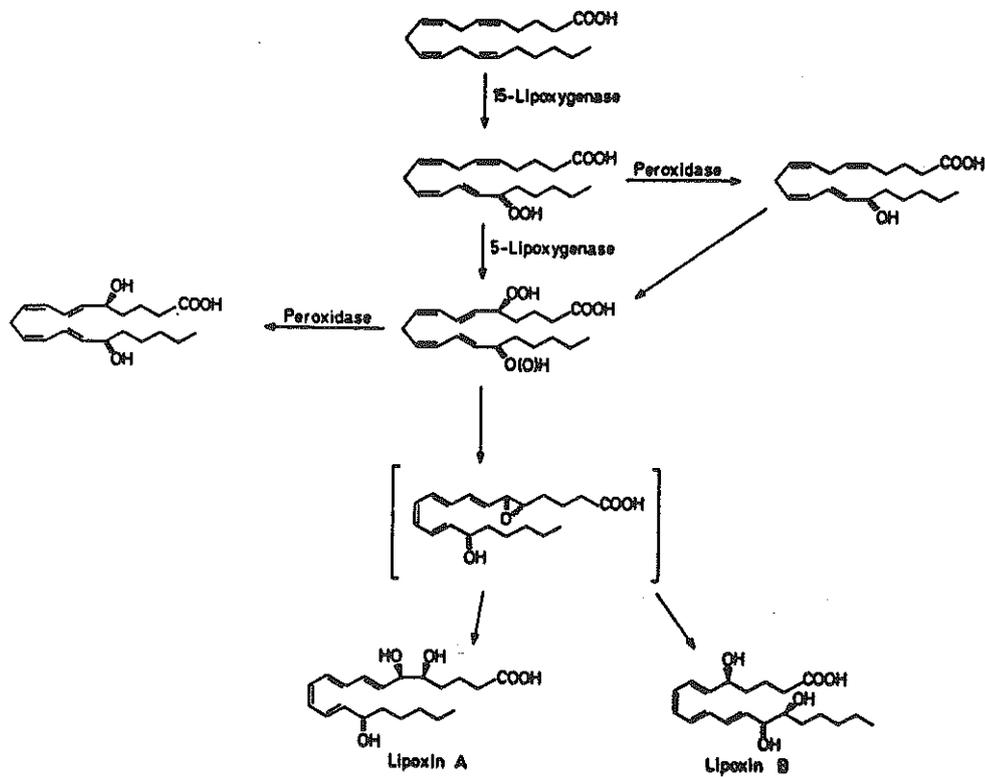


FIGURE 5. Résumé de la formation des lipoxines par l'action combinée de la 15-lipoxygénase et de la 5-lipoxygénase.

Nous noterons qu'il existe une grande ressemblance entre la classification des inhibiteurs des lipoxygénases végétales et celle des inhibiteurs des lipoxygénases animales. De plus, de nombreuses molécules se révèlent comme étant inhibitrices de l'activité lipoxygénasique à la fois dans le règne animal et végétal.

A-INHIBITEURS DES LIPOXYGENASES VEGETALES :

Comme l'a décrit Andrianarison (1991), les inhibiteurs des lipoxygénases végétales peuvent être classés en trois grands groupes :

A.1-Les agents chélateurs :

La lipoxygénase de type 1 de soja peut former des complexes avec des molécules possédant un ou plusieurs noyaux catéchols (SPAAPEN et Coll., 1980). Il s'en suit une inhibition de l'activité lipoxygénasique.

A.2-Les antioxydants :

Ils forment également des complexes avec la lipoxygénase ; et en plus, ils réduisent le fer de l'enzyme de son état ferrique à son état ferreux inactif. C'est le cas par exemple du 2-méthyl-6-(3-hydroxy-4 méthyl phényl)-2-heptène-4-one ou turméroneol A et du 2-méthyl-6-(2-hydroxy-4 méthyl phényl)-2-heptène-4-one ou turméroneol B (IMAI et Coll., 1990). Les polyhydroxyflavones, et en

particulier la quercétine, sont également à classer parmi les antioxydants (TAKAHAMA, 1985).

A.2-Les analogues de substrats :

Certains analogues des acides gras insaturés peuvent inhiber les lipoxygénases végétales. Ainsi, un analogue de l'acide arachidonique : l'acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque (ETYA) peut inhiber la lipoxygénase de soja. Il est qualifié de substrat suicide (KUHN et Coll., 1984).

Il existe d'autres inhibiteurs qui ne peuvent pas être considérés comme appartenant à l'un de ces trois groupes, c'est le cas de l'acide 12-iodo-cis-9-octadécénoïque qui est un inhibiteur irréversible de la lipoxygénase de soja (ROTENBERG et Coll., 1988).

B-INHIBITEURS DES LIPOXYGENASES ANIMALES :

B.1-Les antioxydants :

Dans ce groupe, nous retrouvons les flavonoïdes (WHELER et BERRY, 1986), l'acide curcumique (HUANG et Coll., 1991) et l'acide cafféique (KOSHIHARA et Coll., 1984). Ce ne sont que quelques exemples parmi tant d'autres.

B.2-Les analogues de substrats :

Ce sont surtout des analogues de l'acide arachidonique qui ont été étudiés. Ainsi, l'acide 11,12-déhydroarachidonique et l'acide 5,6-déhydroarachidonique sont des inhibiteurs des lipoxycgénases animales, et plus particulièrement de la 5-lipoxycgénase (COREY et MUNROE, 1982). L'acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque est également un inhibiteur de la 5-lipoxycgénase (KUHN et Coll., 1984).

B.3-Antagonistes compétitifs des récepteurs aux lipoxycgénases :

Le MK886 est un puissant inhibiteur de la synthèse des leucotriènes. En effet, il est capable de se fixer sur le récepteur de la 5-lipoxycgénase au niveau de la "FLAP" et de déplacer celle-ci de son récepteur. Or, la 5-lipoxycgénase n'est active que lorsqu'elle est liée à son récepteur (ROUZER et Coll., 1990).

DEUXIEME PARTIE :

EXPERIMENTATION.

I - MATERIEL :**A-SPECTROPHOTOMETRE :**

PERKIN ELMER LAMBDA 5UV VIS.

Les densités optiques obtenues sont utilisées pour calculer les vitesses initiales des réactions.

B-OXYMETRE :

YSI Model 5300 Biological Oxygen Monitor.

Cet oxymètre utilise une sonde polarographique de CLARK.

C-ENZYME :

Le matériel enzymatique utilisé est représenté par l'isoenzyme 1 de la lipoxygénase de soja.

La lipoxygénase de soja est en effet un mélange de plusieurs isoenzymes mises en évidence par chromatographie liquide haute performance à partir d'extraits non purifiés de soja (RAMADOSS et AXELROD, 1982) :

- la lipoxygénase-1 préparée à partir de graines de soja par gel de filtration et chromatographie d'échange ionique (FINNAZI et Coll., 1973)

- la lipoxygénase-2 préparée à partir de flocons de graines dégraissées (CHRISTOPHER et Coll., 1970)

- la lipoxygénase-3 également décrite (CHRISTOPHER et Coll., 1972).

D-SUBSTRAT :

C'est l'acide linoléique $32 \cdot 10^{-3}$ M qui a servi de substrat au cours des différentes manipulations.

E-TAMPON :

Le ph optimal de la lipoxygénase 1 de soja se situant aux environs de 9, nous avons utilisé le tampon Borate/Acide borique à ph=9,2.

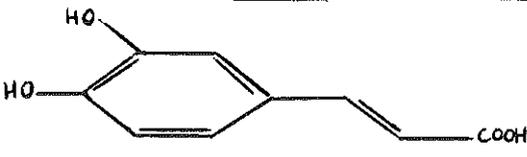
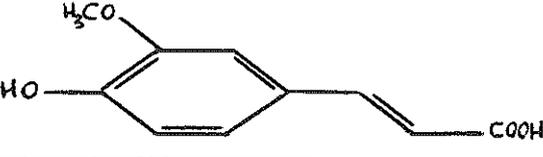
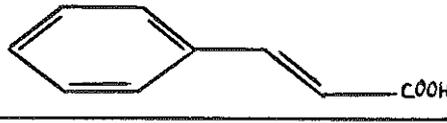
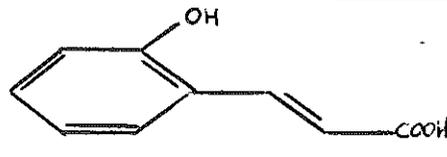
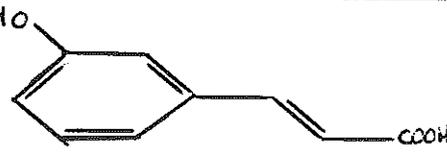
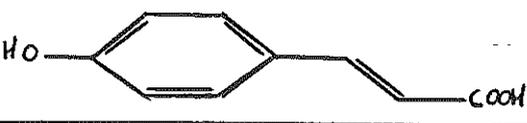
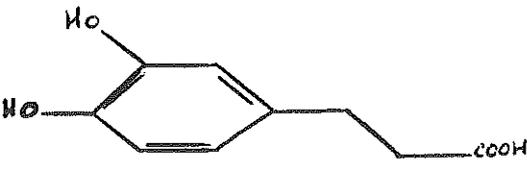
F-EFFECTEURS :

Toutes les molécules qui ont été testées au cours des manipulations sont répertoriées dans le tableau VI.

II - METHODES :**A-TRAVAUX PRELIMINAIRES :**

- Préparation d'une solution d'acide linoléique 10^{-3} M par dilution dans l'éthanol de la solution $32 \cdot 10^{-3}$ M.
- Préparation d'une solution de lipoxygénase de soja à 1 mg/ml. La dissolution est effectuée dans l'eau distillée.
- Préparation pour chaque effecteur d'une gamme de dilution allant de 10^{-2} M à 10^{-5} M. La dissolution est réalisée dans un mélange eau-éthanol (50:50 ; V/V).

TABLEAU VI. Molécules dont l'activité sur la lipoxygénase de soja a été testée au cours des manipulations.

Effecteurs.	P.M.	Formule chimique brute.	Formule chimique développée.
Acide cafféique	180,16	$C_9H_8O_4$	
Acide ferrulique	194,19	$C_{10}H_8O_4$	
Acide cinnamique	148,16	$C_9H_8O_2$	
Acide 2-hydroxy cinnamique	164,16	$C_9H_8O_3$	
Acide 3-hydroxy cinnamique	164,16	$C_9H_8O_3$	
Acide 4-hydroxy cinnamique	164,16	$C_9H_8O_3$	
Acide 3,4-dihydroxy hydrocinnamique	182,18	$C_9H_{10}O_4$	

- Détermination de la longueur d'onde pour laquelle l'activité enzymatique est observée. Ici nous avons travaillé à 233 nm, absorption maximale des deux doubles liaisons conjuguées des hydroperoxydes d'acides gras.

B-CONDITIONS OPERATOIRES :

Les solutions d'effecteurs sont conservées au congélateur et la solution de lipoxygénase de soja au réfrigérateur.

Les manipulations s'effectuent dans la glace et à ph 9.

C-METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE :

L'activité lipoxygénasique est déterminée en mesurant la vitesse d'accroissement de la densité optique à 233 nm qui est enregistrée sur un spectrophotomètre UV à double faisceaux. L'activité spécifique est exprimée par le nombre d'unités enzymatiques par milligramme de protéines. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme capable de produire une nmole de produit par unité de temps (minute). La concentration en protéines est déterminée par la méthode de LOWRY et Coll. (1951) utilisant le sérum d'albumine bovine comme standard.

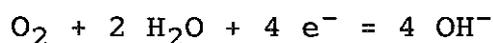
Les densités optiques initiales, obtenues pour chaque réaction enzymatique, sont traitées par une calculatrice afin d'obtenir les vitesses initiales. Celles-ci, en présence d'un effecteur, sont ensuite comparées à un témoin (activité lipoxygénasique sans effecteur) pour en déduire une éventuelle action sur l'activité enzymatique.

D-METHODE POLAROGRAPHIQUE :

L'activité lipoxygénasique en présence de certains effecteurs a été mesurée à l'aide d'un oxymètre.

L'oxymètre utilise une sonde polarographique de CLARK immergée dans une chambre constamment agitée. Cette sonde mesure la consommation d'oxygène pendant la durée de la réaction enzymatique. L'électrode à oxygène de CLARK est constituée d'une très fine membrane placée à l'extrémité de la sonde pour séparer celle-ci du milieu réactionnel. Cette membrane est perméable aux molécules gazeuses qui peuvent alors être mises en contact avec la surface de l'électrode. Lorsqu'une différence de potentiel appropriée est appliquée à l'électrode, les molécules d'oxygène réagissant avec l'électrode permettent le passage du courant. L'intensité du courant est alors proportionnelle à la quantité d'oxygène qui traverse la membrane. L'électrode à oxygène utilisée est constituée d'une cathode en platine et d'une anode en argent.

La consommation d'oxygène au niveau de la cathode se traduit par la réaction suivante :



III - RESULTATS :

A-METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE :

Avant l'étude de chaque effecteur, trois réactions enzymatiques témoins ont été réalisées en utilisant la lipoxygénase de soja, l'acide linoléique dissout dans l'éthanol et en rajoutant au milieu d'incubation une quantité eau-éthanol égale

à celle utilisée pour introduire l'effecteur dans le milieu réactionnel.

En effet, nous verrons plus loin l'importance d'une concentration trop élevée d'éthanol dans le milieu réactionnel.

Chaque concentration en effecteur a été testée trois fois et les tableaux suivants représentent la moyenne des vitesses obtenues lors des trois essais successifs pour le témoin et pour chaque dilution d'effecteurs (Les concentrations indiquées sont les concentrations de l'effecteur dans la cuve de mesure).

Les vitesses initiales sont exprimées en nmoles de produit apparu par minute et par milligramme de protéine enzymatique.

Acide cinnamique à différentes concentrations	Vitesse initiale en nmole/min/mg d'enzyme
Témoin (sans acide cinnamique)	0,074
$2 \cdot 10^{-4}$ M	0,0360
$2 \cdot 10^{-5}$ M	0,0415
$2 \cdot 10^{-6}$ M	0,0430
$2 \cdot 10^{-7}$ M	0,0515

Acide cafféique à différentes concentrations	Vitesse initiale en nmole/min/mg d'enzyme
Témoin (sans acide cafféique)	0,0185
$2 \cdot 10^{-4}$ M	0,0117
$2 \cdot 10^{-5}$ M	0,01385
$2 \cdot 10^{-6}$ M	0,0165
$2 \cdot 10^{-7}$ M	0,0166
$3 \cdot 10^{-5}$ M	0,0180

Lorsque l'acide cafféique est testé à des concentrations plus élevées, on n'observe plus d'inhibition mais une activité

enzymatique normale. Les résultats obtenus nous permettent donc seulement d'affirmer que l'acide cafféique est faiblement inhibiteur ; mais il ne nous est pas possible de déterminer l'IC 50.

Il semblerait qu'à forte concentration, l'acide cafféique ait un comportement semblable à celui de l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique qui n'est pas inhibiteur (Résultats cités dans le tableau suivant). L'acide cafféique diffère seulement de l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique par la présence d'une double liaison sur la chaîne latérale.

Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique à différentes concentrations	Vitesse initiale en nmole/min/mg d'enzyme
Témoin (sans l'acide)	0,0185
10^{-4} M	0,014
10^{-5} M	0,018
10^{-6} M	0,019
10^{-7} M	0,023

Acide 4-hydroxy cinnamique à différentes concentrations	Vitesse initiale en nmole/min/mg d'enzyme
Témoin (sans l'acide)	0,0185
$3 \cdot 10^{-4}$ M	0,003
$3 \cdot 10^{-5}$ M	0,01225
$3 \cdot 10^{-6}$ M	0,0145
$3 \cdot 10^{-7}$ M	0,0165

Acide 3-hydroxy cinnamique à différentes concentrations	Vitesse initiale en nmole/min/mg d'enzyme
Témoin (sans l'acide)	0,0185
2.10^{-4} M	0,0045
2.10^{-5} M	0,0113
2.10^{-6} M	0,016
2.10^{-7} M	0,016

Acide 2-hydroxy cinnamique à différentes concentrations	Vitesse initiale en nmole/min/mg d'enzyme
Témoin (sans l'acide)	0,0185
2.10^{-4} M	0,0035
2.10^{-5} M	0,0165
2.10^{-6} M	0,0175
2.10^{-7} M	0,019

Pour l'effet de l'acide ferrulique sur la réaction enzymatique, les résultats ne sont plus exprimés en vitesse initiale, mais en quantité d'hydroperoxyde formé. En effet, en présence de cet effecteur, la vitesse initiale de la réaction est supérieure à celle du témoin mais ensuite, cette vitesse diminue, devient inférieure à celle de la réaction témoin et l'on observe un effet inhibiteur de ce composé qui se traduit par une diminution de la quantité de produit formé.

Le tableau suivant montre les densités optiques obtenues en fin de réaction en présence de concentrations variables d'acide ferrulique (Concentration dans la cuve).

Nombre de cycles	DO du témoin	Acide ferrulique à différentes concentrations			
		$2 \cdot 10^{-4}$ M	$2 \cdot 10^{-5}$ M	$2 \cdot 10^{-6}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M
14	0,403	0,064	0,0261	0,370	0,408
15	0,424	0,067	0,265	0,379	0,418
16	0,444	0,068	0,267	0,387	0,427
17	0,464	0,069	0,271	0,394	0,434
18	0,483	0,071	0,273	0,400	0,441
19	0,500	0,074	0,275	0,405	0,447
20	0,500	0,075	0,277	0,410	0,451
30	0,503	0,076	0,291	0,432	0,479

1 cycle = 0,05 s.

Les densités optiques (DO) sont exprimées en nm.

Grâce à ces résultats, les pourcentages d'inhibition de l'activité de la lipoxigénase de soja en présence des différents effecteurs ont pu être calculés, et sont répertoriés dans le tableau VII. A partir de ceux-ci, nous avons fait une détermination graphique (Papier semi-logarithmique) de l'IC 50 pour chaque effecteur (Figures 6, 6' et 6''). L'IC 50 étant la concentration en effecteur pour laquelle on a 50% d'inhibition de l'activité enzymatique.

B-METHODE POLAROGRAPHIQUE :

Cette technique mesure la consommation d'oxygène pendant la durée de la réaction enzymatique. Dans le tableau ci-dessous, les vitesses sont exprimées en microlitres d'oxygène fixé sur l'acide gras par seconde.

Effecteurs	Vitesse en $\mu\text{l d'O}_2/\text{s}$
Témoin (sans effecteur)	0,9542
Acide cafféique	0,8617
Acide 2-hydroxy cinnamique	0,8680
Acide 3-hydroxy cinnamique	0,8171
Acide 4-hydroxy cinnamique	0,6673
Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique	0,9314
Acide ferrulique	0,8942

TABLEAU VII. Pourcentages d'inhibition de l'activité de la lipoxigénase de soja en présence de différentes concentrations d'effecteurs.
(Méthode spectrophotométrique).

Effecteurs.	Concentrations.	Pourcentages d'inhibition.
Acide 2-hydroxy cinnamique	$2 \cdot 10^{-4}$ M	81%
	$2 \cdot 10^{-5}$ M	11%
	$2 \cdot 10^{-6}$ M	6%
Acide 3-hydroxy cinnamique	$2 \cdot 10^{-4}$ M	81%
	$2 \cdot 10^{-5}$ M	39%
	$2 \cdot 10^{-6}$ M	14%
	$2 \cdot 10^{-7}$ M	13%
Acide 4-hydroxy cinnamique	$3 \cdot 10^{-4}$ M	84%
	$3 \cdot 10^{-5}$ M	34%
	$3 \cdot 10^{-6}$ M	27%
	$3 \cdot 10^{-7}$ M	11%
Acide cinnamique	$2 \cdot 10^{-4}$ M	51%
	$2 \cdot 10^{-5}$ M	44%
	$2 \cdot 10^{-6}$ M	42%
	$2 \cdot 10^{-7}$ M	30%
Acide cafféique	$2 \cdot 10^{-4}$ M	37%
	$2 \cdot 10^{-5}$ M	25%
	$2 \cdot 10^{-6}$ M	16%
	$2 \cdot 10^{-7}$ M	10%
	$3 \cdot 10^{-5}$ M	2%
Acide ferrulique	$2 \cdot 10^{-4}$ M	84%
	$2 \cdot 10^{-5}$ M	42%
	$2 \cdot 10^{-6}$ M	14%
	$2 \cdot 10^{-7}$ M	4%
Acide 3,4-dihydroxy hydrocinnamique	/	#0%

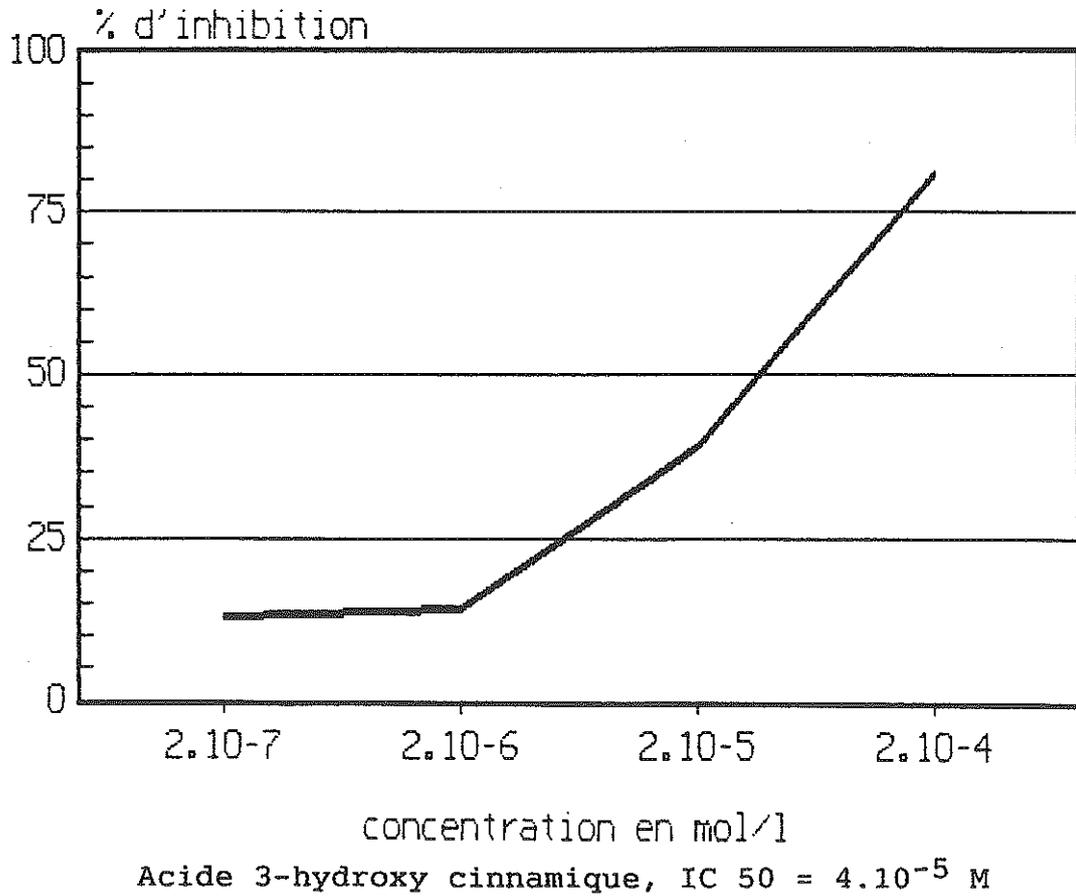
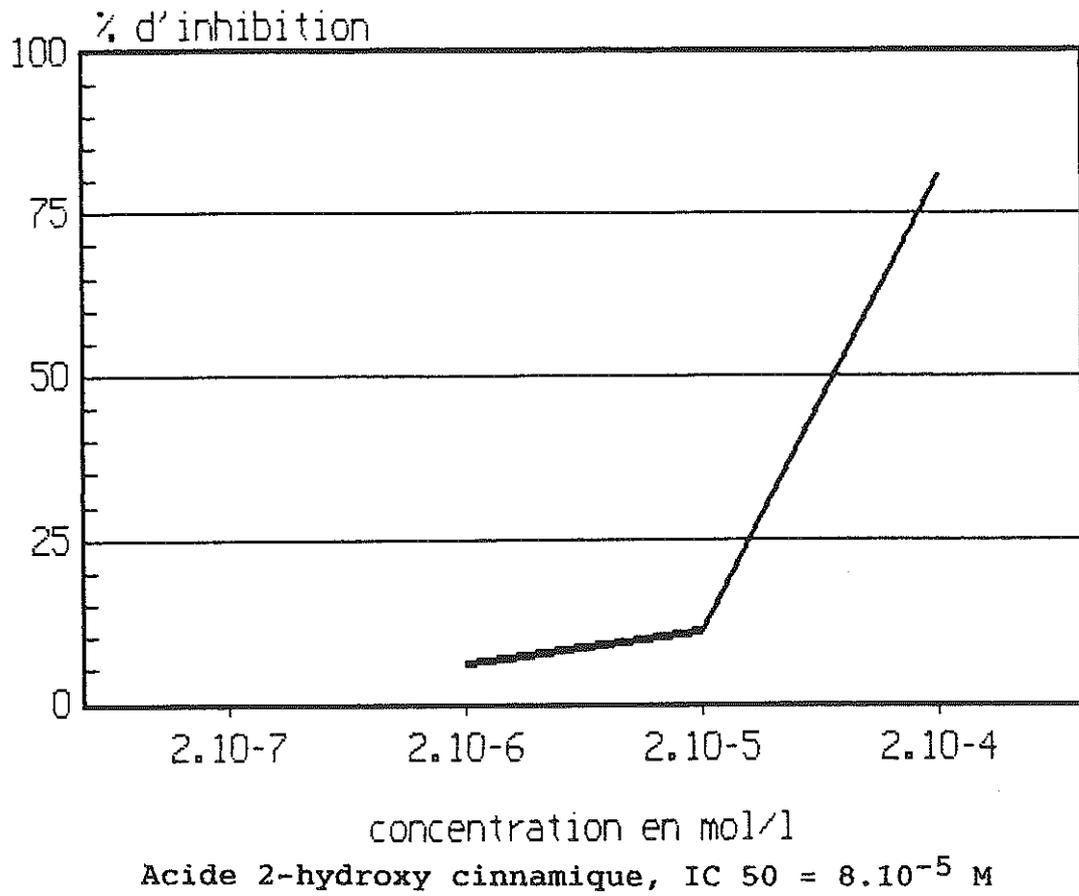


FIGURE 6. Détermination graphique des IC 50.

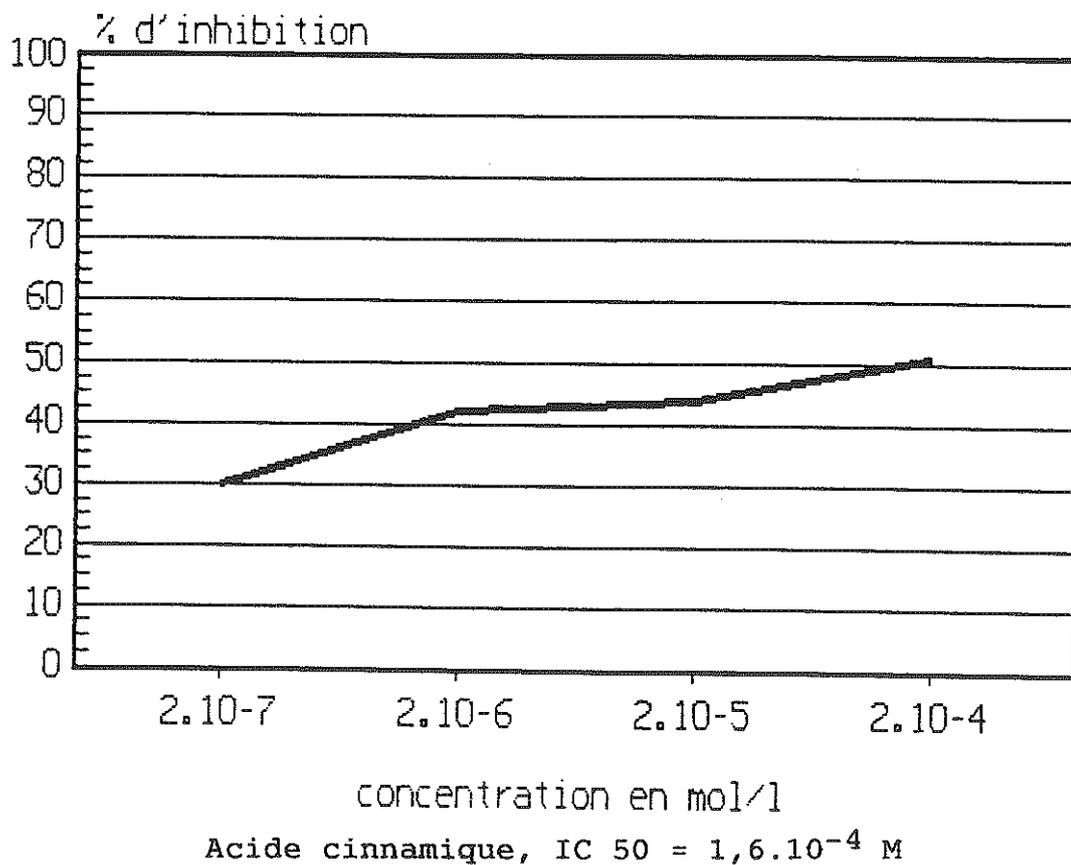
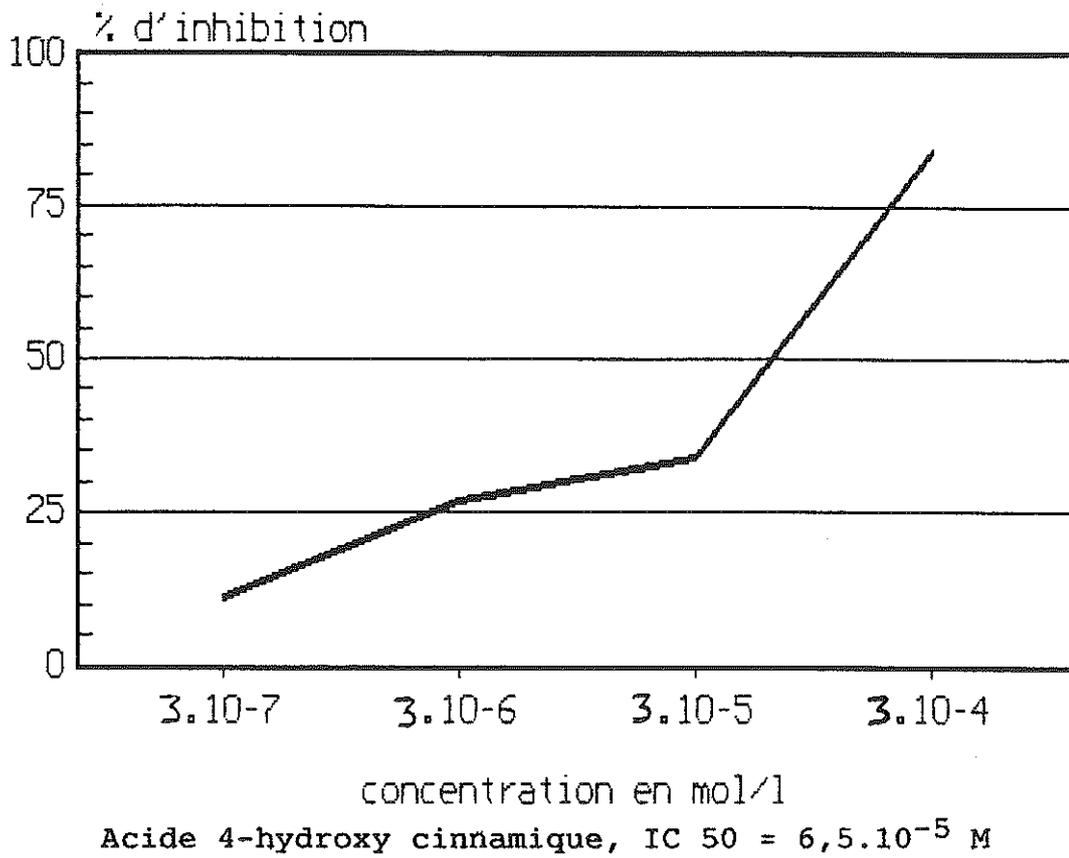


FIGURE 6'. Détermination graphique des IC 50.

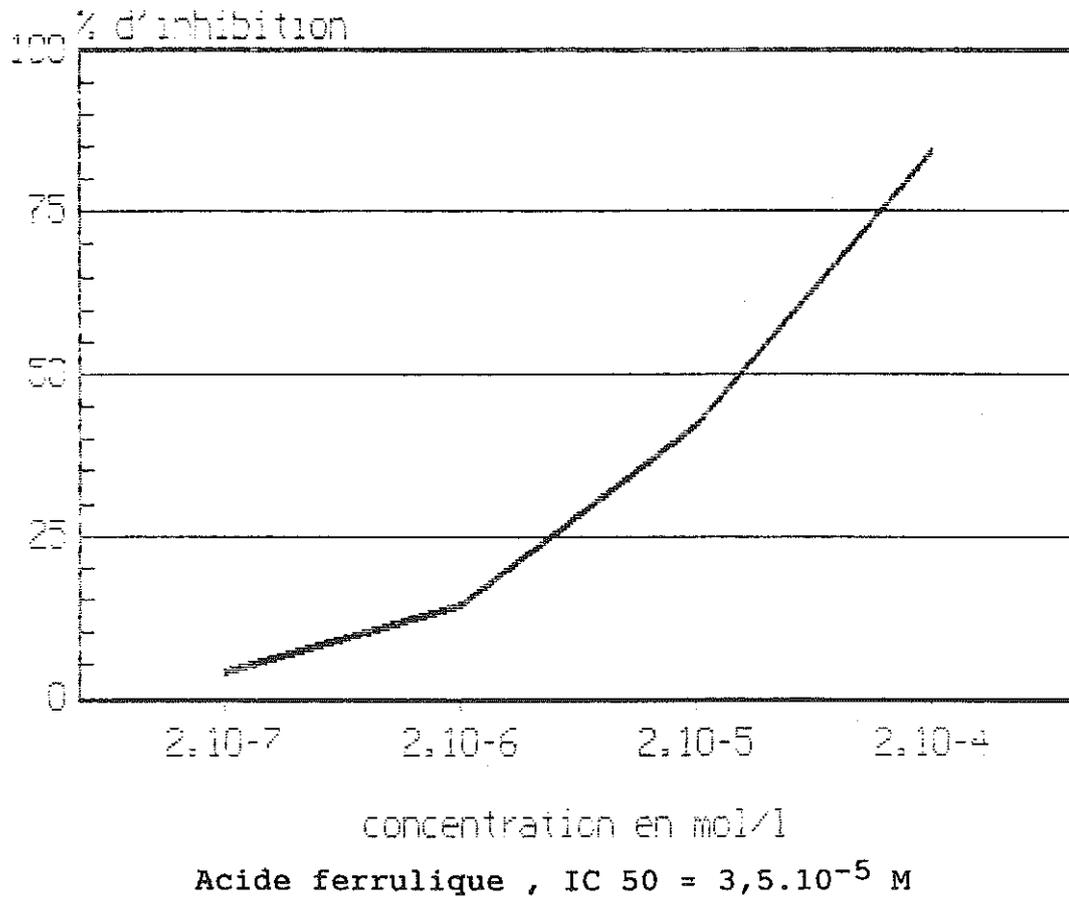


FIGURE 6''. Détermination graphique des IC 50.

TROISIEME PARTIE :

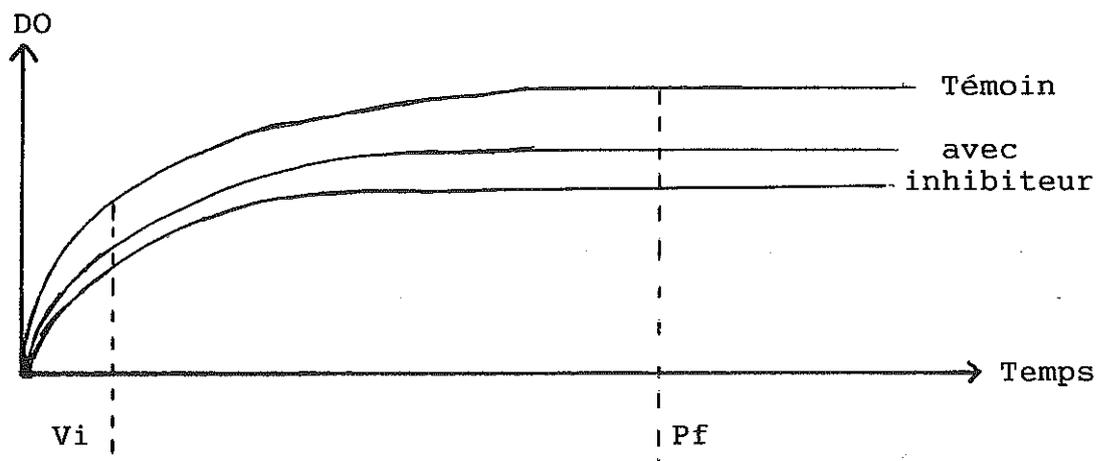
DISCUSSION.

I - INTERPRETATION DES RESULTATS :

A-PROBLEMES RENCONTRES AU COURS DES MANIPULATIONS :

A.1-Vitesse initiale et produit final :

Les courbes obtenues par la méthode spectrophotométrique, densité optique en fonction du temps, représentent la quantité d'hydroperoxyde qui se forme au cours de la réaction enzymatique. En effet, la variation de densité optique est proportionnelle à la quantité d'hydroperoxyde formé.



Allure générale des courbes obtenues à l'écran du spectrophotomètre.

DO : densité optique

V_i : vitesse initiale

P_f : produit formé

La méthode utilisée au cours de ces travaux consiste à calculer les vitesses initiales à partir des premières valeurs de densités optiques. Il est donc indispensable de vérifier qu'en fin de réaction, la quantité totale de produit formé en présence d'un

inhibiteur est inférieure à la quantité de produit formé dans les conditions normales (témoin).

Lors des tests réalisés sur l'acide ferrulique, les vitesses initiales ne correspondaient pas aux concentrations finales d'hydroperoxydes alors que la méthode polarographique nous révèle son pouvoir inhibiteur de l'activité lipoxygénasique. En fait, la quantité de produit formé en présence d'acide ferrulique est inférieure au témoin.

A.2-Interaction de l'éthanol :

Les molécules testées étant insolubles dans l'eau, leur solubilisation a due être réalisée dans un mélange eau/éthanol (V/V : 50/50). De plus, l'acide linoléique est également en solution alcoolique. Or l'éthanol, lorsqu'il est présent en grande quantité, est susceptible d'inhiber la réaction enzymatique. Pour éviter cette réaction d'inhibition, la concentration d'éthanol dans la cuve de mesure doit être inférieure à 1%.

B-RELATION STRUCTURE-ACTIVITE :

B.1-Rôle de l'insaturation :

Les deux méthodes, spectrophotométrique et polarographique, sont concordantes pour affirmer qu'en présence de l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique, l'activité lipoxygénasique est quasiment inchangée. Par contre, en présence des autres effecteurs, on a une inhibition, plus ou moins importante, de l'activité enzymatique.

Il en ressort donc que la double liaison est indispensable à l'activité inhibitrice.

B.2-Rôle des substituants sur le noyau benzénique :

Selon la méthode spectrophotométrique, il apparaît que l'acide cinnamique est meilleur inhibiteur que l'acide cafféique. On pourrait donc penser que les deux substituants hydroxy situés sur le noyau aromatique diminuent le pouvoir inhibiteur. Mais, comparé aux acides 2-hydroxy, 3-hydroxy et 4-hydroxy cinnamique, l'acide cinnamique apparaît comme étant un moins bon inhibiteur (Comparaison des IC 50).

Acide cinnamique : IC 50 = $1,6 \cdot 10^{-4}$ M

Acide 2-hydroxycinnamique : IC 50 = $8 \cdot 10^{-5}$ M

Acide 3-hydroxycinnamique : IC 50 = $4 \cdot 10^{-5}$ M

Acide 4-hydroxycinnamique : IC 50 = $6,5 \cdot 10^{-5}$ M

D'autre part, si on compare les résultats obtenus par la méthode polarographique, le pouvoir inhibiteur de l'acide cafféique est voisin de celui des trois acides cinnamiques hydroxylés. On peut donc penser que la présence de groupements hydroxy sur le noyau benzénique augmente le pouvoir inhibiteur de la molécule.

B.3-Nombre de substituants :

Selon les résultats obtenus par la méthode polarographique, l'acide ferrulique apparaît comme étant moins bon inhibiteur que les trois acides cinnamiques hydroxylés. L'acide cafféique se révèle comme étant un meilleur inhibiteur que l'acide 2-hydroxy cinnamique, et un moins bon inhibiteur que les acides 3-hydroxy et 4-hydroxy cinnamique.

Il semblerait donc que le nombre de substituants sur le noyau benzénique ait peu d'importance quant au pouvoir inhibiteur des molécules testées.

B.4-Nature des substituants :

L'acide cafféique, par la méthode polarographique, se présente comme un inhibiteur plus puissant que l'acide ferrulique. La seule différence entre ces deux acides est le remplacement d'un groupement hydroxy chez l'acide cafféique par un groupement méthoxy chez l'acide ferrulique. Un substituant hydroxy assurerait donc un pouvoir inhibiteur plus important qu'un substituant méthoxy. Peut être y-a-t'il une notion d'encombrement stérique qui gênerait l'inhibition ?

Cependant, par la méthode spectrophotométrique, l'acide ferrulique nous apparaît comme étant le meilleur inhibiteur. Mais il convient de préciser que la détermination de l'IC 50 de l'acide ferrulique ne s'est pas faite de la même façon que pour les autres produits. En effet, pour l'acide ferrulique, les pourcentages d'inhibition et l'IC 50 ont été calculés à partir des densités optiques obtenues en fin de réaction alors que pour les autres

molécules ils ont été déterminés à partir des vitesses initiales des réactions enzymatiques.

B.5-Position des groupements hydroxy sur le noyau benzénique :

Selon la méthode polarographique, on constate que le pouvoir inhibiteur des molécules augmente lorsque le groupement hydroxy passe de la position ortho à la position méta puis à la position para. Si on compare les IC 50, l'acide 2-hydroxy cinnamique apparaît toujours comme étant le plus faible inhibiteur des trois acides cinnamiques hydroxylés. Par contre, l'acide 3-hydroxy cinnamique serait meilleur inhibiteur que l'acide 4-hydroxy cinnamique.

On peut penser que la présence d'un substituant en position ortho, c'est à dire proche de la double liaison, gêne l'action inhibitrice. D'autant plus que par la méthode polarographique, l'acide cafféique s'avère être également un meilleur inhibiteur que l'acide 2-hydroxy cinnamique.

En résumé, de tous ces résultats, il ressort que l'insaturation est indispensable au pouvoir inhibiteur et que ce pouvoir inhibiteur est augmenté par la présence de groupements hydroxy sur le noyau aromatique, en position méta ou para, et qu'il est diminué par la présence d'un groupement hydroxy en position ortho ou d'un groupement méthoxy sur le noyau benzénique.

C-COMPARAISON AVEC D'AUTRES ETUDES :

D'après une étude faite par KOSHIHARA et ses collaborateurs (1984) sur le pouvoir inhibiteur de l'acide cafféique sur des lipoxygénases animales, on remarque que la présence d'un groupement méthoxy sur le noyau benzénique diminue le pouvoir inhibiteur ; ainsi que nous l'avons démontré dans notre étude à partir de l'acide ferrulique grâce à la méthode polarographique. Nous pouvons également constater que l'acide p-méthyl cafféique méthyl ester (possédant un groupement hydroxy en méta) est un inhibiteur moins puissant que l'acide m-méthyl cafféique méthyl ester (possédant un groupement hydroxy en para). Cette constatation va dans le sens des résultats obtenus à partir des acides 3-hydroxy cinnamique et 4-hydroxy cinnamique par la méthode polarographique. Enfin, les auteurs de cette publication signalent que l'ester de l'acide cafféique est un meilleur inhibiteur que l'acide cafféique. Ce résultat pourrait nous amener à suggérer que l'ester de l'acide cinnamique aurait un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de l'acide lui-même (Tableau VIII et figure 7).

D'autres molécules ayant une structure voisine de celle de l'acide cinnamique ont été étudiées. C'est le cas de l'acide rosmarinique, de l'acide cafféoylmalique et de l'acide cafféoyltartarique (KIMURA et OKUDA, 1987). Le pouvoir inhibiteur de ces trois acides a été évalué sur des lipoxygénases animales, et plus particulièrement sur la 5-lipoxygénase. Le degré d'inhibition est dans l'ordre décroissant : acide rosmarinique, acide cafféique, acide cafféoyltartarique, acide cafféoylmalique. Cette étude suggère, comme nous l'avons démontré grâce à nos

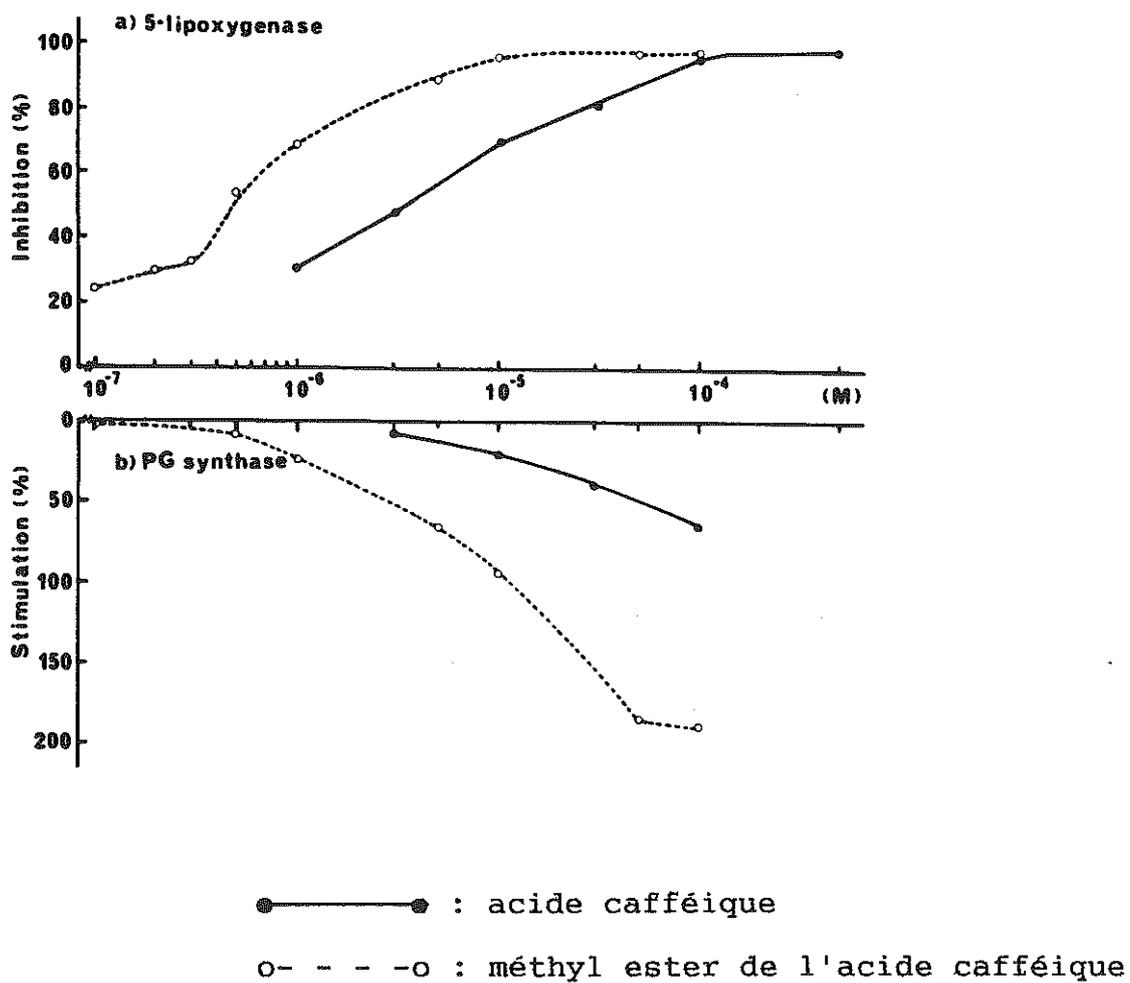


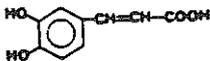
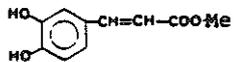
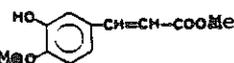
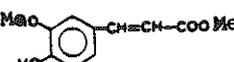
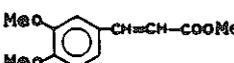
FIGURE 7. Effets de l'acide cafféique et de ses esters méthylés sur l'activité de la 5-lipoxygénase et de la prostaglandine synthétase.

D'après Koshihara et Coll. (1984).

TABLEAU VIII. Inhibition de la 5-lipoxygénase par l'acide
cafféique et ses dérivés.

Ces valeurs sont citées à partir de la figure 7.

D'après Koshihara et Coll. (1984).

Addition	Structure	Concentration (μM)	Enzyme activity (%)
None		--	100
Caffeic acid		3 100	52 4
Caffeic acid methyl ester		3 100	19 4
p-Methyl caffeic acid methyl ester		3 100	121 79
m-methyl caffeic acid methyl ester		3 100	100 7
trimethyl caffeic acid		3 100	102 78

résultats, que la présence de groupements hydroxy sur le noyau benzénique et d'une double liaison sont essentiels pour l'inhibition de l'activité lipoxygénasique.

Une autre étude démontre le pouvoir inhibiteur très puissant de l'acide curcumique sur l'activité lipoxygénasique de cellules épidermiques de souris (HUANG et Coll., 1991). Cela souligne la possibilité que les groupements hydroxy et la double liaison soient responsables du haut pouvoir inhibiteur de cet acide. D'autant plus que cette molécule présentant une symétrie assez parfaite, on les retrouve en double.

Donc les hypothèses émises sur la relation structure-activité, à partir de nos résultats, semblent être confirmées par les études faites sur des molécules ayant une structure chimique voisine de celles que nous avons testées. De plus, il semblerait que les esters aient un pouvoir inhibiteur plus important que les acides eux-même. De toute façon, la présence d'un substituant sur l'extrémité carboxyle ne semble pas gêner le pouvoir inhibiteur de la molécule.

L'insaturation et les groupements hydroxy sur le noyau benzénique constitueraient donc la "structure de base" d'une molécule inhibitrice de l'activité lipoxygénasique.

II-EXTRAPOLATION DE NOTRE ETUDE :

Les résultats que nous avons obtenus au cours de nos manipulations, ainsi que les études faites sur des molécules ayant une structure chimique voisine de l'acide cinnamique, nous

permettent d'étendre nos travaux aux esters cinnamiques utilisés dans l'industrie pharmaceutique et plus particulièrement en cosmétologie. Ils sont en effet employés en tant que filtres solaires.

Etant donné le coût très élevé du matériel animal et la difficulté de purification des lipoxygénases animales, les travaux ont été réalisés sur la lipoxygénase-1 de soja que l'on obtient sous forme lyophilisée (Sigma).

Les lipoxygénases constituent une "famille enzymatique". En effet, chaque lipoxygénase animale présente une séquence très proche de celle des lipoxygénases végétales (SIGAL, 1991). De ce fait, elles sont très largement employées, en particulier la lipoxygénase de type 1 de soja, afin d'essayer d'expliquer les mécanismes d'inhibition (ROTENBERG et Coll., 1988).

De plus, notre étude aboutit à des résultats similaires à ceux obtenus à partir d'études réalisées sur des lipoxygénases animales.

III—UTILISATION DES CINNAMATES EN PHARMACIE :

Certains dérivés de l'acide cinnamique sont des produits employés en cosmétologie. On les retrouve dans de nombreuses préparations où ils jouent le rôle de filtres UV ; essentiellement dans les produits de protection solaire, mais également dans les sticks labiaux, les crèmes de jour et même certaines crèmes capillaires.

A-NECESSITE D'UNE PHOTOPROTECTION :

Le soleil produit un immense rayonnement énergétique électromagnétique couvrant l'ensemble du spectre : des rayons gamma, les plus courts, jusqu'aux ondes de radio, les plus longues. Du fait de la filtration atmosphérique, le spectre solaire au sol, ne comporte que les radiations de longueur d'onde comprises entre 290 nm et 3000 nm. C'est à dire, les UV B (290-320 nm), les UV A (320-400 nm), la lumière visible (400-780 nm) et une part de l'infra rouge (780-3000 nm) (Figure 8).

La qualité de ce rayonnement varie selon l'altitude, la latitude, la saison, l'heure de la journée, l'humidité et la pollution atmosphérique (AMBLARD et BEANI, 1986).

Ces radiations pénètrent plus ou moins profondément dans la peau en fonction de la longueur d'onde (JEANMOUGUIN, 1988), et l'action de ces radiations solaires sur notre peau peut être aussi bien bénéfique que néfaste (Figure 9).

D'une façon générale, les effets bénéfiques sont représentés par les phénomènes précoces qui sont : une action calorique, une action anti-rachitique par synthèse de vitamine D (MIRAVET et GLIME, 1980), une action anti-dépressive (WETTE-BERG et Coll., 1984) et une pigmentation immédiate encore appelée phénomène de Meirovsky. Les effets néfastes sont représentés par les phénomènes à moyen terme ; c'est à dire l'érythème actinique, la pigmentation retardée et l'hyperplasie épidermique ; ainsi que les effets à long terme : la senescence cutanée précoce et la photocarcinogénèse (Figure 10) (AMBLARD et BEANI, 1986).

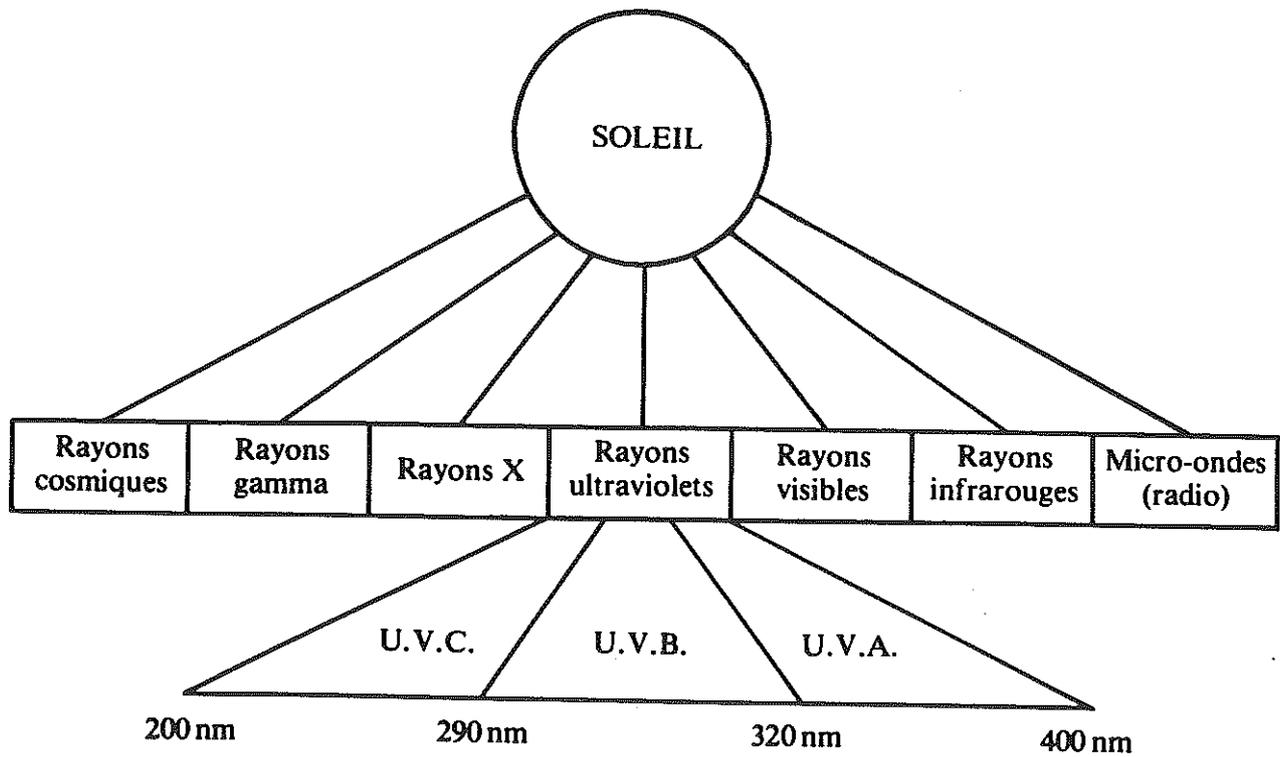


FIGURE 8. Spectre des radiations électromagnétiques du soleil.

D'après Robert et Coll. (1985).

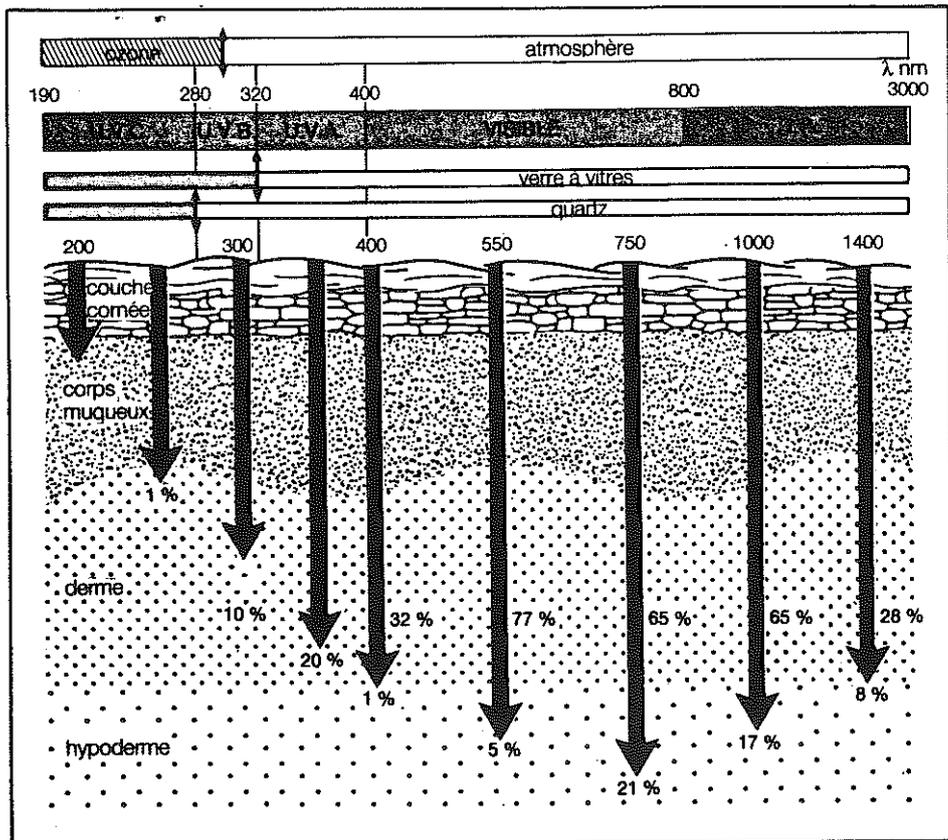


FIGURE 9. Transmission de la lumière à travers la peau normale.

D'après Jeanmouguin (1988).

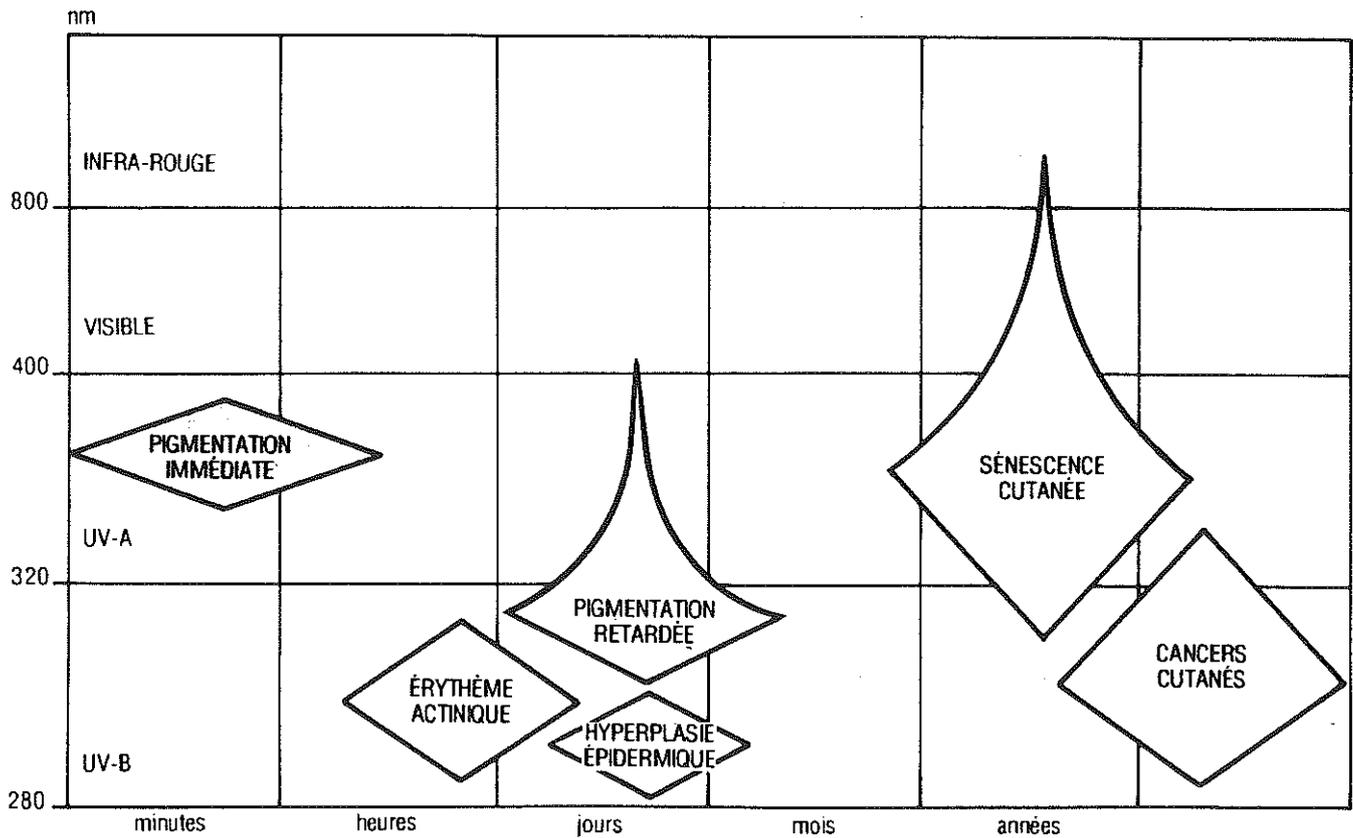


FIGURE 10. Les effets biologiques des radiations solaires sur la peau en fonction du temps et des longueurs d'ondes.

D'après Robert et Coll. (1985).

B-LES DIFFERENTS MOYENS DE PHOTOPROTECTION :

Face à cette agression, la peau de l'homme peut se défendre, du moins pendant un certain temps, par ses propres moyens.

La pigmentation mélanique constitue le principal élément de défense. Mais d'autres phénomènes interviennent : l'épaississement de la couche cornée lors d'exposition répétées aux UV, la sudation et l'importance de la pilosité ; le crâne est ainsi protégé par les cheveux (THOMAS et AMBLARD, 1988). Mais tous les êtres humains ne sont pas égaux face au soleil, d'où la distinction en différents phototypes (Tableau IX).

L'homme a cependant à sa disposition différents moyens d'assurer sa protection face aux radiations solaires : la prise de certains médicaments per os comme les anti-paludéens de synthèse, ou la vitamine PP ; c'est la photoprotection interne (THOMAS et AMBLARD, 1988). La photoprotection externe peut être soit vestimentaire et apparentés, soit assurée grâce au large choix de produits solaires (POELMAN, 1986).

Ces produits de protection contiennent soit des écrans qui sont des substances opaques comme le talc ou l'oxyde de zinc (POELMAN, 1986), soit des filtres solaires qui sont des molécules synthétiques absorbant les rayons UV et dont le point commun est la présence d'un cycle benzénique dans leur structure.

TABLEAU IX. Les différents phototypes.D'après Robert et Coll. (1985).

	Phototypes	Cheveux	Carnation	Éphélides	Potentiel d'érythème	Potentiel de bronzages	Coup de soleil	Degré de sensibilité cutanée
Sujets de type Caucasiens	0	Blancs	Albinos	0	Brûle toujours très facilement	Ne bronze jamais	Constant + + +	Ultra sensible
	I	Roux	Laitéuse	+ + +	Brûle toujours facilement	Ne bronze jamais	Constant + +	Sensible
	II	Blonds	Claire	+ +	Brûle toujours facilement	Bronze très peu hâle léger	Constant +	Sensible
	III A	Blonds	Claire	+	Brûle	Bronze	Fréquent	Sensible
	III B	Châtains	Mate	0	Modérément	Graduellement hâle clair ou foncé		Normale
Sujets de type mongoloïde (Méditerranéens foncés, Asiatiques, Arabes)	IV	Brun clair	Mate	0	Brûle très peu	Bronze toujours bien	Rare	Normale
	V	Brun foncé	Mate	0	Brûle rarement	Bronze abondamment	Exceptionnel	Insensible
Sujets négroïdes	VI	Noirs	Noire	0	Ne brûle jamais	Fortement pigmenté	Jamais	Insensible

Remarque : Le bronzage acquis diminue l'aptitude à l'érythème pour les phototypes II, III et IV.

Il existe deux classes de molécules filtrantes :

- Les filtres à spectre étroit : ils sont sélectifs des UVB et perméables aux UVA. On y retrouve :

- .L'acide para amino benzoïque (PABA) et ses esters,
- .Les dérivés de l'acide cinnamique,
- .Les dérivés de l'acide salicylique,
- .Les dérivés du benzylidène camphre,
- .les benzimidazolés.

- Les filtres à spectre large : ils couvrent à la fois les UVA et les UVB. Ils ont un intérêt dans les photodermatoses et pour retarder la senescence cutanée due au soleil. On y classe :

- .Les dérivés des benzophénones,
- .Les dérivés du dibenzoylméthane.

C-LES CINNAMATES :

Les cinnamates sont donc des filtres à spectre étroit dont leur maximum d'absorption se situe entre 290 nm et 310 nm. Ce sont des esters très largement utilisés dans les produits disponibles sur le marché français, mais également dans d'autres pays tels que l'Allemagne ou les Etats-Unis.

Utilisés seuls, ils ne permettent pas d'atteindre un coefficient de protection élevé car leur stabilité photochimique est médiocre. Pour pallier cette instabilité, les cinnamates seront généralement associés à des filtres à plus large spectre ou à des écrans lorsqu'une protection importante est recherchée (POELMAN, 1986).

Ces substances sont généralement bien tolérées ; cependant, il a été signalé de façon exceptionnelle des cas d'irritation primaire (THOMAS et AMBLARD, 1988), des allergies de contact qui sont propres aux molécules dérivées du benzène, des photosensibilisation de contact et des dermites de contact (THUNE, 1984).

Des études particulières ont été réalisées sur le 2-éthyl hexyl p-méthoxy-cinnamate ou Néo Heliopan AV. Ainsi, le pouvoir mutagène de certains échantillons de ce produit a pu être mis en évidence grâce au test de Ames réalisé sur *Salmonella thyphimurium* (BONIN et Coll., 1982). Ceci a conduit à l'étude du caractère carcinogène de ce produit sur des cellules épidermiques de souris (GALLACHER et Coll., 1984). Le 2-éthyl hexyl p-méthoxy-cinnamate s'est finalement révélé comme pouvant être un initiateur des tumeurs cutanées chez la souris.

D'une façon plus générale, l'utilisation régulière des écrans solaires peut entraîner des carences en vitamine D (SUNSCREENS, 1988). En effet, leur fonction étant de bloquer le passage des UVB, il en résulte un blocage de la synthèse de vitamine D.

Les différents esters cinnamiques utilisés en cosmétologie sont répertoriés dans le tableau X.

IV-CONSEQUENCES EVENTUELLES DE L'UTILISATION AU LONG COURS DE PRODUITS SOLAIRES CONTENANT DES CINNAMATES :

A-RAPPELS SUR L'ABSORPTION CUTANEE : (ROBERT, 1985)

A.1-Structure de la peau :

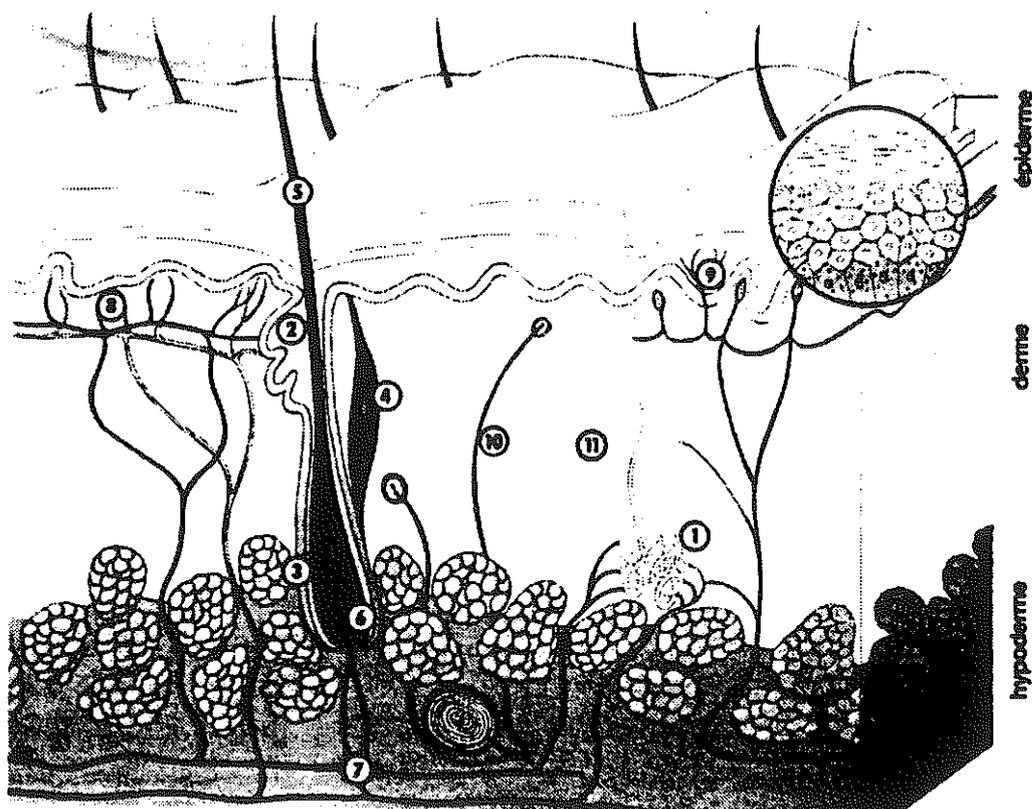
La peau est formée de trois couches distinctes qui sont de l'extérieur vers l'intérieur :

- l'épiderme,
- le derme,
- l'hypoderme (Figure 11).

L'épiderme a essentiellement un rôle de protection. Il comporte lui même cinq couches qui sont de l'extérieur vers l'intérieur :

- Couche cornée ou stratum corneum,
- Couche claire ou transparente ou stratum lucidum (uniquement au niveau de la paume des mains et de la plantes des pieds),
- Couche granuleuse ou stratum granulosum,
- Couche épineuse ou corps muqueux de Malpighi ou stratum spinosum,
- Couche basale ou germinative ou stratum germinativum.

Il comprend quatre types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langerhans.



- | | | |
|------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1: glande sudoripare eccrine | 5: poil | 9: terminaisons nerveuses |
| 2: glande sébacée | 6: papille | sensitives libres |
| 3: follicule pileux | 7: vaisseaux sanguins | 10: corpuscule du tact |
| 4: muscle horripilateur | 8: capillaires | 11: fibres de collagène |

FIGURE 11. Coupe schématique de la peau.

D'après Robert et Coll. (1985).

Le derme est un tissu conjonctif fibro-élastique composé de différentes cellules : les fibrocytes, les histiocytes et les mastocytes ; et d'une matrice intercellulaire. C'est un tissu de soutien et surtout un tissu de nutrition pour l'épiderme.

L'hypoderme, ou tissu sous-cutané, est formé de tissu conjonctif lâche et différencié. Il assure une certaine protection mécanique et joue un rôle essentiel dans la thermorégulation. Il constitue une réserve de nutriments et d'énergie.

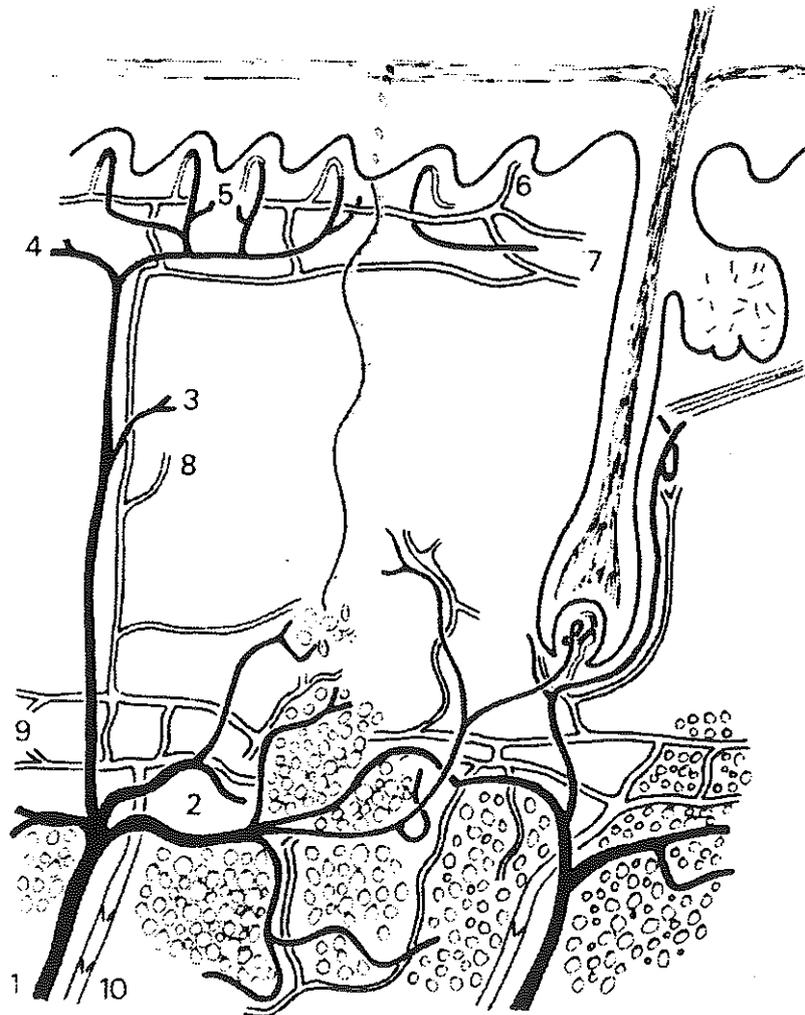
La vascularisation cutanée est assurée par les artères, les veines et les vaisseaux lymphatiques. Les capillaires et un système complexe d'anastomoses unissent les artères et les veines. Seuls le derme et l'hypoderme sont vascularisés (Figure 12).

Les annexes cutanées traversent le derme et l'épiderme. Elles comprennent l'appareil pilo-sébacé (poil et glande sébacée) et les glandes sudoripares : écrines et apocrines.

A.2-L'absorption cutanée :

On a cru pendant longtemps que la peau était imperméable. De nos jours, personne ne conteste plus le fait qu'elle agit comme une membrane semi-perméable, et qu'un certain nombre de substances peuvent la traverser.

Pour être absorbée, une molécule mise au contact de la peau devra atteindre la microcirculation située dans le derme. Il existe donc plusieurs voies possibles de l'absorption percutanée :



- 1: artère sous-cutanée
- 2: plexus artériel dermique profond
- 3: collatérales artérielles
- 4: plexus artériel superficiel
- 5: artériole
- 6: veinule
- 7: plexus veineux superficiels
- 8: collatérales veineuses
- 9: plexus veineux profonds
- 10: veine sous-cutanée

FIGURE 12. La vascularisation cutanée.

D'après Robert et Coll. (1985).

- Couche cornée : elle joue essentiellement un rôle de barrière. Cependant, l'absorption cutanée est possible par diffusion soit entre les cellules, soit à travers les cellules. Cette voie semble même être la voie d'absorption la plus importante. De plus, le stratum corneum par sa structure et sa composition, peut également servir de réservoir pour certaines substances.

- Les annexes cutanées : elles constituent une voie peu importante mais qui semble jouer un rôle significatif lors de la première phase de l'absorption.

- Les couches profondes de l'épiderme : cette zone très perméable, l'est d'autant plus que la peau est altérée ou que la substance est liposoluble.

- Le derme : c'est à ce niveau qu'on trouve un vaste réseau lymphatique et sanguin, et que l'on a passage dans la microcirculation.

La perméabilité cutanée obéit à la loi de Fick sur l'absorption :

$$J = \delta C / \delta t = PDAC_v / h.$$

C/t : vitesse de pénétration souvent représentée par J .

P : coefficient de partage effectif entre la peau et l'excipient.

C_v : concentration de la substance dissoute dans l'excipient.

D : coefficient de diffusion (fonction de la viscosité du produit et du poids moléculaire de la substance).

A : surface d'application du produit.

h : épaisseur de la barrière (stratum corneum).

B-CONSEQUENCES D'UNE EVENTUELLE ABSORTION PERCUTANEE DES CINNAMATES :

Comme nous l'avons décrit précédemment, les cinnamates sont employés en tant que filtre UV dans les produits solaires principalement, mais également dans d'autres préparations cosmétiques. Ils sont donc destinés à être étalés sur la peau afin d'assurer sa protection contre les radiations solaires. Comme tout produit mis au contact de la peau, ces molécules pourront subir une absorption par voie percutanée. En effet, bien que l'objectif de la cosmétologie soit essentiellement d'avoir une action de surface, il ne faut pas oublier que la peau a un rôle d'absorption.

Ce phénomène est d'ailleurs envisagé par les laboratoires de cosmétologie avant la mise sur le marché de leur produits.

Des tests d'eudermie ont été mis au point avec notamment des mesures de l'absorption cutanée et des mesures de la rétention des produits cosmétiques. Les produits solaires subiront tout particulièrement ces deux tests compte tenu de leur fonction protectrice et de leur conditions habituelles d'utilisation : applications répétées sur des aires de peau importantes (AUBIN et LEVEQUE, 1981). Ces mesures permettront de vérifier l'innocuité, au sein de l'organisme, du produit absorbé.

Ceci est complété par un examen toxicologique réalisé avec une attention particulière. Les risques de toxicité générale, après passage de la barrière épidermique, seront envisagés par la détermination de la DL 50 chez deux espèces animales dont l'une n'appartient pas au groupe des rongeurs. La dose létale 50 (DL 50) est la dose nécessaire pour tuer la moitié d'un lot d'animaux

soumis à l'épreuve. On admet généralement que la toxicité chez l'homme se rapproche de celle rencontrée chez l'espèce animale la plus sensible. Une substance est dite toxique si la DL 50 est inférieure ou égale à 50 mg/Kg. On parle d'absence virtuelle de risque aigu si la DL 50 est supérieure ou égale à 5 g/Kg (LACHAPELLE, 1981).

Ainsi, il a été prouvé que le 2-éthyl hexyl p-méthoxy cinnamate, ou Néo héliopan AV, est absorbé par voie percutanée (GALLACHER et Coll., 1984), et que sa DL 50 chez le rat est supérieure à 20 g/Kg à la fois par voie orale et dermique. Alors que celle de l'isoamyl p-méthoxy cinnamate ou Néo héliopan E 1000 est de 10g/Kg per os et de 20g/Kg par voie dermique ; détermination également faite chez le rat.

De nombreux éléments peuvent favoriser une éventuelle absorption percutanée des cinnamates. Tout d'abord, depuis quelques années, de plus en plus de personnes passent leur temps libre au soleil. En effet, le bronzage est devenu un "phénomène de mode" et les activités en plein air sont en pleine expansion. Parallèlement, les dermatologues mettent l'accent sur les dangers d'une protection solaire insuffisante lors d'expositions très fréquentes et très prolongées. Selon EDWARDS Jr et Sr (1990), l'utilisation judicieuse d'un filtre solaire ne prévient pas seulement les effets inconfortables du coup de soleil, mais semble également prévenir le vieillissement cutané précoce et les cancers de la peau. Ceci tend à une augmentation de la consommation des produits solaires : utilisation de façon régulière, sur toutes les parties du corps exposées au soleil. C'est à dire sur une aire

cutanée en général importante. Or, la surface corporelle est un des éléments intervenant dans la loi de Fick.

Les conseils d'utilisation vont également dans le même sens. En effet, la meilleure protection est obtenue lorsque les produits solaires sont appliqués environ une demi-heure à une heure avant l'exposition, ainsi ils peuvent pénétrer dans la peau (SUNSCREENS, 1988). Les applications doivent être renouvelées au cours de la journée et après un bain ou une transpiration intense. Une quantité importante de produit solaire sera donc mise au contact de la peau, ce qui augmente la possibilité d'absorption.

Les cinnamates, mis à part le Parsol hydro, sont des produits liposolubles. Cela veut dire qu'ils présentent une grande affinité pour la peau, assurant ainsi une bonne protection. C'est au niveau du stratum corneum que ces produits seront retenus (Rôle de réservoir) (BISAILLON, 1985). On aura donc un coefficient de partage élevé en raison de leur affinité pour les lipides cutanés (Loi de Fick). De plus, les substances liposolubles traversent très facilement les couches profondes de l'épiderme.

D'autre part, un des effets immédiats du soleil sur la peau est une action calorique grâce aux infra-rouges. Ces rayons pénètrent profondément dans le derme, provoquant ainsi une vasodilatation (CHIVOT et POELMAN, 1982). Or la vasodilatation augmente le passage de substances dans la microcirculation. L'absorption sera également favorisée si les produits sont appliqués sur une peau lésée ou présentant déjà un érythème actinique qui est une manifestation inflammatoire. Or l'inflammation est un facteur en faveur de l'absorption cutanée (BISAILLON, 1985).

Tous ces éléments sont donc en faveur d'une absorption plus ou moins importante des cinnamates. A partir de là, deux actions sont possibles : soit une action locale au niveau de l'épiderme profond, soit une action systémique par passage dans la circulation générale.

. Action locale : de nombreuses études ont montré l'existence d'activités lipoxygénasiques à partir de kératinocytes humains. Ainsi ont été mises en évidence une 12-lipoxygénase et une 15-lipoxygénase (NUGTEREN et KIVITS, 1987). Le rôle physiologique de ces lipoxygénases est encore mal connu, cependant NUGTEREN et KIVITS ont émis l'hypothèse que la 15-lipoxygénase jouerait un rôle dans la régulation de la différenciation des cellules cutanées en une barrière imperméable efficace. Une autre étude met en évidence la ressemblance entre l'activité 15-lipoxygénasique des kératinocytes et des leucocytes (GRABBE et Coll., 1985). Les médiateurs formés, contribueraient à la régulation de l'inflammation et des sensations cutanées (BURALL et Coll., 1988). On pourrait donc penser que les lipoxygénases joueraient un rôle dans la réaction inflammatoire de l'érythème actinique. Cela n'a pas été démontré, on sait seulement qu'on a une libération des enzymes contenues dans les kératinocytes. Cependant, la voie des cyclooxygénases est impliquée par la synthèse de prostaglandines $PGE_{2\alpha}$ et $PGF_{2\alpha}$ (BARAN, 1980). Il est possible d'envisager que les cinnamates absorbés, même en faible quantité, pourrait modifier l'activité lipoxygénasique au sein des kératinocytes en l'inhibant et ainsi atténuer la réaction inflammatoire provoquée par le soleil. Vu sous cet angle, les cinnamates auraient donc non seulement une action protectrice en

évitant le "coup de soleil", mais peut être également une action apaisante en atténuant la réaction inflammatoire dans le cas où la protection n'aurait pas été suffisante.

. Action systémique : au niveau du derme, les cinnamates pourront passer dans la microcirculation cutanée et ainsi gagner la circulation générale. Les esters cinnamiques étant présents en faible concentration (3 à 10 %) dans les produits solaires, l'absorption cutanée ne concernera sûrement qu'une très faible proportion de ces produits. Mais toutes les études démontrent que l'activité lipoxgénasique est sensible à de très faibles concentrations d'effecteurs (10^{-4} M à 10^{-6} M). Une fois au sein de l'organisme, les cinnamates pourront avoir une action au niveau des différentes lipoxgénases contenues dans les plaquettes, les mastocytes, les leucocytes.

Cela signifie que lors d'une administration au long cours de ces molécules, on pourrait avoir une modification du métabolisme des acides gras. Il serait intéressant de tester l'action de ces produits sur l'activité des cyclooxygénases. Ainsi, des molécules telles que l'acide cafféique, l'acide rosmarinique, l'acide cafféoyltartarique et l'acide cafféoylmalique sont des inhibiteurs de la synthèse des leucotriènes et des activateurs de la synthèse des prostaglandines. Par contre, l'acide curcumique est un inhibiteur à la fois de la voie des lipoxgénases et de la voie des cyclooxygénases.

CONCLUSION

Les expériences réalisées dans le cadre de cette étude ont permis de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur de certaines molécules sur l'activité enzymatique de la lipoxygénase de soja.

Ces molécules sont les suivantes : l'acide cinnamique, l'acide 2-hydroxy cinnamique, l'acide 3-hydroxy cinnamique, l'acide 4-hydroxy cinnamique, l'acide ferrulique et l'acide cafféique dont l'activité était déjà connue.

De nombreuses études, et notamment celle réalisée par Sugiura et ses collaborateurs (1989) sur l'acide cafféique et certains de ses dérivés, ont permis de démontrer que les molécules actives sur les lipoxygénases végétales le sont également sur les lipoxygénases animales et humaines.

L'extrapolation de nos résultats au règne animal et plus précisément à l'homme est donc possible.

L'activité inhibitrice de l'acide cinnamique et de ses dérivés testés dans notre étude, nous permet d'envisager sous un nouvel angle l'utilisation des cinnamates en cosmétologie.

En effet, des travaux récents effectués au laboratoire de biochimie (non publiés) permettent de penser que ces molécules, qui sont des esters à longue chaîne aliphatique de l'acide cinnamique, ont un pouvoir inhibiteur (vis à vis des lipoxygénases) supérieur à celui de l'acide lui-même.

Le rôle protecteur des cinnamates dans les produits solaires pourrait donc résulter d'une double action :

- La filtration des UV, propriété déjà connue et pour laquelle ils sont très employés.
- L'atténuation de la réaction inflammatoire de l'érythème actinique consécutive à la baisse d'activité des lipoxygénases cutanées.

Ces constatations ouvrent de nouvelles voies de recherches. Il serait en effet intéressant de :

- Tester l'action de ces molécules sur la voie des cyclooxygénases, dont découle la synthèse des prostaglandines, en particulier $PGE_{2\alpha}$ et $PGF_{2\alpha}$ qui sont les principaux précurseurs de la réaction inflammatoire dans l'érythème solaire.
- D'approfondir les recherches sur le rôle joué par les leucotriènes, produits de la voie des lipoxygénases, dans l'érythème actinique.

Deux objectifs, à court et moyen terme, paraissent essentiels :

- Rechercher de nouvelles molécules ayant un rôle inhibiteur sur l'activité des lipoxygénases.
- Préciser le rôle physiologique exact des lipoxygénases dans l'organisme humain.

Cette meilleure compréhension du rôle de la voie des lipoxygénases serait très utile pour la recherche de molécules activatrices ou inhibitrices dans l'optique d'utilisations thérapeutiques par voie locale ou systémique. La recherche contre le psoriasis est d'ailleurs déjà bien engagée dans cette voie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * AMBLARD P., BEANI J.C. (1986)
Peau et soleil.
Dans "Précis de dermatologie et de vénéréologie", J.H. SAURAT, E. GROSSHANS, P. LAUGIER et J.M. LACHAPELLE eds
Masson, Paris, pp 279-282.
- * ANDRE E., HOU K.W. (1932)
The presence of a lipoid oxidase in soybean, glycine soya.
Lieb. C. R. Acad. Sci. Paris, 194 : 645-647.
- * ANDRIANARISON R.H., BENEYTOUT J.L., TIXIER M. (1989)
An enzymatic conversion of lipoxygenase products by a hydroperoxyde lyase in blue-green algae (Oscillatoria s.p.).
Plant. Physiol., 91 : 1280-1287.
- * ANDRIANARISON R.H., TIXIER M., BENEYTOUT J.L. (1990)
Positional specificity of a lupinus albus lipoxygenase in relation to enzyme concentration and effect of a double dioxygenation product of arachidonic acid.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 172 : 985-992.
- * ANDRIANARISON RIVO-HERY
Métabolisme des acides gras polyinsaturés dans les cellules végétales : rôles catalytiques de la lipoxygénase, de l'hydroperoxyde lyase et de la triène-synthétase.
Limoges, 24 Avril 1991, 194 pages.
Thèse d'université, biochimie métabolique et structurale, Limoges, 1991.
- * AUBIN G., LEVEQUE J.L. (1981)
Expérimentation biologique des produits cosmétiques.
Dans "Précis de cosmétologie dermatologique" M. PRUNIERAS eds
Masson, Paris, pp 123-168.
- * AVDYUSHKO S.A., CHALOVA L.I., OZERETSKOVSKAYA O.L., CHALENKO C.I., IMBS A.B., LATYSKEV S.G., BEZUGLOV U.V., BERGELSON L.D. (1987)
Products of the lipoxygenase oxidation of polyenoic acid induce resistance of potato tubers to phytophthora infestans.
Dokl. Akad. Nauk. (SSSR), 296 : 1012-1014.
- * BARAN R. (Juillet 1980)
Le coup de soleil et son traitement.
Tempo médical, 61 : 93-96.
- * BENEYTOUT J.L., NAJID A., TIXIER M. (1988)
Changes in lipoxygenase activity during seedling development of lupinus albus.
Plant science, 58 : 35-41.

- * BENEYTOU J.L., ANDRIANARISON R.H., RAKOTOARISOA Z., TIXIER M. (1989)
Properties of a lipoxygenase in green algae : Oscillotaria sp.
Plant physiol., 90 : 367-372.
- * BHATTACHERJEE P. (1989)
The role of arachidonate metabolites in ocular inflammation.
Prog. Clin. Biol. Res., 312 : 211-227.
- * BILD G.S., RAMADOSS C.S., KIM S., AXELROD B. (1977)
Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 74 : 949-954.
- * BISAILLON S. (1985)
Absorption cutanée.
Dans "Dermopharmacologie clinique", eds Edisem Maloine S.A.
Paris, pp 39-52.
- * BLACKWELL G.J., CARNUCCIO R., DIROSA M., FLOWER R.J., PARENTE L., PERSICO P. (1980)
Macrocortin : a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids.
Nature, 287 : 147-149.
- * BONIN A.M., ARLAUSKAS A.P., ANGUS D.S., BAKER R.S., GALLAGHER G.U., GREENOAK G., BROWN M.M., MEHER HOMJI K.M., REEVE V. (1982)
UV absorbing and other sun protecting : genotoxicity of 2-ethylhexyl-p-methoxy cinnamate.
Mutat. Res., 105 (5) : 303-308.
- * BORTHAKUR A., RAMADOSS C.S., ROA APPU A.G.G. (1988)
Isolation and structure of lipoxygenase products from Saprolegnia parasitica.
Biochim. Biophys. Acta, 98 : 40-41.
- * BRASH A.R., HAWKINS D.J. (1990)
High performance liquid chromatography for chiral analysis of eicosanoids.
Methods in enzymology, 187 : 187-195.
- * BUNDY G.L., NIDY E.G., EPPS D.E., MIZSAK S.A., WNUK R.J. (1986)
Discovery of an arachidonic acid C-8 lipoxygenase in the gorgonian coral : Pseudoplexaura porosa.
J. Biol. Chem., 261 : 747-751.
- * BURRAL B.A., CHEUNG M., CHIU A., GOETZL E.J. (1988)
Enzymatic properties of the 15-lipoxygenase of human keratinocytes.
J. Invest. Dermatol., 91 (4) : 294-297.
- * CHAN H.W.S. (1973)
Soybean lipoxygenase : an iron-containing dioxygenase.
Biochim. Biophys. Acta, 327 : 32-35.

- * CHEESBROUGH T.M., AXELROD B. (1983)
Determination of the spin state of iron in native and activated soybean lipoxygenase 1 by paramagnetic susceptibility.
Biochemistry, 22 : 3837-3840.
- * CHIVOT M., POELMAN M.C. (1982)
Protection solaire.
La vie médicale, 18 : 1227-1233.
- * CHRISTOPHER J.P., PISTORIUS E., AXELROD B. (1970)
Isolation of an isoenzyme of soybean lipoxygenase.
Biochim. Biophys. Acta, 198 : 12-19.
- * CHRISTOPHER J.P. (1972)
Isolation of third isoenzyme of soybean lipoxygenase.
Biochim. Biophys. Acta, 284 : 54-58.
- * COREY E.J., LANSBURY P.T. (1983)
Stereochemical course of 5 lipoxygenation of arachidonate by rat basophil leukemic cell (RBL-1) and potato enzymes.
J. Am. Chem. Soc., 105 : 4093-4094.
- * COREY E.J., MUNROE J.E. (1982)
Irreversible inhibition of prostaglandin and leucotriene biosynthesis from arachidonic acid by 11,12-dehydro and 5,6-dehydro arachidonic acids respectively.
J. Am. Chem. Soc., 104 : 1752-1756.
- * CZARNETZKI B.M., THIELE T., ROSENBACH T. (1990)
Evidence for leucotriene in animal venoms.
J. Allergy Clin. Immunol. USA, 85 : 505-509.
- * DAYER J.M., SCHORDERET M. (1988)
Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation.
Dans "Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques." M. Schorderet et ses collaborateurs, éditions Slathine, Genève, pp 523-533.
- * DENNIS E.A. (1989)
Cell activation and signal initiation : Receptor and p-lipase control of inositol phosphate, PAF and eicosanoid production, UCLA Symposia on molecular and cellular biology. New Series, edited by E.A. Dennis, A. Hunter and M. Berridge.
New York : Liss, Vol. 106.
- * EDWARDS E.K. Jr and Sr, (1990)
Sunburn and sunscreens : an update and review.
Milit. Med., 155 (8) : 381-383.
- * FINNAZI-AGRO A., AVIGLIANO L., VELDINK G.A., VLIEGENTHART J.F.G., BOLDINGH G. (1973)
The influence of oxygen on the fluorescence of lipoxygenase.
Biochim. Biophys. Acta, 326 : 462-470.

- * FRUTEAU DE LACLOS B., BORGEAT P. (1988)
Conditions for the formation of the 12-oxo derivatives of arachidonic acid from platelet 12-lipoxygenase and soybean 15-lipoxygenase.
Biochim. Biophys. Acta, 998 : 424-433.
- * FURUKAWA M., YOSHIMOTO T., OCHI K., YAMAMOTO S. (1984)
Studies on arachidonate 5-lipoxygenase of rat basophilic leukemia cells.
Biochim. Biophys. Acta, 795 : 458-465.
- * GALLACHER C.H., GREENOAK G.E., VIVIENNE E.REEVE., CANFIELD P.J., BAKER R.S.U., BONIN A.M. (1984)
Ultraviolet carcinogenesis in the hairless mouse skin. Influence of the sunscreen 2-ethyl hexyl-p-methoxycinnamate.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 62 : 577-588.
- * GALLIARD T., PHILLIPS D.R., FROST D.J. (1973)
Novel divinyl ether fatty acids in extracts of Solanum tuberosum.
Chem. Phys. Lipids, 11 : 173-180.
- * GARDNER H.W. (1975)
Isolation of a pure isomer of linoleic acid hydroperoxide.
Lipids, 10 : 248-252.
- * GARDNER H.W., NEWTON J.W. (1987)
Lipid hydroperoxides in the conversion of an aminocyclopropane-1 carboxylic acid to ethylene.
Phytochem., 26 : 621-626.
- * GARDNER H.W. (1988)
Lipoxygenase pathway in cereals.
Adv. Cereal Sci. Technol., 3 : 161-215.
- * GARDNER H.W. (1989)
Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S) hydroperoxides from linoleic acid by a pH dependent mechanism.
Biochim. Biophys. Acta, 1001 : 274-281.
- * GILLARD J.A., FORD HUTCHINSON A.W., CHAN C., CHARLESON S., FOSTER A., FORTIN R., LEGER S., Mac FARLANE C.S., MORTON H., PIECHUTA H., RIENDEAU D., ROUJER C.A., ROKACH J., YOUNG R., Mac INTYRE E., PETERSON L., EIRMAN G., HOPPLE S., HUPE L., MEURER R., OPAS E., PACHOLOK S. (1989)
L 663,536 (MK 886) a novel orally active leukotriene biosynthesis inhibitor.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 67 : 456-464.
- * GRABBE J., ROSENBACH T., CZARNEZKI B.M. (1985)
Production of LTB₄ like chemotactic arachidonate metabolites from human keratinocytes.
J. Invest. Dermatol., 85 (6) : 527-530.
- * HAGAR A., HWANG D.H., DIETZ T.H. (1989)
Lipoxygenase activity in the gills of freshwater mussel.
Biochim. Biophys. Acta, 1005 : 162-169.

- * HAMBERG M., SAMUELSSON B. (1967)
On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase.
J. Biol. Chem., 242 : 5329-5335.
- * HAMBERG M., SAMUELSSON B. (1974)
Prostaglandin endoperoxides, novel transformations of arachidonic acid in human platelets.
Proc. Nat. Acad. Sci., 71 : 3400-3404.
- * HAMBERG M., HAMBERG G. (1980)
On the mechanism of the oxygenation of arachidonic acid by human platelet lipoxygenase .
Biochem. Biophys. Res. Commun., 95 : 1090-1097.
- * HAMBERG M., HERMAN C.A., HERMAN R.P. (1986)
Novel biological transformations of 15-*LS*-hydroperoxy-5,8,11,13-eicosatrienoic acid.
Biochim. Biophys. Acta, 877 : 447-457.
- * HOLMAN R.T., EGWIN P.O., CHRISTIE W.W. (1969)
Substrate specificity of soybean lipoxygenase.
J. Biol. Chem., 244 : 1149-1151.
- * HUANG M.T., THOMAS L., THOMAS F., TANVER F.A., JEFFREY D.L., ALLAN H.C. (1991)
Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermidis.
Cancer research, 51 : 813-819.
- * IMAI S., MAIMI M., FURIHATA K., HAYAKAWA Y., HAWO S. (1990)
Turmeronol A and Turmeronol B, new inhibitors of soybean lipoxygenase.
Agric. Biol. Chem., 54 (9) : 2367-2371.
- * JAKSCHIK B.A., LEE L.H. (1980)
Enzymatic assembly of slow reacting substance.
Nature, 287 : 51-52.
- * JI YI FU, HAEGGSTROM J., COLLINS P., MEIZER J., RADMARK O. (1989)
Leukotriene A₄ hydrolase : analysis of some human tissues by radioimmunoassay.
Biochim. Biophys. Acta, 1006 : 121-126.
- * JEANMOUGUIN M. (1988)
La protection solaire.
Concours médical, 10 (7) : 491-498.
- * KIMURA Y., HIROMICHI O. (1987)
Studies on the activities of tannins and related compounds, X. effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes.
Journal of natural products, 50 (3) : 392-399.

- * KOSHIHARA Y., TOMOHIRO N., SEI-ITSU M., AI-NA-LAO, YASUKO F., TAKASHI T. (1984)
Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotrienes biosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta, 792 : 92-97.
- * KUHN H., HOLSHUTTER H., SCHEWE T., HIEBSCH C., RAPPOPORT S. (1984)
The mechanism of inactivation of lipoxygenases by acetylenic fatty acids.
FEBS Letters, 139 : 577-583.
- * KUHN H., HEYDECK D., WIESNER R., SCHEWE T. (1985)
The positional specificity of wheat lipoxygenase ; the carboxylic group as signal for the recognition of the site of the hydrogen removal.
Biochim. Biophys. Acta, 830 : 25-29.
- * KUHN H., WIESNER R., ALDER R., SCHEWE T. (1989)
Occurrence of free and esterified lipoxygenase products in leaves of Glechoma hederacea L. and other labiatae.
Eur. J. Biochem., 186 : 155-162.
- * KUMLIN M., HAMBERG M., GRANSTROM E., BJORCK T., DAHLEN B., MATSUDA H., ZETTERSTROM O., DAHLEN S.E. (1990)
15 (S) hhydroxyecosatetraenoic acid is the major metabolite in human bronchi : association with airway epithelium.
Arch. Biochem. Biophys. USA, 282 (2) : 254-262.
- * LACHAPELLE J.M. (1981)
Toxicité organique et générale.
Dans "Précis de cosmétologie dermatologique", M. PRUNIERAS, Edition MASSON, Paris, pp 169-188.
- * LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951)
Protein measurements with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193 : 265-267.
- * MACLOUF J., FRUTEAU DE LACLOS B., BORGEAT P. (1982)
Stimulation of leukotrienes biosynthesis in human blood leukocytes by platelet derived 12-hydroperoxyecosatetraenoic acid.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 6042-6047.
- * MAJERUS P.W., BELL R.L., STANFORD N., KENNERLY D.A. (1980)
Diglyceride lipase : a pathway for arachidonate release from human platelets.
In "The regulation of coagulation". K.G. MANN and F.B. TAYLOR Eds Elsevier, North Holland, pp 470-561.
- * MALTBY N.H., TAYLOR G.W., RITTER J.M., MOORE K., FULLER R.W., DOLLERY C.T. (1990)
LTC₄ elimination and metabolism in man.
J. Allergy Clin. Immunol. USA, 85 : 3-9.
- * MANN D.L., MORRISON W.R. (1975)
The effects of ingredients on the oxydation of linoleic acid by lipoxygenase in bread doughs.
J. Sci. Food Agric., 26 : 493-505.

- * MARCUS L., PRUSKY D., JACOBY B. (1988)
Purification and characterization of avocado lipoxygenase.
Phytochem., 27 : 323-327.

- * MILLER D.K., GILLARD J.W., VICKERS P.J., SADOWSKI S.,
LEVEILLE C., MANCINI J.A., CHARLESON P., DIXON R.A.F., FORD-
HUTCHINSON A.W., FORTIN R., GAUTHIER J.Y., RODKEY J., ROSEN
R., ROUZER C., SIGAL I.S., STRADER C.D., EVANS J.F. (1990)
Identification and isolation of a membran protein necessary
for LT production.
Nature Lond., 343 : 278-281.

- * MIRAVE L., GLIME T. (1980)
Soleil et métabolisme phospho-calcique.
Tempo Médical, 61 : 26-28.

- * MULLIEZ E., LEBLANC J.P., RIGAUD M., CHOTTARD J.C. (1987)
5-lipoxygenase from potato tubers. Improved purification and
physiochemical characteristics.
Biochim. Biophys. Acta, 960 : 26-34.

- * MURPHY R.C., HAMMARSTROM S., SAMUELSSON B. (1979)
Leukotriene C : a slow reacting substance from murine
mastocytoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 4275-4279.

- * NAGAI H., SHIMAJAWA T., YAKUO I., AOKI M., KODA A., KASAHARA
M. (1989)
Rôle of peptide LT in liver injury in mice.
Inflammation USA, 13 : 673-680.

- * NAJID A., BENEYTOUT J.L., LEBLANC J.P., TIXIER M., RIGAUD M.
(1988)
Evidence for an arachidonic acid 5-, 8- and 15-lipoxygenase
in Lupinus albus seeds.
Biochim. Biophys. Acta, 960 : 26-34.

- * NEEDLEMAN P. (1978)
Commentary. Experimental criteria for evaluating
prostaglandines biosynthesis and intrinsic function.
Biochem. Pharmacol., 27 : 1515-1516.

- * NICOLAEV V., REDDANA P., WHELAN J., HILDENBRANDT G., REDDY C.
(1990)
Stereochemical nature of the products of linoleic acid
oxidation catalyzed by lipoxygenases from potato and soybean.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 170 : 491-496.

- * NUGTEREN D.H. (1975)
Arachidonate lipoxygenase in blood platelets.
Biochim. Biophys. Acta, 380 : 299-307.

- * NUGTEREN D.H., KIVITS G.A. (1987)
Conversion of linoleic acid and arachidonic acid by skin
epidermal lipoxygenases.
Biochim. Biophys. Acta, 921 : 135-141.

- * OCHI K., YOSHIMOTO T., YAMAMOTO S., TANIGUCHI K., MIYAMOTO T. (1983)
Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphar nuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-phosphate.
J. Biol. Chem., 258 : 5754-5758.
- * PETTITT T.R., ROWLEY A.F., SECOMBES C.J. (1989)
Lipoxins are majors lipoxygenase products of rainbow trout macrophages.
FEBS Letters, 259 : 168-170.
- * POELMAN M.C. (1986)
La photoprotection externe.
Annales dermatologie vénéréologie, 113 : 1259-1270.
- * RADMARK O., SHIMIZU T., JORNVALL H., SAMUELSSON B. (1984)
Leukotriene A₄ hydrolase in human leukocytes : Purification and properties.
J. Biol. Chem., 259 : 12339-12345.
- * RAMADOSS C.S., AXELROD B. (1982)
High performance liquid chromatographic separation of lipoxygenase isoenzymes in crude soybean extracts.
Anal. Biochem., 127 (1) : 25-31.
- * REDDANNA P., WHELAN J., REDDY P.S., REDDY C.C. (1988)
Isolation and charaterization of 5-lipoxygenase from tulip bulbs.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 157 : 1348-1351.
- * REDDANNA P., WHELAN J., MADDIPATI K.R., REDDY C.C. (1990)
Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from potato tubers.
Methods in enzymology, 187 : 268-277.
- * ROBERT P. (1985)
Etude de la peau.
Dans "Dermopharmacologie clinique", édition edissem Maloine, SA Paris, pp 23-38.
- * ROTENBERG S.A., GRANDIZIO A.M., SELZER A.T., CLAPP H.C. (1988)
Inactivation of soybean lipoxygenase-1 by 12-iodo-cis-9-octadecenoic acid.
Biochemistry, 27 : 8813-8818.
- * ROUZER C.A., FORD-HUTCHINSON A.W., MORTON H.E., GILLARD J.W. (1990)
MK 886 a potent and specific LT biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenge leukocytes.
J. Biol. Chem., 265 : 1436-1442.
- * RUSTIN P., DUPONT J., LANCE C. (1983)
A rôle for fatty acids peroxy radicals in the cyanide sensitive pathway of plant mitochondria.
Trends. Biochem. Sci., 8 : 155-157.

- * SAMUELSSON B. (1983)
Leukotrienes : mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.
Science, 220 : 568-575.
- * SAMUELSSON B., DAHLEN S.E., LINDGREN J.A., ROUJER C., SERHAN C.N. (1987)
Leukotrienes and lipoxins : structures, biosynthesis and biological effects.
Science Wash, 237 : 1171-1176.
- * SCHEWE T., RAPOPORT S.M., KUHN H. (1986)
Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase : comparaisn with other lipoxygenases.
Adv. Enzymol., 58 : 191-272.
- * SERHAN N.C., NICOLAOU K.C., WEBBER S.E., VEALA C.A., DAHLEN C.N., PUVSTINEN T.J., SAMUELSSON B. (1986)
Lipoxin A.
J. Biol. Chem., 261 : 16340-16345.
- * SHIMIZU T., RADMARK O., SAMUELSSON B. (1985)
Biosynthesis of LTA₄ from 5-HPETE acid : possible involvement of 8-lipoxygenase reaction.
Adv. Prostaglandin-Tromboxane-Leukotriene-Res., 15 : 177-180.
- * SIGAL E. (1991)
The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism.
The american physiological society. Invited review
- * SOBERMAN R.J. (1990)
Purification and properties of LTC₄ synthetase from guinea pig lung microsomes.
Methods in enzymology, 187 : 335-337.
- * SPAAPEN L.J.M., VERHAGEN J., VELDINK G., VLIEGENTHART J.F.G. (1980)
Properties of a complex of Fe (III)-soybean lipoxygenase-1 and 4-Nitrocatechol.
Biochim. Biophys. Acta, 617 : 132-140.
- * SPECTOR A.A., GORDON J.A., MOORE S.A. (1988)
Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HETEs).
Prog. Lipid. Res., 27 : 271-323.
- * SUGUIRA M., NAITO Y., YAMAURA Y., FUKAYA C., YOKOYAMA K. (1989)
Inhibitory activities and inhibition specificities of caffeic acid derivatives and related compounds toward 5-lipoxygenase.
Chem. Pharm. Bull., 37 (4) : 1039-1043.
- * Sunscreens, (1988)
Med. Lett. Drugs Ther., 30 (768) : 61-63.

- * TAKAHAMA U. (1985)
Irreversible inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis from arachidonic acid by 11,12-dehydro- and 5,6-dehydro arachidonique acids respectively.
Phytochem., 241 : 1443-1446.

- * TAPPEL A.L. (1966)
Lipoxydase.
In : Boyer P.D. et al, eds : the enzymes, 2nd ed., vol 8, New-York, Academic press, pp 275-283.

- * THOMAS P., AMBLARD P. (1988)
Photoprotection.
Dans "Photodermatologie et phototherapie", édition Masson Paris, pp 67-83.

- * THUNE P. (1984)
Contact and photocontact allergy to sunscreens.
Photodermatol., 1 (1) : 5-9.

- * UEDA N., YOKOYAMA C., YAMMAMOTO S., FITZSIMMONS B.J., ROKACH J., OATES J.A., BRASH A.R. (1987)
Lipoxin synthesis by arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 149 : 1063-1069.

- * VANDERHOEK J.Y., BRYANT R.W., BAILEY J.M. (1980a)
15-hydroxy 5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. A potent inhibitor of platelet lipoxygenase.
J. Biol. Chem., 255 : 5996-5998.

- * VANDERHOEK J.Y., BRYANT R.W., BAILEY J.M. (1980b)
Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy 5,8,11,13-eicosatetraenoic acid.
J. Biol. Chem., 255 : 10064-10065.

- * VICK B.A., ZIMMERMAN D.C. (1987)
Oxidative systems for modification of fatty acids : the lipoxygenase pathway.
Dans "Biochemistry of plants" : a comprehensive treatise" Vol 9, P.K. STUMPF Ed. Academic Press, New York ; pp 53-90.

- * VICK B.A., ZIMMERMAN D.C. (1989)
Metabolism of fatty acid hydroperoxydes by Chlorella pyrenoidosa.
Plant. Physiol., 90 : 125-132.

- * WETTE-BERG L., BECK-ERIS J., KJELLMAN B.F., LZUNGREN J.C. (1984)
Circadian rhythms in melatonin and cortisol secretion in depression.
Adv. Biochem. Psychopharmacol., 39 : 197-205.

- * WHELLER E.L., BERRY D.L. (1986)
In vitro inhibition of mouse epidermal cell lipoxygenase by flavonoids : structure-activity relationships.
Carcinogenesis, 7 (1) : 33-36.

- * YAMAMOTO S. (1991)
Lipid peroxidation : reactions of mammalian lipoxygenases.
Free radical biology and medicine.
In "Enzymatic", Vol 10, pp 149-159.

- * YOKOYAMA C., SHINZO F., YOSHIMOTO T., YAMAMOTO S., OATES
J.A., BRASH A.R. (1986)
Arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes
by immunoaffinity chromatography and its reactivity with
hydroperoxyeicosatetraenoic acids.
J. Biol. Chem., 161 : 16714-16721.

- * ZIMMERMAN D.C. (1966)
A new product of linoleic acid oxidation by a flaxseed
enzyme.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 23 : 398-402.

- * ZIMMERMAN D.C., VICK B.A. (1970)
Hydroperoxyde isomerase.
Plant. Physiol., 46 : 445-453.

- * ZIMMERMAN D.C., VICK B.A. (1973)
Lipoxygenase in Chlorella pyrenoidosa.
Lipids, 8 : 264-266.

- * ZIMMERMAN D.C., COUDRON C.A. (1979)
Identification of traumatin, a wound hormone as 12-oxo-trans-
10-dodecenoic acid.
Plant. Physiol., 63 : 536-541.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
PLAN.....	5
INTRODUCTION.....	8
 PREMIERE PARTIE	
LES LIPOXYGENASES VEGETALES ET ANIMALES. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.	11
 I. DEFINITION.....	
	12
 II. PROPRIETES DE LA REACTION LIPOXYGENASIQUE.....	
	12
A-Site d'oxygenation.....	12
B-Stéréospécificité de l'oxygénation.....	13
C-Abstraction stéréospécifique d'un hydrogène.....	14
D-Spécificité du substrat.....	19
E-Cofacteurs des lipoxygénases.....	22
E.1-Fer.....	22
E.2-Calcium.....	22
E.3-ATP.....	23
 III. LES LIPOXYGENASES VEGETALES.....	
	23
A-Dégradation de l'acide linoléique.....	24
B-Dégradation de l'acide linoléique.....	26
C-Dégradation de l'acide arachidonique.....	26

D-Rôle physiologique des lipoxygénases végétales.....	28
IV. LES LIPOXYGENASES ANIMALES.....	29
A-Substrats des lipoxygénases animales.....	29
B-Voie de la cyclooxygénase.....	32
C-Voie des lipoxygénases.....	32
C.1-Voie de la 5-lipoxygénase.....	33
C.2-Voie de la 15-lipoxygénase.....	37
C.3-Voie de la 12-lipoxygénase.....	38
V. INHIBITEURS DES LIPOXYGENASES.....	38
A-Inhibiteurs des lipoxygénases végétales.....	40
A.1-Les agents chélateurs.....	40
A.2-Les antioxydants.....	40
A.3-Les analogues de substrats.....	41
B-Inhibiteurs des lipoxygénases animales.....	41
B.1-Les antioxydants.....	41
B.2-Les analogues de substrats.....	42
B.3-Antagonistes compétitifs des récepteurs aux lipoxygénases.....	42
DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION.....	43
I. MATERIEL.....	44
A-Spectrophotomètre.....	44
B-Oxymètre.....	44

C-Enzyme.....	44
D-Substrat.....	45
E-Tampon.....	45
F-Effecteurs.....	45
II. METHODES.....	45
A-Travaux préliminaires.....	45
B-Conditions opératoires.....	47
C-Méthode spectrophotométrique.....	47
D-Méthode polarographique.....	48
III. RESULTATS.....	48
A-Méthode spectrophotométrique.....	48
B-Méthode polarographique.....	52
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.....	58
I. INTERPRETATION DES RESULTATS.....	59
A-Problèmes rencontrés au cours des manipulations.....	59
A.1-Vitesse initiale et produit final.....	59
A.2-Interaction de l'éthanol.....	60
B-Relation structure-activité.....	60
B.1-Rôle de l'insaturation.....	60
B.2-Rôle des substituants sur le noyau benzénique....	61
B.3-Nombre de substituants.....	62
B.4-Nature des substituants.....	62

B.5-Position des groupements hydroxy sur le noyau benzénique.....	63
C-Comparaison avec d'autres études.....	64
II. EXTRAPOLATION DE NOTRE ETUDE.....	67
III. UTILISATION DES CINNAMATES EN PHARMACIE.....	68
A-Nécessité d'une photoprotection.....	69
B-Les différents moyens de photoprotection.....	73
C-Les cinnamates.....	75
IV. CONSEQUENCES EVENTUELLES DE L'UTILISATION AU LONG COURS DE PRODUITS SOLAIRES CONTENANT DES CINNAMATES.....	78
A-Rappels sur l'absorption cutanée.....	78
A.1-Structure de la peau.....	78
A.2-L'absorption cutanée.....	80
B-Conséquences d'une éventuelle absorption percutanée des cinnamates.....	83
CONCLUSION.....	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	90
TABLE DES MATIERES.....	101

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I	Compositions des isomères de position, géométriques et optiques des H(P)ODEs résultant de l'action sur l'acide linoléique de la lipoxygénase-1 de soja ou de la lipoxygénase de pomme de terre.....15
Tableau II	Analyse structurale des diisomères (E,E) des hydroperoxydes de l'acide linoléique isolés à partir d'un mélange des produits de la réaction de l'acide linoléique avec l'oxygène en présence de la lipoxygénase-1 de soja à différentes valeurs de pH.....17
Tableau III	Pourcentage d'oxydation des acides gras polyinsaturés par la lipoxygénase de soja en présence de calcium.....20
Tableau IV	Spécificité des substrats des lipoxygénases.....21
Tableau V	Activités biologiques majeures des produits de la voie des lipoxygénases et de la voie de la cyclooxygénase.....36
Tableau VI	Molécules dont l'activité sur la lipoxygénase de soja a été testée au cours des manipulations.....46

Tableau VII	Pourcentages d'inhibition de l'activité de la lipoxygénase de soja en présence de différentes concentrations d'effecteurs.....	54
Tableau VIII	Inhibition de la 5-lipoxygénase par l'acide cafféique et ses dérivés.....	66
Tableau IX	Les différents phototypes.....	74
Tableau X	Les esters cinnamiques.....	77

Figure 1	Profil en phase chiral HPLC des HODEs méthyls obtenus à partir des HPODEs résultants de l'action des lipoxygénases de pomme de terre et de soja sur l'acide linoléique.....	16
Figure 2	Analyse structurale des diisomères (Z,E) hydroperoxydes produits de l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase-1 de soja en fonction du pH.....	18
Figure 3	Métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase et des lipoxygénases.....	31
Figure 4	Filiation des leucotriènes.....	34
Figure 5	Résumé de la formation des lipoxines par l'action combinée de la 15-lipoxygénase et de la 5-lipoxygénase.....	39
Figure 6	Détermination graphique des IC 50.....	55
Figure 6'	Détermination graphique des IC 50.....	56
Figure 6''	Détermination graphique des IC 50.....	57
Figure 7	Effets de l'acide cafféique et de ses esters méthylés sur l'activité de la 5-lipoxygénase et de la prostaglandine synthétase.....	65
Figure 8	Spectre des radiations électromagnétiques du soleil.....	70

Figure 9	Transmission de la lumière à travers la peau normale.....	71
Figure 10	Les effets biologiques des radiations solaires sur la peau en fonction du temps et des longueurs d'ondes.....	72
Figure 11	Coupe schématique de la peau.....	79
Figure 12	La vascularisation cutanée.....	81

RESUME

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'activité enzymatique de la lipoxygénase de soja en présence de différentes molécules : l'acide cafféique, l'acide ferrulique, l'acide cinnamique, l'acide deux-hydroxy cinnamique, l'acide trois-hydroxy cinnamique, l'acide quatre-hydroxy cinnamique et l'acide trois, quatre-dihydroxyhydrocinnamique. Mis à part l'acide trois, quatre-dihydroxyhydrocinnamique, toutes ces molécules se sont révélées comme étant plus ou moins inhibitrices.

Nous avons donc pu établir une relation structure-activité entre la structure chimique de l'effecteur et son pouvoir inhibiteur. Ainsi, la double liaison sur la chaîne latérale est indispensable à l'action inhibitrice. La présence et la position des substituants sur le noyau benzénique modifient le pouvoir inhibiteur. Ce dernier augmente lorsque le substituant passe de la position ortho à la position para.

La comparaison avec d'autres études réalisées sur le même thème, a permis de confirmer nos hypothèses sur la relation structure-activité : l'ester de l'acide a un pouvoir inhibiteur encore plus important que l'acide lui même.

Ceci est intéressant, car certains esters cinnamiques sont utilisés en cosmétologie en tant que filtres ultra-violets. On peut donc penser que ces produits pourraient avoir une action au niveau des lipoxygénases cutanées.

Ces cinnamates auraient donc non seulement une action protectrice, mais en plus une action apaisante par diminution de la réaction inflammatoire due à l'érythème actinique.

Mots clés : Cinnamates.
Esters cinnamiques.
Lipoxygénases cutanées.
Photoprotection.